

## 周龄·初始注射时间对小鼠超数排卵的影响

巩雪洁, 臧敦安, 许文豪 (中南民族大学生命科学院医学生物研究所, 湖北武汉 430074)

**摘要** [目的]探讨不同周龄、不同初始注射时间对小鼠超数排卵效果的影响。[方法]用 10 IU PMSG + 10 IU HCG 间隔 48 h 处理 C57BL/6J 小鼠, 收集并统计合子数。[结果]4 周龄超排效果优于 8 周龄, 可达 26.86 枚/只; 4 周龄 C57BL/6J 小鼠 PMSG 和 HCG 注射时间为 12:00—13:00, 超排后收集合子数可达 30 枚/只以上, 而且体外培养的发育状况良好。[结论]4 周龄 C57BL/6J 小鼠适宜超数排卵; PMSG 和 HCG 注射时间为 12:00—13:00, 超排效果相对理想。

**关键词** 小鼠; 超排卵; 激素; 周龄; 初始注射时间

**中图分类号** S865.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)15-0072-03

## The Influence of Week-age and Initial Injection Time on Superovulation in Mice

GONG Xue-jie, ZANG Dun-an, XU Wen-hao (Institute of Medical Biology, School of Life Sciences, Central South University of Nationalities, Wuhan, Hubei 430074)

**Abstract** [Objective] To discuss the influence of week-age and initial injection time on superovulation in mice. [Method] The C57BL/6J mice were treated with 10 IU PMSG + 10 IU HCG interval 48h, and the number of zygotes was collected and counted. [Result] The effect of the four week age superovulation was better than that of eight weeks, and it could reach 26.86. The time of PMSG and HCG injection of C57BL/6J mice at 4 weeks old was 12-13 at noon, and the number of zygotes collected was up to 30 and *in vitro* culture of the fertilized ovum was in good condition. [Conclusion] The 4-week old C57BL/6J mice are suitable for superovulation. When the injection time of PMSG and HCG is 12-13 at noon, the superovulation effect is relatively ideal.

**Key words** Mouse; Superovulation; Hormone; Week-age; Initial injection time

以各种外源促性腺激素诱发动物的许多卵泡发育并排出具有受精能力的卵子的过程称为超数排卵(Superovulation), 简称“超排”。1927年 Smith 和 Engle 首先在小鼠上发现了超排现象, 随后 Cole 和 Hart 发现孕马血清(PMSG)可使未成熟的大鼠超排, 奠定了超排的技术基础<sup>[1]</sup>。我国 20 世纪 70 年代末牛、奶山羊超排后鲜胚移植成功。胚胎移植技术与当今生物学、医学及物种保存领域密切相关, 而胚胎移植成功的关键是大量的优质胚胎, 完善的超排卵技术就成了胚胎移植成功的首要条件。

近年来随着基因工程小鼠的大量开发, 小鼠的卵母细胞和胚胎需求量也日益增加。单靠自然排卵, 耗时耗力, 也很难满足研究需要, 成熟的超排卵技术可以大幅提高动物的生产效率。小鼠的超排受内外多种因素的影响, 超排效果极不稳定。影响小鼠超排效果的因素主要有小鼠的品系、周龄、生理周期, 激素的剂量、注射时间、间隔时间。研究者的报道中, 小鼠超排的激素剂量和周龄没有完全统一, 且对昆明小鼠超排的研究相对比较完备, 但对 C57BL/6J 小鼠超排的研究相对较少, 而 C57BL/6J 小鼠在基因工程小鼠研究中应用非常广泛。

笔者采用孕马血清促性腺激素(PMSG)和人绒毛膜促性腺激素(HCG)对小鼠进行超数排卵, 通过不同周龄、注射时间的小鼠超排效果的比较, 进一步完善小鼠超数排卵方案, 为完善小鼠, 尤其是 C57BL/6J 小鼠的超数排卵技术提供参考。

## 1 材料与方

## 1.1 材料与仪器

## 1.1.1 实验动物。选用 4~10 周龄未交配过的 C57BL/6J

小鼠(购自湖北省实验动物研究中心), 动物质量许可证号码为 SCXK(鄂)2015-0018。

**1.1.2 试剂。**①孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG), 宁波市三生药业有限公司生产, 生产批号 S170106; 血促性素专用稀释液, 宁波市三生药业有限公司生产, 生产批号 C161210。用血促性素专用稀释液配成 100 IU/mL 的储备液, -20℃ 储存备用。②人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, HCG), 宁波人健药业集团股份有限公司生产, 生产批号 170112。用生理盐水配成 100 IU/mL 的储备液, -20℃ 储存备用。③胚胎操作液: M2 小鼠胚胎收集专用培养液(Sigma); 胚胎培养液: KSOM 小鼠胚胎专用培养液(Sigma); 透明质酸酶浓储液(Sigma H4272); 用 M2 培养液稀释至 0.01%; 石蜡油(Sigma)。

**1.1.3 仪器。**尼康 T-S 双端口倒置显微镜、Mettler INC108 med CO<sub>2</sub> 培养箱、国产体视显微镜、用硬玻璃毛细管(1.5 mm 外径)自制的吸卵管、一次性塑料 35 mm 培养皿、康宁 18 mm 培养皿。

## 1.2 方法

**1.2.1 小鼠的准备。**将购买回来的小鼠放入中南民族大学实验动物中心 SPF 级实验动物检疫间内, 进行试验前 7 d 的环境适应性饲养和检疫, 无异常的小鼠用于超排处理。SPF 级动物实验室的环境按照国家标准进行控制: 温度 23~25℃, 湿度 55%±5%, 室内光照为 12 h: 12 h 明暗(08:00—20:00)交替, 空气为一万级净化。

**1.2.2 小鼠的分组。**同一周龄的小鼠归为 1 组, 用同样周龄的 22 只小鼠进行试验。3—5 月进行超排处理的小鼠记为春季组, 6—8 月进行超排处理的小鼠记为夏季组, 9—11 月进行超排处理的小鼠记为秋季组, 12 月一次年 2 月进行超排处理的小鼠记为冬季组。

**1.2.3 小鼠的超数排卵处理。**

**作者简介** 巩雪洁(1982—), 女, 湖北枣阳人, 硕士, 从事动物发育生物学研究。

**收稿日期** 2018-02-27; **修回日期** 2018-04-08

**1.2.3.1 注射 PMSG 10 IU。**第 1 天下午,挑选同一周龄的雌性小鼠,每只小鼠腹腔注射 PMSG 10 IU。

**1.2.3.2 注射 HCG 10 IU。**第 3 天下午同一时刻,即间隔 48 h,每只小鼠腹腔注射 HCG 10 IU,与种雄鼠按照 1:1 的比例合笼。

**1.2.3.3 制移卵管。**①在酒精灯外焰上轻烤玻璃管,使之软化;②玻璃管离开火焰,迅速拉伸玻璃管两端,产生 1 个内径 200~250  $\mu\text{m}$  的管;③为使玻璃管口平整,用小砂轮片将玻璃管切割后,迅速折断;④移卵管口接触火焰后迅速撤离,可减少操作过程中对透明带的伤害。

**1.2.3.4 受精卵的获取。**第 4 天 09:00 取怀孕 0.5 d 的小鼠,断颈处死,腹面朝上放在吸水纸上,立刻用 75% 乙醇喷洒小鼠腹部,尽量减少毛发污染。迅速打开腹腔,暴露子宫和输卵管。轻轻将子宫、输卵管、卵巢和脂肪垫拉出体腔,用镊子尖在靠近输卵管的膜上开一小口,将输卵管和少部分带着的子宫转移到已灭菌的 35 mm 培养皿里(加有预热至 37  $^{\circ}\text{C}$  的 M2 培养液滴)。在 20 倍体视显微镜下,找到输卵管膨大的壶腹部,用胚胎操作针将其刺破,并引流至 M2 培养液滴中,用自制的玻璃移卵管,将卵丘细胞包围的一团合子转移到透明质酸酶液滴中,消化 30 s。然后用口吸管将合子收集到新鲜 M2 培养液滴中,用移卵管上下吹洗几次,去除残留的透明质酸酶、卵丘细胞和杂质。

**1.2.3.5 受精卵的体外培养。**将受精卵转移到预先在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  平衡 24 h 的 KSOM 培养液滴(石蜡油液封的微滴)中,放入  $\text{CO}_2$  培养箱培养 3 d,培养密度一般为每 20  $\mu\text{L}$  10~15 枚。显微镜下观察统计不同时段受精卵发育的状态。

## 2 结果与分析

**2.1 周龄对 C57BL/6J 小鼠超排的效果** 由表 1 可知,10 IU PMSG + 10 IU HCG 间隔 48 h 处理小鼠,4 周龄取合子数明显比 8 周龄多。4 周龄和 8 周龄 C57BL/6J 的超排效果比较,4 周龄优于 8 周龄。

表 1 周龄对 C57BL/6J 小鼠超排效果的影响

Table 1 The influence of week-age on superovulation in mice

| 周龄<br>Week-age//w | 供体雌鼠数量<br>Number of donor<br>female mice//只 | 取合子数<br>Zygote number<br>枚/只    |
|-------------------|---|---------------------------------|
| 4                 | 22  | 26.86 $\pm$ 1.76 <sup>***</sup> |
| 8                 | 22  | 14.58 $\pm$ 0.59                |

注:\*\*\*为  $P < 0.001$

Note:\*\*\* indicated  $P < 0.001$

**2.2 季度对 C57BL/6J 小鼠超排的影响** 由图 1 可知,C57BL/6J 小鼠秋季组超排效果好于冬季组,秋季组小鼠的取合子数为 30 枚以上,而冬季组同样激素的剂量处理 4 周龄、5 周龄、6 周龄小鼠,收集的合子数差别不大,效果都不理想。秋季超排实验,6 周龄小鼠的取合子数比 4 周龄、5 周龄略微好一些。

**2.3 PMSG 初始注射时间对 C57BL/6J 小鼠超排的影响** 由图 2 可知,对于 4 周龄 C57BL/6J 小鼠,12:00—13:00

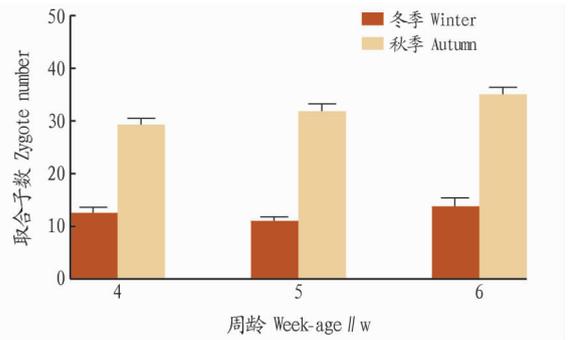


图 1 季度对取合子数的影响

Fig. 1 The influence of quarter on zygote number

初始注射 PMSG 可获得比较多的合子;而 5 周龄 C57BL/6J 小鼠 13:00、17:00 初始注射 PMSG,均可获取比较多的合子;8 周龄 C57BL/6J 小鼠 13:00 初始注射 PMSG,超排效果最佳。若初始 PMSG 时间相同,同一天的 12:00、13:00、15:00、16:00、17:00 注射 PMSG,不同周龄的小鼠超排效果差异比较明显。

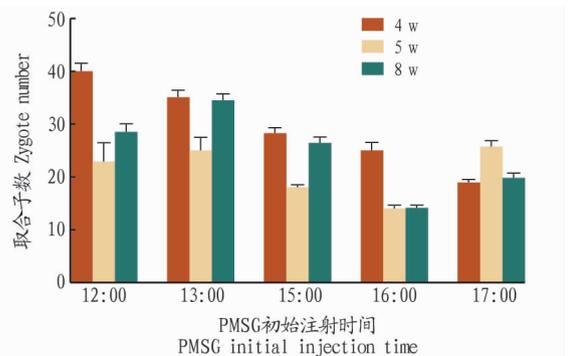


图 2 PMSG 初始注射时间对取合子数的影响

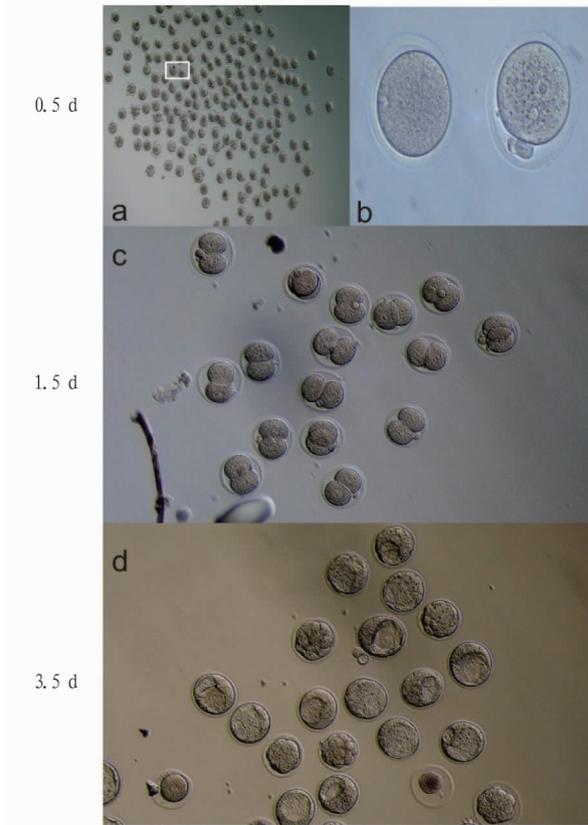
Fig. 2 The influence of the initial injection time on zygote number taken by PMSG

**2.4 C57BL/6J 小鼠受精卵的体外培养** 由图 3 可知,用 KSOM 胚胎培养液培养 C57BL/6J 小鼠的受精卵,1.5 d 后有双原核的受精卵基本都可发育至 2-细胞,2-细胞的 2 个分裂球对称均匀,颜色清晰,透明带完整光滑。3.5 d 后 2-细胞中的绝大部分可发育至囊胚阶段,极少部分皱缩退化。KSOM 胚胎培养液中小鼠受精卵发育的同步化程度较高。

## 3 结论与讨论

**3.1 周龄对超排的影响** 宋绍征等<sup>[2]</sup>比较了 5 周龄与 8 周龄 C57BL/6J 的超排效果,发现 8 周龄效果略好;Esmail 等<sup>[3]</sup>发现 4 周龄 C57BL/6J 更适合超排;陈晓娟等<sup>[4]</sup>比较了获得的卵母细胞数、2-细胞数等,认为 4 周龄 C57BL/6J 超排更好;而 Kolbe 等<sup>[5]</sup>认为 21~32 日龄比 32 日龄以上的 C57BL/6J 小鼠获得的卵母细胞更多。该实验后期采用 4 周龄 C57BL/6J 小鼠进行超排。

**3.2 注射时间对超排的影响** 对大多数小鼠品系来说,内源黄体素(LH)的释放时间为注射 PMSG 之后的第 2 个暗期中点之后的 15~20 h,而排卵发生在注射 HCG 后 10~13 h,但要人为控制排卵时间,就需在內源 LH 释放前注射 HCG。



注: a. 100 × 受精卵; b. 400 × 受精卵, 左侧为未受精卵, 右侧为原核受精卵; c. 200 × 2-细胞; d. 200 × 囊胚

Note: a. 100 × Fertilized ovum; b. 400 × Fertilized ovum, left side was unfertilized ovum, right side was prokaryotic fertilized ovum; c. 200 × 2-Cell; d. 200 × Blastocyst

图3 不同时段受精卵体外发育的状态

Fig. 3 The state of development of fertilized ovum *in vitro* at different times

唐一岷等<sup>[6]</sup>认为 C57BL/6J 小鼠超排后 14 ~ 15 h 取的卵最多; 陈晓娟等<sup>[4]</sup>发现, 4 周龄的 C57BL/6J 小鼠对 PMSG 应答产生的内源黄体素 (LH) 释放量不足以引起排卵, HCG 注射时间为注射 PMSG 后 48 ~ 49 h, 此时获得卵母细胞数较多。该实验中 4 周龄的 C57BL/6J 小鼠内源性 LH 释放不足, 排卵的高峰时间就和上述的“HCG10 ~ 13 h”不一致。实验结果显示, 注射 PMSG (10IU) 时间为第 1 天 12:00—13:00, 间隔

48 h 同样的时间再注射 HCG (10 IU), 注射 HCG 后 18 ~ 21 h 取胚, 也能获得比较好的超排效果。

**3.3 C57BL/6J 小鼠早期胚胎体外发育** 小鼠的早期胚胎即从受精卵开始经过卵裂、2-细胞、8-细胞、桑椹胚、囊胚等阶段, 尚未与子宫建立组织联系的游离阶段的胚胎。体外培养效率首先依赖于超排获得优质的卵母细胞和受精卵。该实验中小鼠受精卵收集时间固定为第 4 天 09:00。光照周期为 05:00—19:00, PMSG 时间也相应提前到中午, 才能保证受精卵的存活率<sup>[7]</sup>。而 Takeo 等<sup>[8-10]</sup>采用其他激素 (IAS 和 eCG, 辅以体外授精 (IVF), 2-细胞百分比、原代出生率都非常可观。该实验采用自然交配获得受精卵, 发育到 2-细胞的百分比可达 27.91%。后续实验若采用 IVF, 受精率可大幅提升, 能进一步提高小鼠早期胚胎体外发育质量。实验小鼠的发情周期、营养状况对超排效果的影响还有待进一步研究。

### 参考文献

- [1] ARMSTRONG D T (赵晓霞, 高昌恒, 译). 家畜超排的生理基础 (下) [J]. 国外畜牧科技, 1991, 18(2): 18-20.
- [2] 宋绍征, 王怡, 王宝珠, 等. 激素剂量、小鼠品系及周龄对超数排卵的影响 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(4): 5-8.
- [3] ESMAIL M Y, QI P, CONNOR A B, et al. Generating chimeric mice by using embryos from nonsuperovulated BALB/c mice compared with superovulated BALB/c and albino C57BL/6 mice [J]. Journal of the American association for laboratory animal science, 2016, 55(4): 400-405.
- [4] 陈晓娟, 王芊芊. C57BL/6J 小鼠促性腺激素注射时间对诱导超排卵的影响 [J]. 畜牧兽医科技信息, 2015(3): 38-39.
- [5] KOLBE T, LANDSBERGER A, MANZ S, et al. Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages [J]. Lab animal, 2015, 44(9): 346-349.
- [6] 唐一岷, 刘丽均, 徐平. 小鼠超排后的取卵时间对体外受精率的影响 [J]. 上海交通大学学报 (农业科学版), 2003, 21(3): 185-188.
- [7] 安德拉斯·纳吉, 玛丽娜·格特森斯坦, 克里斯蒂娜·文特斯藤, 等. 小鼠胚胎操作实验手册 [M]. 孙青原, 陈大元, 译. 北京: 化学工业出版社, 2006: 1.
- [8] TAKEO T, NAKAGATA N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice [J]. PLoS One, 2015, 10(5): 1-11.
- [9] TAKEO T, NAKAGATA N. Efficient production of mouse oocytes using superovulation by immunization against inhibin [J]. Transgenic research, 2016, 25(2): 211-212.
- [10] TAKEO T, NAKAGATA N. Immunotherapy using inhibin antiserum enhanced the efficacy of equine chorionic gonadotropin on superovulation in major inbred and outbred mice strains [J]. Theriogenology, 2016, 86(5): 1341-1346.

(上接第 17 页)

- [37] 王志伟, 纪燕玲, 陈永敢. 禾本科植物内生真菌及其在农业上的应用潜力 [J]. 南京农业大学学报, 2011, 34(5): 144-154.
- [38] FUNK C R, HALISKY P M, JOHNSON M C, et al. An endophytic fungus and resistance to soil webworms: Association in *Lolium perenne* L. [J]. Nature biotechnology, 1983, 1(2): 189-191.
- [39] 朱虹, 单淑芳, 李增智, 等. 苦楝内生真菌及其代谢产物的杀虫活性 [J]. 中国生物防治, 2010, 26(1): 47-52.
- [40] 王婷, 叶耀辉, 郑红梅, 等. 植物内生真菌抗虫活性研究进展 [J]. 江西中医药, 2016, 47(5): 67-70.
- [41] 左玮. 植物内生真菌在植保上的应用 [J]. 安徽农学通报, 2014, 20(1): 90-91.
- [42] RAPS A, VIDAL S. Indirect effects of an unspecialized endophytic fungus on specialized plant-herbivorous insect interactions [J]. Oecologia, 1998, 114(4): 541-547.
- [43] 傅婉秋, 谢星光, 戴传超, 等. 植物-微生物联合对环境有机污染物降

解的研究进展 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(4): 929-939.

- [44] 田林双. 内生真菌降解多环芳烃菲研究 [D]. 南京: 南京师范大学, 2007.
- [45] CORRÊA R C, RHODEN S A, MOTA T R, et al. Endophytic fungi: Expanding the arsenal of industrial enzyme producers [J]. Journal of industrial microbiology & biotechnology, 2014, 41(10): 1467-1478.
- [46] AMBROSE K V, TIAN Z P, WANG Y F, et al. Functional characterization of salicylate hydroxylase from the fungal endophyte *Epichloe festucae* [J]. Scientific reports, 2015, 5(1): 1-12.
- [47] 徐在超, 史亚楠, 张仁铎, 等. 三株具重金属抗性油菜内生真菌对镉铅锌富集特性研究 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2016, 55(6): 153-160.
- [48] MIRZAHOSSEINI Z, SHABANI L, SABZALIAN M R, et al. ABC transporter and metallothionein expression affected by NI and *Epichloe* endophyte infection in tall fescue [J]. Ecotoxicology and environmental safety, 2015, 120: 13-19.