

腹腔镜引导食蟹猴胚胎移植

Laparoscopic Guided Embryo Transfer of Cynomolgus Monkey

王燕、许玉婷、李春杨、孙强*

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心，中国科学院，上海

*通讯作者邮箱: gsun@ion.ac.cn

引用格式: 王燕, 许玉婷, 李春杨, 孙强. (2023). 腹腔镜引导食蟹猴胚胎移植. *Bio-101* e1010983. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010983.

How to cite: Wang, Y., Xu, Y. T., Li, C. Y., and Sun, Q. (2023). Laparoscopic Guided Embryo Transfer of Cynomolgus Monkey. *Bio-101* e1010983. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010983. (in Chinese)

摘要: 胚胎移植是辅助生殖的一个关键步骤, 如果此过程不成功, 将导致实验猴怀孕失败。胚胎移植是指将体外受精, 或者通过单精注射及其他方式得到的胚胎, 移植到生理状态同步的雌性猴输卵管或子宫内, 使之继续着床发育的技术。提供卵母细胞的个体称为供体, 接受胚胎的个体称为受体。

胚胎移植包括: 胚胎的选择、受体的判定、移植方法及妊娠诊断。胚胎选择目前主要观察卵裂球的形态及其发育时期。受体的判定, 根据动物的健康状况、年龄、体重、胎次、及胚胎时期与受体子宫的同步性等综合指标, 判断是否是优质受体。移植方法采用腹腔镜引导移植法。妊娠诊断用B超仪监测。

关键词: 胚胎移植, 受体, 腹腔镜

材料与试剂

1. 不可吸收缝合线 (2-0)
2. 可吸收肠线 (3-0)
3. 75%酒精
4. 碘酊
5. 舒泰 50 维克贸易 (上海) 有限公司 3597133073812
6. 硫酸阿托品注射液 (上海禾丰制药有限公司)

7. 注射用青霉素钠/80 万单位 华北制药股份有限公司
8. 布洛芬

仪器设备

1. 手术器械包（气腹针、戳卡、眼科剪、镊子、持针钳、止血钳、圆针、三棱针。以上物品高压灭菌备用。）
2. 气腹机（OLYMPUS UHI-3）
3. 高辉度光源装置（OLYMPUS CLH-250）
4. 摄像系统（OLYMPUS OTV-SC2）
5. 显示屏（SONY）
6. 高纯氮
7. 无影灯
8. B 超仪 ACUSON NX3 Elite 西门子

实验步骤

一、受体挑选

1. 选择健康、无生殖道疾病的雌性猴；
2. 年龄在 4-10 岁，体重 3-5.5 kg 较好，3 kg 以下太瘦，体质相对较差，5.5 kg 以上过于肥胖的动物，容易造成体内激素水平下降，内分泌失调，影响胚胎着床。
3. 优先选择有生产（生育）史的雌性猴做受体，这样的猴有产仔及带仔经验，能提高仔猴出生存活率。
4. 根据胚胎时期选择相对应的移植窗口期，在月经周期第 13-18 天、子宫内膜厚度达到 2.5 mm 以上时移植最佳。早期胚胎即 2-4 细胞时期胚胎，可选择移植给卵泡期（临近排卵的卵泡）和排卵 1-2 天的受体；16 细胞至囊胚期的胚胎，移植给排卵 1-4 天的受体，一般不选择处于卵泡期的受体。
5. 对用于超排取卵的供体实验猴，我们选择其做受体时，需要距离上次取卵时间间隔至少 3 个月才能使用。自体移植除外，可以在取卵后第 2 天进行胚胎移植。

二、受体动物准备

1. 受体动物手术前禁食 12 h。

2. 麻醉：舒泰 50，剂量 4-6 mg/kg，肌肉注射。
3. 麻醉前给药：阿托品 0.1 mg/kg，皮下注射；青霉素 10 万单位/kg，肌肉注射。
4. 被毛：上至肚脐上方 3 cm 处，下至腹股沟处，将整个肚皮的毛剔除干净。
5. 保定：麻醉后的受体动物以头低臀高的姿势放置在手术台上，然后将四肢分别用绷带固定在手术台的四个支架上。
6. 消毒：先用 1.8-2.2%碘酊对术部进行消毒（腹部剃毛区全部消毒），待碘酊干燥后，用 75%的酒精脱碘三次。
7. 铺上一次性无菌洞巾，暴露术区。

三、手术方法

1. 气腹针以 45 度角于脐轮上缘 1 cm 处插入腹腔，接气腹机，进气速度不超过 1 L/min，腹腔内压力不超过 24 mmHg。
2. 待腹部鼓起皮肤无褶皱后，拔掉气腹针，用眼科剪沿气腹针针眼向肚脐方向剪 0.5cm 的切口，提起脐上皮肤，将戳卡先斜后垂直慢慢插入腹腔，拔出套管芯，接通光源及显示屏，缓慢插入腹腔镜。
3. 气腹针在右侧腹股沟上约 2 cm 处插入，用气腹针拨开附着在卵巢上的大网膜或者脂肪，使左右两侧卵巢暴露。
4. 用眼科剪在卵巢对应部位的皮肤开口约 1 cm，再用止血钳伸入开口处，夹住包裹卵巢的脂肪并牵引出腹腔外固定好。
5. 拔出腹腔镜，关闭腹腔镜系统，打开无影灯照在暴露的卵巢上。
6. 理顺输卵管，用镊子轻轻夹住喇叭口，胚胎操作人员将吸有胚胎的移植管顺喇叭口插入输卵管，吹入胚胎。
7. 待胚胎放置后，将输卵管，卵巢小心放回腹腔复位。
8. 采用结节缝合方法缝合术口，第一步用可吸收肠线将内膜缝合；第二步用不可吸收丝线将皮肤缝合。术口消毒后将受体送回饲养笼内。

腹腔镜介导胚胎移植示意图：



图1和图2. 腹腔镜介导下，将输卵管牵引出腹腔。



图3. 固定输卵管及喇叭口。

图4. 胚胎装入移植管；

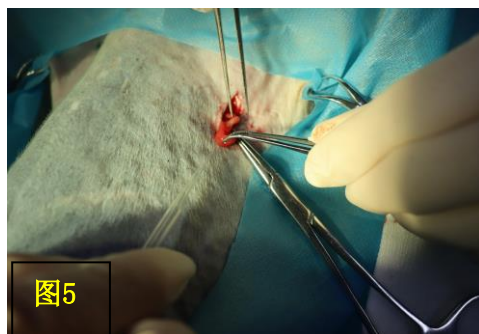


图5. 胚胎移植入输卵管

术后护理

手术后，将由专业的兽医人员进行日常护理，首先给动物保温，直至动物完全清醒，活动正常。术后三天内，每天观察动物精神状况及伤口情况，并每天注射一次镇痛药克洛芬（1 mg/kg）以及青霉素（10万 IU/kg），第四天停药。

四、食蟹猴早期妊娠诊断

胚胎移植后23-27天可以用B超监测方法，观察到胎猴心脏跳动（图6），即可确定妊娠成功。

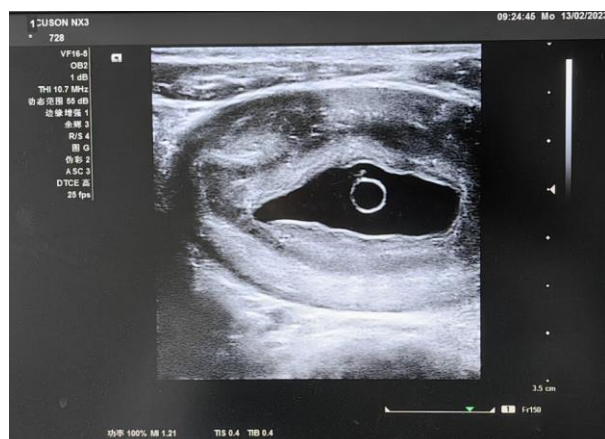


图6. 胚胎移植后第26天怀孕子宫及胎儿超声图像.

注意事项

1. 术后动物冬天注意保暖，放置于空调房内。
2. 动物放回笼内时取侧卧位，确认动物麻醉苏醒后再离开。