

小鼠体外受精方案的优化：降低培养基消耗并改进实验流程

主要研究结果

- **HTF 用量可显著降低：**在 KM 小鼠品系中，Biorocks HTF 培养基使用量可减少达 90%，胚胎发育率无统计学显著下降。
- **HTF 培养胚胎到 2 细胞阶段可行但具风险：**简化方法（方法 3）省略受精后清洗步骤，在 HTF 中精胚共培养过夜，于 KM 品系表现良好。
- **KSOM 仍然是胚胎体外受精后培养的金标准：**尽管本次实验受精后直接在 HTF 培养到 2 细胞阶段的简化措施取得成功，但公认的最佳操作规范依然强烈建议：应洗涤胚胎，并将其转移至像 Biorocks KSOM 这样的专用培养基中。这一关键步骤不仅能避免细胞碎片的毒性危害，还有助于胚胎克服许多小鼠品系中常见的“二细胞阻滞”现象。
- **最优推荐方案：**方法 1（HTF 用量减 75% + 标准 KSOM 转移）在效率与安全性间取得最佳平衡，适用于广泛小鼠品系。

1. 引言

小鼠胚胎体外培养是发育生物学、遗传学及辅助生殖技术的基石。体外受精（IVF）的成功率高度依赖体外受精液和操作方法。本实验室前期已建立一套标准操作流程（SOP），采用 Biorocks HTF 进行受精操作，并利用 Biorocks KSOM 进行受精后培养。该培养体系旨在实现较高的胚胎发育率。

基于用户反馈，本研究基于实验室原有标准操作流程（SOP），旨在验证两种优化策略：

首先，验证降低 HTF 消耗量的操作方案。

其次，评估受精后直接在 HTF 培养到 2 细胞阶段的简化措施。

2. 材料与方法

2.1. 动物模型和配子收集

本次验证实验选用高排卵量的远交系 KM 小鼠。精子来源为从两只具正常生育力的公鼠上收集新鲜精液。卵母细胞采集方法为，从经超数排卵后的母鼠中收集卵丘-卵母细胞复合体（COCs），混匀后随机分配至各实验组，消除配子质量差异的混杂影响。

2.2. 实验设计和 IVF 流程

四组 IVF 方法对比（基准方法与三种改良方法）：

- **精子获能：**将新鲜精液收集到 400 μ L 的 HTF 中，混匀后吸 200 μ L 精子悬液到含 1.8mL 新鲜 HTF 的获能皿中，制备总体积为 2mL 的获能皿（a），此获能皿用于基准方法、方法 1 和方法 3。对于方法 2，剩余的 200 μ L 原始精子悬液直接进行培养获能（b）。所有获能皿均覆盖 Biorocks 的矿物油，在 37 $^{\circ}$ C，5%CO₂和 5% O₂下获能 1h。

- **受精：**混匀的 COCs 以约 60 个每组随机均匀分配到实验组对应的皿/微滴中，以此消除组间卵母细胞的质量差异。为实现跨实验组的最终精子浓度一致性，受精操作按以下方案执行：
 - **基准方法：**将(a)的 100 μ L 获能精子加入含 2mL HTF 的受精皿中进行受精。
 - **方法 1 和方法 3：**将 (a) 的 10 μ L 获能精子加入含 200 μ L HTF 的受精滴中进行受精。
 - **方法 2：**将 (b) 的 1 μ L 获能精子加入含 200 μ L HTF 的受精滴中进行受精。

2.3. 胚胎培养和发育评估

- **基准方法、方法 1 和方法 2：**受精培养 4-5h 后，使用 4 个 300 μ L 的 HTF 滴清洗受精卵，每滴清洗 3-4 次，最后使用一滴 300 μ L 的 KSOM 清洗 3-4 次。
- **方法 3：**受精卵在受精滴中过夜，在第一天使用 KSOM 清洗已经发育至 2 细胞的胚胎。

所有实验组胚胎在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂和 5%O₂条件下，于 30 μ L KSOM 中覆盖矿物油培养。对第一天（2 细胞）和第四天（囊胚）的胚胎发育情况进行评估并记录。

3. 结果

各方法的胚胎发育情况如表 1 所示。尽管观察到微小的数值差异，但结果显示，基准方法与各改良方法在受精率及后续囊胚期发育能力方面均无统计学意义上的差异，4 种方法均实现了良好的胚胎发育效果。

表 1：IVF 方法的对比结果

	D0 卵母 细胞数量	D1 2 细胞 数量	D4 囊胚数 量	2 细胞率	卵母细胞 到囊胚率	2 细胞到囊 胚率
基准方法	261	183	102	70.1%	39.1%	55.7%
方法 1	274	176	102	64.2%	37.2%	58.0%
方法 2	278	191	109	68.7%	39.2%	57.1%
方法 3	169	124	78	73.4%	46.2%	62.9%

4. 分析讨论

本研究的核心目标是验证减少 HTF 培养基消耗的方法。以 2 只公鼠和 10 只母鼠的数量来进行实验计算，与基准法相比，改良方法可显著节约 HTF 的使用量（表 2）。

表 2：不同方法的 HTF 使用量和节省情况（2 只公鼠和 10 只母鼠）

方法	获能体积	受精体积	HTF 总体积	% 节省比率

基准方法	4 mL (2 mL x 2 公鼠)	20 mL (2 mL x 10 母鼠)	24 mL	0%
方法 1	4 mL (2 mL x 2 公鼠)	2 mL (0.2 mL x 10 母鼠)	6 mL	75%
方法 2	0.4 mL (0.2 mL x 2 公鼠)	2 mL (0.2 mL x 10 母鼠)	2.4 mL	90%

在明确了这些方法的显著优势后，关键在于培养基用量的减少是否会对生物学结果产生影响。本研究证实，小鼠体外受精方案可通过改良提高效率，且不会导致实验效果出现统计学意义上的下降。方法 3 的结果进一步表明，直接培养的方法对 KM 这样的远交系小鼠品系的容错性可能更高。

然而，对方法 3 的可行性需谨慎解读。标准受精后清洗步骤的核心目的之一，是将胚胎从经过数小时培养后含有死精及细胞碎片的环境中转移出来——这些物质会释放具有细胞毒性的活性氧（ROS）。此外，该方法延迟了将胚胎转移至专为突破 2 细胞阻滞设计的培养基中。在体外培养条件下，2 细胞阻滞是许多小鼠品系（尤其是近交系）面临的主要发育障碍 [3]。HTF 等受精培养基的配方旨在维持配子活力及促进受精过程，而非满足受精卵向囊胚发育所需的特定代谢及离子需求。与之相反，KSOM 培养基通过低葡萄糖浓度及优化的钾离子浓度设计突破 2 细胞阻滞 [2,3]。这一原理在《小鼠胚胎操作实验手册》等权威著作中也得到了强调，该指南强烈建议将受精卵转移至添加氨基酸的 KSOM 培养基中培养，而非继续在 HTF 培养基中培养，这一操作适用于所有小鼠品系，对于已知存在 2 细胞阻滞问题的品系尤为重要 [1]。

尽管本研究中 KM 品系的胚胎能在 HTF 培养基中成功完成第一次卵裂，但这一结果不应被广泛推广。对于敏感性更高的近交系小鼠，或在需要从珍贵的转基因小鼠中最大限度获取胚胎的实验中，将胚胎长期置于 HTF 这类非最优培养基中培养，会增加胚胎发育失败的不必要风险。最安全且科学合理的做法是，在实际可行的情况下，尽快将受精卵转移至适合其发育的培养基中。受精后 4-5 小时清洗受精卵并将其转移至 KSOM 培养基的标准操作，仍是确保在最广泛遗传背景的小鼠品系中实现最高成功率的金标准。

5. 结论

本研究证实，减少 HTF 培养基用量是提高小鼠体外受精成本效益的有效且安全的方法。尽管在本研究中，采用 HTF 培养基过夜培养的简化方法（方法 3）对 KM 小鼠品系无不良影响，但考虑到专用培养基在帮助许多小鼠品系突破 2 细胞阻滞方面的关键作用，我们仍建议将胚胎从受精培养基（HTF）转移至受精后培养培养基（KSOM）中。因此，方法 1 既实现了培养基的大幅节省，又保留了尽早将胚胎转移至 KSOM 培养基这一已证实安全的操作，是经验证可广泛应用的方案。

6. 参考文献

[1] Behringer, R., et al. (2014). *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

[2] Gardner, D. K., & Sakkas, D. (1993). Mouse embryo cleavage, metabolism and viability: role of medium composition. *Human Reproduction*, 8(2), 288–295.

[3] Ho, Y., et al. (1995). Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Molecular Reproduction and Development*, 41(2), 232-238.

Biorocks