

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

[IVF protocol

一、实验试剂

1. MEM+BSA+10%FBS：自己配置。10%为体积分数，如将 1.5ml FBS 成品加入 13.5ml 的 MEM+BSA。

2. 矿物油：sigma (M8410-100ML)。

3. 胚胎培养液 KSOM：millipore (MR-020P-F)

4. 透明质酸酶 (Hyaluronidase)：sigma (H4272)，30mg 干粉 (0℃以下储存) 加入 3ml M2 溶液，配制成 10mg/ml 的高浓度储存液 (10X)，取出 100ul 的 10X 储存液加入 900ul M2 培养液即为 1mg/ml 的工作液，分装成 100ul/管，使用时每只母鼠 50ul，液体全部-20℃保存。

培养条件：37℃，5%CO₂，5%O₂，90%N₂

二、实验步骤

1. 第一天：晚 9 点供卵雌鼠注射 PMSG，3W 小鼠 5UI/只，2M 以上小鼠 10UI/只。已提前配制好***UI/ml 的 PMSG 和 hCG。

2. 第三天：46-48h 后约晚 7 点注射 hCG，3W 小鼠 5UI/只，2M 以上小鼠 10UI/只。

3. 第四天：在注射 hCG 后 14-16h 进行受精，最好不超过 15h，约第四日早 9 点-11

点杀鼠取卵。

如果不需要消化卵丘细胞，可不加 FBS。FBS 是用来保护透明带，防止其硬化

!!! 1cell 清洗皿要做俩个滴

分类	容量	试剂	是否覆油	
附睾采集皿	2.5ml	MEM+BSA		
精子获能皿	900ul	MEM+BSA	覆油	受精前 1h
卵子采集皿	2.5ml	MEM+BSA+10%FBS		
卵子清洗皿	2.5ml	MEM+BSA+10%FBS		
受精皿	490ul	MEM+BSA	覆油	
1cell 清洗皿	200ul	MEM+BSA	覆油	受精后 4-6h
发育培养皿	50ul	KSOM	覆油	受精后 1D， 提前过夜覆 盖矿物油平 衡

注意：除 KSOM 培养皿外，均在操作前提前 30m-1h 预平衡。因覆盖石蜡油后预平衡易产生气泡，可先预热试剂再覆油。

4.准备获能精子：因精子需提前获能一小时，需要提前一个多小时杀 F1 公鼠。在注射 hCG 后 12-13h 处死雄鼠，迅速分离输精管和附睾尾，尽可能取出脂肪和血管，用镊子和 30 号针头切附睾尾 6-7 下，放入精子获能皿，置于 37℃ 温育 1h。

5.准备卵细胞：提前 30m 准备卵子采集皿、卵子操作皿，剪取卵巢、输卵管和小部分子宫，镜下用注射针头切出 2 个输卵管，挑入 50ul (1mg/ml) 的透明质酸酶滴，用针头切开壶腹部，挤出排出的卵丘细胞团，在酶滴中消化 1-2min，直至卵丘细胞完全脱落，然后用口吸管将卵转入卵子清洗皿中洗去透明质酸酶和杂质。记录卵的时期及个数，见表 1。

6.受精：将事先准备好的 490ul 受精滴加入 10ul 精子，并将含第二极体的卵转入受精滴，立即放入培养箱，开始计时。

7.清洗 1cell：4-6h 观察并记录原核数量，/将所有卵或受精卵转移至新的 1cell 清洗皿 (200ul)，石蜡油覆盖。

