

小鼠非手术胚胎移植技术

Transcervical Embryo Transfer in Mice

王苗苗, 张静, 陆晓雨, 李桂琳, 吴兴龙, 李相运*

河北农业大学动物科技学院, 保定, 河北

*通讯作者: Lxyun@hebau.edu.cn

引用格式: 王苗苗, 张静, 陆晓雨, 李桂琳, 吴兴龙, 李相运. (2022). 小鼠非手术胚胎移植技术. *Bio-101* e1010960. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010960.

How to cite: Wang, M. M., Zhang, J., Lu, X. Y., Li, J. L., Wu, X. L. and Li, X. Y. (2022). Transcervical Embryo Transfer in Mice. *Bio-101* e1010960. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010960. (in Chinese)

摘要: 小鼠胚胎移植是非常重要的一项胚胎操作技术, 是体外受精、转基因动物以及品系净化的关键环节。小鼠非手术法胚胎移植技术简单易行, 节约时间, 对小鼠损伤小, 不易感染, 减少小鼠的痛苦, 同时也符合实验动物福利伦理原则。本文采用全新的小鼠非手术胚胎移植器, 详细介绍小鼠非手术法胚胎移植的步骤和注意要点, 将小鼠桑椹胚或囊胚经子宫颈移植单侧子宫角, 显著提高胚胎移植成功率。

关键词: 小鼠; 非手术胚胎移植; 子宫颈; 桑椹胚; 囊胚; 子宫角

研究背景: 小鼠是发育生物学和生殖生物学领域重要的模型动物, 其胚胎移植技术是研究体外受精、嵌合体、转基因、基因打靶、胚胎冷冻种子库以及品系净化的关键环节。小鼠胚胎移植技术包括手术法和非手术法, 但手术法不仅费时、技术要求高、增加小鼠疼痛, 且术后易感染, 而非手术法简单易行, 节约时间, 对小鼠损伤小, 不易感染, 减少小鼠的痛苦, 同时也符合实验动物福利伦理原则。早在 1951 年, Beatty 等人首先报道小鼠的非手术法胚胎移植, 随后 Marsk、王培生等人也都相继研究改进了非手术法胚胎移植, 但成功率始终较低, 这严重限制了该项技术的推广与应用。本文采用全新的小鼠非手术胚胎移植器, 将小鼠桑椹胚或囊胚经子宫颈移植单侧子宫角, 显著提高移植成功率。

材料与试剂

1. 小鼠饲养笼
2. 婴儿棉签
3. 眼科剪刀
4. 磁条
5. 小鼠非手术胚胎移植器（TCET）（保定正木生物科技有限公司）（图 1）



图 1. 小鼠非手术胚胎移植器（TCET）

6. 开腔管（保定正木生物科技有限公司）
7. 吸胚管（保定正木生物科技有限公司）



图 2. 吸胚管

8. 一次性 90 mm 细菌培养皿（青岛金典生化器材有限公司）
9. 一次性 1 mL 注射器（江西洪达医疗器械集团有限公司）
10. CD-1 成年雌鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司）

11. CD-1 结扎公鼠（北京维通利华实验动物技术有限公司）
12. 桑椹胚或囊胚
13. DPBS 磷酸盐缓冲液（见溶液配方）
14. 阿佛丁（见溶液配方）

仪器设备

1. 体视显微镜（Nikon SMZ 745）
2. 恒温热台（北京比威克生物技术有限责任公司）
3. 纤维冷光源（南京博城光电科技有限公司 LED-100）

实验步骤

1. 挑选外阴部肿胀的发情期雌鼠，与结扎公鼠 1:1 在下午 17:00 合笼，次日上午 8:00 检查阴道栓，见栓者记为假孕 0.5 d，2 天后即假孕 2.5 d 雌鼠作为胚胎移植受体。
2. 在 90 mm 培养皿做若干 100 μ L 的含 0.4%牛血清白蛋白的 DPBS 液滴，将胚胎洗涤干净后依据受体数量将胚胎分组，每只受体可移植 5-15 枚胚胎，利用吸尿管将每组胚胎紧密聚集在一起。
3. 左手抓住 TCET 密封管，右手抓住 TCET 手柄，体视显微镜调至最低倍，首先用 TCET 吸取 7 mm DPBS 液和 2 mm 气泡，再吸取胚胎，含胚胎的液体段长度控制在 5 mm 以内，最后再吸取 3 mm 气泡。在吸取胚胎的时候，尽可能让 TCET 前端直立吸取胚胎。(图 3, 4)。

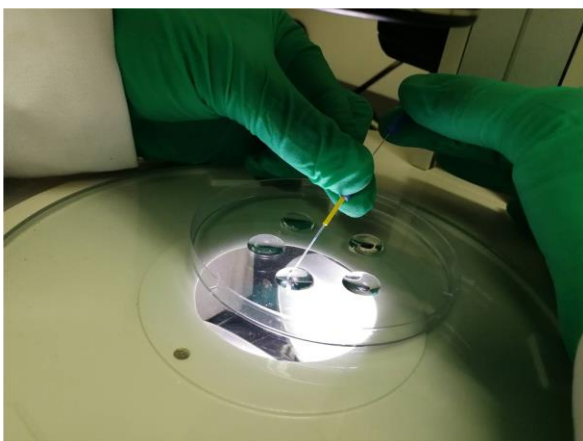


图 3 体视镜下利用 TCET 装载胚胎

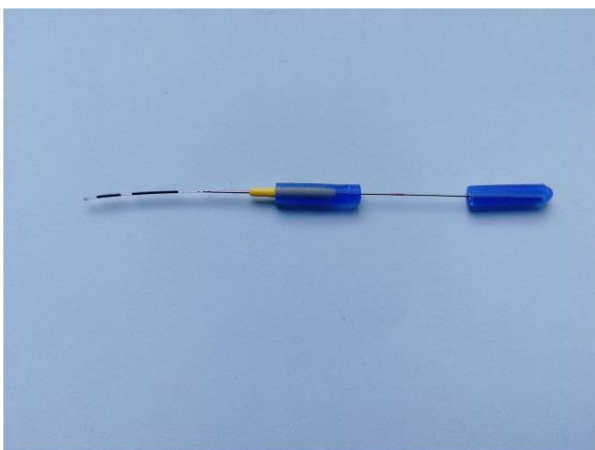


图 4 四段法装载胚胎的 TCET 模式图

4. 在纤维冷光源侧面吸附一条宽 10 mm 长 100 mm 的磁铁，将装好胚胎的 TCET 手柄直立吸附在磁铁上，静置 2 min 以上（图 5）。

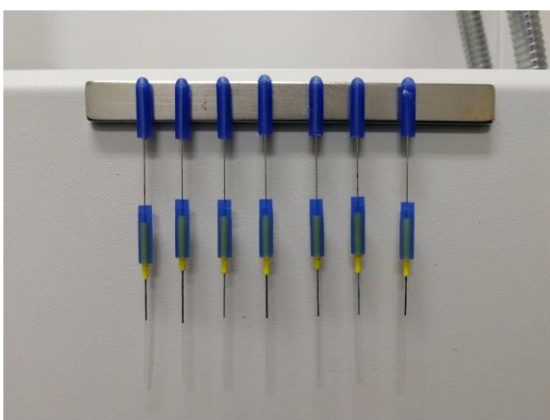


图 5 利用磁条直立固定装载胚胎的 TCET

5. 假孕 2.5 d 受体小鼠腹腔注射阿佛丁麻醉（每 10 g 体重注射 0.2 mL），利用左手拇指和中指固定小鼠尾根，右手持开腔管蘸取少量 DPBS 液后缓慢插入小鼠阴道，在纤维冷光源下确认子宫颈口并用婴儿棉签擦拭，清洁子宫颈口（图 6）。



图 6 腹腔注射阿佛丁麻醉受体小鼠

6. 右手持装有胚胎的 TCET，将 TCET 前端在 DPBS 液中浸润后经子宫颈口缓慢插入任意一侧子宫角，通常 TCET 能够轻松流畅地进入子宫内。如果感觉有任何阻力，立即停止。极个别小鼠的子宫颈口可能很紧，可用一个未装胚胎的 TCET 提前疏通一下子宫颈口，疏通深度不要超过 5 mm（图 7，图 8，图 9）。



图 7 利用开腔管打开小鼠阴道，定位子宫颈口



图 8 将装载胚胎的 TCET 完全插入小鼠一侧子宫

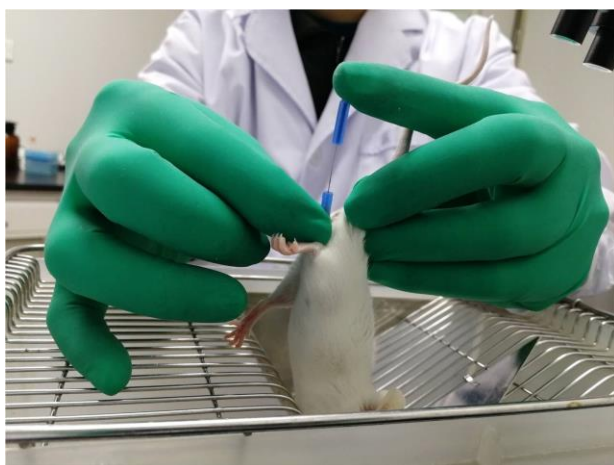


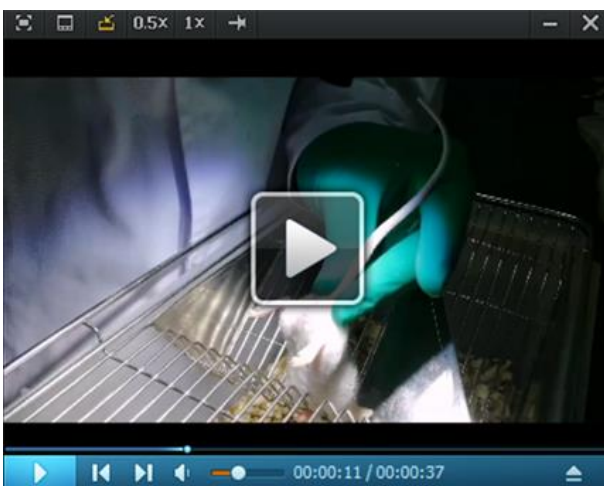
图 9 按压 TCET 手柄，将胚胎注入子宫内

7. TCET 中间密封管身约进入开腔器一半时，左手拇指和食指固定 TCET 和开腔管，右手捏住 TCET 手柄向下缓慢按压 8 mm，然后，左手将 TCET 手柄和小鼠尾巴固定在一起，右手捏住 TCET 密封管和开腔管一起向上运动至 TCET 手柄，随后一起拔出 TCET 和开腔管。如有需要，可用剪刀在左耳或右耳剪缺口标记（视频 1）。



视频 1. 开腔管的使用

8. 将小鼠置 37℃ 恒温热台直至苏醒。



视频 2. 小鼠非手术胚胎移植。

注意事项

1. 胚胎移植之前，最好先用几只成年雌鼠模拟练习 TCET 的操作方法。
2. 受体小鼠必须麻醉，否则妊娠率和产仔率会显著下降。
3. 推荐使用 8 周龄以上，体重 26 g 以上的假孕 2.5 d 的 CD-1 成年雌鼠作为胚胎移植受体。
4. 所移植胚胎的发育阶段必须是致密桑椹胚或囊胚，且胚胎仅能被移植至单侧子宫角。

5. TCET 移植器为一次性使用，如果反复使用，产仔率会有所降低。
6. TCET 移植器必须缓慢插入子宫颈，最好一次完成，如遇阻力，立即停止，不可反复插入。

溶液配制

1. DPBS 液:

称取 NaCl 8 g、KCl 0.2 g、Na₂HPO₄ 1.15 g、KH₂PO₄ 0.2 g，加入 500 mL 超纯水，震荡溶解；再称取 CaCl₂ 0.1 g 和 MgCl₂·6H₂O 0.1 g，加入 500 mL 超纯水，震荡溶解，将以上两种溶液混合均匀后，加入 2 g 牛血清白蛋白，静置 30 min，0.22 μm 滤器过滤除菌，分装，冷藏保存。

2. 阿佛丁:

称取 2.5 g 三溴乙醇（Sigma T48402）置 200 mL 烧杯，加入 5 mL 叔戊醇（成都艾科达化学试剂有限公司）溶解，再加入 195 mL 生理盐水，60 °C 磁力搅拌溶解，完全溶解后室温冷却，0.22 μm 过滤除菌，避光冷藏保存。

参考文献

1. Bin Ali, R., van der Ahe, F., Braumuller, T. M., Pritchard, C., Krimpenfort, P., Berns, A. and Huijbers, I. J. (2014). [Improved pregnancy and birth rates with routine application of nonsurgical embryo transfer](#). *Transgenic Res* 23(4): 691-695.
2. Cui, L., Zhang, Z., Sun, F., Duan, X., Wang, M., Di, K. and Li, X. (2014). [Transcervical embryo transfer in mice](#). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 53(3): 228-231.
3. Green, M., Bass, S. and Spear, B. (2009). [A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications](#). *Biotechniques* 47(5): 919-924.
4. Steele, K. H., Hester, J. M., Stone, B. J., Carrico, K. M., Spear, B. T. and Fath-Goodin, A. (2013). [Nonsurgical embryo transfer device compared with surgery for embryo transfer in mice](#). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 52(1): 17-21.
5. Stone, B. J., Steele, K. H., Men, H., Srodulski, S. J., Bryda, E. C. and Fath-Goodin, A. (2020). [A Nonsurgical Embryo Transfer Technique for Fresh and Cultured Blastocysts in Rats](#). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 59(5): 488-495.
6. Stone, B. J. (2020). [Nonsurgical Embryo Transfer Protocol for Use with the NSET Device](#). *Methods Mol Biol* 2066: 107-111.