

小鼠胚胎移植实验方法^{*}

况 玲 郭庆勇 武聚富 张 慧 袁 龙

(新疆农业大学动物医学学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要:目的 在小鼠胚胎移植实验中除了胚胎的质量外, 希望从受体状况及胚胎移植的技术和方法上摸索出最佳胚胎移植的条件, 提高胚胎移植率, 为临床胚胎移植提供实验和理论数据。方法 从超数排卵或自然发情怀孕 3.5 d 的母鼠子宫内收集胚胎, 在显微镜下观察, 以最快的速度将发育与胚龄一致并且形态完好的胚胎检出, 并移植到自然发情 2.5 d 的小鼠子宫内。结果 超数排卵的胚胎质量比自然发情的胚胎质量差, 在 12 个自然发情的受体中有 3 个怀孕并产下 12 只仔鼠。结论 小鼠胚胎移植与供受体的准备、小鼠的超数排卵、胚胎品质有着密切的关系, 胚胎移植的技术和方法对胚胎移植有着至关重要的关系。

关键词: 小鼠; 胚胎移植; 移植技术

中图分类号: Q954.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-6179(2008)01-0064-03

胚胎移植妊娠率一直是人们关注的焦点, 影响胚胎移植妊娠率的因素众多, 也很复杂。胚胎品质、供受体的发情同步化、移植操作技术水平等与胚胎移植的妊娠率都有直接或间接关系。其中, 胚胎品质的影响较为明显, 而受体因素对胚胎移植妊娠率的影响则较为复杂^[1]。胚胎移植技术尽管在理论上有很好的前景^[2], 但在实际应用中却由于种种原因并未产生所期待的效果, 这与同期发情、超数排卵、胚胎品质和胚胎移植技术等有着重要的关系。我们希望通过小鼠的胚胎移植探讨实验前的准备工作、动物超数排卵、供受体同期发情、胚胎品质、手术操作方法和胚胎移植技术等方面的理论和技术问题。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物: 昆明系小白鼠, 购自新疆医科大学实验动物中心, 5~10 周龄, 体重在 20 g 以上 (SCXK(新)2003~0001)。

1.1.2 试剂: PBS (pH 值为 7.3), 自制; PMSG, 宁波市激素制品有限公司, 生产批号: 030911; HCG, 宁波市激素制品有限公司, 生产批号: 041105; 新生牛血清 (FCS), 杭州四季青生物工程材料有限公司, 生产

批号: 050312。

1.1.3 仪器: 体视显微镜, Motic 公司; 捡卵针及移植针, 自制; 表面皿 $\varnothing 50$ mm, 30 mm; 常规手术器械, 本学院购置; 电子天平, 梅特勒-托利多仪器 (上海) 有限公司; 电热恒温培养箱, 连云港医疗器械设备厂。

1.2 方法

1.2.1 冲卵液的配制: 用改良的杜氏 (Dublecco's) 磷酸盐缓冲液。

1.2.2 胚胎的获取: 实验前, 先进行雌鼠的发情鉴定。选择处于发情盛期的雌鼠与公鼠自然交配, 或选择处于间情后期或发情初期的雌鼠^[3], 用 PMSG 和绒毛膜促性腺激素进行超排处理后, 与公鼠 1:1 合笼。合笼见栓后第 3~3.5 d, 将供体小鼠颈椎脱臼致死, 酒精浸泡消毒, 在解剖盘内剪开腹部皮肤并向上扩创, 显露腹壁肌肉, 再于耻骨前缘剪开肌肉, 拨开内脏, 暴露子宫角。用眼科剪先将子宫角上的脂肪剥离干净。于子宫颈处剪断后, 子宫角连同输卵管和卵巢一起取出, 置与 50 mm 表面皿中。先用 5 号细针头在子宫角和输卵管结合部挑开, 再用注射器抽取 1~2 mL 37℃ 5% FCS PBS 液, 接上特制的平头注射针头, 从子宫体处分别进入两侧子宫角进行冲胚。冲出液体静置片刻后, 在体视显微镜下, 用捡卵针将发育良好的桑椹期和囊胚期的胚胎检出,

收稿日期: 2007-04-30

^{*} 基金项目: 2005 年校青年基金项目。

作者简介: 况 玲 (1962—), 女, 博士, 副教授。研究方向: 临床兽医学、动物胚胎工程学。

放入加有 37℃ 5% FCS PBS 液直径 30 mm 表面皿中,加盖后置于 37℃温箱中待用。

胚胎形态评级参照王敏康等^[4],根据胚胎形态,将其分为 4 级。Ⅰ级:卵裂球对称,胞质无异常,无碎片;Ⅱ级:卵裂球对称或不对称,胞质无异常,碎片<20%;Ⅲ级:卵裂球对称或不对称,碎片为 20%~50%;Ⅳ级:卵裂球对称或不对称,碎片>50%。

1.2.3 公鼠输精管结扎:公鼠输精管结扎在正式实验开始三周前进行。取健康的成熟公鼠,年龄在 8 周龄以上,846 原液用生理盐水 8 倍稀释后,每只小鼠腹腔注射 0.25 mL 做全身麻醉。麻醉后仰卧保定并固定四肢,于耻骨前缘 0.5 cm 处剪毛、消毒,横向剪开皮肤,切口长约 0.5 cm;再剪开肌肉及腹膜,显露腹部脏器,轻轻牵拉出膀胱,在膀胱基部两侧可找出纤细透明的输精管;先用一眼科镊轻轻提起输精管,再用另一个眼科镊于酒精灯上烧红后,迅速将提起的输精管烙断;常规关闭腹部切口,皮肤和肌肉层做一次性缝合即可。解除保定后,置于笼中,8 h 内禁食禁水。在第一次正式使用前,应先试用一次,以排除输精管中的余精。

1.2.4 受体母鼠:用输精管结扎公鼠与发情盛期的受体雌鼠 1:1 合笼,第二天早上或第三天见栓者,即可作为受体鼠,受体鼠比供体鼠见栓晚 24 h,标记好后置于笼中待用。

1.2.5 移植方法:受体小鼠的麻醉方法同结扎鼠,采用俯卧保定方式并固定四肢及尾部。手术部位选在腹部一侧,左右侧均可。切口距脊柱 0.5 cm,距最后肋骨 0.3 cm。术部剪毛、消毒后,分两层打开腹腔。一般在剪开皮肤后,隔着腹壁肌肉即可看到一团白色的卵巢脂肪,此处即为肌肉层的切口处。切开腹壁后,轻轻牵拉出卵巢及子宫角,观察卵巢红体状况,判断发情时间。

用捡卵针从待用胚胎中挑选 20 枚左右Ⅰ级或Ⅱ级胚胎,捡洗两遍,放于 5% FCS PBS 液 930 mm 表面皿中,先将待移胚胎集中,之后以虹吸的方法将选中的胚胎吸入移植针内,所带液体要尽量少些。

将子宫角下方垫以镊柄,稍倾斜;先用 5 号针头在子宫角末端的血管稀少处或无血管处刺一小孔定位,之后将移植针沿小孔插入,上下轻轻移动移植针,在确定移植针的针尖在子宫角内时,缓缓将胚胎注入。手术完成后,轻轻将卵巢及子宫角还纳腹腔,腹壁做一次性缝合。

2 结果

2.1 实验分组

分批次购进 106 只体重在 20 g 以上且性成熟的昆明白小鼠,随机分笼编号,将发情有规律的小鼠分组进行胚胎移植实验。Ⅰ组:选用发情初期或间情后期的母鼠用激素进行超数排卵处理后,与公鼠合笼交配;Ⅱ组:选用发情盛期的母鼠直接与公鼠合笼交配。

2.2 两组母鼠的见栓率比较

两组母鼠与正常公鼠合笼,小鼠合笼后是否交配以见栓与否为标准(表 1)。Ⅰ组见栓率为 61.11%,Ⅱ组见栓率为 56.84%,无明显差异。

表 1 两组母鼠的见栓效果比较

组别	合笼数量(只)	见栓数量(只)	见栓百分比(%)
Ⅰ组	18	11	61.11
Ⅱ组	44	25	56.84

实验采用阴门直接观察法,操作过程中由于应激因素存在和操作误差,会影响小鼠见栓率。

2.3 两组母鼠的胚胎数量与质量比较

对自然发情与超排后见栓的小鼠,在第 3.0~3.5 d 进行冲胚、采胚,并进行胚胎形态鉴定,其结果对比如表 2。超排虽可以增加胚胎的数量,但是质量没有自然发情的好,因为激素的作用,胚胎的质量受到不同程度的影响,所以存在有一定数量的退化和发育异常胚胎,胚胎的形态质量差于自然发情小鼠的胚胎形态质量。

表 2 两组母鼠的胚胎质量比较

分组	小鼠数量	胚胎总数	平均胚胎数	4 细胞期	8 细胞期	桑椹期	囊胚期	退化胚
Ⅰ组	12	411	34.25	43	34	234	58	42
Ⅱ组	12	187	15.58	5	10	127	33	12

2.4 移植结果

实验室在解决小鼠超排技术后^[3],用以上胚胎移植方法,自 2006 年 7 月至 2006 年 9 月,在实验室内共移植供体 12 次,受体小鼠 12 只,其中移植成功 3 只。

第一只于 2006 年 8 月 15 日产小鼠 2 只,第二只于 2006 年 9 月 16 日产小鼠 8 只,第三只于 2006 年 9 月 27 日产小鼠 2 只。

因为主要想摸索受体及受体子宫状态、移植技术和方法,所以只选择了自然发情的小鼠胚胎,而没

有使用超排获取的胚胎。

移植成功的小鼠经繁殖实验均具有生殖能力。

3 讨论

3.1 胚胎存放时间

胚胎冲出后,应立即检出和进行胚胎形态鉴定,胚胎在体外或室温下存放时间愈短愈好。将胚胎发育正常的胚胎移入含 5%FCS 的 PBS 培养液中,放到适当的温度下保存。

3.2 移植针标准

移植针在酒精灯上徒手拉制要求一定要细,不合格的不能用,这样才能在虹吸时不带多余的液体,以确保胚胎着床率。

3.3 子宫角定位

在针刺子宫角时,对子宫角的不当固定或过度牵拉,将导致子宫的损伤、淤血等,影响小鼠受孕。

3.4 受体的准备

在胚胎移植中,胚胎最终必须移植到合适的受体中才能妊娠。因为受体的生殖、生理状态对妊娠率有很大的影响,因此受体的准备非常重要,要经过严格的筛选^[3]。受体的选择要求营养状态和性周期正常,移植时卵巢有红体存在。另外,受体的年龄和胎次对胚胎移植的影响是明显的^[4],但实验使用的小鼠均为第一胎次,是否对胚胎移植有影响尚待研究。胚胎检出后,应立即对受体实施麻醉及移植手术,应尽快在很短时间内将胚胎移入受体子宫内。

我们的胚胎移植手术,是通过子宫角移植,而管彤等(2001)曾做过相关的研究,认为在输卵管伞移植、输卵管移植和子宫移植这三种移植方法中,以子宫角移植的成功率为最低^[5]。

3.5 无菌操作

在进行胚胎移植手术的整个过程中,一定要保持无菌,无论是对供、受体的污染,还是对胚胎的污染,在一定程度上都会对胚胎和妊娠环境有不良刺激,降低胚胎质量和移植妊娠率,从而影响胚胎移植质量。大量的研究已表明,操作污染是造成胚胎死亡和早期妊娠中断的主要原因之一^[6]。所以,在移植过程中,乃至胚胎的生产、保存过程中应注意无菌控制。从室外的人工授精、超排采卵和移植等工作到室内药品的管理使用、胚胎的洗涤、装管等各个环节,都要增强无菌意识,加强无菌控制。

3.6 胚胎保存

在捡、洗胚胎的 PBS 液中,一定要加入适量的新生牛血清,以防胚胎下沉后与表面皿底部贴壁,捡、洗胚胎完毕后,应将其放入 37℃ 恒温箱内,同时,还要防止表面皿中液体过少而蒸发干。在体视显微镜下进行捡胚时,速度尽量快,因为体视显微镜的灯光很热,长时间的烧烤,可能导致胚胎死亡。

3.7 移植操作技术

手术中,在往子宫角内吹入胚胎时,推压注射器活塞的速度一定要慢,力度一定要把握适当,以防将空气注入子宫内而影响到移入胚胎在受体子宫内的着床。操作水平的高低会直接影响移植妊娠率,主要包括对胚胎和受体的移植部位的不同技术的操作,熟练的操作者手法迅速轻柔,可以大大地缩短操作时间,减少对子宫和胚胎的损伤。

3.8 调整移植针尖

手术中,如果在注入胚胎时,移植针内的液体不下行,是因针尖与子宫贴壁造成的,此时可适当将移植针的针尖从子宫角内提起一些,再慢慢推注。

3.9 移植的胚胎数量

移植的胚胎数量不能太多,如单侧移植每次不能超过 10 枚,双侧移植不能超过 25 枚,移植太多对受体不好,甚至导致受体死亡。

3.10 供受体发情同步

供体小鼠的发情与受体小鼠发情的同步性密切相关,是决定胚胎能否移植成功的关键。故受体鼠与结扎公鼠的合笼时间与供体鼠的见栓时间晚 12~24 h,同步见栓者,移植效果不佳^[3]。

3.11 麻醉

在进行胚胎移植手术时,小鼠的麻醉程度不要太深。手术结束后,8 h 内要禁食禁水。

参考文献

- [1] 殷宗俊,龙学仁,许瑞锋,等.受体牛胎次与黄体等级对胚胎移植妊娠率的影响.中国奶牛,2006,7:22~23.
 - [2] Brigid Hogan. Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. 246~267.
 - [3] 郭庆勇,简子健,刘小兰,等.小鼠发情周期不同时期超数排卵效果的研究.新疆农业大学学报,2006,29(3):16~18.
 - [4] 王敏康,刘冀琰,李劲松,等.小鼠的胚胎移植方法.动物学杂志,2000,35(6):31~34.
 - [5] 管彤,王凤山,王静,等.小鼠胚胎移植技术方法比较.实验动物科学与管理,2001,18(1):29~31.
 - [6] 李同豹,梁坤,韩永胜,等.影响牛胚胎移植妊娠率的主要因素.中国奶牛,2003,3:39~41.
- (下转第 72 页)

将明令废止基地、方案以及个人执照。

该法令明确规定,除经批准而且该动物已被完全麻醉或适合于一系列实验外,禁止对已进行过试验的动物再进行实验;对已被使用过的动物或正在承受不良影响的动物,应进行人道处死。

该法令还制定了实验动物食宿照料的最低标准,为实验动物饲养规定了饲养条件,为实验动物基地制定了控制条件。

该法令还规定,实验动物(老鼠、田鼠、仓鼠、兔、狗、猫、欧洲鹦鹉和灵长类动物)必须从合法的基地获得。

该法令设立了监督机构(目前 21 个官员)主管执照颁发事宜,在访问基地的同时,负责执行法令。

3 英国《动物保护法案》(麻醉)(1954 年)(节选)

如果给动物做的任何手术没有使用麻醉剂来消除手术中的疼痛,根据 1911 年的《动物保护法》及其修正案或命令,这次手术将被认为不合法和不人道的手术,主要负责人将应承担相应的法律责任。

此条款适用于任何没有使用防止动物组织过敏或防止影响动物骨骼设备的手术或使用空心针进行注射或抽血手术。

反对所有能够给动物造成疼痛、痛苦或苦痛的实验或程序。不论什么时候使用动物,都必须尽一切可能避免给动物造成痛苦,这一点非常重要。

4 英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)法规(节选)

英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)反对以下动物试验,包括不必要的重复,科学价值不大,或已有不用活体动物的替代方法的动物实验。

英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)反对在非必须性物质检验中使用动物,如化妆品,某些家用产品和食品添加剂。

英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)认为最重要的是在申请许可之前,需要对所有新的实验和实验草案进行全面的伦理审查。

英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)支持 1986 年颁布的《动物(科学程序)法》中的条款,应该任命一个或几个人全面负责在一个科学程序完成中的动物的日常管理,必须任命一个兽医外科医生监控这些动物的健康和福利状况。

英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)反对使用从野外捕获得任何动物来做实验研究。

英国皇家反虐待动物协会(RSPCA)反对使用黑猩猩来做实验研究。黑猩猩有复杂的行为和社会需求,而在实验室环境中是永远无法满足的。

参考文献

- [1] 王禄增,王捷,于海英,等.动物暨实验动物福利学法规进展.沈阳:辽宁民族出版社,2005.

(上接第 66 页)

Experiment Method of Mouse Embryo Transfer

KUANG Ling, GUO Qing-yong, WU Ju-fu, ZHANG Hui, YUAN Long
(College of Veterinary Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China)

Abstract: **Objective** Besides the embryonic quality, we hope to explore the better technique and method of mouse embryonic transferred, to increase the yield of embryonic transfer. **Methods** Embryos were collected from both the natural and superovulated estrous mouse of pregnant 3.5 days. Using microscope to collect the embryos that were coincidence in the embryonic development and age, and transferred them to mouse uterus of natural estrous 2.5 days. **Result** As compared with, superovulation could increase embryonic quantity, however there is no better than natural estrous in embryonic quality. In twelve receptors of natural estrous, three receptors were pregnant and produced twelve mice. **Conclusion** The factors of affecting embryonic transfer are the donor and receptor, multiple ovulation, embryonic quality score, the number of embryo transferred, the technique and method of embryo transferred.

Key words: Mouse; Embryo transfer; Technology transfer