

赖娅娜, 曾文滔. 真孕受体用于金黄仓鼠胚胎移植的方法建立与优化 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(10): 72-77.

Lai YN, Zeng WT. Establishment and optimization of a method for transferring golden hamster embryos using true pregnancy recipients [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(10): 72-77.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.10.009

真孕受体用于金黄仓鼠胚胎移植的方法建立与优化

赖娅娜, 曾文滔*

(南京医科大学医药实验动物中心, 南京 211166)

【摘要】 目的 优化金黄仓鼠胚胎移植技术, 探索金黄仓鼠真孕受体最佳移植胚胎数目及发育时期。**方法** 建立真孕白化金黄仓鼠种群作为胚胎移植受体, 比较胚胎发育期、受体减胚及二次移植受体对产仔率、供胚得仔率及后代存活率的影响, 确定真孕受体最佳胚胎移植枚数及移植方法。**结果** 相对于野生型金黄仓鼠作为移植受体, 真孕白化受体可快速判定子代来源, 并适用于多种以胚胎移植为基础的生殖类实验方案, 采用受精卵或二细胞胚胎对移植效果无显著影响 ($P>0.05$); 减胚组能显著提高供胚得仔率 (22%, $P<0.05$), 二次移植受体的未孕率显著提高 (42%, $P<0.01$); 移植 6~10 枚胚胎的供胚得仔率最高 (27%, $P<0.01$), 存活率正常 (89%)。**结论** 6~10 枚供体胚胎有助于提高供胚得仔率和存活率, 基于白化真孕受体的胚胎移植方法, 为金黄仓鼠的应用与开发提供了技术支撑。

【关键词】 金黄仓鼠; 受精卵; 二细胞胚胎; 胚胎移植

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 10-0072-06

Establishment and optimization of a method for transferring golden hamster embryos using true pregnancy recipients

LAI Yana, ZENG Wentao*

(Animal Core Facility of Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China)

【Abstract】 Objective To optimize the technical parameters used for embryo transfer in golden hamsters, and explore the optimal number and developmental period of transplanted embryos for golden hamster pregnancy recipients. **Methods** We established a population of true pregnant albino golden hamster embryo transfer recipients and compared the effects of different embryonic developmental stages, recipient embryo reduction, and secondary transfer recipients on litter yield, donor embryo yield, and offspring survival rate. **Results** Compared with wild-type golden hamster transplant recipients, true pregnancy albino recipients allowed the origin of the offspring to be determined quickly, and were suitable for various reproductive experimental programs based on embryo transfer. The use of fertilized eggs or two-cell embryos had no significant impact on the transfer effect ($P>0.05$); however, the rate of donor embryos was significantly increased in the recipient embryo-reduction group (22%, $P<0.05$). The second transfer recipient's non-pregnancy rate was significantly increased (42%, $P<0.01$). The highest embryo yield rate (27%, $P<0.01$) and normal survival rate (89%) occurred with the transfer of 6~10 embryos. **Conclusions** The transfer of 6~10 donor embryos may improve the yield and survival rate of donor embryos. Here, we successfully established an embryo transfer method using pregnant albino golden

【基金项目】 江苏省实验动物协会科研项目 (DWXH202303); 江苏省卫健委医学科科研项目 (Z2023003); 国家重点研发计划 (2021YFF0702500)。

【作者简介】 赖娅娜 (1979—), 女, 实验师, 硕士, 研究方向: 基因编辑动物模型构建。E-mail: lai yana@njmu.edu.cn

【通信作者】 曾文滔 (1987—) 男, 高级实验师, 研究方向: 生殖医学与遗传。E-mail: wentaozeng@njmu.edu.cn

hamsters as recipients, thus providing technical support for the application and development of gene modification models in golden hamsters.

[Keywords] golden hamster; fertilized egg; two-cell embryos; embryo transfer

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

金黄仓鼠 (golden hamster) 又称叙利亚仓鼠 (Syrian hamster), 属于啮齿目仓鼠科, 因其具有繁殖周期短、易于饲养等特点, 成为早期研究配子发生及受精机制的主要模式动物之一^[1-2]。与哺乳类动物中应用最广泛的小鼠相比, 仓鼠在肿瘤学、遗传学、生殖研究领域、营养学和传染病学等医学生物学研究领域具有更为明显的优势^[3-6]。金黄仓鼠生殖技术虽然起步早, 但其卵子和早期胚胎对外环境异常敏感, 极易形成胚胎发育阻滞, 其卵子或早期胚胎体外操作至今仍是一件极具挑战的工作; 此外, 雄性金黄仓鼠无凝固腺, 利用结扎雄鼠制作的假孕受体鼠无法通过阴栓判定是否交配, 移植效率极低。由此不仅导致金黄仓鼠胚胎移植相关基础数据的缺乏, 更是制约了金黄仓鼠在生殖生物学和基因工程领域的研究应用^[7-10]。

实验动物的标准化是保障实验数据和结果准确性的必要前提和基础。以胚胎移植为基础的生物净化可高效、快捷地提高实验动物病原微生物等级^[11], 配合种资源冷冻保存技术可快速应对感染区动物净化处理工作, 是现今使用最广泛的生物净化和生物安全防控方法^[12]。目前, 国内金黄仓鼠仍采用剖腹产净化的方法^[3], 建立简便的胚胎移植方法对基因修饰金黄仓鼠建立与应用具有重要意义。本文通过真孕白化金黄仓鼠提高移植胚胎附植率, 探索并优化金黄仓鼠真孕受体胚胎移植关键性技术参数, 以为金黄仓鼠模型应用与种资源传递提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8~20 周 SPF 级金黄仓鼠雄鼠 20 只、雌鼠 40 只, 体重 (120±20) g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供 [SCXK (京) 2021-0011]。SPF 级白化金黄仓鼠 (8~20 周雄鼠 40 只、雌鼠 200 只, 体重 (120±20) g) 及净化供胚品系 (8~20 周雄鼠 50 只、雌鼠 150 只, 体重 (120±20) g) 为本单位利用 CRISPR-Cas9 技术构建。使用大鼠 IVC 笼架饲养于南京医科大学医药实验动物中心屏障环境 [SYXK (苏) 2020-0022], 14 h/10 h 明/暗循环 (明 6:00~

20:00), 自由采食。实验动物病原微生物检验由南京医科大学医药实验动物中心质量保障部完成 (BSL-2, NJ2022210)。所有实验均经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准 (IACUC-2210035、IACUC-2402038), 实验设计及饲养使用过程均遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

HECM-11 胚胎培养液^[4] (配制, 所有试剂均购于美国 Sigma 公司); 石蜡油 (美国 Sigma 公司, 货号 M8410); 三溴乙醇 (美国 Sigma 公司, 货号 T48402); 叔戊醇 (美国 Sigma 公司, 货号 721123); 透明质酸酶 (美国 Sigma 公司, 货号 H3506); 孕母马血清促性腺激素 (宁波第二激素厂, 批号 B2301111)。大鼠 IVC 笼架 (苏州猴皇公司, 型号 MK-D-1); 三气培养箱 (德国 Eppendorf 公司, 型号 Galaxy 48R); 体式显微镜 (日本 Olympus 公司, 型号 SZX10); 移液枪 (德国 Eppendorf 公司, 型号 100 μL、1 mL); 培养皿 (美国 Corning 公司, 货号 430165); 手术镊 (瑞士 Dumont 公司, 型号 15916-G); 眼科镊 (瑞士 Dumont 公司, 型号 500338); 手术剪 (张家港大都医疗器械, 型号 YYJ-PT); 反力式止血夹 (上海金钟手术器械, 型号 XEC230); 持针器 (上海金钟手术器械, 型号 J32010); 缝合针 (上海医用缝合针厂, 型号角②弧 6×10); 缝合线 (上海医用缝合针厂, 型号 5-0); 洗卵针 (北京吉田生物, 货号 BJ-40)。

1.3 实验方法

1.3.1 受体种群建立及实验分组

真孕移植受体鼠为本单位自主构建的酪氨酸酶敲除白化金黄仓鼠 ($Tyr^{-/-}$)^[4]。购买的 SPF 级金黄仓鼠经隔离检疫后作为受体鼠接受 $Tyr^{-/-}$ 胚胎移植, $Tyr^{-/-}$ 移植后代以自然配繁的方式建立白化系受体种群。实验一, 移植受体根据胚胎发育时期分为受精卵移植组和二细胞期移植组, 研究金黄仓鼠最佳的胚胎移植时期; 实验二, 以二细胞期移植组为对照组, 比较受体减胚组及受体二次移植组对移植胚胎的产仔率和活仔率的影响; 实验三, 根据二细胞期胚胎移植数目分为 6~10 枚、11~15 枚、16~20 枚、21~25 枚及 26~30 枚 5 组, 研究金黄仓鼠最佳胚胎移植数目。以上各组移植受体数不少于 5 只。

1.3.2 供体鼠与受体鼠制备

所有雌鼠需要经过 2 个情期记录,按发情时间分组使用。供体鼠(6~8 周龄)在发情周期的第 1 天根据体重腹腔注射孕母马血清促性腺激素(PMSG,15 IU/120 g)诱导超排卵,发情第 4 天与雄性仓鼠 1:1 合笼配繁(雄鼠合笼频次间隔 1 周以上),次日 9:00 镜检雌性阴道分泌物(图 1A、1B),有精子判定为交配供体。受体鼠在自然发情第 4 天与雄鼠 1:1 配繁,检精当天记为 0.5 d,受精卵及二细胞胚胎均移植 0.5 d 自然交配受体。

1.3.3 供体受精卵及二细胞胚胎的获取

提前 1 d 制备 HECM-11a 或 HECM-11b 培养微滴,在 37.5 ℃ 三气培养箱平衡过夜(10% CO₂、5% O₂、85% N₂)。受精卵在检精当天 13:00 左右取卵,操作液为 HECM-11a,二细胞胚胎在检精次日 13:00 左右取卵,操作液为 HECM-11b。腹腔注射 1.25% 阿佛丁(1.8 mL/100 g)麻醉后断颈处死供体雌鼠,暴露腹腔剪取输卵管,置于培养微滴内,在体式显微镜下,用眼科镊撕开输卵管壶腹部,释放出细胞团,加入 30 μL 透明质酸酶消化处理 3~5 min。将受精卵在 HECM-11a 微滴内洗涤 3 次,去除多核受精卵及未受精卵子。二细胞胚胎无需透明质酸酶处理,撕开输卵管释放胚胎后用口吸管洗涤 3 次,挑

选卵裂球大小均匀的二细胞胚胎备用,收集胚胎及胚胎移植均在暗室红色光源下进行。

1.3.4 金黄仓鼠胚胎移植

1.25%阿佛丁麻醉受体雌鼠,背部皮肤正中开口后,在腹部肋骨与髂骨之间打开腹壁肌肉层,镊取脂肪垫拉出一侧卵巢及输卵管(图 1C),吸取一定数目胚胎备用,在体式显微镜下用眼科镊纵向撕裂输卵管壶腹部与伞端之间,移植管向输卵管壶腹部吹入胚胎。受体减胚组完成胚胎移植后取出另一侧生殖附件,将输卵管与子宫链接处截断,减少受体鼠自身的胚胎数量,提高供胚生存空间。提前用保温桶(含 37.5 ℃ 温袋)避光转运胚胎至屏障内生殖实验室,需在 2 h 内完成取胚及移植实验。

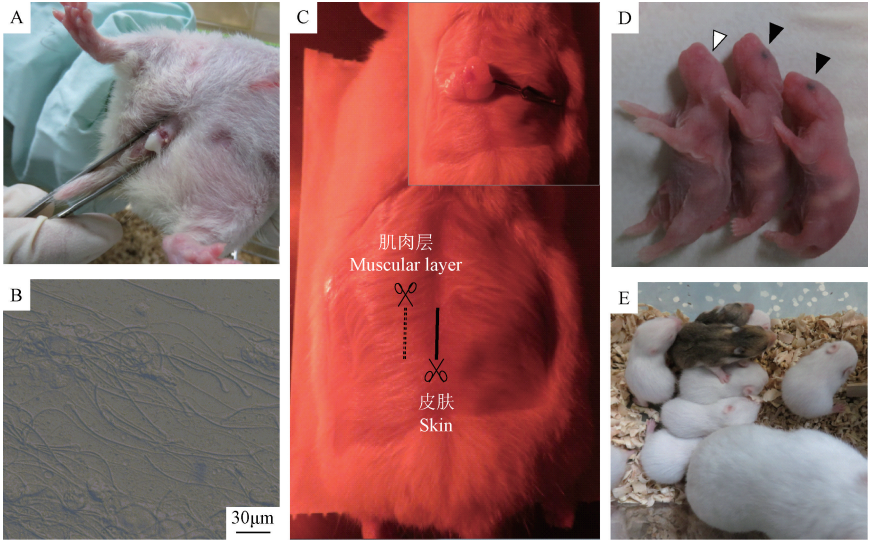
1.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件进行数据分析,组间采用独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 白化金黄仓鼠种群构建

利用真孕金黄仓鼠受体移植 *Tyr*^{-/-} 仓鼠胚胎,成功获得了 SPF 级 *Tyr*^{-/-} 仓鼠繁育种群。后续金黄仓鼠胚胎移植数据统计过程中,产仔当天通过眼睛色素判定供胚产仔情况,黑色为供胚子代,1 周后可



注:A:发情第 1 天及交配后取阴道分泌物;B:阴道分泌物涂片镜检精子;C:胚胎移植时受体皮肤及肌肉层开口位置;D:产仔首日通过眼睛色素判定供胚发育幼鼠;E:1 周后可通过毛色辨别幼鼠来源。

图 1 胚胎移植方法及后代幼鼠辨别

Note. A, Vaginal secretions were taken on day 1 of estrus and after mating. B, Smear of vaginal secretions for microscopic examination of sperm. C, Location of the opening of the skin and muscle layer of the recipient at the time of embryo transfer. D, Donor embryo developmental litter was determined by eye pigment on the first day of delivery. E, Offspring developed from donor embryos were identified by hair color after one week.

Figure 1 Embryo transfer method and offspring identification

通过毛色区分(图 1D、1E)。净化过程中产生的 $Tyr^{-/-}$ 后代可转为备用受体鼠,用于受体种群贮备和更新。

2.2 不同发育时期胚胎移植

将移植胚分为受精卵移植组和二细胞移植组,明确胚胎移植最佳发育时期。移植数据显示受精卵期供胚产仔率为 11%、幼鼠存活率为 92%;二细胞期供胚产仔率为 14%、存活率为 83%,两组数据无显著性差异($P>0.05$),未孕受体数和受体产仔数相近;采用受精卵与二细胞胚胎移植后供胚平均数没有显著性差异,低比例的供胚得仔率证明受体胚胎比移植胚胎更具竞争优势。实验结果表明,金黄仓鼠受精卵与二细胞胚胎期均可用于真孕受体胚胎移植,供胚得仔率偏低(见表 1)。

2.3 真孕受体单侧输卵管结扎减胚移植结果

以二细胞移植组为对照组,比较受体减胚组

(对侧输卵管结扎)组及受体二次移植组(首次移植造成的输卵管断裂)对于移植效果的影响。结果显示,受体减胚组的供胚得仔率为 22%,显著高于其它两组($P<0.05$),平均供胚得仔率 73%(3 只),高于对照组的 27%(2 只),证明受体减胚可以增加供胚的生长空间,提高供胚得仔率。减胚组供胚离乳存活数仅为 56%,与其它两组差异极为显著($P<0.01$)。受体二次移植组与对照组在供胚产仔率和供胚离乳存活率均无显著差异($P>0.05$),二次移植的受体未孕率(42%)高于对照组(11%)及减胚组(20%),结果表明受体鼠不宜二次利用(见表 2)。

2.4 金黄仓鼠真孕受体最佳胚胎移植数目

在二细胞移植操作中,按 6~10 枚、11~15 枚、16~20 枚、21~25 枚、26~30 枚对移植供胚数进行分组(见表 3)。在得仔率方面,受体移植 6~10 枚

表 1 胚胎不同发育时期对移植产仔情况的影响
Table 1 Effect of different developmental periods of embryos on the litter size of the transfer

分组 Groups	移植受体 总数 Total number of transplant recipients	未孕受体 Unpregnant recipient	A 移植胚胎 总数 Total number of transferred embryos	供胚得仔情况 Delivery of embryos and offspring			受体产仔情况 Receptor farrowing status	
				B		C 存活只数 (C/A) Survival number(C/A)	产仔总数 Total litter size	均只产仔数 Average litter size
				得仔总数(B/A) Total number of offspring obtained(B/A)	均只产仔数 Average litter size			
受精卵移植组 Zygotic embryo transfer group	29	4	456	51(11%)	2	47(92%)	176	6
二细胞移植组 Two-cell embryo transfer group	120	13	1926	263(14%)	2	219(83%)	715	6

表 2 不同受体鼠输卵管状态对胚胎移植产仔数的影响
Table 2 Effect of different status of the oviducts of recipient on embryo transfer litter size

分组 Groups	A 移植受体总数 Total number of transplant recipients	B 未孕受体 (B/A) Unpregnant recipient (B/A)	C 移植胚胎总数 Total number of transferred embryos	供胚得仔情况 Delivery of embryos and offspring			受体产仔情况 Receptor farrowing status	
				D		E 存活只数 (E/D) Survival number(E/D)	产仔总数 Total litter size	均只产仔数 Average litter size
				得仔总数(D/C) Total number of offspring obtained(D/C)	均只产仔数 Average litter size			
对照组 Control group	120	13(11%)	1926	263(14%)	219(83%)	2	715	6
受体减胚组 Receptor embryo reduction group	5	1(20%)	74	16(22%)*	9(56%)**	3	6	1
受体二次移植组 Recipient second transplantation group	12	5(42%)**	174	17(10%)	16(94%)	1	21	2

注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。
Note. Compared with control group,* $P<0.05$,** $P<0.01$.

表 3 供胚数对二细胞期胚胎移植产仔的影响

Table 3 Effect of number of donor embryo segments on the litter size of two-cell stage embryos transferred

分组 Groups	移植受体总数 Total number of transplant recipients	A 移植胚胎总数 Total number of transferred embryos	供胚得仔情况 Delivery of embryos and offspring			受体产仔情况 Receptor farrowing status	
			B 得仔总数(B/A) Total number of offspring obtained(B/A)		C 存活只数 (C/B) Survival number(C/B)	产仔总数 Total litter size	均只产仔数 Average litter size
6~10 枚 6~10 pcs	8	67	18(27%) ^{##}	2	16(89%)	52	7
11~15 枚 11~15 pcs	60	816	116(14%)	2	101(87%)	358	6
16~20 枚 16~20 pcs	31	528	56(11%)	2	51(91%)	197	6
21~25 枚 21~25 pcs	12	261	36(14%)	3	33(92%)	34	3
26~30 枚 26~30 pcs	8	219	35(16%)	4	16(46%) ^{##}	62	8

注:各组之间相互比较,^{##} $P<0.01$ 。
Note. Compared between different groups, ^{##} $P<0.01$.

组供胚得仔率最高(27%),显著优于其它各组($P<0.01$);在供胚存活率方面,26~30 枚胚胎移植组供胚离乳存活数最低(仅为 46%),显著低于其它几组($P<0.01$),此组的单只受体产仔只数达到了 12 只(4+8),过高的产仔数严重影响了代乳存活率,其他各组间供胚存活率没有统计学差异。因此,单只自然交配受体鼠移植 6~10 胚胎可获得最大的胚胎利用率。

3 讨论

近几年,金黄仓鼠在以新冠病毒为代表的病毒及传染病学研究中应用广泛^[9],金黄仓鼠可直接感染 SARS-CoV-2 并表现出与人类 COVID-19 相似的统计学意义^[10],SARS-CoV-2 感染的基因修饰疾病模型金黄仓鼠可能会发展为重症感染甚至死亡。因此,建立方便快捷的生物净化技术以及提高繁育鼠饲养等级尤为重要。标准的小鼠生物净化技术操作过程中需要用到假孕受体鼠,真孕受体在小鼠生物净化及辅助生殖中偶有使用,获得胚胎较少的品系可以通过真孕受体胚胎移植增加供胚得仔率,构建致死率较高的基因编辑小鼠时也会通过真孕受体来解决妊娠率低、死胎、巨胎等问题^[13]。雄性金黄仓鼠无凝固腺,利用结扎雄鼠制作的假孕受体鼠无法通过阴栓判定是否交配,移植效率极低,因此利用真孕受体鼠胚胎移植具有一定的可行性。以 $Tyr^{-/-}$ 白化金黄仓鼠品系自然交配作为胚胎移植的受体鼠的优势在于,净化过程中不仅可以通过阴

道分泌物镜检精子判定交配情况,利用新生幼鼠眼睛色素判定子代来源极大地减少了净化后代的筛选和鉴定工作;而产生的 $Tyr^{-/-}$ 后代(受体胚胎)可用于受体种群的补充和更新,形成良性循环后无需额外开展制备受体鼠的扩群工作。

金黄仓鼠胚胎体外培养与基因编辑依然面临诸多困难,其胚胎对光照、pH 值、温度等体外培养环境非常敏感,易发生胚胎发育阻滞进而影响产仔率^[4-6]。此前已发现显微注射胚胎二细胞移植要优于受精卵期^[4],二细胞胚胎不需透明质酸酶消化颗粒细胞,可快速分辨并去除未受精和发育异常胚胎,减少胚胎体外操作时间,在胚胎移植实验操作中更具优势。但本项研究对比发现未经显微注射的早期胚胎的供胚得仔率与活仔率没有统计学差异,受精卵及二细胞胚胎均可用于胚胎移植。实验还发现受体胚胎比移植胚胎更具竞争优势(受精卵移植后代占比 22%、二细胞移植后代占比 27%),真孕受体胚胎移植存在很大的局限性。通过减少受体胚胎数能明显减少受体后代的产生(27%),增加供胚的得仔率(73%),但相对较低的活仔率(减胚组 56%)和妊娠率(受体二次移植组 42%)提示受体减胚方法还需进一步研究。

明确真孕受体最佳的胚胎移植数目能有效减少供体鼠的使用量,也是“3R 原则”中减少(Reduction)原则的重要体现,在金黄仓鼠辅助生殖中具有重要的应用意义。杭州师范大学以小鼠作为移植胚胎研究对象时发现,胚胎移植并不会随着

移植胚胎数的增加而提高产仔数^[14-15],本文对二细胞移植组划分的 5 个数目区间也得出了相似的结果,6~10 枚组供胚产仔率与各组相比较差异极为显著($P<0.01$);而供胚活仔率除了显著高于 26~30 枚组($P<0.01$),与其它组没有统计学意义($P>0.05$)。因此,金黄仓鼠真孕受体单侧移植 6~10 枚胚胎可获得最佳的供胚得仔率。

综上所述,通过优化移植受体及胚胎移植方法,研究对比多因素金黄仓鼠胚胎移植技术条件,本文为金黄仓鼠胚胎移植技术提供了参考依据和数据支持,对金黄仓鼠基因修饰模型开发、应用以及种资源库的建立与分享有着重要意义。

参考文献:

[1] HIROSE M, OGURA A. The golden (Syrian) *Hamster* as a model for the study of reproductive biology: Past, present, and future [J]. *Reprod Med Biol*, 2018, 18(1): 34-39.

[2] 朱九明,顾亚平. 金黄仓鼠发情规律和排卵数的观察 [J]. *实验动物与比较医学*, 1990, 10(1): 8-9, 14.

ZHU J M, GU Y P. Observation on estrus regularity and ovulation number of golden *Hamster* [J]. *Lab Anim Comp Med*, 1990, 10(1): 8-9, 14.

[3] 郭亚茜,杜晓鹏,朱华. 金黄地鼠生物净化及其应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(5): 676-682.

GUO Y X, DU X P, ZHU H. Biological purification and application of golden *Hamster* [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(5): 676-682.

[4] ZHANG H, ZHANG F, CHEN Q, et al. The piRNA pathway is essential for generating functional oocytes in golden hamsters [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 1013-1022.

[5] HASUWA H, IWASAKI Y W, AU YEUNG W K, et al. Production of functional oocytes requires maternally expressed PIWI genes and piRNAs in golden hamsters [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 1002-1012.

[6] LOUBALOVA Z, FULKA H, HORVAT F, et al. Formation of spermatogonia and fertile oocytes in golden hamsters requires piRNAs [J]. *Nat Cell Biol*, 2021, 23(9): 992-1001.

[7] WU M, DONG B, CAO A, et al. Delineation of molecular pathways that regulate hepatic PCSK9 and LDL receptor expression during fasting in normolipidemic hamsters [J]. *Atherosclerosis*, 2012, 224(2): 401-410.

[8] JIA Y, WANG Y, DUNMALL L S C, et al. Syrian *Hamster* as an ideal animal model for evaluation of cancer immunotherapy [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1126969.

[9] 周小青,唐成程,邹庆剑. SARS-CoV-2 易感实验动物研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2021, 31(2): 128-134.

ZHOU X Q, TANG C C, ZOU Q J. Research progress of SARS-CoV-2-susceptible laboratory animals [J]. *Chin J Comp Med*, 2021, 31(2): 128-134.

[10] OSTERRIEDER N, BERTZBACH L D, DIETERT K, et al. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters [J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 779.

[11] 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.

LIU W, TAO F B, HUANG D W, et al. Research progress in cultivating SPF mice by embryo transfer technology [J]. *J Hebei U Univ Health Sci*, 2013, 15(1): 30-32.

[12] KIM H, BANG J, BAEK S H, et al. Eliminating murine norovirus, *Helicobacter hepaticus*, and intestinal *Protozoa* by embryo transfer for an entire mouse barrier facility [J]. *Exp Anim*, 2022, 71(1): 28-35.

[13] ZHOU G, WEI H, WANG X, et al. Serial culture is critical for *in vitro* development of parthenogenetic embryos in the golden Syrian *Hamster* [J]. *Cell Reprogram*, 2018, 20(3): 187-195.

[14] 何志颖. 规范化基因剔除小鼠技术体系的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2006.

HE Z Y. Study on the technical system of standardized gene knockout mice [D]. Shanghai: Second Military Medical University, 2006.

[15] 桂飞,杨伟伟,孙筱品,等. 小鼠胚胎移植影响因素的初步探索 [J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(6): 483-488.

GUI F, YANG W W, SUN X P, et al. Preliminary study on the influencing factors of mouse embryo transfer [J]. *Lab Anim Comp Med*, 2020, 40(6): 483-488.

[收稿日期] 2024-04-11