

Biorocks C-TYH 培养基用于小鼠体外受精中精子获能的验证

主要研究结果

- **针对稳定的杂交品系（B6D2F1）：**标准 HTF 培养基可实现优异且稳定的受精率与囊胚发育率。
- **针对难培养的近交品系（BALB/c）：**与 HTF 相比，使用 C-TYH 培养基进行精子获能时，2 细胞率近乎翻倍（61.3% vs. 31.0%），囊胚率也显著提高。
- **针对 C57BL/6 品系：**C-TYH 培养基的 2 细胞率较 HTF 有明显提升（83.0% vs. 74.6%），表明其可实现更高效的受精过程。
- **推荐方案：**HTF 是发育稳定品系的标准选择；对于近交品系（如 BALB/c）的体外受精结果优化、低受精率问题排查，或使用冷冻保存精子的情况，推荐使用 C-TYH 培养基。

1. 引言

在小鼠模型的体外受精（IVF）方案中，实验成功的核心取决于能否在体外有效复现精子获能过程。人输卵管液（HTF）培养基作为一种经广泛验证的通用型培养基，在众多应用场景中均能稳定实现优异的受精效果，但特定遗传背景的小鼠品系及特殊实验条件下，采用替代配方的培养基可能更具优势。

为此，本研究提供 C-TYH 这一专用培养基，供研究者优化精子获能方案，尤其适用于 HTF 培养基无法达到理想效果的场景。本报告通过实验直接对比 C-TYH 与 HTF 在多种常见小鼠品系中的性能，为培养基选择提供清晰依据。

2. 材料与amp;方法

精子收集与获能

通过切开 C57BL/6、B6D2F1 及 BALB/c 品系雄鼠的附睾尾，并轻轻挤压，将精子释放至 250 μ L 的 C-TYH 培养基液滴中进行收集。收集到的精子悬液经合并混匀后，被分为两个实验组进行获能。为最大限度减少实验变量，我们采用了 1.9 mL 的获能体积；该较大体积使得来自同一雄鼠的精子能够被分配至两种不同的获能组，同时将初始收集培养基的残留效应降至最低。需要指出的是，尽管本次验证为实现对比目的而采用了较大体积，但标准方案通常使用更小的获能体积（例如 200 μ L）。根据我们内部公布的数据（详见《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》）以及其他文献的既有方法，采用 200 μ L 的 C-TYH 进行获能，预期将得到一致的成功受精结果。

- **组 1（HTF 获能）：**取 100 μ L 初始精子悬液，转移至含 1.9mL HTF 培养基的获能皿中。

- **组 2 (C-TYH 获能)**：取 100 μ L 初始精子悬液，转移至含 1.9mL C-TYH 培养基的获能皿中。

将两组培养皿均置于 37°C、5% CO₂、5% O₂的培养箱中培养 1 小时，完成精子获能。

体外受精与胚胎培养

从超数排卵的雌性小鼠体内收集卵丘 - 卵母细胞复合体 (COCs)，混匀后随机分配到覆盖 Biorocks 矿物油的受精滴中。两组实验的受精操作均通过向含 COCs 的 200 μ L HTF 培养基滴中加入获能精子完成：对于 C57BL/6 和 B6D2F1 品系，加入 10 μ L 获能精子；对于 BALB/c 品系，因观察到其精子浓度较低，将获能精子加入量增至 30 μ L 以作补偿。

将受精培养皿置于 37°C、5% O₂、5% CO₂的三气培养箱中培养 4-5 小时。受精完成后，清洗受精卵并转移至 Biorocks KSOM 培养基中培养。分别在培养第 1 天评估胚胎卵裂至 2 细胞期的情况，第 4 天评估胚胎发育至囊胚期的情况。

3.结果与讨论

为验证 C-TYH 培养基相对于成熟 HTF 标准培养基的性能，本研究采用三种不同小鼠品系开展对比体外受精实验，记录卵母细胞发育至 2 细胞期及囊胚期的情况，结果如下表所示。

表 1: HTF 与 C-TYH 培养基用于精子获能的体外受精结果对比

品系	获能培养基	D0 卵母细胞数	D1 2 细胞数	D4 囊胚数	2 细胞率	卵母细胞至囊胚率	2 细胞期至囊胚率
C57BL/6	HTF	59	44	24	74.6%	40.7%	54.5%
	C-TYH	53	44	23	83.0%	43.4%	52.3%
B6D2F1	HTF	89	74	63	83.1%	70.8%	85.1%
	C-TYH	90	73	69	81.1%	76.7%	94.5%
BALB/C	HTF	29	9	7	31.0%	24.1%	77.8%
	C-TYH	31	19	13	61.3%	41.9%	68.4%

结果表明，两种培养基的性能存在明显的品系依赖性差异：

- 对于 B6D2F1 杂交品系，HTF 与 C-TYH 均能实现优异的 2 细胞率与囊胚率，证实 HTF 作为稳定品系的高性能培养基具有可靠应用价值。
- 对于 C57BL/6 近交品系，C-TYH 的 2 细胞率 (83.0%) 较 HTF (74.6%) 有明显提升，表明其可促进更高效的受精。

- 差异最显著的为 BALB/c 近交品系：与 HTF 相比，C-TYH 的 2 细胞率近乎翻倍（61.3% vs. 31.0%），卵母细胞至囊胚率也显著提高（41.9% vs. 24.1%）。这一结果提示，BALB/c 品系的精子在 C-TYH 培养基中获能效果远优于 HTF。

4. 策略性应用与推荐方案

基于实验结果，推荐以下培养基应用策略：

- HTF 培养基：仍为常规体外受精方案中稳定杂交小鼠品系（如 B6D2F1）的推荐选择，其在该类品系中可稳定实现高受精率与高发育率。
- C-TYH 培养基：强烈推荐用于以下场景：
 - 涉及近交品系的实验方案，尤其当 HTF 培养基效果不佳时。C57BL/6 与 BALB/c 品系的数据直接证实了其优越性能。
 - 低受精率或受精率不稳定的方案排查。
 - 使用冷冻保存精子的实验，该类精子可能从 C-TYH 的配方中获益。

5. 结论

尽管 HTF 培养基在许多常规小鼠体外受精实验中高效且可靠，但 C-TYH 作为一种经验证的高性能替代培养基，专为满足敏感小鼠模型更严苛的培养需求而设计。数据明确显示，对于 BALB/c、C57BL/6 等难培养近交品系，使用 C-TYH 培养基进行精子获能可显著提高受精率与胚胎发育率。这种针对性的培养基选择策略，对于在更广泛应用场景中最大化实验可重复性与成功率至关重要。