



小鼠胚胎移植技术优化及对巨细胞病毒净化研究

杜 凯^{1,2} 李文光¹ 吴德国¹ 赵德明²

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101) (2. 中国农业大学, 北京 100094)

摘要:目的 建立小鼠巨细胞病毒净化方法,以获得无 MCMV 感染的小鼠。方法 利用胚胎移植技术,通过使用不同激素、不同发情周期注射激素、受体鼠品系、不同的移植方法、不同时期胚胎移植,以及移植胚胎数量等对比试验,优化了净化条件。利用优化的胚胎移植净化方法,对供体鼠进行了净化。**结果** SIGMA 生产的激素,在 10 IU 剂量下超排得到的可用胚胎数量约为 17 枚/只;在小鼠发情间期超排得到的可用胚胎最多,超排的可用胚胎数约为 23 枚/只;选取 C57 雄性小鼠与 ICR 雌性小鼠交配的子一代作为受体鼠,产仔率达 44.5%;输卵管移植较子宫移植效果好,产仔率为 40.64%;移植 2 细胞胚胎的妊娠率为 80%,明显优于单细胞和 8 细胞;受体鼠移植 24 枚胚胎时,产仔率达到了 43.75%。利用优化的小鼠巨细胞病毒胚胎移植净化方法,净化得到了无 MCMV 感染的小鼠。**结论** 建立了小鼠巨细胞病毒净化方法,为获得无 MCMV 感染的小鼠种群提供了可靠的保障。

关键词:小鼠巨细胞病毒;胚胎移植;净化

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)05-0031-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.006

实验动物是相关科学研究重要的、不可或缺的实验材料,动物的质量可直接反映出科研水平的高低^[1]。小鼠巨细胞病毒可导致小鼠肺炎,感觉神经性耳聋,眼内感染,心脏感染(心包心肌炎、营养不良性心脏钙化,皮肤感染疱疹),脑炎,肝炎等^[2-4],对毒理学、免疫学、药理学、肿瘤学等试验会产生影响。因此,从事相关试验研究使用的小鼠需要排除小鼠巨细胞病毒的感染。

1 材料与方法

1.1 小鼠来源

结扎鼠、供体鼠、受体鼠来源于遗传发育所动物中心。待净化鼠:C57 小鼠,经检测种群感染小鼠巨细胞病毒。

1.2 实验药品

PMSG、hCG 分别购自宁波第二激素厂和 SIGMA 公司,M2 操作液、M16 培养液和二甲基亚砜(DMSO)购自 SIGMA 公司。

1.3 方法

1.3.1 结扎雄鼠的准备:双侧输精管结扎雄鼠。手

术 1 周后,与雌鼠交配,见到阴道栓的雌鼠未怀孕,证明雄鼠结扎成功,可使用。使用时,做好见栓记录,连续 4~6 次不见栓的结扎鼠以二氧化碳吸入法^[5]淘汰处死。

1.3.2 供体鼠的超排处理:雌鼠在实验第 1 天下午 16 时腹腔注射 PMSG,第 3 天下午 16 时腹腔注射 hCG。注射 hCG 后,1 只雌鼠与 1 只雄鼠进行合笼。第 4 天上午 8 时检查雌鼠阴道是否有栓塞,见栓的鼠作为供体。

1.3.3 受体的同期发情处理:假孕雌鼠是通过用结扎雄鼠与受体鼠交配得到的。第 3 天下午 16 时,结扎雄鼠与受体鼠合笼交配。

1.3.4 胚胎采集、冲洗:在实验的第 5 天,通过脱颈法处死供体雌鼠,用 70% 的酒精喷洒腹部,使用眼科剪在腹部中间剪开一个小口。眼科镊夹住剪开的皮肤,向头尾部拉伸使毛发脱离腹腔。眼科剪剪开腹膜,取出输卵管、子宫,转移到装有 M2 的平皿上。注射器吸取冲胚液,将胚胎冲出。使用移卵管将胚胎收集起来,转移到含新鲜 M2 的培养液中,反复洗几次。将胚胎转移至微滴培养皿中,培养液清洗,

收稿日期:

作者简介:杜 凯(1982—),男,博士,工程师,研究方向:实验动物.E-mail: kdu@genetics.ac.cn

通信作者:赵德明(1958—),男,博士,教授.研究方向:动物病原和病理学.E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

37 ℃、5%二氧化碳的条件培养暂存。

1.3.5 品质鉴定:在胚胎保存液中将胚胎清洗 2~3 次后,放于显微镜下观察,品质鉴定分为优良胚胎、普通胚胎、不良胚胎和不可用胚胎,其中优良胚胎和普通胚胎为可用胚胎。

1.3.6 胚胎移植:交配后 0.5~3.5 d 的单细胞发育到囊胚阶段的胚胎,可以移植到假孕雌鼠的生殖道内使其继续发育。1.5 d 的胚胎可以移植到假孕 1.5 d 小鼠的输卵管壶腹部,而 3.5 d 的胚胎可以移植到 2.5 d 或 3.5 d 假孕雌鼠的子宫内。

1.3.7 检测:受体鼠产仔后,利用已报道的小鼠巨细胞病毒 PCR 检测方法^[6]进行检测。

1.4 试验

1.4.1 不同厂商激素的对比试验:按照 1.3.2 介绍的超排方法进行,使用不同厂商、不同剂量的激素进行超排处理,对比得到的胚胎数量,以及优良胚胎和正常胚胎占到总胚胎数量的比率。选取的两家 PMSG、HCG 厂家为:SIGMA、宁波第二激素厂。剂量分别选取 5、7.5、10IU。

1.4.2 小鼠不同发情周期注射激素的对比试验:选取不同发情周期的供体小鼠注射 PMSG,后续超排按照 1.3.2 方法进行,对比超排出受精卵的数量,用以确定选取哪个发情周期的小鼠进行超排处理。

1.4.3 受体鼠品系的对比试验:选取 C57、ICR、C57 雄性与 ICR 雌性交配的子一代(CIF1 代)以及 C57 雌性与 ICR 雄性交配的子一代(ICF1 代)作为受体鼠,利用输卵管移植法移植 C57 小鼠 2 细胞的胚胎,双侧输卵管移植,移植相同数量的胚胎,对比仔鼠出生后的移植率。

1.4.4 输卵管移植与子宫移植产仔率的对比试验:选取 C57 小鼠,随机分成两组。分别进行输卵管移植和子宫移植,均进行双侧移植。产仔后计算产仔数量,得出产仔率。

1.4.5 不同时期胚胎通过输卵管移植的成功率试验:采集的 C57 小鼠的单细胞、2 细胞和 8 细胞胚胎,进行输卵管移植,移植到 ICR 母鼠的输卵管内,观察受体鼠的妊娠率,用以评价不同时期的胚胎对输卵管移植成功率的影响。

1.4.6 输卵管移植移植胚胎数量的对比试验:选取品质在优良、正常的 2 细胞胚胎,移植到受体鼠的输卵管内,每只小鼠移植 12、24、32 枚胚胎,观察受体鼠的产仔率,用以评价移植胚胎数目的不同对输卵

管移植效果的影响。

2 结果

2.1 不同厂商激素的对比试验结果

按照 1.3.2 介绍的方法分别对 8 周 C57 小鼠 60 只使用不同厂商、不同剂量的激素进行超排处理,对比得到的胚胎数量,以及优良胚胎和正常胚胎占到总胚胎数量的比率。由表 1 可知,使用 SIGMA 生产的激素超排效果无论从可用胚胎数和可用胚胎比率看,均明显优于宁波第二激素厂。SIGMA 产激素超排不同剂量间可用胚胎比率差别不大,使用 10IU 剂量超排 C57 小鼠的优良、正常胚胎数约 17 枚/只。

表 1 不同厂商不同剂量的激素对比试验结果

Table 1 Results of different hormones in different manufacturers				
厂商	剂量/IU	优良、正常 胚胎数/枚	不良、不可用 胚胎数/枚	可用胚胎 比率/%
宁波第二激素厂	5.0	34	36	48.57
	7.5	32	36	47.06
	10.0	41	35	53.95
SIGMA	5.0	80	19	80.81
	7.5	145	31	82.39
	10.0	171	39	84.26

2.2 小鼠不同发情周期注射激素的对比试验结果

每组分别选取 10 只发情间期、发情前期、发情期、发情后期 8 周的 C57 小鼠,按照 1.3.2 介绍的方法进行超排处理,SIGMA 产激素使用 10IU,对比得到的胚胎数量,以及优良胚胎和正常胚胎占总胚胎数量的比率。由表 2 可知,在小鼠的发情间期超排,得到的优良、正常胚胎数量最多,平均每只小鼠获得约 23 枚胚胎。

表 2 不同发情周期注射激素的对比结果

Table 2 Results of injection hormones in different estrous cycles			
发情周期	超排小鼠 数量/只	胚胎总数/ 枚	优良、正常 胚胎数/枚
发情间期	10	248	229
发情前期	10	195	182
发情期	10	129	123
发情后期	10	152	132

2.3 受体鼠品系的对比试验结果

选取 8 周的 C57、ICR、CIF1 代和 ICF1 代的受体

鼠,采用输卵管移植方法,双侧输卵管移植,移植 25 枚 2 细胞胚胎,待仔鼠出生后计算产仔数量,得出 4 种不同品系的小鼠的产仔率分别为 37.5%、42%、44.5%和 43.5%。由表 3 可知,CIF1 代小鼠作为受体产仔率较高。

表 3 受体鼠品系的对比结果

Table 3 Results of recipient mouse strains				
品系	受体母鼠数量/只	胚胎数量/枚	产仔数/只	产仔率/%
C57	8	200	75	37.5
ICR	8	200	84	42.0
CIF1	8	200	89	44.5
ICF1	8	200	87	43.5

2.4 输卵管移植与子宫移植产仔率对比试验结果

选取 17 只 ICR 小鼠,随机分成两组,分别进行输卵管移植和子宫移植,均进行双侧移植,其中输卵管移植 ICR 母鼠 10 只共移植 251 枚优良、正常胚胎,子宫移植受体母鼠 7 只共移植 211 枚 C57 小鼠胚胎。由表 4 可知,输卵管移植和子宫移植分别产仔 102 只、58 只,产仔率分别为 40.64%、27.49%。

表 4 不同移植方法产仔率对比试验结果

Table 4 Results of different transplantation methods in birth rate						
移植方法	供体品系	受体品系	妊娠数量/只	移植胚胎数/枚	产仔数/只	产仔率/%
输卵管移植	C57	ICR	10	251	102	40.64
子宫移植	C57	ICR	7	211	58	27.49

2.5 不同时期胚胎通过输卵管移植的成功率试验结果

采集 C57 小鼠的单细胞、2 细胞和 8 细胞胚胎,进行输卵管移植,移植到 ICR 母鼠的输卵管内,观察受体鼠的妊娠率,由表 5 可知,移植 2 细胞胚胎的妊娠率最高,达到了 80%,而移植单细胞和 8 细胞的妊娠率分别为 50%和 40%。

表 5 移植不同时期胚胎的对比试验结果

Table 5 Results of embryo transfer in different periods				
不同时期胚胎	受体母鼠数量/只	胚胎数/枚	怀孕数量/只	妊娠率/%
单细胞	10	208	5	50
2 细胞	10	203	8	80
8 细胞	10	205	4	40

2.6 输卵管移植移植胚胎数量的对比试验结果

选取品质在优良、正常的 2 细胞胚胎,移植到受体鼠的输卵管内,每只小鼠移植 12、24、32 枚胚胎,

以观察受体鼠的产仔率。由表 6 可知:当受体鼠移植 24 枚胚胎时,产仔率最高达到了 43.75%,而移植 12、32 枚胚胎的产仔率分别为 37.5%和 34.38%。

表 6 移植数量的对比试验结果

Table 6 Results of different numbers of embryo transfer				
胚胎总数/枚	移植胚胎数量/(枚/只)	妊娠数量/只	产仔数量/只	产仔率/%
120	12	8	45	37.50
240	24	8	105	43.75
320	32	7	110	34.38

2.7 仔鼠的检测结果

仔鼠出生后,眼角静脉丛采集抗凝血。利用小鼠巨细胞病毒 PCR 检测方法进行检测,结果显示均为阴性,见图 1。说明感染小鼠巨细胞病毒的 SPF 级小鼠,经过建立优化的胚胎移植净化方法,成功排除了小鼠巨细胞病毒的感染。

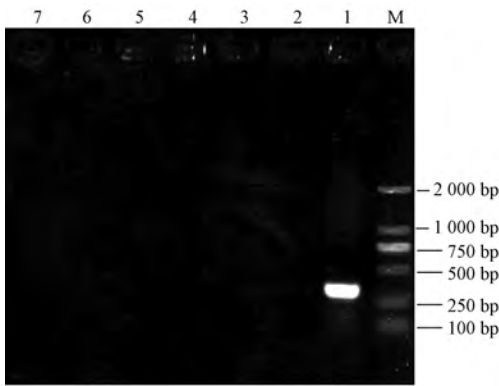


图 1 PCR 检测结果

注:M:D2000 Marker; 1: 阳性对照; 2: 阴性对照;
3: 样品 1; 4: 样品 2; 5: 样品 3; 6: 样品 4; 7: 样品 5

Fig.1 Results of PCR

Note:M:D2000 Marker; 1: Positive control; 2: Negative control;
3:Sample1; 4:Sample2; 5:Sample3; 6:Sample4; 7:Sample5

3 讨论

用于小鼠净化的方法主要为药物净化、剖腹产净化和胚胎移植净化^[7-9]。药物净化有一定的作用^[10],净化不理想,难以达到目的。剖腹产净化主要难点在于较难判断母鼠的妊娠期,而且仔鼠的气味会影响其代乳过程中的存活和育成,有的病毒(如淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒)可通过胎盘造成净化的失败。胚胎移植技术逐渐受到试验人员的重视。小鼠的胚胎透明带可形成一道天然的屏障,能



有效地抵御细菌、病毒的侵入^[11],能通过胎盘屏障的病原体也不能穿透透明带,且胚胎在供体鼠体内时间很短,也有效降低了母子间垂直传播的可能性,同时在胚胎移植过程中的冲洗步骤还能有效减弱或消除病原体的活力^[12],这些极大地增加了对病原体净化的有效性,为排除小鼠巨细胞病毒奠定了坚实的基础^[13]。

本文利用优化的胚胎移植净化技术对感染了小鼠巨细胞病毒的 SPF 级小鼠进行了胚胎移植净化,获得了无小鼠巨细胞病毒感染的 SPF 级小鼠。

参 考 文 献

[1] 李瑞生,董罡,孔德强,等. 胚胎移植技术对特种突变小鼠的净化研究[J].中国实验动物学报,2005,13(4):239-241.

[2] Ikuta K, Ogawab H, Hashimoto H, *et al.* Restricted infection of murine cytomegalovirus (MCMV) in neonatal mice with MCMV-induced sensorineural hearing loss [J]. J Clin Virol, 2015, 69: 138-145.

[3] Lokensgard J R, Schachtele S J, Mutnal M B, *et al.* Chronic Reactive gliosis following regulatory T cell depletion during acute MCMV encephalitis [J]. GLIA, 2015, 63 (11): 1982-1996.

[4] 刘玲玲. 小鼠巨细胞病毒免疫致病机制的研究[D]. 武汉:华中

科技大学,2014.

[5] 史光华,李麟辉,吕龙宝,等. 实验动物仁慈终点及安乐死的法规现状与思考[J].实验动物科学,2019,36(2):72-75.

[6] 杜凯,吴德国,赵德明. 小鼠巨细胞病毒 PCR 诊断方法的建立及其应用[J]. 实验动物科学,2015,32(5):11-14.

[7] 魏履升,田沈,章兆和,等. 药物净化法建立 SPF 小鼠群的探讨[J]. 上海畜牧兽医通讯,1983,3(4):195-196.

[8] 麦丽开·阿不力米提,徐艺玫,侯岩岩,等. KM 种白内障小鼠的剖腹净化研究[J]. 疾病预防控制通报,2013,28(2):7-8.

[9] 刘丽均,郁丽丽,朱权凤,等. 生物工程技术在实验小鼠生物净化上的应用[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(11):63-66.

[10] Towne J W, Wagner A M, Griffin K J, *et al.* Elimination of pasteurella pneumotropica from a mouse barrier facility by using a modified enrofloxacin treatment regimen [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014, 53(5): 517-522.

[11] 龙家茹,孙戈. 动物卵母细胞透明带与受精的关系[J]. 井冈山学院学报: 综合版,2008,29(4):62-64.

[12] Goh B T, Smith G W, Samarasinghe L, *et al.* Penicillin concentrations in serum and cerebrospinal fluid after intramuscular injection of aqueous procaine penicillin 0.6 MU with and without probenecid[J]. Br J Vener Dis, 1984, 60(6): 371-373.

[13] 刘伟,陶芳标,黄德武,等. 应用胚胎移植技术培育 SPF 级小鼠的研究进展[J]. 河北联合大学学报(医学版),2013, 15(1):30-32.

Optimization of Mouse Embryo Transfer Technology and Purification of Cytomegalovirus

DU Kai^{1,2}, LI Wenguang¹, WU Deguo¹, ZHAO Deming²

(1. Institute of Genetics and Developmental Biology Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

(2. China Agriculture University, Beijing 100094, China)

Abstract: Objective A mouse cytomegalovirus purification method was established to obtain mice without MCMV infection. **Method** The purification conditions were optimized by using different hormone, different estrous cycle injection hormone, receptor mouse strain, different transplantation method, different embryo transfer, and the number of transplanted embryos. The donor mice were purified by the optimized method of embryo transfer purification. **Result** The result showed that the number of embryos produced by SIGMA was over 17 at 10 IU. The number of embryos available for ovulatory superovulation is the largest, and the number of embryos available for superovulation is about 23. The offspring of C57 male mice and ICR female mice were the recipient mice, with a litter size of 44.5%. The effect of tubal transplantation is better than that of uterus transplantation, with a birth rate of 40.64%. The pregnancy rate of transplanted 2 cell embryos was 80%, better than that of single cells and 8 cells. When the recipient mice transplanted 24 embryos, the litter size reached 43.75%. Mice without MCMV infection were purified by embryo transfer. **Conclusion** A purification method of murine cytomegalovirus was established to provide reliable protection for the population of mice without MCMV infection.

Key words: murine cytomegalovirus; embryo transfer; purify