

Mouse In Vitro Fertilization (IVF)

南京爱贝生物科技有限公司提供全套 **EasyCheck®** 小鼠体外受精、胚胎冷冻、胚胎移植试剂与耗材。提供小鼠胚胎玻璃化冷冻、精子冷冻、**IVF**、**ICSI**、输卵管胚胎移植、非手术法子宫胚胎移植等技术培训及视频资料。

www.njabsw.net njabsw@163.com

客服：025-66068668 15850505817

小鼠胚胎生产方法 (IVF、PA、SCNT)

一、 小鼠卵母细胞体外成熟

小鼠 GV 期卵母细胞体外成熟液(Tan Jin-He et al,2008)

| Component | Company | /500mL | /100mL |
|-----------------------|---------|--------|--------|
| TCM-199 | Gibco | 450ml | 90ml |
| FCS(10%) | Gibco | 50ml | 10ml |
| 17 β -estradiol | Sigma | 0.5g | 0.05g |
| Sodium pyruvate | Sigma | 12.1g | 0.242g |
| FSH(0.05IU/ml) | | 25 IU | 5 IU |
| LH (0.05IU/ml) | | 25 IU | 5 IU |
| EGF(10ng/ml) | | 5000ng | 1000ng |

备注：① 体外成熟密度：30 oocytes/100ul maturation medium

二、 小鼠卵母细胞体内成熟及体外受精 (IVF)

1、实验材料

- ① 雌性和雄性小鼠：昆明白，6-8周龄，12光照，温度20-25℃，自由采食和饮水
- ② 耗材与设备：1ml注射器，眼科剪，眼科镊
- ③ 试剂：PMSG/ECG，HCG，体外受精液HTF，KSOM-AA胚胎培养液

2、培养皿准备 (IVF前1天下午准备并在培养箱里平衡过夜)

- ① 鲜精采集皿：1ml HTF (35mm国产)
- ② 卵子采集皿：1ml HTF或HEPES-KSOM (35mm国产)
- ③ 体外受精皿和清洗用培养皿：60mm(进口)皿----上部做受精液滴 (HTF)，

下部做清洗液滴 (HTF)

④ 发育培养皿: 35mm(进口)皿, 培养密度: 10embryo/40ul

3、操作步骤

A. 体内成熟的 MII 期卵母细胞收集准备

6-8 周龄雌鼠腹腔(IP)注射 10IU PMSG (适宜时间: 6-7pm)

↓48h later

腹腔 (IP) 注射 10IU HCG

↓13-18h later

雌鼠颈椎脱臼致死, 75%酒精消毒背部, 从背部剪下两侧卵巢及输卵管迅速置于预热的 HFM

↓

在体视镜下用 1ml 注射器 (1 号针头) 将输卵管刺破, 释放出 COCs

↓

用口吸管将 COCs 置于 100ul 0.1% Hya 消化去除卵丘细胞(体视镜下观察)

↓

MIII 期卵母细胞经 HFM 液滴洗涤 3 次, 移入 HTF 受精液中, 置于 CO₂ 培养箱培养 1h 备用(10embryo/50ul)

B. 采集小鼠精液进行 IVF

MIII 期卵母细胞准备好之后, 颈椎脱臼致死雄鼠

↓

75%酒精消毒背部, 剪开背部取出附睾尾及输精管迅速置于预热的获能液 HTF 中, 剪 5-7 下, 使精子上浮并获能 30min~1h

↓

用移液器取 10~20ul(依精液浓度而定)精液于受精液中共同孵育 6 小时

↓

倒置显微镜下挑选排出 PB2 或有 2PN 的受精卵经 KSOM 培养液洗涤几次, 移入 KSOM 培养液 (平衡 4h 以上) 继续培养。此时计为 0h, 统计受精率

↓

观察, 记录体外受精和发育情况

三、小鼠体内受精原核期胚胎获取(In Vivo)

6-8周龄雌鼠腹腔 (IP) 注射10IU PMSG (适宜时间: 6-7pm)

↓48h later

腹腔注射 10IU HCG,立即与雄鼠按 1: 1 比例合笼交配

↓

次日早晨检查雌鼠是否有阴道栓, 有阴栓者表明已成功交配

↓22h post-HCG

将有阴栓的雌鼠颈椎脱臼致死, 75%酒精消毒背部, 从背部剪下两侧卵巢及输卵管迅速置于预热的 HFM 液中

↓

在体视镜下用 1ml 注射器 (1 号针头) 将输卵管刺破, zygote 释放出来

↓

用口吸管（移卵管）将 zygote 置于 50ul 0.1% Hya 消化去除卵丘细胞，再经 HFM 液滴洗涤 3 次

↓

在体视显微镜下观察 zygote 形态，挑选有 PB2 或 2PN 的形态正常受精卵置于 KSOM 培养液，先在平衡（平衡至少 4h 以上，最好是 1 天的平衡时间）过的培养液滴中洗涤几次然后再开始体外培养。微滴培养法：10 个 embryo/20ul medium (Lane 和 Gardner,1992)

↓

观察、记录体外发育情况 (2-cell,4-cell,8-cell,morula和blastocyst)

四、 小鼠卵母细胞孤雌激活(PA) 参考(Tan Jin-He et al,2008)

方案一：

6-8 周龄雌鼠腹腔 (IP) 注射 10IU PMSG (适宜时间：6-7pm)

↓48h later

腹腔 (IP) 注射 10IU HCG

↓18h

雌鼠颈椎脱臼致死，75%酒精消毒背部，从背部剪下两侧卵巢及输卵管迅速置于预热的 CZB-H

↓

在体视镜下用 1ml 注射器 (1 号针头) 将输卵管刺破，释放出 COCs

↓

用移卵针将 COCs 置于 50ul 0.1% Hya 消化去除卵丘细胞

↓

将 MII 期卵母细胞移入 Ca^{2+} -free CZB 中洗涤几次

↓

MIII 期卵母细胞在激活液 [Ca^{2+} -free CZB+ SrCL₂(10 m M/L)+CB(5μg/ml)] 中激活 2.5h

↓

倒置显微镜观察卵母细胞是否激活，1PN 或 2PN 表明成功激活

↓

激活后的卵母细胞在平衡过的 KSOM 或 CZB 培养液中洗涤 3 次，转移至 KSOM 或 CZB 液滴
开始 IVC

↓

观察，记录胚胎体外发育情况

方案二：

6-8 周龄雌鼠腹腔 (IP) 注射 10IU PMSG (适宜时间：6-7pm)

↓48h later

腹腔 (IP) 注射 10IU HCG

↓13h

雌鼠颈椎脱臼致死，75%酒精消毒背部，从背部剪下两侧卵巢及输卵管迅速置于预热的 CZB-H

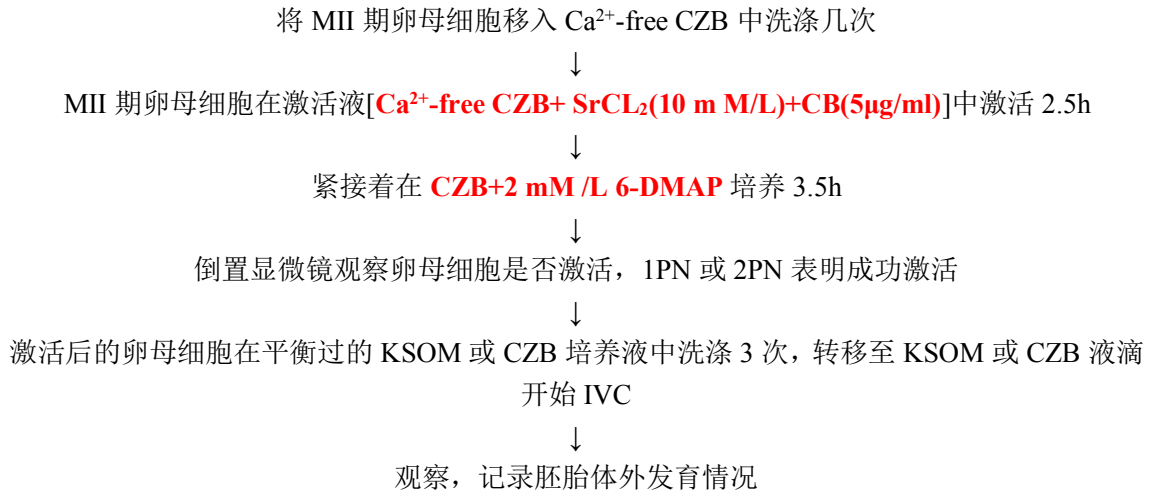
↓

在体视镜下用 1ml 注射器 (1 号针头) 将输卵管刺破，释放出 COCs

↓

用移卵针将 COCs 置于 50ul 0.1% Hya 消化去除卵丘细胞

↓



五、小鼠体细胞核移植(克隆)

1、化学去核（化学诱导和化学辅助去核）

◆ 小鼠超数排卵及 GV 期卵母细胞体外成熟 (IVM)

ICR 雌鼠（6-8 周龄）腹腔（IP）注射 10IU PMSG（时间：8:00am）

↓46-48h later

颈椎脱臼致死小鼠，取双侧卵巢于 H-CZB 中，30G 注射器刺破大的有腔卵泡

↓

收集 COCs/NO 并在 H-CZB 液滴中洗涤几遍，移入 IVM 皿（平衡 4h 以上）培养 5h，培养密度：10-20 个/50 μl

◆ 卵母细胞去核和透明带消化

体外成熟 5h 后，机械吹吸 COCs 去除卵丘细胞（没有用 Hya 消化去除卵丘细胞）

↓

挑选 GVBD 卵母细胞（体视镜能观察到 GVBD 吗？）移入 DC(0.4 $\mu\text{g/ml}$)+KSOM 培养 2h

↓

移入 DC(0.4 $\mu\text{g/ml}$)+CHX(50 $\mu\text{g/ml}$)+KSOM 培养 12h（时间太长，尝试把时间缩短为 3h）

↓

将排出 PB1 的卵母细胞移入 Pronase(5mg/ml) 消化约 2min 去除透明带

↓

在 KSOM 液滴中洗涤 3 遍，移入 KSOM 液滴，37 $^{\circ}\text{C}$ ，5% CO_2 培养(15h)待用

◆ 粘合和融合

去核卵母细胞在 KSOM 中培养 15h 后（尝试把时间缩短为 0~5h）

↓

卵胞质移入 PHA (10 $\mu\text{g/ml}$) + H-CZB 粘合液滴中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，2min

↓

移入 H-CZB 体细胞(卵丘细胞)液滴中，拨动卵胞质使其与体细胞粘贴，形成卵母细胞-体细胞复合体

↓
卵母细胞-体细胞复合体移入融合液（无 Ca）中平衡 2min, 立即转入电击槽电极间
↓
交流电 5v/mm, 3μs 对复合体进行排队（10 个/批），接触面平行于两电极间
施加直流电脉冲（92V/mm, 70us, 2 次），静置 1min
↓
复合体在 KSOM 液滴中洗涤 2 遍，快速移入 KSOM 液中培养 20~30min 后检查融合情况
↓
将成功融合的复合体移入 Ca²⁺-free CZB+ CB(5μg/ml)中培养 3h(防止电刺激后排出 PB2 极体,
促进体细胞的重编程)

◆ 化学激活

将融合后培养 3h 的复合体移入激活液 [Ca²⁺-free CZB+ SrCL₂(10 m M/L)+CB(5μg/ml)]培养 6h

◆ 无透明带重构胚体外培养

激活后的重构胚在 KSOM 液滴中洗涤 2 遍后，移入 WOW 体系培养
(10 个 microwells/well, embryo density: 10 个/500μl)

2、手工去核

◆ 小鼠超数排卵及 MII 期卵母细胞收集

ICR 雌鼠（6-8 周龄）腹腔（IP）注射 10IU PMSG（时间：5:00pm）

↓46-48h later

腹腔（IP）注射 10IU HCG

↓16-18h later

颈椎脱臼致死小鼠，取双侧卵巢于 H-CZB 中，在体视镜下用 1ml 注射器（1 号针头）将输卵管膨大部刺破，COCs 团块和 NO(自然裸卵)释放出来

↓

将 COCs 移入 0.1%透明质酸酶静置 2min, 去除卵丘细胞, 收集卵母细胞和卵丘细胞并在 H-CZB 液滴中洗涤几遍后，移入 H-CZB 待用

◆ 卵母细胞透明带部分消化和手工去核

挑选排出 PB1 的卵母细胞置于 H-CZB 液滴中

↓

将排出 PB1 的卵母细胞移入 Pronase(5mg/ml) 消化部分透明带（要保证消化后极体还存在），注意控制消化时间（20 个/次）

↓

快速将透明带部分消化的卵母细胞移入体外操作液 CB(5μg/ml)+ H-CZB 液滴中，用胚胎分割刀沿 PB1 方向将卵母细胞 1/3 切除，卵胞质移入 H-CZB 液滴待用

↓

将切割后的卵胞质移入 Hoechst33342/33258(5μg/ml)染色 5-10min, 在 UV 光下观察记录去核率（可以省略）

◆ 粘合和融合

手工去核卵胞质移入 PHA (10μg/ml) + H-CZB 粘合液滴中，37°C，2min

↓

移入 **H-CZB** 体细胞(卵丘细胞)液滴中，拨动卵胞质使其与体细胞粘贴，形成卵母细胞-体细胞
复合体，再将复合体转入 **H-CZB** 液滴中，等待融合

↓

卵母细胞-体细胞复合体和另一半卵胞质移入融合液 (**无 Ca**) 中平衡 **2min** (10 个/批)

↓

迅速将复合体和另一半卵胞质移置融合槽的北面和南面，交流电 **5v/mm, 3 μ s** 对复合体进行排队 (10 个/批)，接触面平行于两电极间，同时将另一半胞质与复合体粘贴构成“三明治”形状
(当心拔掉体细胞)，最后，施加直流电脉冲 (**92V/mm, 70 μ s, 2 次**)，静置 **1min**

↓

将复合体快速移入 **KSOM** 液滴中洗涤几遍，并培养 **1-3h**(**促进体细胞核重编程**),检查融合情况

◆ 化学激活

将培养 1-3h 成功融合的重构胚移入激活液 [**Ca²⁺-free CZB+ SrCL₂(10 m
M/L)+CB(5 μ g/ml)**]培养 **6h** (开始记录培养日期)