

# C57BL/6J 小鼠冻融 IVF 原核胚用于 Cas9 显微注射探讨

曾文滔\*, 周建丽, 赵书琴, 张亚男, 梅 云

(南京医科大学医药实验动物中心, 南京 211166)

**【摘要】 目的** 探讨小鼠体外受精(IVF)冻融后用于 Cas9 注射的可行性。**方法** 新鲜 C57BL/6J 小鼠卵子 IVF 后采用冻存管法(EFS20/40)冷冻原核胚(单细胞胚)和 2 细胞胚胎,次日复苏后培养。比较冻融原核胚和 2 细胞胚胎的回收率及成活率。选取部分冻融原核胚与新鲜原核胚同时进行 Cas9 和稀释液胞质注射并培养至 2 细胞,分别比较注射后的存活率及 2 细胞发育率。**结果** 冻融后的 B6 小鼠原核胚的回收率为 92.5%、成活率为 92.8%,2 细胞胚的回收率为 90.5%、成活率 95.8%,两组数据差异无显著性( $P > 0.05$ )。新鲜原核胚 Cas9 注射后的存活率为 92.7%,空白组注射组为 97.5%,冻融原核胚 Cas9 注射后的存活率为 82.6%,空白组为 92%,冻融组 Cas9 注射与各组差异有显著性( $P < 0.05$ ),其它各组差异无显著性( $P > 0.05$ )。注射后的 2 细胞胚发育率差异无显著性( $P > 0.05$ )。**结论** 冻融原核胚可用于 Cas9 显微注射。

**【关键词】** 体外受精;受精卵;胚胎冷冻;Cas9;显微注射

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 08-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.08.013

## Frozen-thawed pronuclear embryos by *in vitro* fertilization of C57BL/6J mice can be used for Cas9 microinjection

ZENG Wen-tao\*, ZHOU Jian-li, ZHAO Shu-qin, ZHANG Ya-nan, MEI Yun  
(Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

**【Abstract】 Objective** To verify the feasibility of Cas9 microinjection in frozen-thawed pronuclear embryos, based on the model of pronuclear embryos of C57BL/6J mice by *in vitro* fertilization. **Methods** After fertilized mouse pronuclear embryos cultured *in vitro*, one-cell and 2-cell embryos were frozen using EFS20/40 cryopreservation tube. The next day recovered and then cultured. The recovery rate and survival rate of the one-cell and 2-cell embryos were compared. The frozen-thawed and fresh pronuclear embryos were injected with Cas9 mixture and injection buffer into the cytoplasm, and then cultivated to 2-cell embryos, and the survival rate and development rate of the 2-cell embryos were compared. **Results** The recovery rate of frozen-thawed one-cell embryos was 92.5%, the survival rate was 92.8%, the recovery rate of 2-cell embryos was 90.5% and the survival rate was 95.8%, showing no significant difference. Furthermore, the survival rate of fresh one-cell embryos after Cas9 injection was 92.7%, the survival rate of one-cell embryos of the blank group was 97.5%. While the survival rate of Cas9 injected frozen-thawed one-cell embryos was 82.6%, and that of the blank group was 92%, showing a significant difference between the frozen-thawed injected group and other groups ( $P < 0.05$ ). The development rate of 2-cell embryos after Cas9 injection was not significantly different. **Conclusions** Frozen-thawed pronuclear embryos can be used for Cas9 microinjection.

**【Key words】** IVF; Fertilized eggs; Frozen embryos; Cas9; Microinjection

[作者简介] 周建丽(1985-),女,实验师,研究方向:实验动物与基因编辑。E-mail: zhoujianli@njmu.edu.cn

[通讯作者] 曾文滔(1987-),男,助理实验师,研究方向:实验动物与生殖生理。E-mail: wentaozeng@njmu.edu.cn

体外受精(*In vitro* fertilization, IVF)与胚胎冷冻技术已广泛应用于不孕不育医学、种质资源保存、物种运输等行业<sup>[1-3]</sup>,大量文献证明冷冻胚胎的发育时期、保存时间长短对复苏存活率、附植及产仔率没有明显的影响<sup>[4,5]</sup>,冻融自然受精原核胚很早就被用于转基因鼠制作<sup>[6-8]</sup>,IVF 受精胚冻融后用于显微注射还鲜有报道,对小鼠基因模型构建将有重要的实用意义。

C57BL/6(B6)小鼠一直是基因模型鼠制作的主要品系,超数排卵后自然交配获得原核胚或早期胚胎进行基因改造<sup>[9]</sup>。随着 B6 小鼠体外受精技术的完善,采用冻精(鲜精)IVF 技术批量生产胚胎可节约大量科研经费和时间,大型基因编辑实验室已经实现无活体雄鼠化模式(或少量)。但使用 IVF 获得双原核胚胎至少需要 8 h,对后续实验的连续性影响很大,本文针对这一关键点,对 B6 小鼠原核胚冻融后的存活率、注射存活率及 2 细胞发育率做了相关实验比较,探讨 IVF 结合胚胎冷冻技术应用于 Cas9 显微注射的可行性。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,5 只,10 周龄,体重 25~28 g;SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠,40 只,3~4 周龄,体重 11~13 g,均购自南京医科大学实验动物中心[SCXK(苏)2016-0002]。雄鼠单只饲养,雌鼠适应光照周期 1 周,饲养与实验均在南京医科大学实验动物中心屏障环境[SYXK(苏)2016-0016],环境温度 20℃~26℃,湿度 40%~70%,光照周期 12 L:12 D,光照时间 08:00~20:00。动物实验方案经过南京医科大学实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要耗材与仪器

#### 1.2.1 试剂耗材

获能液(modified Krebs Ringer bicarbonate solution, TYH)<sup>[1]</sup>;受精液(human tubal fluid, HTF)<sup>[1]</sup>;培养液 M16 (Sigma, M7292);促卵泡液(equine chorionic gonadotropin, eCG; Syntex);促排卵液(human chorionic gonadotropin, HCG; Syntex);石蜡油(Sigma, M8410);35 mm 培养皿(Corning, 430165);胚胎测试水(Water; Sigma, W1503);注射稀释物(Injection buffer),溶液配制试剂全部购置于 Sigma。

#### 1.2.2 主要仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱(Binder);生物安全柜(ESCO, class II type A2);体视显微镜(Olympus);冷光源(Olympus);显微操作仪(Olympus);电动气压注射泵(Eppendorf);拉针仪(Sutter, P-2000);焠针仪(Narishige, MF-900);液氮罐(CBS);手术器械 1 套;口吸管(自制)。

#### 1.2.3 注射物

Cas9 表达质粒(Addgene No. 44758)PCR 扩增获得线性化产物,在体外由试剂盒 T7 UltraKit (Ambion, AM1345)完成转录。SgRNA 的表达载体 PCR 扩增获得线性化产物,sgRNA 由试剂盒 MEGAshortscript Kit (Ambion, AM1354)在体外利用 T7 RNA 聚合酶完成转录。Cas9 mRNA 和 sgRNA 分装,保存于 -80℃ 冰箱<sup>[10]</sup>。

## 1.3 实验方法

#### 1.3.1 原核胚获得

按董婉维等<sup>[1,11]</sup>方法进行超数排卵和取卵, HCG 注射 14 h 后进行 IVF,按 Takeo 等<sup>[1]</sup>方法进行精子采集、获能和体外受精。

#### 1.3.2 胚胎冷冻

1 mL 冻存管加入 50  $\mu$ L EFS40 冻存液待用,30~60 枚/批移入 EFS20 预处理并洗涤 3 遍,2 min 后转入冻存管 EFS40 中,1 min 后投入液氮储存,冷冻液参照梁洋等<sup>[12]</sup>方法。

#### 1.3.3 胚胎复苏

37℃ 预热 0.25 mol/L 与 0.75 mol/L 蔗糖解冻液,冻存管取出后迅速拧开盖子倒出液氮并静置 10 s,加入 1 mL 0.75 mol/L 蔗糖解冻液轻轻吹吸,捡取胚胎后移入 0.25 mol/L 蔗糖解冻液平衡 3~5 min,待卵裂球恢复扩展后移入 M16 培养。

#### 1.3.4 胞质注射

将 25 ng/ $\mu$ L Cas9 mRNA 和 10 ng/ $\mu$ L sgRNA (注射稀释物稀释)混合,空白对照为注射稀释物,置于冰盒上备用。室温下 50 枚/批移入 M2 操作液,显微操作仪辅以电动气压注射泵胞质注射 Cas9 样品,目测针尖前轻微膨胀即可停止,以此反复。

#### 1.3.5 胚胎培养

所有操作后的胚胎需在 M16 培养液(每滴 30  $\mu$ L)中洗涤 3 遍,再 30 枚/滴培养,14 h 后统计 2 细胞发育率。

#### 1.3.6 形态观察

复苏后胚胎出现透明带脱落、撕裂、胞质溶解、

萎缩、碎裂视为死亡,注射后 30 min 胚胎胞质出现溶解萎缩视为死亡,受精卵未发育、卵裂球不均匀计入发育率。

1.4 统计学方法

应用 IBM SPSS Statistics 19.0 统计软件进行分析,两样本率的比较采用  $\chi^2$  独立性检验,以  $P < 0.05$  为差异有显著性。

2 结果

2.1 原核胚与 2 细胞胚的冷冻与复苏效果比较

原核胚冷冻回收率为 92.5% (111/120),培养 30 min 后存活率 92.8% (100/111)。2 细胞冷冻冷冻回收率为 90.5% (96/106),培养 30 min 后存活率为 95.8% (92/96)。结果表明,原核胚冷冻的回收率、存活率达到 90.5% 和 95.8%。与 2 细胞对照组(92.5%、92.8%)差异无显著性( $P > 0.05$ )。

2.2 胞质显微注射对冻融原核胚的影响

在室温(23℃)下显微注射 Cas9,新鲜胚胎组存活率、发育率分别为 93.6% (103/110) 和 98.0% (101/103);冻融组分别为 82.6% (133/161) 和 98.4% (62/63);空白新鲜组分别为 97.5% (39/40) 和 100% (39/39);空白冻融组分别为 92% (46/50) 和 97.8% (45/46)。新鲜组发育率为 100% (44/44),冷冻组发育率为 97.3% (37/38)。冻融原核胚注射存活率与各组差异有显著性( $P < 0.05$ ),发育率各组差异无显著性( $P > 0.05$ )(表 1)。

3 讨论

小鼠 IVF 技术在小鼠扩繁,种资源保存、品系恢复等生产实验中广泛应用,较自然交配具有受精时间统一、受精率高等优点,IVF 受精卵正在被越来越多的基因编辑实验用于显微注射。但长时间的受精过程对显微注射及胚胎移植工作影响很大,造成工作效率低下,且原核胚的雌雄原核非常小,无法达到原核注射类的实验要求,而原核胚复苏后 2 h 雌雄原核非常接近,核腔膨大。利用胚胎冷冻技术可以自由切换原核胚的发育起始时间,根据实验量调整复苏数量有效的避免实验资源的浪费。

原核胚复苏存活率虽然与 2 细胞复苏率无显著差异,但原核胚个体较大,完全套用 2 细胞冷冻程序容易造成脱水不彻底,形成的冰晶会对胚胎造成伤害,复苏时也无法快速恢复形态<sup>[13,14]</sup>,移入培养液后的渗透压差会造成急速膨胀而死亡,原核胚冷冻复苏过程的相关参数还需要进一步的摸索。此外,每管冷冻数目以及复苏时枪头口的形态、吹吸力度等操作因素对冷冻效果也有很大的影响。

近年来,基因编辑技术发展迅速,随着 Cas9 技术的诞生,基因编辑技术也变得简单易行,多数实验经胞质注射就能完成基因编辑工作<sup>[15]</sup>,对胚胎的机械损伤也小。在本实验中,冷冻后的原核胚注射质感要差于新鲜组,分析认为可能是透明带韧性降低,需增加穿刺力度,对胚胎造成一定挤压,导致成

表 1 显微注射后原核胚的存活率与发育率对比  
Tab.1 Comparison of the survived rate and development rate of the microinjected pronuclear embryos

| 组别<br>Groups                                   | 注射数/枚<br>Number of injected<br>/eggs | 存活数/枚<br>Number of survived<br>/eggs | 存活率/%<br>Survivla rate | 培养数/枚<br>Number of cultivated<br>/eggs | 2 细胞数/枚<br>Number of 2-cell<br>embryos /eggs | 发育率/%<br>Development<br>rate |
|------------------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|------------------------|----------------------------------------|----------------------------------------------|------------------------------|
| 新鲜组 Cas9 注射<br>Cas9 injected fresh embryos     | 110                                  | 103                                  | 93.6                   | 103                                    | 101                                          | 98                           |
| 新鲜组空白注射<br>Injected blank fresh embryos        | 40                                   | 39                                   | 97.5                   | 39                                     | 39                                           | 100                          |
| 新鲜组培养<br>Cultivated fresh embryos              | /                                    | /                                    | /                      | 44                                     | 44                                           | 100                          |
| 冷冻组 Cas9 注射<br>Cas9 injected recovered embryos | 161                                  | 133                                  | 82.6*                  | 63                                     | 62                                           | 98.4                         |
| 冷冻组空白注射<br>Injected blank recovered embryos    | 50                                   | 46                                   | 92                     | 46                                     | 45                                           | 97.8                         |
| 冷冻组培养<br>Cultivated recovered embryos          | /                                    | /                                    | /                      | 38                                     | 37                                           | 97.3                         |

注:与新鲜空白注射组相比,\* $P < 0.05$ 。  
Note. Compared with the injected blank fresh embryo group,\* $P < 0.05$ .

活率显著差异,另外,在本实验中,注射样品的不同对存活率也有一定的影响,但无显著性差异( $P > 0.05$ ),且注射存活率均在 60% 以上,存活率正常<sup>[3]</sup>,注射后发育率无显著差异。本实验冻存组注射成活率虽然略低于新鲜组,但整体数据证明冷冻原核胚可以作为 IVF 胚胎显微注射的优化步骤,将有助于调整工作时间,促进实现无雄鼠化(配种笼),减少动物饲养量。

参考文献:

[ 1 ] Takeo T,Nakagata N. Mouse sperm cryopreservation and effective embryo production using cryopreserved C57BL/6 mouse sperm [J]. J Mamm Ova Res,2010,27(2010):70-78.

[ 2 ] 路佩瑶,张春香,岳文斌. 超数排卵在哺乳动物中的应用[J]. 山西农业科学,2009,37(5):84-87.

[ 3 ] 孙青原,陈大元. 小鼠胚胎操作实验手册[M]. 北京:化学工业出版社,2006.

[ 4 ] Riggs R, Mayer J, Dowling-Lacey D, et al. Does storage time influence postthaw survival and pregnancy outcome? An analysis of 11,768 cryopreserved human embryos[J]. Fertil Steril,2010,93(1):109-115.

[ 5 ] Wirleitner B,Vanderzwalmen P,Bach M,et al. The time aspect in storing vitrified blastocysts: its impact on survival rate, implantation potential and babies born[J]. Hum Reprod,2013,28(11):2950-2957.

[ 6 ] Takahashi R,Hirabayashi M,Ueda M. Production of transgenic rats using cryopreserved pronuclear-stage zygotes [J]. Transg

Res,1999,8(5):397-400.

[ 7 ] Leibo SP, DeMayo FJ, O'malley B. Production of transgenic mice from cryopreserved fertilized ova [J]. Mol Reprod Dev, 1991,30(4):313-319.

[ 8 ] Bagis H,Odaman H,Sagirkaya H,et al. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos [J]. Mol Reprod Dev,2002,61(2):173-179.

[ 9 ] 曾文滔,张爱华,吕萌,等. 调整精卵交汇时间提高 C57 BL/6J 小鼠超数排卵的受精率[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(12):27-30.

[10] 马元武,马婧,路迎冬,等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1(Irsl) 基因[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(3):55-60.

[11] 董婉维,周生来. FVB 小鼠超排卵及胚胎冷冻技术的研究[J]. 中国比较医学杂志,2006,16(11):652-654.

[12] 梁洋,杜文敬,王春生,等. 小鼠早期胚胎的 EFS20/40、EFS40、DAP213 和 GP25 玻璃化法冷冻保存[J]. 江西农业大学学报,2010,32(6):1248-1252.

[13] 徐勇,张嘉保. 哺乳动物胚胎超低温冷冻保存的研究进展[J]. 黑龙江动物繁殖,2001,9(1):15-17.

[14] 左琴,岳秉飞,刘双环,等. 近交系小鼠胚胎玻璃化冷冻技术研究[J]. 中国比较医学杂志,2001,11(2):82-84.

[15] Mali P,Yang L,Esvelt KM,et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339 (6121): 823-826.

[ 收稿日期 ]2016-12-05

专家问答

问:对于活体成像的定量方式,现有的单位是否可以简化? 比如单位面积对应的信号强度? 如何计算肿瘤特异部位和正常对照部位的荧光强度比值? 我们曾经尝试选出一个肿瘤区域和一个背景区域,用这两个数值的比值去代替,不知道是否合理?

答:我们可以圈选两个 ROI 值(region of interest),如果这两个 ROI 值信号采集的时间是一样的,圈选范围的面积、大小和形状也是一致的,那就变得简单多了,就只需要看光子数量,也就是说可以根据光子数量代表的信号强度来直接进行这样的量化对比。

(感谢第四军医大学 师长宏 教授和冷泉港生物科技股份有限公司分子影像部门副总经理 王志宇 先生的解答)