

小鼠胚胎移植

Embryo Transfer in the Mouse

唐蔚，李周结，俞骞，陈子尘，王倩雯，陈国元，吴宝金*

分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台，中国科学院，上海

*通讯作者邮箱: baojin.wu@sibcb.ac.cn

引用格式: 唐蔚，李周结，俞骞，陈子尘，王倩雯，陈国元，吴宝金. (2022). 小鼠胚胎移植. *Bio-101* e1010945. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010945.

How to cite: Tang, W., Li, Z. J., Yu, Q., Chen, Z. C., Wang, Q. W., Chen, G. Y. and Wu, B. J. (2021). Embryo Transfer in the Mouse. *Bio-101* e1010945. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010945. (in Chinese)

摘要: 胚胎移植技术是生物净化、制备基因修饰动物及其他胚胎操作工作的关键技术。按照胚胎发生的阶段不同，移植部位也不同，一般分为输卵管移植和子宫移植。

关键词: 小鼠胚胎移植、输卵管移植、子宫移植

材料与试剂

材料

1. 系线镊（协和，货号：MR-F201A）
2. 弯嘴眼科镊（施强，货号：JYN1030）
3. 小血管剪（金钟，货号：JA2405）
4. 止血夹（灵涛，货号：LW0080）、缝合钳（三友，货号：SY11Cr）
5. 带线缝合针（双箭，货号：YY0166-2002）
6. 吸卵针（国产毛细玻璃管，熔点 0.9-1.1×120 mm）
7. 培养皿（FALCON，货号：353002）
8. 无尘纸（金佰利，货号：F050401）
9. 细砂轮

实验动物: 假孕雌鼠（ICR、大于 6 周龄），结扎雄鼠（ICR、大于 6 周龄）。所用动物购自多个国内供应商，饲养在独立换气笼盒系统，动物自由饮水，自由采食 Co60 辐射的灭菌饲料。

试剂

1. KSOM (MILLIPORE 公司, 产品目录号: MR-121-D)
2. FHM (MILLIPORE 公司, 产品目录号: MR-025-D)
3. 矿物油 (SIGMA, 货号: M8410)
4. 2,2,2-Tribromoethanol (SIGMA-ALDRICH T48402)
5. 2-Methyl-2-butanol (SIGMA 240486)
6. ULTRA PURE WATER (MILLIPORE TMS-006-A)
7. 2.5%阿佛丁麻醉剂 (见溶液配方)

仪器设备

1. 热台 CO₂ 恒温培养箱 (Thermo i160)
2. 超洁净工作台 (万里 SW-CJ-2FX)
3. 显微镜 (NIKON SMZ800N/SMZ645)
4. 电子称 (精天 JT201N)
5. 电子天平 (sartorius BSA124S)
6. 磁力搅拌器 (CORNING PC-420D)

实验步骤

一、移植使用毛细玻璃管 (移植管) 的制备

输卵管移植使用的毛细玻璃管, 每根移植管的内径都应大于一个二细胞期胚胎的直径而小于 2 个二细胞期胚胎的直径。子宫移植使用的毛细玻璃管, 每根移植管的内径都应大于一个囊胚的直径而小于 2 个囊胚的直径。制作步骤如下:

1. 打开酒精灯, 双手捏住毛细玻璃管的两头。置于外焰煅烧数秒后, 离开火焰的同时水平拉长毛细管。
2. 在离煅烧处大约 20 mm 的位置用细砂轮将玻璃针切断, 尽量使断面平齐, 在显微镜下和标准品对比内径尺寸, 尺寸合格后针头轻触酒精灯火焰处理断面, 将断面烧至平滑, 以不会戳伤胚胎, 不戳坏培养皿底部为标准, 以减少其对输卵管的损伤。尺寸不合格者直接弃于利器盒内。

二、吸取胚胎的方法

1. 二细胞期胚胎的吸取：从CO₂恒温培养箱中取出装有胚胎的KSOM培养皿，将胚胎转移到FHM液滴中清洗数次，先在移植管中吸入一段矿物油，隔一个气泡后吸一段培养液，之后紧跟着三个气泡间隔少许培养液，再吸入10-15枚胚胎，最后再吸入一个小气泡及少量培养液。
2. 囊胚期胚胎的吸取：从CO₂恒温培养箱中取出装有胚胎的KSOM培养皿，将胚胎转移到FHM液滴中清洗数次，先在移植管中吸入一段矿物油，隔一个气泡后吸取一段较之矿物油两倍长的培养液，隔一个气泡后吸入4-7枚胚胎，最后再吸入一个小气泡及少量培养液。

三、输卵管移植

输卵管移植用于单细胞期和二细胞期胚胎的移植。步骤如下：

1. 称取0.5天假孕雌鼠的重量（28g-35 g最佳），用2.5%麻醉剂以0.02ml/g腹腔注射将其麻醉。
2. 腰背部剃毛备皮，酒精消毒后做正中纵向切口，利用皮下组织疏松的特点，根据移植需要将切口向左侧或右侧移位，再将腰椎侧方0.5 cm处的腹后壁肌层用小剪刀钝性分离至腹膜腔，用无损镊迁出卵巢、输卵管、子宫。
3. 将输卵管包膜剪开一个小口，看清输卵管伞部的走向，将移植管从开口处插入输卵管伞部 2—3 mm，将受精卵吹进膨大部，略停片刻再拔出。
4. 将卵巢、输卵管、子宫复位，分别缝合肌层和皮肤，并置于热台上直至苏醒。

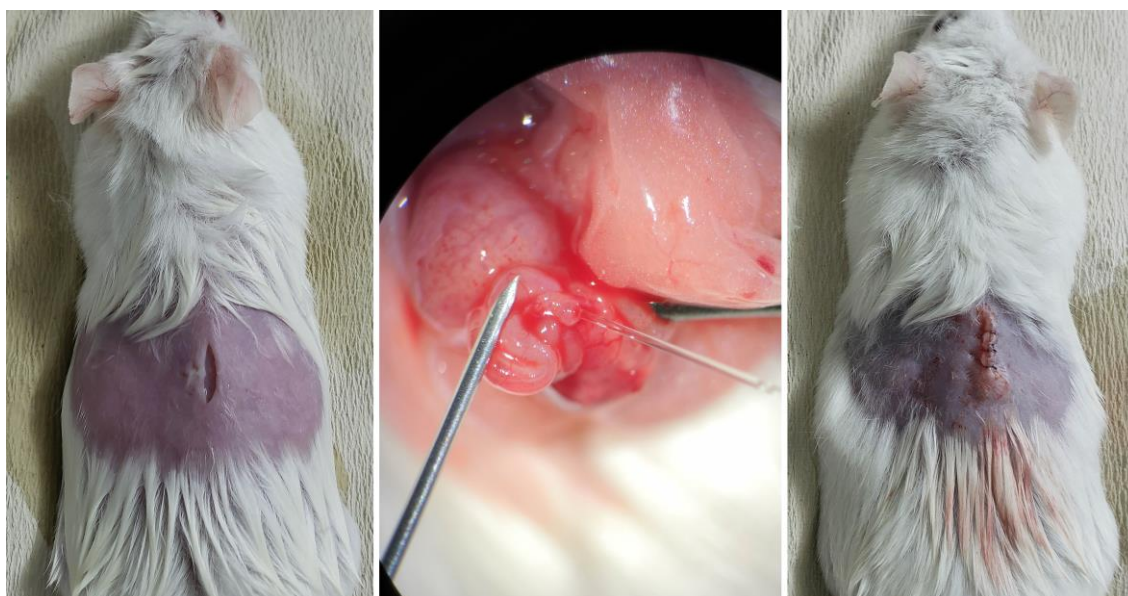


图 1. 小鼠胚胎输卵管移植

四、子宫移植：子宫移植用于囊胚期胚胎的移植。子宫移植相较于输卵管移植简单，子宫移植有很好的妊娠效果，处于这一阶段的胚胎较易着床。

1. 称取 2.5 天假孕雌鼠重量，用 2.5%麻醉剂以 0.02 ml/g 腹腔注射将其麻醉。
2.5 天受体母鼠好坏的判断，由于交配后经过了 2.5 天，此时母鼠卵巢上已经没有 0.5 天可见的小白点，此时的小白点趋于血红色。这样的母鼠其子宫受孕状态更好，胚胎更易着床发育。
2. 腰背部剃毛备皮，酒精消毒后做正中纵向切口，利用皮下组织疏松的特点，根据移植需要将切口向左侧或右侧移位，再将腰椎侧方 0.5 cm 处的腹后壁肌层用小剪刀钝性分离至腹膜腔，用无损镊迁出卵巢、输卵管、子宫。
3. 在子宫输卵管结合部下方避开血管用注射器针头在子宫壁上刺一个斜角向上的小孔至子宫腔，将移卵管从小孔处插入子宫腔内 2—3 mm，将囊胚吹进子宫，略停片刻再拔出。
4. 将卵巢、输卵管、子宫复位，分别缝合肌层和皮肤，并置于热台上直至苏醒。

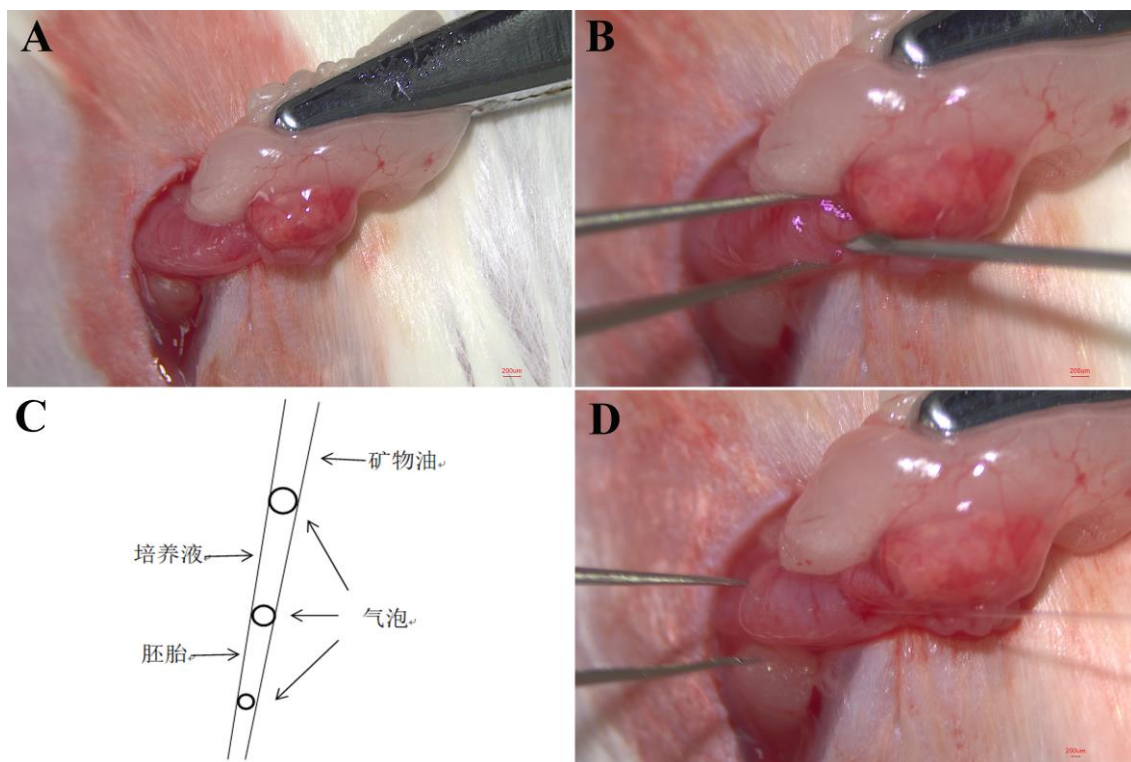


图 2 小鼠胚胎子宫移植过程

实验心得

1. 控制移植管的虹吸效应：吸取胚胎时需尽量减轻移植管的虹吸效应，以便更好地控制液体在管内的移动，其关键是在制备移植管时要保证管径的粗细均匀。
2. 输卵管移植技巧：一般进行受精卵的输卵管移植，要找到输卵管伞口，将移植管从输卵管伞口插入，然后将胚胎吹入输卵管膨大部。有时因伞口结构特殊，容易发生吹入的液体倒流的情况，使刚吹入输卵管的胚胎也随着液体一起流出，从而降低了仔鼠的出生率甚至导致移植失败。此时可以用无损伤的镊子或者注射器针头辅助插入伞口部的移植管，将移植管缓缓插入输卵管更深的位置，最好是输卵管2~3个弯曲之后，再吹入胚胎，可以大大保证产仔率。在我们以往的实验中，一只受体母鼠通常移植20-30颗胚胎，产仔数一般为8-12只。
3. 气泡标记的处理：输卵管移植时为了标记胚胎已成功吹入输卵管，通常在吸取的胚胎前后各吸取几个气泡作为标记，但在子宫移植时必须少吸取气泡，以减少空气对胚胎着床的影响，可将移植管末端吹入子宫的小气泡小心地排出，也可以在将胚胎缓缓吹入子宫时仔细观察移植管，在确认吹入中间部分培养液时，就停止操作并拔出移植管。

4. 实验中快速准确地找到卵巢的技巧有二种，在剪开腹后壁肌层前，向四周滑动皮肤便能透过肌层观察到卵巢，打开腹膜腔后，假孕雌鼠的卵巢上分布有小白点也有助辨认之。

5. 本实验室通常采用单侧移植，偶尔也做双侧移植。采用背部正中切口，可以通过一个切口做双侧输卵管或子宫移植，减少对受体动物的损伤。

溶液配方

1. 2.5%阿佛丁麻醉剂配制

称取 10 g 2,2,2-Tribromoethanol 后加入 10ml 2-Methyl-2-butanol, 240 转/25℃ 避光振荡至沉淀完全消失，配制成浓缩液。使用时按照 2.5%浓度将浓缩液加入相应的 ULTRA PURE WATER 中（2.5 ml 浓缩液：97.5 ml 超纯水），280 转/25 °C 避光振荡至沉淀完全消失，0.25 nm 过滤器过滤后即工作液。

致谢

本实验室的胚胎操作技术主要来源于中科院分子细胞中心李劲松研究员实验室，美国洛克菲勒大学转基因平台及美国洛克菲勒大学 Peter Mombaerts 实验室。特此致谢！

参考文献

1. Andras, N., Marina, G., Kristina, V. and Richard, B.(2003). Manipulating the Mouse Embryo. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.