

# 不同日龄和品系小鼠超排卵、体外受精及受孕率的比较研究

徐平

(中国科学院上海实验动物中心, 上海 200233)

**【摘要】** 用 PMSG 和 HCG 分别对不同日龄(28 日龄、56 日龄和 112 日龄)的 ICR、B6C3F1 和 C57BL/6J 三个品系小鼠进行超排处理, 并分别进行 IVF(体外受精)及体外培养后将 2-细胞期的胚胎移植至假孕受体的输卵管中, 以此比较不同日龄和品系小鼠的超排、体外受精率和受孕率。结果显示, 三个品系的 28 日龄小鼠的排卵数均高于 56 日龄和 112 日龄的排卵数 ( $P < 0.01$ ), 但品系和年龄并不影响卵母细胞在体外受精后形成 2-细胞胚胎的受精率(平均约为 91%的受精率), 以及这些正常的胚胎在移植至受体后的受孕率(约 51%左右)。

**【关键词】** 小鼠; 超排卵; 受精, 体外; 胚胎移植

中图分类号: Q95-33 文献标识码: A 文章编号: 1002-1485(2001)02-0078-04

## The Comparative Study on Ova Superovulation, Rate of *In Vitro* Fertilization and Pregnancy of Different Strains at Different Ages

XU Ping

(Shanghai Laboratory Animals Center, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233, China)

**【Abstract】** Three strains of mice (ICR, B6C3F1 and C57BL/6J) of 28, 56 and 112 days old were in superovulation with PMSG and HCG. The techniques of *in vitro* fertilization, culture, and transplantation of two-cell embryos to pseudopregnant recipients were used. The highest numbers of oocytes were obtained from 28-days old superovulated mice in the three strains, being prominent discrepancy with 56-days and 112-days old mice ( $P < 0.01$ ). There was no difference of the insemination rate among three strains ( $P > 0.05$ ). Approximately 91% of ova developed to the two-cell stage after *in vitro* fertilization, and about 51% of these living two-cell embryos from the three different strains developed into foetus through transplantation in recipients, with no discrepancy in rate of pregnancy ( $P > 0.05$ ).

**【Key words】** Mice; Superovulation; *In vitro* fertilization; Embryos transplant

小鼠是现代生物医学中应用最为广泛的实验动物, 特别是随着基因工程动物的大量开发, 对小鼠卵

母细胞和小鼠胚胎的需求量正日趋增多。但是依靠动物的自然排卵, 所得到的卵母细胞数较少, 同时又消耗大量的时间和浪费较多的动物。因此我们通过体外受精、体外培养后将 2-细胞胚胎移植至受体等技术对不同品系的小鼠, 在不同的日龄期进行超数排卵效果、体外受精率(*in vitro fertilization*)及 2

基金项目: 国家科技部“九五”攻关课题(96-A23-06-05)

作者简介: 徐平, 男, (1964-) 副研究员, 研究方向: 实验动物

低温生物学和实验动物遗传性疾病

一细胞胚胎移植后的怀孕率等进行了比较研究。

## 1 材料与方 法

1.1 动物来源及分组 雌性未交配过的 SPF (无特殊病原体) 级三个小鼠品系: ICR 远交群小鼠, B6C3F1 杂交一代小鼠和 C<sub>57</sub>BL/6J 近交系小鼠。动物来自日本 SLC 公司, 分别在 28 日龄、56 日龄和 112 日龄进行超排和收集卵母细胞。三个品系小鼠的雄性小鼠在 90 日龄左右时进行精子的收集。另外胚胎移植受体使用 CD-1 小鼠 (来自于 Charles River 日本公司, SPF/VAF 级)。

1.2 动物饲养和实验条件 动物饲养在万级单向层流饲养架中, 室内温度控制在 (23±1)℃, 湿度维持在 (55±5)%; 使用日本 CLEA 公司生产的  $\gamma$  线辐照灭菌饲料, 自由采食, 自动饮水, 室内照明采用 14·10 h 明暗交替。

1.3 仪器与试剂 35 mm 培养器皿 (NUNC 生产), 20, 100, 200, 500, 1000  $\mu$ l 移液器 (GILSON 生产), 冷冻管 (NUNC 生产), 实体显微镜 (NIKON, SMZ-10), 解剖针、手术用器械 (森田制作), 嘴吸式移液器 (SIGMA), CO<sub>2</sub> 培养箱 (ESPEC), 液氮罐, 恒温操作台 (森田制作), HIF 培养基 (日本熊本大学 CARD 配制), 石蜡油 (SIGMA) 等。

### 1.4 超排与卵母细胞的生产

1.4.1 激素投入 取三个品系各日龄段小鼠各 10 只, 在下午 4~5 时每只小鼠腹腔注射 5 IU 的孕马血清促性腺激素 (PMSG, 帝国制药), 48 h 后再注射 5 IU 的人绒毛膜促性腺激素 (HCG, 帝国制药), 对小鼠进行超数排卵。小鼠在注射 HCG 后 15 h 收集卵母细胞。

1.4.2 培养基准备 用 PB1 基础培养液预先配制好 HIF 培养基 (日本熊本大学 CARD 配制), 于采卵前一天在直径 3.5 mm 的培养皿中做好二个培养基液滴 (100, 200  $\mu$ l), 用矿物油或石蜡油 (SIGMA 公司生产) 覆盖, 放入 37℃ 的 CO<sub>2</sub> (含 5% CO<sub>2</sub>) 培养箱中培养 12 h。

1.4.3 卵母细胞的取出 颈椎脱臼的方法处死小鼠, 剖腹取出连带输卵管和卵巢的子宫, 然后剪下输卵管放入矿物油中, 在输卵管的膨大部用解剖针稍稍刺破, 将卵母细胞团引出, 并导入到 200  $\mu$ l 的 HIF 培养基液滴中。

### 1.5 精子采集与体外授精

1.5.1 培养基准备 用预先配制好的 HIF 培养基, 在 35 mm 的培养皿中滴入 200  $\mu$ l 的液滴, 用石蜡油或矿物油覆盖, 在采精前放入 37℃ 的 CO<sub>2</sub> (含 5% CO<sub>2</sub>) 培养箱中培养 12 h。

1.5.2 精子采集 取三种品系的雄性小鼠 (年龄在 90 日龄左右) 各一只, 按 Nakagata<sup>[1~3]</sup> 的方法, 颈椎脱臼处死后, 连同附睾一起取出睾丸, 剪下附睾的上体部, 用解剖针刺破后挤出精子, 再用解剖针挑取精子放入 HIF 培养基中, 在体外授精前放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 1 h。

1.5.3 体外授精 (IVF) 将培养 1 h 的精子悬浮液在显微镜下检查精子活力和精子数量, 然后用移液器按每个培养基液滴 10  $\mu$ l (约含精子 200 个/ $\mu$ l) 移入卵母细胞 (50~100 个), 放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。注意: 体外授精时, 操作台的温度保持在 35~37℃ 左右。

### 1.6 2-细胞胚胎的鉴定与受体输卵管内移植

1.6.1 受精卵的清洗 在体外受精 (IVF) 后 5~7 h, 将培养皿从 CO<sub>2</sub> 培养箱中取出, 用嘴吸式移液器将受精卵移入到新的 HIF 培养基液滴中, 清洗两次后再放回 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。

1.6.2 2-细胞胚胎的鉴定 将经 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后的受精卵放在实体显微镜下做镜检, 剔除异常卵及未受精卵, 将正常发育的 2-细胞受精卵作移植准备。

1.6.3 受体母鼠的准备 取 100 日龄左右的 CD-1 雌性小鼠, 在移植前一天的下午 3~5 时与和输精管结扎的雄性小鼠交配后形成假孕, 以次日早上观察到阴道栓为假孕 0.5 d 的小鼠, 用作受精卵的移植。

1.6.4 胚胎在受体输卵管中的移植 受体小鼠用戊巴比妥麻醉, 在腰椎两侧腹部各切开一 2~3 mm 的小口, 用钟表镊子取出卵巢和输卵管, 调整位置后用鼻科夹固定, 在输卵管的喇叭口与壶腹部之间用鼻科剪剪一小口, 再将吸入 2-细胞胚胎的嘴吸式移液器 (移植针直径为 2-细胞胚胎直径的 1.5 倍左右) 朝壶腹部方向插入输卵管中, 将胚胎吹入。另侧的操作相同 (两侧各移植 7~8 个左右的受精卵), 多余胚胎进行冷冻保存。在 12~14 d 时, 解剖受体小鼠, 检查受孕率。

## 2 结果

### 2.1 不同品系及年龄对超排效果的影响

3 个不同品系小鼠在 3 个不同日龄时期经超排后的卵母细胞的生产数见表 1。从表中可以看出, 三个不同的品系, 在 28 日龄时所收集到的卵母细胞数比 56 日龄和 112 日龄的多( $P < 0.01$ )。尤其是 28

日龄的 C<sub>57</sub>BL/6N 和 B6C3F1 小鼠比 112 日龄的多近 1 倍左右。这些结果与 Gates<sup>[4]</sup>, Songsasen<sup>[5]</sup> 和 Sugiyama<sup>[6]</sup> 等所报告的相符。56 日龄的 C<sub>57</sub>BL/6N 小鼠的超排量是 112 日龄小鼠超排量的近一半, 是 28 日龄小鼠超排量的三分之一不到, 此日龄段的超排卵数几乎与自然排卵数相近<sup>[7]</sup>。日龄较严重地影响了小鼠的超排效果( $P < 0.01$ )。

表 1 不同品系小鼠不同日龄期超排后所得的卵母细胞数

Tab. 1 Number of ova superovulated in different strains of mice at different ages

品系 Strain	自然排卵数 Ovulation	28 日龄超排数 Superovulation of 28 days old	56 日龄超排数 Superovulation of 56 days old	112 日龄超排数 Superovulation of 112 days old
ICR	14.8	45.5 ± 8.2 (n=10)	31.6 ± 7.4 (n=10)	33.3 ± 5.3 (n=10)
B6C3F1	12.4	56.2 ± 5.7 (n=10)	22.9 ± 12.1 (n=10)	29.6 ± 10.2 (n=10)
C <sub>57</sub> BL/6J	9.1	42.3 ± 10.1 (n=10)	12.8 ± 6.4 (n=10)	22.9 ± 9.3 (n=10)

### 2.2 不同品系及年龄与体外受精的关系

采用 IVF 技术可以很好地使卵母细胞在体外受精。表 2 显示三个品系小鼠, 其卵子分别在体外受精后并发育成 2-细胞期胚胎有较高的百分率(83%~95%), 其中 ICR 小鼠三个日龄段小鼠卵子的体外授精率分别为 91.2%, 92.8% 和 90.9%; B6C3F1 小鼠分别为 93.9%, 95.0% 和 95.4%; C<sub>57</sub>BL/6J 小鼠分别为 84.8%, 86.1% 和 83.2%。尽管日

龄严重影响了小鼠的超排效果, 但表 2 的数据经方差分析得出, 小鼠的卵母细胞的体外受精率除了品系之间有差异外, 同一品系不同日龄的卵母细胞的体外受精率差异没有显著性( $P > 0.05$ ); 另外, 本研究表明, 4 月龄以下小鼠的退化卵或异常卵差异没有显著性( $P > 0.05$ )。

### 2.3 不同品系日龄 IVF 受精卵对移植后受孕率的影响

表 2 不同品系小鼠各年龄段卵子的体外受精率

Tab. 2 Oocytes developed to 2-cell stage by *in vitro* fertilization

品系 Strain	28 日龄 28 day old		56 日龄 56 day old		112 日龄 112 day old	
	异常卵 abnormal ova	受精率 rate of fertilization	异常卵 abnormal ova	受精率 rate of fertilization	异常卵 abnormal ova	受精率 rate of fertilization
ICR	4.8% (22/455)	91.2% (395/433)	4.1% (13/316)	92.8% (279/303)	4.9% (16/333)	90.9% (288/317)
B6C3F1	4.1% (23/562)	93.9% (506/539)	3.5% (8/229)	95.0% (211/222)	4.7% (14/296)	95.4% (269/282)
C <sub>57</sub> BL/6J	5.4% (23/423)	84.8% (339/400)	4.7% (6/128)	86.1% (105/122)	3.9% (9/229)	83.2% (183/220)

将不同品系、不同日龄小鼠的 2-细胞受精卵移植到假孕的 CD-1 小鼠的输卵管中, 结果显示, 品系与年龄对 2-细胞期胚胎的受孕率没有影响( $P > 0.05$ )。三个品系小鼠的 2-细胞胚胎移植后, 约有 51% 的受孕率(45%~57%)(表 3)。

IVF 的受精率和移植后的受孕率, 作者认为: 通过超排处理后, 从 28 日龄小鼠可以得到比 56 日龄和 112 日龄更多的卵母细胞, 而且可以成功地进行体外受精并经移植后受孕。这种差异的原因是因为性成熟后的小鼠固有的性周期和性激素对超排激素(HCG、PMSG)的影响所至, 与朱士恩<sup>[8]</sup>、Yokoyama<sup>[9]</sup> 等报告的结果相同。因此对性成熟前后的小鼠进行超排是为生产转基因小鼠提供大量胚胎的较经济、有效的

## 3 讨论

通过比较不同品系、不同日龄小鼠的超排效果、

方法。

表 3 不同品系各年龄段的 2-细胞胚胎移植后的受孕率

Tab.3 Rate of pregnancy after transplantation of 2-cell embryos

品系	取卵小鼠日龄	受体数	移植胚胎数	12~14 d 受孕胎仔数(%)
Strain	Age of donor mice (days)	No. of recipients	No. of embryos transplanted	No. of foetus at 12-14days
ICR	28	5	78	40(51.3%)
	56	5	81	45(55.6%)
	112	5	74	39(52.7%)
B6C3F1	28	5	84	41(48.8%)
	56	5	86	49(56.9%)
	112	5	79	41(51.9%)
C57BL/6J	28	5	73	36(49.3%)
	56	5	85	45(52.9%)
	112	5	76	34(44.7%)

据 Onadera 和 Ishijima<sup>[10]</sup> 的研究,小鼠日龄和卵母细胞的发育有关,从 10~12 月龄小鼠所得到的退化卵比从 2~9 月龄小鼠所采集到的卵要高得多。另外,据 Minato 和 Toyoda<sup>[11]</sup> 的报告,从 17~21 日龄的小鼠所取得的卵母细胞,受精后会发育成不正常的胚胎细胞,这些胚胎或带有庞大头部精子,或没有精子头,或仅仅只有前核细胞。这种受精卵的异常率相对成年小鼠而言要高得多。在本研究中,作者未对幼年龄(4 周龄以下)和大年龄(6 月龄以上)小鼠的超排效果进行比较研究,所以尚未有此方面的卵母细胞发育的报告,有待进一步探讨。

参 考 文 献

1 中瀧直己,超急速冻结法を用いた体外受精由来マウス 2 细胞期胚の冻结保存について. 日本不妊学会杂志, 1989, 34: 470-474

2 Nakagata N. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by *in vitro* fertilization between cryopreserved gametes. J Reprod Fert, 1993, 99:77-80

3 中瀧直己. マウス胚および配合子の冻结保存. 实验动物, 1994,

43:11-18

4 Gates AH. Maximizing yield and developmental uniformity of eggs. Methods in mammalian embryology. W. H. Freeman, San Francisco, CA. 1976, 64-76

5 Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from strains of mice. Cryobiology, 1997, 35:225-269

6 Sugiyama F, Kajiwara N, Hayashi S, et al. Development of Mouse Oocytes Superovulated at Different Ages. Laboratory Animal Science, 1992, 42(3):297-298

7 Hogan B, Constantini F, Lacy E. Manipulating the mouse embryo. Second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994

8 朱士恩,曾申明,田见辉,等. 不同群系小鼠胚胎玻璃化冷冻保存技术的研究. 生物技术通讯, 1999, 10:183-186

9 Yokuyama M. Freeze preservation of mouse embryos; with reference to strain differences. J Mamm Ova Res, 1989, 6:19

10 Onadera M, Ishijima Y. Effect of Maternal Age on Viability of Ova in Mice. J Fert Ster, 1987, 32:114-117

11 Minto Y, Toyoda M. Immature Tubal Ova in PMSG Treated or PMSG-HCG Treated Prepubertal Mice and Fertilization of These Ova by Epididymal Spermatozoa *in vitro*. J. Animal Reprod, 1980, 26:81-89

(收稿日期:2001-01-02)