

Biorocks 辅助生殖技术（ART）培养基（KSOM、HTF 及矿物油）用于小鼠胚胎体外培养的性能验证

1. 引言

小鼠植入前的胚胎体外培养是支撑发育生物学、遗传学及辅助生殖技术（ART）发展的核心技术。培养基的成分无疑是影响实验结果的最关键变量，它直接决定胚胎的卵裂率、囊胚形成率及后续胚胎活力。钾离子优化培养基（KSOM）经专门配方设计，可满足早期胚胎的营养与代谢需求，尤其能帮助胚胎突破 2 细胞阻滞——这是体外培养中许多近交系及远交系小鼠胚胎常出现的发育停滞现象。

尽管 KSOM 是主要的生长培养基，但辅助生殖技术（尤其是体外受精，IVF）的成功与否，也在很大程度上取决于辅助生殖相关试剂的质量。人输卵管液（HTF）培养基对配子处理、精子获能及受精过程至关重要；高纯度矿物油需覆盖在培养基微滴表面，以防止培养基蒸发并维持稳定的 pH 值与渗透压。不同商业供应商提供的这些组分性能可能存在差异，因此必须进行严格验证，以确保实验结果的可重复性。

本研究对 Biorocks ART 系列培养基进行了全面的性能验证。研究目标是评估 Biorocks KSOM、Biorocks HTF 及 Biorocks 矿物油联合使用时，对四种不同小鼠品系（B6D2F1、ICR、KM、C57BL/6）经自然交配及体外受精获得的胚胎，其支持植入前胚胎发育的能力。

2. 材料与方法

2.1. 动物模型

实验采用四种品系的雌性（6-8 周龄）与雄性小鼠：B6D2F1（F1 杂交系）、ICR（远交系）、KM（远交系）及 C57BL/6（近交系）。所有动物均饲养于标准实验室环境中，光照周期为 12 小时光照 / 12 小时黑暗，食物与水供应充足。所有操作均严格遵循动物饲养与使用指南。

2.2. 胚胎获取

在获取胚胎前，对所有雌性小鼠采用标准超数排卵方案处理：先腹腔注射孕马血清促性腺激素（PMSG）5IU，48 小时后再腹腔注射人绒毛膜促性腺激素（hCG）5IU。

2.2.1. 合笼

注射 hCG 后，将超数排卵的雌性小鼠与同品系可育雄性小鼠合笼。交配后次日早晨（第 0.5 天），检查雌性小鼠阴道是否存在阴栓。对检测到阴栓的雌性小鼠，通过冲洗输卵管获取受精卵。

2.2.2. 体外受精（IVF）

IVF 实验中，配子的制备与共培养严格遵循以下方案进行：从可育雄性小鼠的附睾尾及输精管中收集精子，将其释放至含 2mL Biorocks HTF 培养基的 35mm 培养皿中，培

培养基表面覆盖 Biorocks 矿物油；将培养皿置于三气培养箱（37°C、5% CO₂、5% O₂）中，使精子获能至少 1 小时；从超数排卵雌性小鼠的输卵管中获取卵丘 - 卵母细胞复合物（COCs），将其转移至一个受精培养皿中（该培养皿同样含 2mL Biorocks HTF 培养基，表面覆盖 Biorocks 矿物油）；向含 COCs 的培养皿中加入 100μL 获能精子悬液，使配子共培养 4-5 小时以完成受精；受精结束后，对受精卵进行多步清洗：先在含 2mL 新鲜 Biorocks HTF 培养基的培养皿中清洗，随后依次在 4 个 300μL Biorocks HTF 培养基微滴中清洗，最后在 300μL Biorocks KSOM 培养基微滴中清洗 3 次，再转移至最终的培养微滴中。

2.3. 胚胎培养与发育评估

所有受精卵（无论品系及获取方法）均采用 Biorocks KSOM 培养基培养。胚胎以群体培养方式（20-30 枚胚胎 / 微滴）置于 30μL 培养基微滴中，微滴表面覆盖 Biorocks 矿物油。在 37°C、5% CO₂、5% O₂ 的培养箱中持续培养 4 天。

通过形态学观察评估胚胎发育进程，主要关注两个关键时间节点：第 1 天胚胎卵裂至 2 细胞期的情况，以及第 4 天胚胎形成囊胚（具有明显内细胞团与囊胚腔）的情况，并在关键发育阶段拍摄代表性图像。

2.4. 数据分析

以培养的受精卵总数为基数，以百分比形式计算胚胎发育率。同时计算 2 细胞期胚胎向囊胚期的发育率，以评估胚胎卵裂后的发育能力。

3. 结果

3.1. Biorocks KSOM 培养基中胚胎的整体发育能力

Biorocks ART 系列培养基成功支持了四种品系小鼠经两种方式获取的胚胎的体外发育。实验中持续观察到较高的 2 细胞期卵裂率，且后续可形成形态正常的囊胚，具体数据详见表 1。

表 1 不同品系小鼠胚胎在 Biorocks KSOM 培养基中的体外发育情况

	B6D2F1 (自然 交配)	B6D2F1 (IVF)	ICR (自然 交配)	ICR (IVF)	KM (自然 交配)	KM (IVF)	C57BL/6 (自然 交配)	C57BL/6 (IVF)
实验受精卵数	1117	651	445	395	2368	1032	173	170
2 细胞数	867	595	383	330	1605	897	90	139
囊胚数（第 4 天）	798	554	305	264	1093	551	71	118
受精卵至 2 细胞发育率	77.6%	91.4%	86.1%	83.5%	67.8%	86.9%	52.0%	81.8%
受精卵至囊胚发育率	71.4%	85.1%	68.5%	66.8%	46.2%	53.4%	41.0%	69.4%
2 细胞至囊胚发育率	92.0%	93.1%	79.6%	80.0%	68.1%	61.4%	78.9%	84.9%

3.2. 自然交配与体外受精来源胚胎的发育情况比较

一项重要研究结果是：在多个小鼠品系中，体外受精来源的胚胎发育性能始终更优。以 B6D2F1 品系为例，体外受精来源胚胎的囊胚率达 85.1%，显著高于自然交配来源胚胎的 71.4%；近交系 C57BL/6 小鼠表现出更明显的类似趋势，其体外受精来源胚胎的囊胚率从自然交配的 41.0% 提升至 69.4%；KM 品系也呈现类似改善，囊胚率从自然交配的 46.2% 提高至体外受精的 53.4%；而远交系 ICR 小鼠经两种方式获取的胚胎发育性能均较稳定，囊胚率相近（约 67%-68%）。

3.3. 不同品系小鼠的胚胎发育率差异

正如预期，B6D2F1 杂交系小鼠胚胎展现出最高的发育潜能，其 2 细胞期至囊胚期的发育率优异，自然交配组达 92.0%，体外受精组达 93.1%。远交系 ICR 小鼠胚胎同样表现出较强的发育能力，约 80% 的 2 细胞期胚胎可发育至囊胚期。近交系 C57BL/6 与远交系 KM 小鼠是实验中较难培养的模式，整体囊胚率较低（尤其自然交配来源的胚胎）。但这两个品系经体外受精获取的胚胎发育性能均有显著提升，且 2 细胞期至囊胚期的发育率仍保持较高水平（C57BL/6：约 79%-85%；KM：约 61%-68%），表明该培养基即使对敏感性品系，也能支持其卵裂后的胚胎发育。

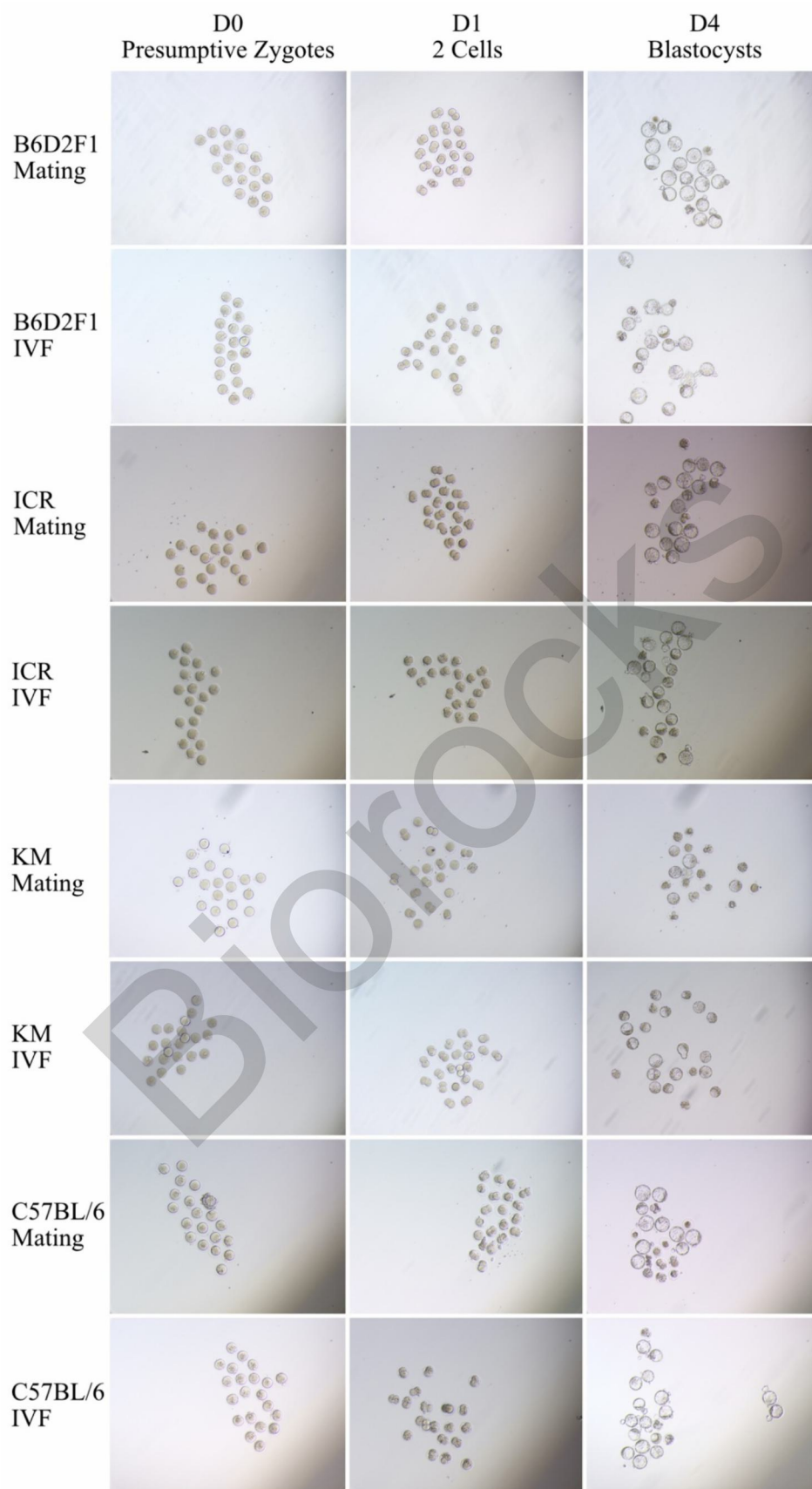


图1 小鼠胚胎在 Biorocks KSOM 培养基与矿物油中的发育代表性图像，显示胚胎从受精卵阶段到囊胚阶段的健康发育过程

4. 讨论

本研究对 Biorocks ART 系列培养基进行了全面验证，证实该系列培养基在多种变量条件下，仍能稳定支持植入前胚胎的良好发育。实验数据既验证了该整合体系的有效性，也凸显了其在应用中的多功能性。

尽管 KSOM 是主要的生长培养基，但实验的成功同样离不开 Biorocks HTF 培养基与矿物油的优质性能：体外受精过程中实现的高受精率，表明 Biorocks HTF 能有效维持配子活力、支持精子获能与受精过程；而胚胎在微滴培养中 4 天内的稳定发育，则证明 Biorocks 矿物油纯度高、无毒性，可有效保护脆弱的微环境，防止培养基蒸发及 pH 值与渗透压发生有害变化。

体外受精来源胚胎（尤其 B6D2F1、KM、C57BL/6 品系）的优异发育性能是一项重要研究结果。这提示 Biorocks 培养基体系能提供最优培养环境，充分发挥体外受精技术的优势，如精确控制受精时间、筛选高质量配子等，进而获得发育同步性更高、活力更强的受精卵。

对“2 细胞期至囊胚期”发育率的分析，可更深入揭示培养基的功能：稳定的 B6D2F1 品系胚胎发育率极高（>92%），表明 Biorocks KSOM 培养基中的营养成分与能量底物组成不会成为胚胎卵裂后发育的限制因素；对于 KM 等较难培养的品系，尽管整体囊胚率较低，但培养基仍能为其提供发育支持，这提示初始受精卵质量可能是决定这些品系胚胎发育成功的主要因素。

该培养基体系在遗传背景差异显著的小鼠品系中——稳定的杂交系 B6D2F1、两种远交系 ICR 与 KM、广泛使用的近交系 C57BL/6——均表现出稳定性能，充分证明其配方的可靠性。这种多功能性具有重要价值——它减少了不同研究项目或不同小鼠模型间对培养基进行优化的需求，从而提高实验的一致性与效率。

5. 结论

综上所述，Biorocks ART 系列培养基（包括 KSOM、HTF 及矿物油）构成了一套稳定且多功能的培养体系。该体系能持续支持不同遗传背景、不同获取方式的小鼠胚胎实现高植入前发育率，且对体内受精与体外受精来源的胚胎均表现出良好效能。这一结果验证了该培养基体系作为高性能通用培养体系的适用性，可广泛应用于生殖生物学与转基因研究领域的各类实验。