

小鼠的胚胎移植方法*

王敏康^{①②} 刘冀珑^① 李劲松^① 廉莉^① 张田^② 陈大元^①

(^①中国科学院动物研究所生殖生物学国家重点实验室 北京 100080 ;^②云南师范大学生命科学系 昆明 650223)

摘要 :全面而详细地描述了小鼠胚胎移植中所采用的输卵管移植及子宫移植方法 ,包括作者的改进。介绍了寄母小鼠的选择、配种及孕鼠的编号方法等 ,具有较强的实用意义。

关键词 :小鼠 胚胎移植 输卵管移植 ;子宫移植 编号

中图分类号 :Q954.4 **文献标识码** :A **文章编号** :0250-3263(2000)06-31-04

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39360028);

第一作者介绍 :王敏康 ,男 ,38岁 ,副教授 ,博士 ,研究方向 :生殖生物学 ;E-mail :wangmk1998@yahoo.com ;

收稿日期 :2000-01-22 ,**修回日期** :2000-03-20

Embryo Transfer in the Mouse

WANG Min-Kang^{①②} LIU Ji-Long^① LI Jin-Song^① LIAN Li^①
ZHANG Tian^② CHEN Da-Yuan^①

(^①Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences Beijing 100080, China;

^②Department of Life Science, Yunnan Normal University Kunming 650223, China)

Abstract :This article described detail embryo transfer of oviduct and uterus in the mouse , including some improving in procedure. The selection , mating and numbering the foster mother also have been introduced.

Key words :Mouse ; Embryo transfer ; Oviduct transfer ; Uterus transfer ; Numbering

作为一种最为广泛使用的实验动物,小鼠的胚胎移植可以说是最后判断从活体到活体的一项实验是否成功的重要标志。由于小鼠体型较小,操作需要在解剖镜下进行,对于新从事此项工作的人来说,有一定的困难,有关文献内容也不全面^{1,2}。笔者结合多年从事这方面的工作经验,对此做一介绍。

1 可供移植的胚胎

对于小鼠来说,从受精后 7~10 小时的受精卵,即观察到雌雄原核和第 1 极体的受精卵到体内或体外培养 4~5 天的囊胚都可以移入受体(寄母)小鼠中。

2 受体小鼠的选择与交配

6~10 周龄的雌性小鼠均可作为胚胎移植的受体使用。与其它品系的小鼠比较,昆明鼠体形较大,适应及抗病性强,母性好,是良好的胚胎移植受体。可供胚胎植入的受体小鼠有两种:即假孕寄母小鼠和自然怀孕的受体小鼠,这可根据所移入的胚胎数量来决定选择。小鼠一般为半夜交配和排卵,所以第 2 天有阴栓者从上午到下午为见栓的 0.5~1 天,这种雌鼠可用于输卵管移植。也可使用见阴栓 2.5 和 3.5 天的假孕或自然怀孕的小鼠做受体,但只能从子宫部位移植,且移植的胚胎须达到桑椹胚和囊胚生长阶段。若待移植胚胎数较少如仅为 1~

4 枚时,则需用自然怀孕的雌鼠做受体。

2.1 假孕小鼠 经过与结扎输精管的雄鼠交配后的雌鼠为假孕小鼠。以假孕小鼠为受体时,可供植入的胚胎数量为 5~18 枚,移植时应两侧植入数量大致相等的胚胎。通常在头一天下午或傍晚检查用于胚胎移植的雌性小鼠的阴道开口情况。若外观红润或肿胀、开口较大,即是处于发情期的小鼠,可选出与结扎输精管两周以后的雄鼠交配。交配方式为雌鼠:雄鼠 = 2:2 或 1:2。第二天早晨检查有阴栓者即可用作胚胎移植受体。

2.2 自然怀孕小鼠 因为小鼠为多胎动物,胚胎较少时不易着床。若待移入的胚胎数量为 1~4 枚时,需选择自然怀孕的小鼠为受体。选出处于发情期的雌鼠于头一天下午放入正常雄性小鼠笼中。第二天上午检查,有阴栓者的第 1 天就可进行输卵管移植。也可在 2.5 或 3 天时进行子宫内移植。移植时 1~2 枚可放入一侧子宫或输卵管,也可每侧移植 2 枚^[3]。雌鼠的选择及交配方式与假孕鼠相同。但需选用不同的品系,使移入胚胎和受体自己的孕胚相区别。例如:移入胚胎为白色品系的话,受体孕鼠可选用:1)昆明白(雌)×黑色(雄)C57B;2)雌性白鼠与 F1(C57BL 雌×CBA 雄)雄鼠;3)雌性白鼠与 F1(C57BL 雌×DBA 雄)三个组合之一的交配雌鼠^[3]。若移入胚胎为有色的话,则选用昆明白色雌×白色雄作为受体。

3 移植部位

对于胚胎移植的受体小鼠,即寄母小鼠,可供胚胎移入的部位有输卵管和子宫角。所以有输卵管移植法和子宫移植法两类。在操作时应根据胚胎发育时期和受体条件双向选择采用适当的移植方法。

4 手术准备

4.1 麻醉 可用1.5%的戊巴比妥钠(0.15~0.2 mg/10 g 体重)腹腔注射麻醉,效果很好;也可采用氯氨酮(0.6~1.2 mg/10 g 体重)或氨基甲酸乙酯(1.2~1.6 mg/10 g 体重)做麻醉剂。注射后一般5~10分钟即可起效。维持时间在0.5~1小时之内较好。少数小鼠使用上述剂量不能有效麻醉,可略为补充。麻醉较好的标准是小鼠安静不挣扎,稍用力掐后肢时小鼠会抽回。

4.2 固定 可选用厚度为3~4 mm,长宽分别15 mm×12 mm的透明有机玻璃,然后按小鼠平卧四肢拉伸后,在两前肢的腕关节部位和两后肢的附关节部位的相应的有机玻璃板上钻4个圆孔,直径为2 mm。将完整的橡皮筋由底面穿过有机玻璃板上的圆孔,在上面形成环状,由底部牵引时可收缩橡皮筋环。固定小鼠时采用平卧方式,将四肢套进橡皮筋环后拉紧即可,既快又不会造成损伤。小鼠的固定并不是必须的,若麻醉掌握得好和操作熟练,则不必固定。

5 移植操作

5.1 输卵管移植 输卵管移植的方式又有两种,现分别介绍。

5.1.1 经喇叭口移植法 麻醉小鼠,除去手术区背毛,背中略靠后部纵向切(剪)开一长为10~15 mm的纵向开口,通过透明的背肌体壁确定卵巢、输卵管和子宫的位置,并在其上方的体壁上开一小口。用眼科镊轻轻拉出卵巢、输卵管及部分子宫。避开血管,在包裹卵巢和输卵管开口的卵巢囊膜上撕开一小口,用尖镊子固定住输卵管开口或漏斗部,然后把直径为100

~120 μm 的玻璃胚胎细管从输卵管开口即漏斗部插入,将胚胎及少量培养液吹入输卵管。若遇到卵巢囊内充血或卵巢囊膜出血,可用消毒的卫生纸或滤纸及时吸去血液。

5.1.2 经膨大部移植法 手术方式及顺序同经喇叭口移植法。拉出卵巢和输卵管后,先用4号针尖(或更细一些的胰岛素注射针头)在输卵管膨大部前上方靠近卵巢的部位扎一小口,注意避开血管。针尖可预先蘸点1%的台盼兰以指示输卵管上的开口位置。然后将装有胚胎的玻璃管轻轻插入小口,并推进到输卵管膨大部,将胚胎吹出^[4]。这可以胚胎移植管中胚胎前后的气泡都进入输卵管作为标志。与经喇叭口移植法相比较,经膨大部移植法不受卵巢囊内充血的影响,但在移植时应尽量选用细的胚胎移植管径。

5.2 子宫内移植 子宫内移植的手术难度较小,但只适用于从桑椹胚到囊胚期阶段的胚胎。方法是选见阴栓第2.5天或第3.5天的怀孕或假孕雌鼠。背位开一口,在子宫角靠输卵管部位选血管分布少的部位,用4号针扎一小孔,然后用玻璃微管把桑椹胚或囊胚期的胚胎移入。

无论何部位的移植,都应尽量避免带入多余的培养液或气泡。每次移入操作后,应将移植管尖端浸入培养液中,在解剖镜下检查移植管中是否有余留胚胎。若有,应再次补移。为确定移入胚胎的分布,可在移入后的第10天或18.5天打开腹腔检查移植胚胎的植入或分布以及胎儿成活情况。18.5天的胎儿从子宫中取出后可用同期产仔的继母小鼠哺育。

6 孕鼠编号

胚胎移植的受体小鼠可采用双耳剪口和剪爪编号,如图1所示。它具有简便易记的特点,只用剪刀而无需采用专用的打孔工具即可完成。方法是左耳由前向后三个部位即前、中、后剪一个三角形的缺口。前部切口为1号、中部切口为2号、后部切口为3号;二个切口为4号,三个切口为5号。右耳与左耳相应位置的切口分别代表6~10号。11号开始为左上肢

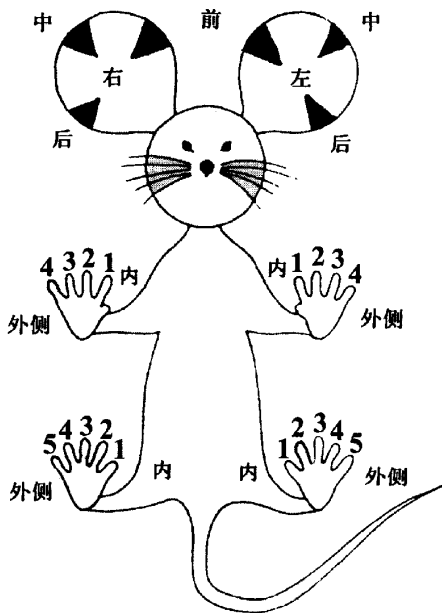


图1 双耳剪口及前后肢剪爪编号法

加耳号。左上肢从内侧开始切去第1指加耳号表示11~20号;分别切去第2~4指加耳号分

别表示21~50。左右前肢内侧同时切去第1指加耳号表示51~60号。单独切去右内侧第1指加耳号表示61~70号。分别切去第2、3、4指加耳号表示71~100号。分别切去下肢左右趾加前肢和耳号可编第101~1010号。此种编号和记忆原则是“由前向后,从左向右,从内向外;个位耳,十位手,百位脚”。这种编号方式简单明了,不用专门回忆记录就可直接看出。

参 考 文 献

- [1] 菅原七郎著(张志超,徐春生主译).哺乳动物发育工程实验方法.南京:南京大学出版社,1994.121~142.
- [2] Hogan B, F. Costantini, E. Lacy. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1986. 246~267.
- [3] Wang M-K, Y. Kato, Y. Tsunoda. Effects of several factors on the monozygotic twin production in the mouse. *J. Reprod. Dev.*, 1997, **43**(1): 91~95.
- [4] 王敏康,张田,刘冀琰等.一种改良的胚胎吸管.动物学杂志,1999, **34**(6): 34~35.
- [5] Kimura Y, R. Yanagimachi. Intracytoplasmic sperm injection in the mouse. *Biol. Reprod.*, 1995, **52**: 709~720.