

犬胚胎移植

Embryo Transplantation of Dog

王晓民^{1,2}, 赖良学^{1,*}

¹中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东省; ²生命科学学院, 西湖大学, 杭州, 浙江省

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 王晓民, 赖良学. (2022). 犬胚胎移植. *Bio-101* e1010971. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010971.

How to cite: Wang, X. M. and Lan, L. X. (2022). Embryo Transplantation of Dog. *Bio-101* e1010971. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010971. (in Chinese)

摘要:

胚胎移植即将不同个体的胚胎、基因编辑胚胎或是核移植重构胚胎等移植到与供体胚胎发育时间相一致的受体母犬输卵管或子宫内, 使胚胎继续完成体内发育的过程。该技术目前已十分成熟, 包括大、小鼠, 兔子等实验动物及猪、牛、羊等大动物上都应用的十分广泛。通过异体移植或自体移植, 可以快速繁育优良性状或提高胚胎的利用效率。在犬的基因编辑或体细胞克隆过程中需要运用到胚胎移植技术, 这是犬胚胎操作过程中还可或缺的一项技术。

关键词: 胚胎移植, 自体移植, 异体移植

材料与试剂

1. M199 (Invitrogen)
2. FBS (Gibco)
3. 异氟烷 (瑞沃德)
4. 手术器械 (国产)
5. 手术创巾 (国产)
6. 双抗 P/S (Gibco)
7. 生理盐水 (格美研)

8. 胚胎移植管 (Kendall)
9. 口吸管 (自制)
10. 玻璃管 (国产)
11. 培养皿 (Corning)

仪器设备

1. 体视显微镜 (Olympus)

实验背景

由于犬独特生殖生物学特性，其辅助生殖技术一直发展很缓慢。犬的一个生殖周期，包括大约 1 周的发情前期和发情期，随后是 2 个月的间情期。间期之后是一个可变的 (2-10 个月) 乏情期，导致每年只能排卵 1-2 次。尽管数十年来一直在研究驱使发情的传统生殖激素 (促性腺激素、雌二醇、孕酮)，但对乏情期的可变持续时间和最终终止浓度并不清楚。科研人员曾多次尝试诱导犬的发情，但结果各不相同。例如，注射外源性卵泡刺激素 (FSH) 用于刺激卵泡生长。多巴胺激动剂和促性腺激素释放激素激动剂等被用来通过刺激促性腺素释放来诱导发情。后两种处理类型在大多数研究中都成功诱导了发情，但其有效性高度依赖于激素处理时的生殖周期阶段，对于 GnRH 激动剂，长期处理会导致抑制发情的效果。因此，虽然已经在犬身上尝试了许多不同的发情诱导技术，但很少取得一致的结果。

发情行为开始后，LH 峰后两天，一个生发泡期卵母细胞会排到输卵管中，并在输卵管中额外 48-72 小时才能成熟 (MII) 并可受精。这种时间安排的进化优势在犬类和其他哺乳动物之间不同的原因目前尚不清楚。此外，卵母细胞延迟成熟的机制尚不清楚，尽管有人认为卵丘细胞与排卵卵母细胞的长期紧密结合有关。然而，试图在体外重演这一成熟过程的尝试总的来说效率非常低。关于犬体外卵母细胞成熟 (IVM) 的研究很多，但总体效果都很差。

目前，胚胎移植主要通过手术的方法，包括自体移植和异体移植，其中自体移植是指将自身的胚胎从体内取出，在体外处理后再移植回自身体内的过程；异体移植是指将体内取出的胚胎移植到另一只处于同一发情阶段的受体母犬体内的过程。移植部位的选择取决于胚胎的发育阶段，要么转移到输卵管要么转移到子宫角。输卵管更适合早

期胚胎 (<8 细胞), 而输卵管移植到子宫角在技术上更简单, 更适合晚期胚胎 (>8 细胞期)。

实验步骤

1. 挑选 2 岁以上经产的发情母犬作为胚胎移植受体犬;
2. 将与供体胚胎发育处于同一阶段的母犬进行麻醉;
3. 找到卵巢和输卵管, 并选择卵巢上黄体多的一侧进行移植;
4. 用胚胎移植管吸取一小段液体, 再吸入一段空气, 接着吸入胚胎, 再吸入一段空气, 最后再吸入一段液体, 即装好胚胎;
5. 找到输卵管伞, 将移植管导入输卵管内大概 1/3 的位置, 轻轻将胚胎推入输卵管中, 缓慢拔出移植管;
6. 缝合手术口。

结果与分析

1. 异体移植一般单侧移植 8-10 个受精卵;
2. 自体移植过程中, 选择黄体多的一侧进行冲胚, 黄体少的一侧不冲胚并进行移植。

失败经验

1. 移植后的胚胎不发育, 可能与供受体母犬发情阶段不一致相关。

溶液配方

1. 胚胎移植液: M199+10%FBS

致谢

1. 感谢十二五国家科技重大专项“实验用 Beagle 犬及疾病模式犬研究开发平台”[2011ZX09307-304]提供的经费支持;
2. 感谢广州生物医药研究总院有限公司提供的实验场地、实验用犬及相关技术支持;
3. 感谢北京希诺谷生物科技有限公司共同参与的技术研究;

4. 研究成果以“Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system; Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer”分别发表在 Journal of Molecular Cell Biology 和 Journal of Genetics and Genomics 杂志上。

参考文献

1. 胡敏华，周志东，王晓民，龙海斌，倪庆纯，刘运忠. (2015) [实验用 Beagle 犬的繁殖性能分析](#). 广东畜牧兽医科技, 3: 41-44.
2. 张敦伟，王晓民，连雪科，刘运忠，高翔，倪庆纯. (2013) [Beagle 犬活体取胎及其成纤维细胞的培养](#). 实验动物与比较医学, 3: 210-214.
3. Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., Bierschwal, C. J. (1991) [Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone](#). Theriogenology 3: 603-11.
4. Feng, C., Wang, X. M., Shi, H., Yan, Q. M., Zheng, M., Li, J., Zhang, Q. J., Qin, Y. M., Zhong, Y. G., Mi, J. D., Lai, L. X. (2018) [Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer](#). J Genet Genomics 45: 47-50.
5. Concannon, P. W. (1986) [Canine pregnancy and parturition](#). Vet Clin North Am Small Anim Pract 16: 453-75.
6. Evans, J.M., and Savage, T.J. (1970) [The collection of vaginal smears from bitches](#). The Veterinary record 87: 598-599.
7. Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G., Park, J. E., Kim, J. J., Kim, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y., Lee, B. C. (2007) [Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer](#). Theriogenology 5: 941-7.
8. Zou, Q. J., Wang, X. M., Liu, Y. Z., Ouyang, Z., Long, H. B., Wei, S., Xin, J. G., Zhao, B. T., Lai, S. S., Shen, J., Ni, Q. C., Yang, H. Q., Zhong, H. L., Li, L., Hu, M. H., Zhang, Q. J., Zhou, Z. D., He, J. X., Yan, Q. M., Fan, N. N., Zhao, Y., Liu, Z. M., Guo, L., Huang, J., Zhang, G. G., Ying, J., Lai, L. X., Gao, X. (2015) [Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system](#). J Mol Cell Biol 6: 580-3.