

# 小鼠囊胚注射

## Mouse Blastocyst Injection

唐蔚<sup>1</sup>, 俞睿<sup>1</sup>, 陈子尘<sup>1</sup>, 李周结<sup>1</sup>, 王倩雯<sup>1</sup>, 丁一夫<sup>2</sup>, 吴宝金<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>动物实验技术平台, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

<sup>2</sup>细胞生物学国家重点实验室, 中国科学院分子细胞科学卓越创新中心, 上海

\*通讯作者邮箱:[baojin.wu@sibcb.ac.cn](mailto:baojin.wu@sibcb.ac.cn)

引用格式: 唐蔚, 俞睿, 陈子尘, 李周结, 王倩雯, 丁一夫, 吴宝金. (2022). 小鼠囊胚注射. *Bio-101* e1010949. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010949.

How to cite: Tang, W., Yu, Q., Chen, Z. C., Li, Z. J., Wang, Q. W., Ding, Y. F. and Wu, B. J. (2022). Mouse Blastocyst Injection. *Bio-101* e1010948. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010948. (in Chinese)

**摘要:**囊胚注射是一种将 ES 胚胎干细胞注射入囊胚期的小鼠胚胎, 从而获得嵌合体小鼠的实验技术。注射的 ES 细胞一般是在体外基因改造后的细胞, 如 ES 细胞在囊胚注射后能成功分化为小鼠的生殖细胞后, 进而配种传代, 就能获得基因改造过的子代小鼠。

**关键词:** ES 细胞, 供体小鼠, 假孕母鼠, 显微注射

### 材料与试剂

1. 尖嘴系线镊 (协和医疗公司, 产品目录号: MR-F201A)
2. 手术剪 (金钟公司, 产品目录号: JA2405)
3. 注射针 (SUTTER INSTRUMENT 公司, 产品目录号: B100-75-10)
4. 固定针 (SUTTER INSTRUMENT 公司, 产品目录号: B100-75-10)
5. 吸卵针 (国产毛细玻璃管, 熔点 0.9-1.1\*120mm)
6. 无菌注射器 (KDL 公司, 规格: 1ml)
7. 1.5 ml 离心管 (Axygen 公司, 产品目录号: MCT-150-L-C)
8. Filter System (CORNING 公司, 产品目录号: 431097)
9. 0.22  $\mu$ m Filter (Millex-GP 公司, 产品目录号: SLGP033RB)
10. 100\*20mm 培养皿 (FALCON 公司, 产品目录号: 353003)

11. 35\*10mm 培养皿 (FALCON 公司, 产品目录号: 353001)
12. 砂轮
13. FHM (MILLIPORE 公司, 产品目录号: MR-025-D)
14. KSOM (MILLIPORE 公司, 产品目录号: MR-121-D)
15. M16 (MILLIPORE 公司, 产品目录号: MR-016-D)
16. 矿物油 (SIGMA 公司, 产品目录号: M8410)
17. PMSG (宁波市三生药业有限公司)
18. HCG (宁波市三生药业有限公司)
19. ES DMEM (MILLIPORE 公司, 产品目录号: SLM-220-M)
20. ES FBS (Hyclone 公司, 产品目录号: SH30070.03)
21. NEAA (MILLIPORE 公司, 产品目录号: tms-001-c)
22. P/S (Gbico 公司, 产品目录号: 15140-122)
23. Nuc (MILLIPORE 公司, 产品目录号: ES-008-D)
24. Glu (MILLIPORE 公司, 产品目录号: TMS-002-C)
25. 2-Mer (MILLIPORE 公司, 产品目录号: ES-007-E)
26. 2,2,2-Tribromoethanol (SIGMA-ALDRICH 公司, 产品目录号: T48402)
27. 2-Methyl-2-butanol (SIGMA 公司, 产品目录号: 240486)
28. ULTRA PURA WATER (MILLIPORE 公司, 产品目录号: TMS-006-A)
29. Polyvinylpyrrolidone (SIGMA 公司, 产品目录号: P5288-100G)
30. PMSG (见溶液配方)
31. HCG (见溶液配方)
32. ESno2inolif 溶液 (见溶液配方)
33. 2.5%阿佛丁溶液 (见溶液配方)

## 仪器设备

1. 拉针仪 (SUTTER INSTRUMENT 公司, 型号: P-97)
2. 煅针仪 (NARISHIGE 公司, 型号: MF-900)
3. 显微镜 (NIKON 公司, 型号: SMZ800N)
4. 倒置显微镜 (OLYMPUS 公司, 型号: IX73)

5. 显微操作系统（品牌：NARISHIGE，型号：IM-9C）
6. 压电式破膜仪（EPPENDORF 公司，型号：PiezoXpert）
7. 热台（品牌：TOKRI HIT，型号：TPX-SQFT）
8. 离心机（EPPENDORF 公司，型号：5430）
9. 超洁净工作台（品牌：万里，型号：SW-CJ-2FX）
10. 二氧化碳恒温培养箱（THERMO 公司，型号：i160）
11. 生物安全柜（THERMO 公司，型号：1300 SERIES A2）

## 实验步骤

### （一）实验动物的准备

#### 1. 囊胚

供应小鼠品系的选择：主要根据所要采用的ES细胞的遗传背景，通常是根据ES细胞与宿主胚胎毛色基因型来挑选，以便于识别后代是否为嵌合体，如：使用129起源的ES细胞，常选择C57BL/6提供注射用宿主囊胚。由于自然交配囊胚产量不高，而且胚胎发育可能不同步，通常选择3-4周龄的雌鼠进行超排以便获得足够数量的受精卵。

2. 可育雄鼠：选用8周龄以上的同品系雄鼠，最好有过交配记录。

3. 用作胚胎移植受体的假孕母鼠：由6-

8周龄自然发情的母鼠与结扎雄鼠交配所成。其性周期与受精卵供应鼠保持一致。

### （二）注射用囊胚的制备

选取10-15只3-4周龄的雌性小鼠，于第一天下午7:00-8:00腹腔注射5IU PMSG，42-48小时后（第三天）腹腔注射5IUHCG,然后与可育雄鼠合笼，第四天早上选出有阴道栓的雌鼠，第七天将有阴道栓的小鼠处死，剥离后将完整的输卵管和子宫剪下，置于FHM操作液中。在显微镜下找到输卵管和子宫交接处，将吸取了FHM的注射器针头部轻轻插入，用FHM液体缓缓冲出受精卵。将受精卵收集起来，清洗干净，最后将受精卵吸至含多个M16培养液滴的35mm培养皿中。此M16培养皿需提前放入二氧化碳恒温培养箱内平衡超过4-6小时，并用矿物油覆盖M16培养液滴。

### （三）代孕鼠的制备

移植囊胚使用子宫移植法，使用见栓后2.5天的假孕母鼠。在供卵鼠与可育雄鼠合笼当天，挑选自然发情的母鼠与结扎雄鼠合笼，第二天早上检查交配情况，标记有阴道栓者，可做代孕鼠。母鼠至少为6-8周龄，理想体重为25 g-35 g，通常选择母性较好的ICR来作为代孕母鼠。

### （四）显微注射系统的建立

#### 1. 注射针的控制

使用外径为 1mm，内径 0.75mm 的无芯毛细玻璃管，固定在水平拉针仪上，用设定好的程序拉出大小长度适合的针胚，将针胚固定在煅针仪上，将针的内径为 15-18 $\mu$ m 处紧贴玻璃球，点踩踏板，迅速将针熔断。选择针口平整光滑且不内缩的注射针，在针尖稍远处将针坯弯成 20-30°。

#### 2. 固定针的控制

选用外径为 1mm，内径 0.75mm 无芯毛细玻璃管固定在拉针仪上，用设定好的程序拉出大小长度适合的针胚，用砂轮在直径为 120-150 $\mu$ m 处将玻璃针切断，尽量保证断面平整光滑，然后将针固定在煅针仪上，将针烧制成内径为 18-20 $\mu$ m 大小，最后在距针尖 2-3mm 处，将针坯弯成 20-30°。

### （五）显微注射操作过程

#### 1. 注射针及持卵针的安装

将固定针安装在显微注射仪的左边的持针器上，调整好角度，使针的末端平行于注射用培养皿底部；

右侧显微注射仪的压力控制装置需要事先装入水，排除掉所有气泡，以便能精准控制注射针。注射针需事先在安全柜内进行预处理，用 10  $\mu$ l 注射器在针管的后部小心注入约 3 mm 的水银柱（整个过程需要特别谨慎小心，防止水银洒落），然后将注射针小心地安装在右侧持针器上，调整角度，使针与注射用培养皿底部平行。

#### 2. 显微注射的操作（见视频）

[视频：囊胚形态及注射过程](#)

- a. 在 100 mm 的培养皿中央制作两排 20  $\mu$ l 的 ESno2inolif 液滴，左侧用 2.5% PVP 做一个液滴，用矿物油覆盖。
- b. 将注射针缓缓降入 2.5%PVP 液滴中，在低倍物镜下找到针尖，轻轻转动压力控制装置，结合压力破膜仪，清洗干净针的内壁，不要残留杂质和油滴。将清洗干净的注射针和固定针放置在 ESno2inolif 液滴中，使它们在一条直线上，并使其处于视野中心。
- c. 用口吸管吸取 10-15 枚适度扩展的囊胚，放入 ESno2inolif 液滴中，然后吸取适量 ES 细胞，缓缓吹入液滴中，使其沉淀到底部。
- d. 在高倍物镜下，仔细选择单个 ES 细胞，吸取 10-15 个 ES 细胞排列在注射针里，注意避免挤压细胞。
- e. 用固定针吸住囊胚，调整好囊胚的位置，使囊胚内细胞团处于合适的位置（一般为 9 点钟方向），在 3 点钟方向挑选滋养层细胞连接处薄弱处作为入针点，点踩压力破膜仪踏板，用脉冲打破透明带，将注射针轻轻插入囊胚腔体，将 ES 细胞注入腔体。
- f. 轻轻抽出注射针，将已注射完成的囊胚放在一侧。
- g. 定期将注射好的胚胎转移到 M16 培养皿中，放入二氧化碳恒温培养箱。
- h. 全部注射完毕，将胚胎移植至 2.5 天的假孕母鼠中。等待 17 天后，小鼠出生。

### 溶液配方

#### 1. PMSG:将PMSG 冻干粉溶于0.9%NaCl

无菌生理盐水,浓度50IU/ml, 根据实验需要的量分装到1.5 ml EP 管中。

-20 °C至少可保存一个月。

#### 2. HCG:将冻干粉溶于0.9%NaCl

无菌生理盐水,浓度50IU/ml, 根据实验需要的量分装到1.5 ml EP 管中。

-20 °C至少可保存一个月。

#### 3. ESno2inolif 溶液:

试剂	用量	终浓度
----	----	-----

ES DMEM	404 ml	80%
ES FBS	75 ml	25%
NEAA	5 ml	1%
P/S	5 ml	1%
Nuc	5 ml	1%
Glu	5 ml	1%
2-Mer	1 ml	0.2%

将上述试剂混合放入 500 ML Filter System 中，放置在室温超净台中，自行过滤结束储存于 4℃ 冰箱。其中，Nuc 和 Glu 需在 37 °C 水浴中从浑浊液变至透明清澈再加入。

#### 4. 2.5%阿佛丁溶液

称取 10g 2,2,2-Tribromoethanol 后加入 10 ml 2-Methyl-2-butanol，240 转/25 °C 避光振荡至沉淀完全消失，配制成浓缩液。使用时按照 2.5% 浓度将浓缩液加入相应的 ULTRA PURE WATER（2.5 ml 浓缩液：97.5 ml 超纯水），280 转/25 °C 避光振荡至沉淀完全消失，0.22 μm 过滤器过滤后即为工作液。

#### 5. 2.5% PVP 溶液

称取 2.5 g PVP 粉末加入 100 ml FHM 中，放入 4 °C 冰箱 24 小时待其完全溶解后，用 0.22 μm Filter 过滤，分装至 1.5 ml 离心管中，-20 °C 储存。使用时，需提前一周放入 37 °C 二氧化碳恒温培养箱中，待其完全融化，液体流动顺畅方可使用。

### 致谢

本实验室的胚胎操作技术主要来源于中科院分子细胞中心李劲松研究员实验室，美国洛克菲勒大学转基因平台及美国洛克菲勒大学 Peter Mombaerts 实验室。特此致谢！

### 参考文献

1. Andras, N., Marina, G., Kristina, V. and Richard, B.(2003). Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.