

猪抑制素多克隆抗体对 C57BL/6J 小鼠超数排卵的增效作用

赵赫, 张涛, 李丽, 肖宇宙, 安学芳, 张帆

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430070)

[摘要] **目的** 制备兔抗猪抑制素多肽偶联钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 多克隆抗体, 探究其对 C57BL/6J 小鼠超数排卵的影响。**方法** 将人工合成的猪抑制素多肽偶联 KLH 蛋白免疫新西兰白兔, 制备抗抑制素血清 (anti-inhibin serum, AIS, 即抑制素多克隆抗体)。将纯化后的 AIS 联合孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 经腹腔注射雌性 C57BL/6J 小鼠, 48 h 后再注射人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) 诱导超数排卵, 15 h 后收集并计数超数排卵获得的卵母细胞数; 在体外受精 24 h 后检测 2-细胞期胚胎数。**结果** 将 KLH 免疫新西兰白兔后制备 AIS, 采用间接 ELISA 法测定 AIS 效价, 结果显示其效价可达 1:512 000; AIS 经硫酸铵沉淀法纯化后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析, 结果显示在分子量为 50 kDa 及 25 kDa 处均出现了清晰可见的条带, 符合免疫球蛋白 G 抗体亚型重链和轻链的理论分子量大小, 表明成功制备出猪抑制素多克隆抗体。与常规超数排卵方法相比, AIS 10 倍稀释联合 PMSG 处理可以显著增加小鼠超数排卵产生的卵母细胞数量 ($P < 0.05$), 约为常规 PMSG 处理的 1.5 倍。**结论** 本研究制备的猪抑制素多克隆抗体作为改良超数排卵试剂, 可以提高 C57BL/6J 小鼠的超数排卵效果, 在后续的市场应用中有较大前景。

[关键词] 抗猪抑制素血清; C57BL/6J 雌性小鼠; 超数排卵; 卵母细胞数; 2-细胞期胚胎数

[中图分类号] Q95-33; S865.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2026)02-0271-08



Enhancement Effect of Porcine Inhibin Polyclonal Antibody on Superovulation in C57BL/6J Mice

ZHAO He, ZHANG Tao, LI Li, XIAO Yuzhou, AN Xuefang, ZHANG Fan

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430070, China)

Correspondence to: ZHANG Fan (ORCID: 0009-0002-4393-3081), E-mail: zhangf@wh.iov.cn

[ABSTRACT] **Objective** To prepare rabbit anti-porcine inhibin polypeptide-keyhole limpet hemocyanin (KLH) conjugated polyclonal antibody and evaluate its effect on superovulation in C57BL/6J mice.

Methods New Zealand white rabbits were immunized with a synthesized porcine inhibin polypeptide conjugated with KLH to produce anti-inhibin serum (AIS, i.e., inhibin polyclonal antibody). Female C57BL/6J mice received intraperitoneal injections of purified AIS in combination with pregnant mare serum gonadotropin (PMSG), followed by human chorionic gonadotropin (hCG) after 48 hours to induce superovulation. Oocytes obtained from superovulation were collected and counted 15 hours post-hCG administration, and the number of 2-cell embryos was assessed 24 hours after in vitro fertilization.

Results AIS prepared by immunizing New Zealand White rabbits with KLH-conjugated porcine inhibin polypeptide was subjected to titer determination by indirect ELISA, showing titers reaching 1:512 000. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis analysis of ammonium sulfate-purified AIS revealed distinct 50 kDa and 25 kDa bands corresponding to the theoretical molecular weights of IgG antibody heavy and light chains, confirming successful production of porcine inhibin polyclonal antibody. Compared with conventional superovulation methods, AIS diluted 10-fold combined with PMSG significantly increased the number of

[基金项目] 国家重点研发计划“基础科研条件与重大科学仪器设备研发”重点专项“实验动物质量精准监管与安全性评价关键技术研究”(2024YFF0728800); 湖北省科技厅项目“基因工程小鼠辅助生殖关键试剂优化及质量控制研究”(2025CFC022)

[第一作者] 赵赫 (1987—), 男, 硕士, 实验师, 主要从事基因工程小鼠管理工作。E-mail: zhaohe@wh.iov.cn。ORCID: 0009-0001-2390-1018

[通信作者] 张帆 (1985—), 男, 硕士, 高级实验师, 主要从事实验动物质量控制与管理工作。E-mail: zhangf@wh.iov.cn。ORCID: 0009-0002-4393-3081

oocytes obtained from superovulation in mice ($P < 0.05$) by approximately 1.5-fold. **Conclusion** Porcine inhibin polyclonal antibody, as an improved superovulation reagent, can improve superovulation efficiency in C57BL/6J mice, and shows promising prospects for future applications.

[Key words] Porcine anti-inhibin serum; C57BL/6J female mice; Superovulation; Oocyte number; Number of 2-cell embryos

抑制素是由 α 亚基和 β 亚基通过二硫键共价连接而成的异二聚体糖蛋白激素, 根据 β 亚基亚型的不同可分为抑制素A和抑制素B两种^[1]。在雌性动物体内, 卵巢颗粒细胞可以分泌抑制素A和抑制素B, 它们在生殖周期中均发挥重要作用; 而在雄性动物体内, 睾丸支持细胞仅分泌抑制素B, 抑制素B在精子发育周期中发挥重要作用^[2]。雌性动物体内, 卵泡的发育和成熟依赖于卵泡刺激素 (follicle-stimulating hormone, FSH), FSH的分泌受激活素的调控, 而抑制素可以通过与细胞表面的II型激活素受体结合来降低激活素的活性, 进而影响垂体分泌FSH, 因此抑制素和FSH在机体中呈现负相关关系^[3]。国内外学者研究发现, 利用抗抑制素血清 (anti-inhibin serum, AIS) 可中和动物体内的抑制素活性, 从而增加动物的排卵数。大动物 (如奶牛^[4]、山羊^[5]、马^[6]等) 主动免疫AIS后, 它们体内的卵泡数和排卵数均明显升高; 实验动物 (如小鼠^[7]、大鼠^[8-9]等) 也作为模型动物用于主动免疫AIS改进超数排卵方法的研究, 目前该效果已在C57BL/6J小鼠^[10]、BALB/c小鼠^[11-12]等多个品系中得到验证。在基因工程小鼠胚胎移植实验中, 超数排卵能够获得的卵母细胞数往往是决定实验成败的关键^[13]。有研究表明, 使用AIS联合孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG) 进行促排可以有效改良超数排卵效果, 获得的卵母细胞数量是常规超数排卵方法的2~3倍, 并且对卵母细胞的质量和胚胎发育均无不良影响^[7]。因此, AIS在优化小鼠超数排卵方案方面有着理想的应用前景。

在AIS制备中, 常见的免疫原主要有3种: 从性腺提取的抑制素、真核或原核表达的抑制素亚基和人工合成的抑制素多肽段^[7, 14-15]。其中人工合成抑制素多肽段具有制备过程简单、批次间质量稳定的特点。在多肽氨基酸序列的选择上, 抑制素 α 亚基的氨基酸序列在不同物种间高度保守 (同源性在98%以上)^[16-17], 因此多选择抑制素 α 亚基N端第1~30位的氨基酸序列制备多肽抗原, 其抗体理论上可以中和不同物种体内的抑制素。如Wang等^[7]使用猪抑制素多肽免疫山羊获得的AIS, 能够中和C57BL/6J小鼠体内的抑制素,

从而达到超数排卵效果。

目前, 基于AIS研发的高效超数排卵试剂在国内市场上具有较广泛的应用前景。国际市场上由日本Cosmo Bio公司出售的CARD HyperOva高效超数排卵试剂虽处于领先地位, 但价格过高。为填补国内高效超数排卵试剂的市场空白, 研发经济实用、性能稳定的超数排卵试剂, 并满足科研与应用需求, 本研究采用猪抑制素多肽偶联钥孔血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 免疫家兔的方法制备AIS, 探索一种新型AIS制备途径, 并在雌性C57BL/6J小鼠体内评价其超数排卵效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2月龄普通级雌性新西兰白兔1只, 体重约2 kg, 购自武汉市万千佳兴生物科技有限公司 [SCXK (鄂) 2021-0011, 质量合格证号为422355503328700001]。SPF级雌性C57BL/6J小鼠15只, 3~5周龄, 体重为10~14 g, 购自广东药康生物科技有限公司 [SCXK (粤) 2020-0054, 质量合格证号为44836900004147]。SPF级雌性C57BL/6J小鼠12只, 4周龄, 体重为10~14 g, 购自广东药康生物科技有限公司 [SCXK (粤) 2020-0054, 质量合格证号为448247000 45817]; SPF级雄性C57BL/6J小鼠2只, 8周龄, 体重为22~24 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司湖北分公司 [SCXK (鄂) 2022-0030, 质量合格证号为42202360000 9981]。实验动物饲养及操作在中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心 [SYXK (鄂) 2022-0131] 屏障环境中开展, 12 h/12 h明暗交替, 相对湿度40%~70%, 室温22~24 °C, 自由饮水与摄食。本实验中所有操作均符合中国科学院武汉病毒研究所实验动物相关管理制度要求, 所有动物实验均已通过中国科学院武汉病毒研究所科学研究伦理审查委员会审查 (批号WIVAF30202401)。

1.2 主要试剂与仪器

注射用PMSG (批号B240608) 及人绒毛膜促性腺激素 (human chorionic gonadotropin, hCG) (批号S240

201) 购自宁波三生生物科技股份有限公司; 小鼠体外受精培养液 (批号 53241222) 及精子获能液 (批号 53241226) 购自南京南晶生物技术有限公司; M2 培养基 (批号 0000256724)、弗氏完全佐剂 (批号 SLCQ7622) 和弗氏不完全佐剂 (批号 0000324832) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 饱和硫酸铵溶液 (批号 SL34212301) 购自北京酷来博科技有限公司; PBS (pH=6.8, 批号 P24111345564) 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (批号 0720A23) 和辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (immunoglobulin G, IgG) 多克隆抗体 (货号 A0208) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; Tween-20 (货号 ST825) 购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 小鼠超数排卵试剂 CARD HyperOva (货号 19-2) 购自日本 Cosmo Bio 公司; 舒泰[®] 50 (货号 83887905) 购自法国 Virbac 公司; One-Step PAGE Gel Fast Preparation Kit (货号 E303-01) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。12×F8 可拆高结合力透明酶标板 (货号 504201) 购自无锡耐思生命科技股份有限公司; biosharp 透析袋 (货号 BS-QT-021) 购自杭州博日科技有限公司。

洁净工作台 (型号 SW-CJ-1BU) 购自苏州安泰空气技术有限公司; 二氧化碳培养箱 (型号 HERAcCell Vios 160i) 和 NanoDrop 超微量分光光度计 (型号 NanoDrop 2000) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 体式显微镜 (型号 MZ101) 购自广州市明美光电技术有限公司; 高速台式离心机 (型号 HT120) 购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 酶标仪 (型号 EPOCH2) 购自美国 BioTek Instruments 公司; 医用冷藏冷冻箱 (型号 HYCD-290) 和医用冷藏箱 (型号 HYC-920) 购自青岛海尔生物医疗股份有限公司; 电子天平 (型号 CN-LPC6002) 购自昆山优科维特电子科技有限公司; 小动物麻醉机 (型号 TAJI-IE) 购自深圳市瑞沃德生命科技股份有限公司。

1.3 AIS 制备

根据文献^[9]报道, 并结合生物信息学分析, 使用 DNASTar 软件对抑制素 α 亚基氨基酸序列进行综合预测分析, 最终以抑制素 α 亚基第 216~232 位多肽偶联 KLH (以下简称“抑制素多肽”) 作为免疫原 [多肽合成及 KLH 偶联工作由福来德生物科技 (武汉) 有限公司完成] 免疫新西兰白兔, 制备多克隆抗体。首次免疫采用腭淋巴结内注射+足底皮下注射的方式, 将 750 μ L 抗

原 (含抑制素多肽 600 μ g) 与等体积弗氏完全佐剂充分乳化后, 于兔两侧腭淋巴结各注射 600 μ L, 两侧足底皮下各注射 150 μ L; 间隔 2 周后进行第 2、3 次加强免疫, 加强免疫采用背部皮下多点注射的方式, 将 750 μ L 抗原 (含抑制素多肽 600 μ g) 与等体积弗氏不完全佐剂充分乳化后, 背部皮下多点注射 (总体积 100~150 μ L), 每次 5~6 个位点; 第 3 次免疫 1 周后, 于耳缘静脉采血检测抗体效价; 效价达到预期要求 (1/100 000) 后, 使用舒泰[®] 50 肌肉注射 (20 mg/kg) 麻醉兔, 手术颈动脉插管取全血后分离血清, 获得 AIS 原液。动物尸体冻存后交由专业环保公司进行无害化处理。

1.4 AIS 效价检测

采用 ELISA 方法检测 AIS 的效价, 设置空白对照孔、阴性对照孔和样品孔。用 0.02 mol/L 的 PBS (pH=6.8) 将抑制素多肽稀释至 1 μ g/mL, 按 100 μ L/孔包被 96 孔微孔板, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 弃去孔内液体, 随后将酶标板倒扣于吸水纸上轻轻拍打甩干, 用 PBST (含有 0.1% Tween-20 的 PBS) 洗涤 3 次, 再用 1% 的牛血清白蛋白封闭, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h; 弃去孔内液体, 甩干后用 PBST 洗涤 3 次, 将 AIS 初始稀释 1 000 倍后, 进行 2 倍梯度稀释; 空白对照孔加入 100 μ L PBST, 阴性对照孔加入 100 μ L 免疫前兔阴性血清, 样品孔分别加入 100 μ L 梯度稀释的 AIS 样本, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 弃去孔内液体, 甩干后用 PBST 洗涤 3 次, 每孔加入 1:1 000 稀释的羊抗兔 IgG-HRP, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min; 弃去孔内液体, 甩干后用 PBST 洗涤 3 次, 每孔再加入显色底物 50 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 10 min; 每孔加入 50 μ L 的终止液终止反应; 用酶标仪测定各孔在 450 nm 波长处的吸光度 (A) 值。采用 P/N 比值法计算抗体效价, 计算公式为 P/N 比值=免疫后血清 $A_{450\text{nm}}$ /免疫前血清 $A_{450\text{nm}}$, 以 P/N \geq 2.1 为阳性判定标准。

1.5 AIS 纯化及鉴定

使用硫酸铵沉淀法纯化 AIS: 在兔血清中逐滴缓慢加入饱和硫酸铵并充分搅拌均匀, 直至兔血清与饱和硫酸铵的体积比为 1:1 (50% 饱和度), 随后 4 $^{\circ}$ C 静置过夜; 4 $^{\circ}$ C, 900 \times g 离心 15 min, 弃上清液, 用与兔血清初始体积相同的 PBS 溶解沉淀; 再逐滴缓慢加入 1/2 体积的饱和硫酸铵, 4 $^{\circ}$ C, 900 \times g 离心 15 min, 弃上清液, 收集沉淀, 用与初始兔血清体积相同的 PBS 充分溶解沉淀, 将溶液加入透析袋, 于 4 $^{\circ}$ C 用 PBS 进行透析, 每隔 2 h 更换一次透析液, 透析 8 h 以充分去除硫

酸铵。收集透析后的溶液，并通过SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析AIS纯度，分离胶质量浓度为12%。

1.6 小鼠验证实验

1.6.1 不同超数排卵方法对3~5周龄C57BL/6J小鼠超数排卵效果的影响实验

将15只3~5周龄的雌性C57BL/6J小鼠随机分为5组，分别为A1-1（AIS原液）组、A1-2（AIS 100倍稀释）组、A1-3（AIS 10 000倍稀释）组、P1（PMSG）组和H1（HyperOva）组，每组3只；另有1只雄性C57BL/6J小鼠用于采集精子以进行体外受精。实验首日，对A1-1组、A1-2组和A1-3组小鼠腹腔注射100 μ L AIS和100 μ L（10 U）PMSG的混合液，对P1组小鼠腹腔注射200 μ L（10 U，此前尝试较低剂量时的超数排卵效果不理想）PMSG，对H1组小鼠腹腔注射100 μ L CARD HyperOva；48 h后，对5组小鼠各腹腔注射200 μ L hCG（10 U）进行诱导排卵。注射hCG 15 h后，采集每组小鼠两侧输卵管的卵母细胞，同时取雄鼠附睾中精子，进行体外受精；体外受精24 h后，在体式显微镜下计数每组小鼠的受精2-细胞期胚胎数及未受精卵母细胞数。

1.6.2 不同超数排卵方法对4周龄C57BL/6J小鼠超数排卵效果的影响实验

将12只4周龄的雌性C57BL/6J小鼠随机分为A2-1（AIS原液）组、A2-2（AIS 10倍稀释）组、P2（PMSG）组和H2（HyperOva）组4组，每组3只；另有1只雄性C57BL/6J小鼠用于采集精子以进行体外受精。实验首日，A2-1组、A2-2组腹腔注射100 μ L AIS和100 μ L（10 U）PMSG的混合液，对P2组小鼠腹腔注射200 μ L PMSG，对H2组小鼠腹腔注射100 μ L CARD HyperOva；48 h后，对4组小鼠各腹腔注射200 μ L（10 U）hCG进行诱导排卵。注射hCG 15 h后，采集每组小鼠两侧输卵管的卵母细胞，同时采集雄鼠附睾精子进行体外受精；体外受精24 h后，在体式显微镜下计数每组小鼠的2-细胞期胚胎数以及未受精卵母细胞数。

1.7 统计学分析

使用GraphPad Prism 6软件对实验结果进行统计分析，所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。由于样本量较小（ $n=3$ ），本研究未对数据进行正态性检验，仅进行方差齐性检验。数据经方差齐性检验确认方差齐后，多组间比较采用单因素方差分析，随后使用Tukey检验进行两两比较，两组间特定比较采用非配对 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制素 α 亚基优势抗原表位的生物信息学筛选结果

利用DNASar软件对抑制素 α 亚基进行生物信息学分析，结果显示，第216~232位氨基酸区域具有较高的结构柔性、表面可及性与亲水性，且抗原性指数显著高于其他区域，具备优良的抗原表位特征。因此，选取该区域氨基酸序列（HTRARPPSGGERARRSTC，分子量为1995.19 Da）为免疫原（图1），委托武汉福来德生物科技有限公司合成多肽。

2.2 兔抗抑制素多克隆抗体的制备及抗体效价检测结果

ELISA结果显示（表1），兔血清在1:512 000稀释度下，P/N比值 ≥ 2.1 ，满足阳性判定标准，故最终测得兔抗抑制素血清效价为1:512 000。

2.3 AIS蛋白纯化与SDS-PAGE鉴定

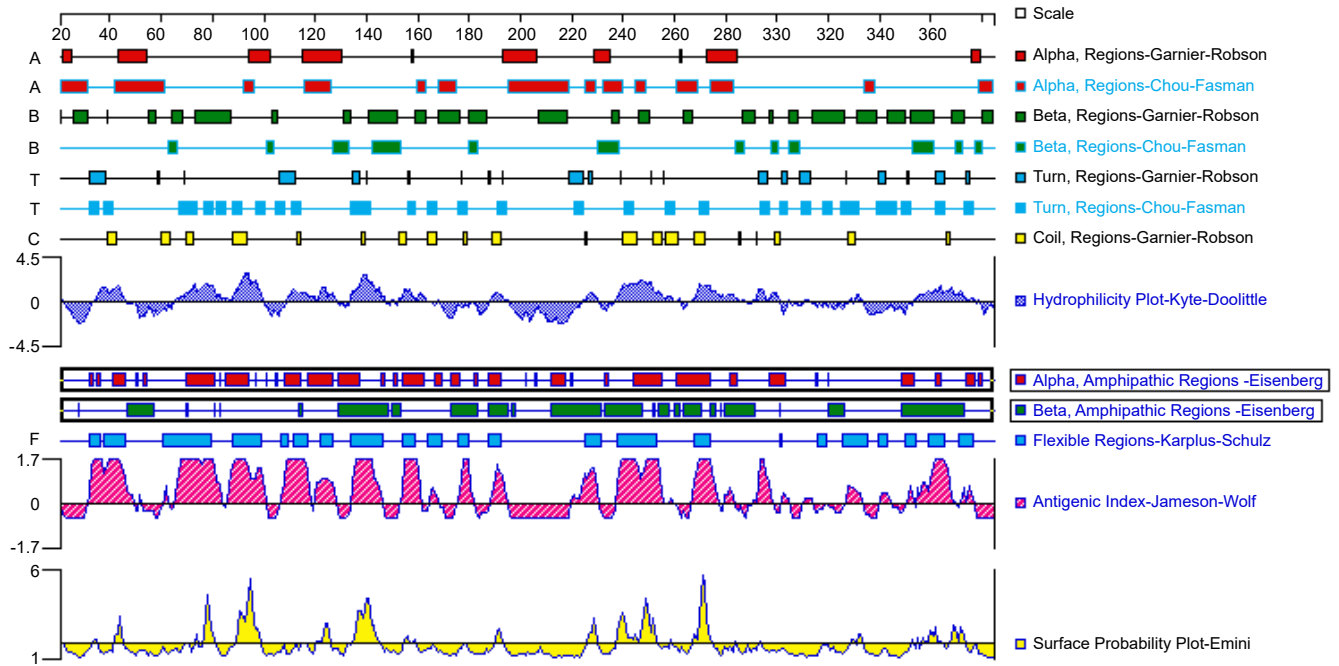
采用饱和硫酸铵法对AIS进行纯化，使用NanoDrop测定纯化后的蛋白质量浓度为25.8 mg/mL。取纯化后的AIS蛋白（稀释至1 mg/mL）以及HyperOva各5 μ L，进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结果（图2）显示，在分子量50 kDa及25 kDa处均出现了清晰的条带，它们分别符合抗体重链和轻链的大小。

2.4 不同稀释浓度AIS对3~5周龄C57BL/6J小鼠超数排卵效果的初步探索

如图3所示，A1-1组小鼠的卵母细胞数显著高于A1-2组和P1组（ $P<0.01$ ），表明AIS原液的促排效果优异；A1-3组与P1组的卵母细胞数无显著差异（ $P>0.05$ ），表明AIS高稀释倍数下排卵效果减弱；A1-1组与H1组无显著性差异（ $P>0.05$ ），表明二者促排效果相当。另外，与卵母细胞数变化趋势相似，A1组小鼠的受精2-细胞期胚胎数显著高于P1组（ $P<0.05$ ），但H1组的受精2-细胞期胚胎数与A1-1组、A1-2组、P1组相比均无显著性差异（ $P>0.05$ ）。以上结果表明，AIS的促排效果具有剂量依赖性：AIS原液的促排效果最优，随着稀释倍数增加，卵母细胞数和2-细胞期胚胎数呈下降趋势。因此，下次实验不再对AIS进行过高的稀释。

2.5 不同稀释浓度AIS对4周龄C57BL/6J小鼠超数排卵效果的验证结果

如表2所示，A2-2组的卵母细胞数为（52.67 \pm



注: Alpha, α-螺旋; Beta, β-折叠; Turn, 转角; Coil, 无规卷曲。
 Note: Alpha, α-helix; Beta, β-sheet; Turn, turn; Coil, random coil.

图1 基于DNASar的抑制素α亚基二级结构与抗原表位的生物信息学分析

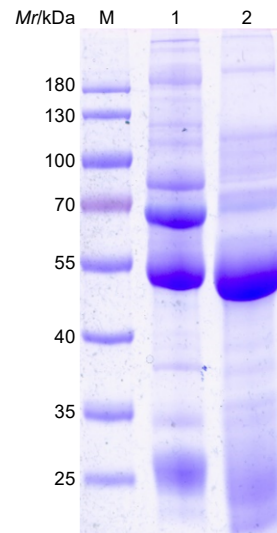
Figure 1 Bioinformatics analysis of secondary structure and antigenic epitopes of inhibin α-subunit based on DNASar

表1 抑制素抗体效价检测结果

Table 1 Results of anti-inhibin antibody titer detection

($A_{450\text{nm}}$)			
稀释浓度 Dilution ratio	免疫前血清 Pre-immune serum	免疫后血清 Post-immunization rabbit serum	PBST对照 PBST control
1:1 000	0.086	2.106	0.070
1:2 000	0.096	2.083	0.068
1:4 000	0.086	2.033	0.069
1:8 000	0.087	2.005	0.071
1:16 000	0.076	1.139	0.069
1:32 000	0.060	1.187	0.067
1:64 000	0.075	1.067	0.067
1:128 000	0.082	1.008	0.066
1:256 000	0.073	0.761	0.065
1:512 000	0.071	0.548	0.067
1:1 024 000	0.073	0.573	0.069
Blank	0.075	0.239	0.067

3.06) 枚, 显著高于P2组 [(36.00±5.29) 枚, $P < 0.05$], 约为P2组的1.5倍; A2-2组的卵母细胞数与H2组 [(63.00±6.00) 枚] 相比无显著性差异 ($P > 0.05$), 说明二者促排效果接近; A2-1组的卵母细胞数为(22.67±3.51) 枚, 与A2-2组相比显著降低 ($P <$



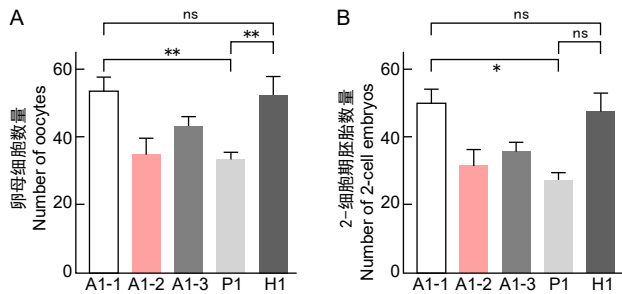
注: M, 蛋白 marker; 泳道1, AIS纯化蛋白; 泳道2, HyperOva 高效超数排卵试剂。

Note: M, protein marker; lane 1, the purified protein of AIS; lane 2, HyperOva high-efficiency superovulation reagent.

图2 抑制素抗体的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Figure 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of inhibin antibody

0.05), 推测高浓度AIS可能对4周龄C57BL/6J小鼠排卵具有抑制作用。A2-2组的2-细胞期胚胎数为



注：不同处理方法下小鼠超数排卵的卵母细胞数量 (A) 和 2-细胞期胚胎数量 (B)。A1-1, AIS 原液组; A1-2, AIS 100 倍稀释组; A1-3, AIS 10 000 倍稀释组; P1, PMSG 组; H1, HyperOva 组。n=3, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; $^{ns}P > 0.05$ 。

Note: Number of oocytes (A) and 2-cell stage embryos (B) in mice with superovulation under different treatments. A1-1, AIS stock solution group; A1-2, AIS 100-fold dilution group; A1-3, AIS 10 000-fold dilution group; P1, PMSG group; H1, HyperOva group. n=3, ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$; $^{ns}P > 0.05$.

图3 不同超数排卵方法对3~5周龄C57BL/6J小鼠卵母细胞数和2-细胞期胚胎数的影响

Figure 3 Effects of different superovulation methods on the number of oocytes and the number of 2-cell embryos in C57BL/6J mice aged 3 to 5 weeks

表2 不同超数排卵方法对4周龄C57BL/6J小鼠卵母细胞数以及2-细胞期胚胎数的影响

Table 2 Effects of different superovulation methods on the number of oocytes and 2-cell embryos in 4-week-old C57BL/6J mice

组别	卵母细胞总数	2-细胞期胚胎总数
Group	Total number of oocytes	Total number of 2-cell embryos
A2-1	22.67±3.51	14.00±3.61
A2-2	52.67±3.06 ^{abc}	47.67±2.52 ^{abc}
P2	36.00±5.29	31.00±5.57
H2	63.00±6.00 ^a	47.67±5.51 ^a

注：^a与P2组相比， $P < 0.05$ ；^b与A2-1组相比， $P < 0.05$ ；^c与H2组相比， $P > 0.05$ 。n=3；A2-1组，AIS原液组；A2-2组，AIS 10倍稀释组；P2组，PMSG组；H2组，HyperOva组。

Note: ^acompared with the P2 group, $P < 0.05$; ^bcompared with the A2-1 group, $P < 0.05$; ^ccompared with the H2 group, $P > 0.05$. n=3; A2-1 group, AIS stock solution group; A2-2group, AIS 10-fold dilution group; P2 group, PMSG group; H2 group, HyperOva group.

(47.67±2.52) 枚，与H2组 [(47.67±5.51) 枚] 相比无显著性差异 ($P > 0.05$)，但均显著高于P2组 [(31.00±5.57) 枚, $P < 0.05$]; A2-1组的2-细胞期胚胎数为 (14.00±3.61) 枚，显著低于P2组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

超数排卵技术是提高动物生产繁殖能力的有效手段，已被广泛应用于动物生产与繁殖领域。该技术已成功应用于多种实验动物进行超数排卵，包括不同品种品系的小鼠、大鼠和豚鼠等实验动物^[18]。在基因工程小鼠的胚胎移植技术中，往往使用超数排卵手段来获取大量的卵母细胞，从而为后续的实验做准备，其中卵母细胞数量的多少会直接影响实验的成功率^[19]。目前常用的超数排卵方法为联合使用PMSG和hCG，此方法具有普适性，但也有一定的局限性。研究表明，高浓度的PMSG会导致动物体内雌二醇的含量升高^[20]，从而影响排卵后卵母细胞受精、胚胎发育和胚胎着床^[21-24]。为了寻找超数排卵技术的改良方法，研究人员围绕抑制素与FSH之间的负相关调节机制开展了相关探索，发现使用AIS可以中和动物体内抑制素的活性，进而提高动物体内FSH的水平，这是一种有效的超数排卵改良方法，并且此种方法对卵母细胞质量以及后期的胚胎发育无明显不良影响^[7]。本研究基于目前的研究结果，寻求一种新的AIS制备方法，并在C57BL/6J小鼠中验证了AIS的超数排卵效果。本文2.5节结果显示，本研究制备的AIS在对C57BL/6J小鼠进行超数排卵时，A2-2组获得的卵母细胞数约是常规超数排卵方法(P2组)的约1.5倍，显著提高了C57BL/6J雌性小鼠的超数排卵效果，本研究结果可为国内高效超数排卵试剂的研发提供参考。若后续推广应用成功，该方法有望填补国内相关市场的空白。

在常规的超数排卵方法中，不同周龄小鼠对同一激素的应答反应存在差异。有研究表明，21~32日龄的C57BL/6J小鼠经PMSG和hCG联合刺激后可获得较多的卵母细胞^[25]，BALB/c和129背景品系小鼠在未性成熟时的排卵数也较高^[26]。在采用AIS联合PMSG和hCG处理C57BL/6J小鼠的研究中，各周龄小鼠的排卵数量均有提升，但同样具有周龄特异性，其中，4周龄小鼠的排卵数量最高^[27]。

由于新西兰白兔具备免疫应答能力强、实验操作简便、饲养成本低廉以及抗体多样性等显著优势，本研究将其选定为免疫动物^[28]。在免疫原制备过程中，载体蛋白的选择是影响抗体质量的关键因素。相较于常用的BSA和卵清蛋白，KLH凭借其卓越的免疫原性、灵活的偶联特性以及高度的特异性等优势，成为制备小分子半抗原高效抗体理想的载体蛋白^[29]。

本研究在抗体研发策略上进行创新,选取猪源抑制素 α 亚基部分序列合成多肽,并将其与KLH偶联以增强免疫原性。通过免疫新西兰白兔成功制备出兔源AIS。目前,商业化超数排卵试剂HyperOva为山羊来源抗体,其制备周期较长、成本偏高,不利于大范围普及应用;而本研究采用的兔源抗体制备体系具有制备周期短、免疫效率高、生产成本低、动物饲养与管理更为简便等优势,在实验室自制、低成本批量制备及长期稳定供应方面更具潜力,适合在常规实验动物中进行推广和应用。实验结果显示,A2-2组的卵母细胞数与2-细胞期胚胎数均显著高于P2组($P<0.05$),且与H2组无显著差异,从功能上证实本研究制备的兔源AIS对C57BL/6J小鼠具有显著的促排作用,为AIS在小鼠超数排卵中的应用提供了实验依据,标志着本研究的AIS在制备与功能验证方面取得阶段性成果。

但本研究仍存在以下不足之处:在实验动物供应商的选择方面,未统一供应商,不同供应商的小鼠在遗传背景、饲养环境、肠道菌群、体重及生理状态上存在细微差异,可能导致小鼠对激素的敏感性不同,进而影响超数排卵效果,引入个体间差异。因此,在后续研究中会统一动物供应商、周龄、体重及饲养环境,进一步提高实验的稳定性与可重复性。此外,本研究仅观察了特定周龄雌性C57BL/6J小鼠的超数排卵情况,实验仅选取3~5周龄C57BL/6J小鼠,周龄范围较窄。未来将围绕AIS抗体的适用范围、稳定性、纯度验证展开更深入研究,完善不同品系、不同周龄、不同保存条件下的应用数据,为AIS抗体在生殖工程、转基因动物制备及生命科学中的广泛应用提供更翔实、可靠的技术支撑。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究所涉及的所有动物实验方案均已通过中国科学院武汉病毒研究所科学研究伦理审查委员会批准(批号WIVAF30202401)。所有实验操作均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求,按照中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心标准操作规程进行。

All animal experimental protocols involved in this study have been approved by the Institutional Review Board of Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences (CAS) (Approval No. WIVAF30202401), and all experimental operations have been carried out in accordance with the Standard Operating Procedures of the Experimental Animal Center of Wuhan Institute of Virology, CAS and in compliance with the requirements of the relevant laws and regulations on laboratory animals in China.

[作者贡献 Author Contribution]

赵赫负责动物实验,并完成论文初稿撰写;
张涛承担免疫学相关实验操作;
李丽参与动物实验;
肖宇宙负责实验数据采集、图片拍摄及相关软件分析;
安学芳负责对论文撰写指导;
张帆提出本研究方案,并负责获取项目资助和最终手稿核定。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本论文不存在任何单位和个人利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] MAKANJI Y, WALTON K L, WILCE M C, et al. Suppression of inhibin A biological activity by alterations in the binding site for betaglycan[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(24):16743-16751. DOI: 10.1074/jbc.M801045200.
- [2] MAKANJI Y, ZHU J, MISHRA R, et al. Inhibin at 90: from discovery to clinical application, a historical review[J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(5):747-794. DOI: 10.1210/er.2014-1003.
- [3] 马继福, 巴合提·博代, 贾昊天, 等. 抑制素对促卵泡素作用机制的研究进展[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(1):37-41, 126-127. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2022.06.0226.
- [4] MA J F, Bakhet Bodai, JIA H T, et al. Research progress on the mechanism of inhibin on follicle-stimulating hormone[J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2023(1):37-41, 126-127. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2022.06.0226.
- [4] AKAGI S, KANEKO H, NAKANISHI Y, et al. Ovarian response and FSH profile in cows following injection of various doses of inhibin antiserum[J]. *J Vet Med Sci*, 1997, 59(12):1129-1135. DOI: 10.1292/jvms.59.1129.
- [5] SAMIR H, NAGAOKA K, WATANABE G. The stimulatory effect of subluteal progesterone environment on the superovulatory response of passive immunization against inhibin in goats[J]. *Theriogenology*, 2018, 121: 188-195. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.07.031.
- [6] NAMBO Y, KANEKO H, NAGATA S, et al. Effect of passive immunization against inhibin on FSH secretion, folliculogenesis and ovulation rate during the follicular phase of the estrous cycle in mares[J]. *Theriogenology*, 1998, 50(4): 545-557. DOI: 10.1016/s0093-691x(98)00160-5.
- [7] WANG H, HERATH C B, XIA G, et al. Superovulation, fertilization and *in vitro* embryo development in mice after administration of an inhibin-neutralizing antiserum[J]. *Reproduction*, 2001, 122(5): 809-816. DOI: 10.1530/rep. 0.122 0809.
- [8] ISHIGAME H, MEDAN M S, WATANABE G, et al. A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats[J]. *Biol Reprod*, 2004, 71(1):236-243. DOI: 10.1095/biolreprod.104.027789.
- [9] MOCHIDA K, MORITA K, SASAOKA Y, et al. Superovulation with an anti-inhibin monoclonal antibody improves the reproductive performance of rat strains by increasing the pregnancy rate and the litter size[J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):8294. DOI: 10.1038/s41598-024-58611-9.
- [10] TAKEO T, NAKAGATA N. Superovulation using the combined

- administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0128330. DOI: 10.1371/journal.pone.0128330.
- [11] MOCHIDA K, HASEGAWA A, OTAKA N, et al. Devising assisted reproductive technologies for wild-derived strains of mice: 37 strains from five subspecies of *Mus musculus*[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114305. DOI: 10.1371/journal.pone.0114305.
- [12] 顾剑洁, 葛蓉, 徐伟超, 等. 不同超排卵方案对BALB/c小鼠超排卵效果的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(6): 482-484. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.012.
- GU J J, GE R, XU W C, et al. Effect of different superovulation schemes on superovulation in BALB/c mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2017, 37(6): 482-484. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2017.06.012.
- [13] BYERS S L, PAYSON S J, TAFT R A. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs)[J]. *Theriogenology*, 2006, 65(9):1716-1726. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.016.
- [14] 姜勋平, 杨利国, 刘桂琼, 等. 抑制素基因免疫对小鼠生殖的影响[J]. *中国兽医学报*, 2002, 22(4):368-370. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2002.04.018.
- JIANG X P, YANG L G, LIU G Q, et al. Effects of inhibin α (1-32) gene immunization on mouse reproductive traits[J]. *Chin J Vet Sci*, 2002, 22(4):368-370. DOI: 10.16303/j.cnki.1005-4545.2002.04.018.
- [15] 许丹丹, 张敬文, 张健鹏, 等. 驴源马痘疹病毒8型ORF72基因原核表达及多克隆抗体制备[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2023(1):117-121. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2022.03.0196.
- XU D D, ZHANG J W, ZHANG J P, et al. Prokaryotic expression of donkey-derived Equid alphaherpesvirus type 8 ORF72 gene and polyclonal antibody preparation[J]. *Heilongjiang Anim Sci Vet Med*, 2023(1):117-121. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2022.03.0196.
- [16] 韩璐, 宋新辉, 徐佳寅, 等. 基于ferritin纳米载体的抑制素 α 亚基的多克隆抗体的制备[J]. *基因组学与应用生物学*, 2024, 43(5): 877-889. DOI: 10.13417/j.gab.043.000877.
- HAN L, SONG X H, XU J Y, et al. Preparation of polyclonal antibodies based on inhibin α subunits of ferritin nanocarriers[J]. *Genom Appl Biol*, 2024, 43(5):877-889. DOI: 10.13417/j.gab.043.000877.
- [17] 张成云, 曾宪垠. 抑制素免疫在家畜繁殖中的应用[J]. *畜牧兽医杂志*, 2008, 27(2): 35-37. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6704.2008.02.012.
- ZHANG C Y, ZENG X Y. Immunization of inhibin and its application in animal reproduction[J]. *J Anim Sci Vet Med*, 2008, 27(2):35-37. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6704.2008.02.012.
- [18] MUÑOZ I, DEL NIÑO JESUS A, JOSA A, et al. Use of follicle-stimulating hormone (FSH) to increase the in vitro fertilization (IVF) efficiency of mice[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1995, 12(10):738-743. DOI: 10.1007/BF02212903.
- [19] SCOTT L F, SUNDARAM S G, SMITH S. The relevance and use of mouse embryo bioassays for quality control in an assisted reproductive technology program[J]. *Fertil Steril*, 1993, 60(3): 559-568. DOI: 10.1016/s0015-0282(16)56176-7.
- [20] LEGGE M, SELLENS M H. Optimization of superovulation in the reproductively mature mouse[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1994, 11(6):312-318. DOI: 10.1007/BF02215719.
- [21] ERTZEID G, STORENG R, LYBERG T. Treatment with gonadotropins impaired implantation and fetal development in mice[J]. *J Assist Reprod Genet*, 1993, 10(4): 286-291. DOI: 10.1007/BF01204944.
- [22] VAN DER AUWERA I, D'HOOGHE T. Superovulation of female mice delays embryonic and fetal development[J]. *Hum Reprod*, 2001, 16(6):1237-1243. DOI: 10.1093/humrep/16.6.1237.
- [23] EZOE K, DAIKOKU T, YABUUCHI A, et al. Ovarian stimulation using human chorionic gonadotrophin impairs blastocyst implantation and decidualization by altering ovarian hormone levels and downstream signaling in mice[J]. *Mol Hum Reprod*, 2014, 20(11): 1101-1116. DOI: 10.1093/molehr/gau065.
- [24] DENG S R, XU J, ZENG J W, et al. Ovarian stimulation leads to a severe implantation defect in mice[J]. *Reprod BioMedicine Online*, 2013, 27(2):172-175. DOI: 10.1016/j.rbmo.2013.03.018.
- [25] KOLBE T, LANDSBERGER A, MANZ S, et al. Productivity of superovulated C57BL/6J oocyte donors at different ages[J]. *Lab Anim*, 2015, 44(9):346-349. DOI: 10.1038/labana.746.
- [26] GATES A H, BOZARTH J L. Ovulation in the PMSG-treated immature mouse: effect of dose, age, weight, puberty, season and strain (BALB/c, 129 and C129F1 hybrid)[J]. *Biol Reprod*, 1978, 18(3):497-505. DOI: 10.1095/biolreprod18.3.497.
- [27] TAKEO T, MUKUNOKI A, NAKAGATA N. Ovulation of juvenile, mature, and aged female C57BL/6 mice following coadministration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin[J]. *Theriogenology*, 2019, 135:1-6. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.028.
- [28] 王刚, 刘科, 赵伟健, 等. 我国SPF新西兰兔培育和生物学特性研究方面的进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2010, 30(3): 229-232. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2010.03.019.
- WANG G, LIU K, ZHAO W J, et al. Research progress on breeding and biological characteristics of SPF rabbit in China [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2010, 30(3): 229-232. DOI: 10.3969/j.issn.1674-5817.2010.03.019.
- [29] HARRIS J R, MARKL J. Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review[J]. *Micron*, 1999, 30(6): 597-623. DOI: 10.1016/s0968-4328(99)00036-0.

(收稿日期: 2025-06-10 修回日期: 2025-09-11)

(本文编辑: 周培)

引用本文

- 赵赫, 张涛, 李丽, 等. 猪抑制素多克隆抗体对C57BL/6J小鼠超数排卵的增效作用[J]. *实验动物与比较医学*, 2026, 46(2): 271-278. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.088.
- ZHAO H, ZHANG T, LI L, et al. Enhancement effect of porcine inhibin polyclonal antibody on superovulation in C57BL/6J mice[J]. *Lab Anim Comp Med*, 2026, 46(2): 271-278. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2025.088.