

刘晓静, 刘晓欣, 张天存, 等. 小鼠非手术胚胎移植技术影响因素研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(4): 88-96.

Liu XJ, Liu XX, Zhang TC, et al. Technical factors influencing non-surgical embryo transfer in mice [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(4): 88-96.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.04.009

小鼠非手术胚胎移植技术影响因素研究

刘晓静, 刘晓欣, 张天存, 田永路, 李夏莹*, 韦玉生*

(北京大学生命科学学院实验动物中心, 北京 100871)

【摘要】 目的 研究不同非手术移植器、植入胚胎数量、胚胎时期、胚胎品系对小鼠非手术胚胎移植效率的影响以及手术移植和非手术移植效率的比较, 以期建立稳定的小鼠非手术胚胎移植技术体系。**方法** 使用非手术的方法进行小鼠的胚胎移植。**结果** 使用两种不同的非手术移植器进行胚胎移植, 怀孕率分别为 $(75.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(66.67 \pm 14.43)\%$, 生存率分别为 $(46.11 \pm 6.31)\%$ 、 $(18.89 \pm 0.96)\%$; 胚胎的数量分为 10、15、20 枚 3 组进行非手术移植, 怀孕率分别为 $(66.67 \pm 11.55)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(66.67 \pm 23.09)\%$, 生存率分别为 $(29.33 \pm 4.16)\%$ 、 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(17.00 \pm 3.46)\%$; 将囊胚和桑葚胚进行非手术移植, 怀孕率分别为 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(46.67 \pm 11.55)\%$, 生存率分别为 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(10.22 \pm 2.77)\%$; 选用 C57BL/6J、ICR、基因修饰 A、基因修饰 B 4 个品系小鼠作为供体, 进行非手术移植, 怀孕率分别为 $(66.67 \pm 11.55)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(73.33 \pm 11.55)\%$ 、 $(80.00 \pm 0.00)\%$, 生存率分别为 $(26.67 \pm 2.67)\%$ 、 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(32.00 \pm 3.53)\%$ 、 $(29.34 \pm 2.31)\%$; 手术移植 15 只假孕鼠, 非手术移植 15 只假孕鼠, 怀孕率分别为 $(80.00 \pm 0.00)\%$ 、 $(86.67 \pm 11.55)\%$, 生存率分别为 $(38.67 \pm 4.81)\%$ 、 $(36.00 \pm 5.82)\%$ 。**结论** 不同移植器进行非手术移植产仔率存在差异; 每次移植 15 枚的胚胎数量移植效率较高; 选用囊胚期胚胎进行非手术移植的效率较高; 手术移植效率与非手术移植效率无明显差异。

【关键词】 小鼠; 非手术移植; 胚胎移植

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 04-0088-09

Technical factors influencing non-surgical embryo transfer in mice

LIU Xiaojing, LIU Xiaoxin, ZHANG Tiancun, TIAN Yonglu, LI Xiaying*, WEI Yusheng*

(Laboratory Animal Research Center, School of Life Science, Peking University, Beijing 100871, China)

【Abstract】 Objective We aimed to investigate the effects of different non-surgical embryo transfer devices, number of transferred embryos, embryo stage, and embryos obtained from different mouse strains on the efficiency of non-surgical embryo transfer in mice, and to compare the efficiencies of surgical and non-surgical embryo transfer, in order to establish a stable non-surgical embryo transfer technology system. **Methods** Mouse embryo transfer was carried out using non-surgical method. **Results** The pregnancy rates using two different non-surgical transfer devices were $(75.00 \pm 0.00)\%$ and $(66.67 \pm 14.43)\%$, and the birth rates were $(46.11 \pm 6.31)\%$ and $(18.89 \pm 0.96)\%$,

[作者简介] 刘晓静 (1993—), 女, 硕士, 研究方向: 小鼠胚胎操作相关技术研究。E-mail: lxj@pku.edu.cn

[通信作者] 李夏莹 (1986—), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向: 实验动物福利伦理和微生物检测。E-mail: lixiaying@pku.edu.cn

韦玉生 (1975—), 男, 博士, 高级工程师, 研究方向: 基因修饰动物模型研发与实验动物管理。

E-mail: yusheng.wei@pku.edu.cn * 共同通信作者

respectively. Transfer of 10, 15, and 20 embryos resulted in pregnancy rates of $(66.67 \pm 11.55)\%$, $(80.00 \pm 0.00)\%$, and $(66.67 \pm 23.09)\%$, and birth rates of $(29.33 \pm 4.16)\%$, $(38.67 \pm 4.81)\%$, and $(17.00 \pm 3.46)\%$, respectively. When blastocysts and morulae were transferred non-surgically, the resulting pregnancy rates were $(80.00 \pm 0.00)\%$ and $(46.67 \pm 11.55)\%$ and the birth rates were $(38.67 \pm 4.81)\%$ and $(10.22 \pm 2.77)\%$, respectively. Four strains (C57BL/6J, ICR, genetically modified mice A, genetically modified mice B) were used as donors for non-surgical embryo transfer, with resulting pregnancy rates of $(66.67 \pm 11.55)\%$, $(80.00 \pm 0.00)\%$, $(73.33 \pm 11.55)\%$, and $(80.00 \pm 0.00)\%$, and birth rates of $(26.67 \pm 2.67)\%$, $(38.67 \pm 4.81)\%$, $(32.00 \pm 3.53)\%$, and $(29.34 \pm 2.31)\%$, respectively. Fifteen pseudo-pregnant mice were transplanted surgically and 15 were transplanted non-surgically, with pregnancy rates of $(80.00 \pm 0.00)\%$ and $(86.67 \pm 11.55)\%$, and birth rates of $(38.67 \pm 4.81)\%$ and $(36.00 \pm 5.82)\%$, respectively. **Conclusions** Transfer device A resulted in a higher birth rate in this study. The embryo transfer efficiency was higher when 15 embryos were transferred into unilateral uterine horns of pseudo-pregnant 2.5-day recipients. Blastocyst-stage embryo transfer was more efficient than morula-stage transfer. There was no significant difference in efficiency between surgical and non-surgical embryo transfer procedures.

【Keywords】 mice; non-surgical transfer; embryo transfer

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

基因修饰小鼠已经广泛用于鉴定基因功能、动物发育和细胞分化以及各种疾病机制及防治研究^[1-3]。构建基因修饰小鼠过程复杂,包括将 DNA(和/或 RNA 以及蛋白)显微注射或电转到受精卵细胞中,或者在胚胎干细胞利用同源重组靶向基因^[4-5],然后将操作后的胚胎移植到假孕小鼠的输卵管或子宫角中^[6],以获得基因修饰小鼠。目前,将小鼠胚胎通过手术移植到代孕鼠是制备基因修饰小鼠模型的最常用方法,但手术移植需要切开皮肤和肌肉,将内脏器官外化和牵引^[7],并需要缝合伤口,引发代孕鼠疼痛和痛苦^[6]。手术移植过程繁琐,代孕鼠术后恢复方面的潜在问题以及可能的术后感染需要监测^[8-9]。动物福利与伦理要求动物研究需遵循“3R”原则^[10],以寻求替代动物的程序、减少使用的动物数量以及改进方法以尽量减少疼痛和痛苦。2009 年非手术胚胎移植方法作为一种替代方案被提出并由 ParaTechs 公司商业化^[11]。该方法是利用特定器械,通过非手术的方式将胚胎通过子宫颈移植到子宫角的技术,整个操作过程相对于传统的手术子宫角移植简单,且由于无须在腹部开创口以及子宫上打洞,受体动物的疼痛显著降低^[12-13]。在本研究中,对两种非手术胚胎移植器、移植胚胎数量、不同时期胚胎以及不同品系小鼠胚胎的移植效率进行比较,并对比非手术移植和手术移植的效率,从而为小鼠非手术胚胎移

植技术的应用提供更全面的实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验所用小鼠均为 SPF 级,购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2021-0006];饲养于北京大学实验动物中心[SYXK(京)2020-0035]。代孕雌鼠选用 28~32 g 的 8 周封闭群 ICR 小鼠 189 只,结扎雄鼠选用 32~35 g、10~12 周的封闭群 ICR 小鼠 60 只;供体 ICR 雌鼠选用 12~14 g、3~4 周的封闭群 ICR 小鼠 240 只,交配雄鼠选用 32~35 g、10~12 周的封闭群 ICR 小鼠 60 只;供体 C57 雌鼠选用 12~14 g、3~4 周近交系 C57BL/6J 小鼠 30 只,交配雄鼠选用 28~32 g、10~12 周的近交系 C57BL/6J 小鼠 10 只;A 基因修饰与 B 基因修饰供体雌鼠选用 12~14 g、3~4 周 C57BL/6J 背景基因 A 敲除纯合和基因 B loxp 插入纯合小鼠各 30 只,交配雄鼠分别选用 28~32 g、10~12 周 C57BL/6J 和基因 B loxp 插入纯合小鼠各 10 只。所有操作均遵循北京大学动物实验伦理要求,动物实验伦理审批单位为北京大学实验动物福利伦理委员会(LAC-WeiYS-1),整个研究过程符合 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

孕马血清促性腺激素(PMSG)(宁波第二激素厂公司,批号:B240501);人绒毛膜促性腺激素

(HCG)(宁波第二激素厂公司,批号:S231005); M2 培养液(Sigma-Aldrich 公司,批号:0000349107);KSOM 培养液(南京贝尔公司,批号:20240430);三溴乙醇(Sigma-Aldrich 公司,批号:T48402)。手术器械:组织剪、线剪、组织镊、持针器、脂肪夹、眼科剪、眼科镊、手术缝合针、手术缝合线(瑞沃德公司);冲胚针:针尖处理过的 1 mL 胰岛素注射器(碧迪医疗器械有限公司);1 mL 无菌注射器(北京慕鸥生物有限公司);移卵针(自制);移植器 A(保定正木生物科技有限公司);移植器 B(机构赠予);10 μ L 移液器(Eppendorf 公司);体视显微镜(尼康公司);CO₂ 培养箱(日本 PHChI 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 超数排卵

供体雌鼠腹腔注射 10 IU PMSG,48 h 后腹腔注射 10 IU HCG,并与相同品系雄鼠同笼交配,次日检查阴道,挑出有精栓的雌鼠,见栓 2.5 d 的供体鼠用于移植桑葚胚,见栓 3.5 d 的供体鼠用于移植囊胚。

1.3.2 假孕鼠制备

挑选处于发情期的雌鼠,与结扎雄鼠合笼,第二天检查阴道,挑出有精栓的雌鼠作为见栓 2.5 d 的受体鼠用于子宫移植。

1.3.3 胚胎采集

见栓 2.5 d 或 3.5 d 的供体小鼠处死后,立即取出输卵管和子宫(保证输卵管与子宫连接完好),将输卵管和子宫放于盛有 M2 的培养皿中,镜下找到伞口用冲胚针冲出胚胎(见栓 2.5 d 冲出的胚胎收集桑葚胚,见栓 3.5 d 冲出收集囊胚)。冲出胚胎后将其收集到 M2 液滴中,挑选清洗 3 遍后移入 KSOM 液滴,CO₂ 培养箱内备用。

1.3.4 胚胎移植

(1)手术移植:麻醉假孕鼠,消毒后,剪开毛皮层、真皮层,找到子宫一侧,用脂肪夹固定。镊子轻轻夹住子宫,镜下找到子宫角位置,注射器打孔,迅速将盛有胚胎的移植针送进孔中并轻轻将胚胎吹入子宫内。将子宫部放回小鼠体内,缝合创口后小鼠放在恒温台上等待苏醒,苏醒后的小鼠不超过 2 只放入笼盒加做窝材料,填写笼卡与信息记录。

(2)非手术移植器械 A 移植:麻醉假孕鼠,将

开殖器塞入小鼠阴道内,通过开殖器看到子宫颈口后将盛有胚胎的移植器经子宫颈口送入子宫内,直至中间蓝色管体进入开殖器一半处,将胚胎打入子宫内,向后旋转拔出移植器,镜下检查移植器中是否有胚胎残留。移植结束后取出开殖器,小鼠放恒温台上苏醒后记录信息,放笼盒内待产。

(3)非手术移植器械 B 移植:将 10 μ L 移液枪调至 1.5 μ L,装上移植管并将清洗后的胚胎全部吸入移植管中,将移液枪调至 1.8 μ L,移植管前部保持一段气柱。将开殖器放入小鼠阴道内,找到子宫颈口,将移植管伸入子宫颈口,通过子宫颈口进入子宫。待移植管的热缩管进入开殖器的后 1/3 处停止,将枪打到第一个点,排出胚胎,稍往后退一点,再将枪打到第二个点,将液体排尽。缓慢撤出移植管,在体视镜下检查移植管中的胚胎是否全部排出。移植结束后取出开殖器,小鼠放恒温台上苏醒后记录信息,放笼盒内待产。

1.4 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10 对试验数据进行 *t* 检验。实验结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间数据用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 表示有显著性差异。

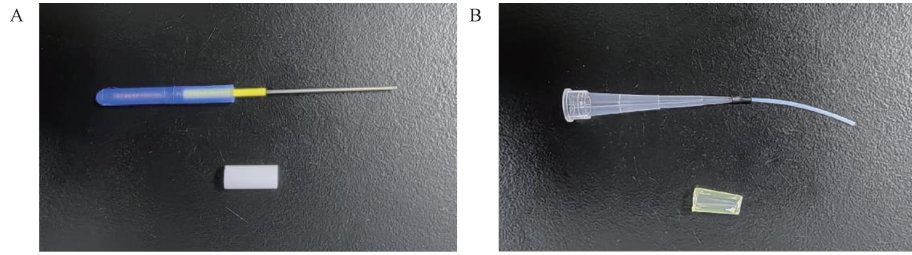
2 结果

2.1 不同移植器对移植效率的影响

移植器是非手术移植效率的主要决定因素之一,本实验利用可获得的两种移植器分别进行实验比较(图 1)。生存率以及怀孕率是移植效率的关键指标。选择囊胚期胚胎,进行胚胎移植试验,在代孕鼠生仔后比较两组的生存率和怀孕率。详细移植数据见表 1。移植器 A 组和移植器 B 组怀孕率无显著差异($P>0.05$),移植器 A 组生存率显著高于移植器 B 组($P<0.05$)(图 2)。

2.2 不同胚胎数量对移植效率的影响

为筛选出最优移植胚胎的数量,将胚胎移植的数量分为 10、15、20 枚 3 组,用移植器 A 进行移植后,分别对怀孕率和生存率做了对比。结果如表 2 所示。根据前期查询资料^[14],15 枚囊胚是较优的移植数量,故本研究分别比较移植 10 枚和 15 枚囊胚、20 枚和 15 枚囊胚的怀孕率和生存率



注:A:移植器 A;B:移植器 B。

图 1 两种移植器

Note. A, Transfer device A. B, Transfer device B.

Figure 1 Two types of embryo transfer devices

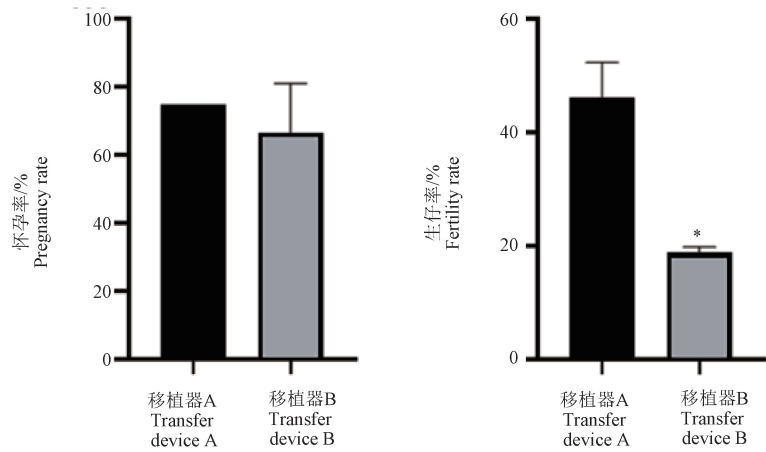
表 1 不同移植器的移植数据

Table 1 Transplant data of different transplants devices

移植器 Devices	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值± 标准差 $\bar{x} \pm s$	移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生存率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x} \pm s$
移植器 A Transfer device A	4	3	75.00		60	26	43.33	
	4	3	75.00	(75.00±0.00)%	60	25	41.67	(46.11±6.31)%
	4	3	75.00		60	32	53.33	
移植器 B Transfer device B	4	2	50.00		60	12	20.00*	
	4	3	75.00	(66.67±14.43)%	60	11	18.33*	(18.89±0.96)%
	4	3	75.00		60	11	18.33*	

注:与移植器 A 组相比,* $P<0.05$ 。

Note. Compared with transfer device A group,* $P<0.05$.



注:与移植器 A 组相比,* $P<0.05$ 。

图 2 不同移植器移植效率比较

Note. Compared with transfer device A group,* $P<0.05$.

Figure 2 Comparison of embryo transfer efficiency of different devices

是否有差异,结果显示怀孕率均无差异,10 枚和 15 枚的生存率无差异,15 枚和 20 枚的生存率差异极显著($P<0.01$,图 3)。

2.3 不同胚胎时期对移植效率的影响

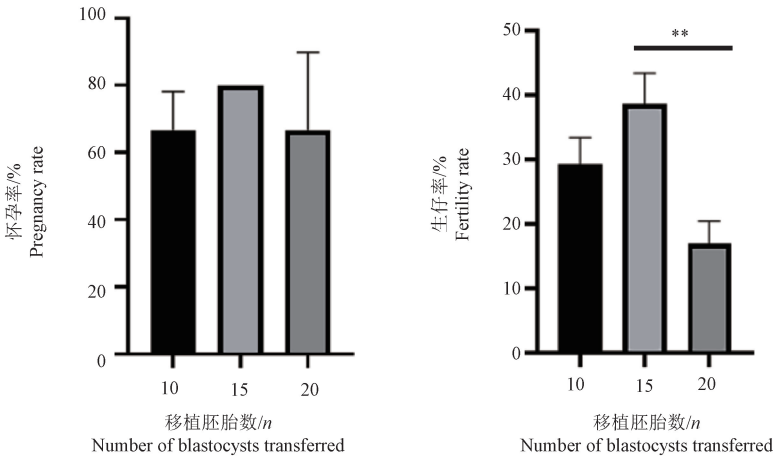
在子宫移植时获取的胚胎常出现发育不同

步的情况,本研究进一步对囊胚和桑葚胚移植效率进行比较,实验使用移植器 A 进行非手术移植,每只代孕鼠移植 15 枚胚胎。结果如表 3 所示。囊胚组怀孕率显著高于桑葚胚组($P<0.05$),生存率极显著高于桑葚胚组($P<0.001$)。

表 2 不同胚胎数量的移植数据
Table 2 Transplant data of different number of embryos

移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$	移植总囊胚数/ <i>n</i> Total Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生仔率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$
10	5	3	60.00	(66.67±11.55)%	50	13	26.00	(29.33±4.16)%
	5	3	60.00		50	14	28.00	
	5	4	80.00		50	17	34.00	
15	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	30	40.00	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	25	33.33	
	5	4	80.00		75	32	42.67	
20	5	2	40.00	(66.67±23.09)%	100	15	15.00**	(17.00±3.46)%
	5	4	80.00		100	15	15.00**	
	5	4	80.00		100	21	21.00**	

注：与移植 15 枚组相比，** $P<0.01$ 。
Note. Compared with the group of 15 embryos transplanted, ** $P<0.01$.



注：与移植 15 枚组相比，** $P<0.01$ 。
图 3 不同移植数量移植效率比较
Note. Compared with the group of 15 embryos transplanted, ** $P<0.01$.

Figure 3 Comparison of embryo transfer efficiency of different number of embryos

表 3 不同胚胎时期的移植数据
Table 3 Transfer data at different embryonic stages

胚胎时期 Embryonic stages	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$	移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生仔率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x}\pm s$
囊胚 Blastocyst	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	30	40.00	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	25	33.33	
	5	4	80.00		75	32	42.67	
桑葚胚 Morula	5	2	40.00*	(46.67±11.55)%	75	6	8.00***	(10.22±2.77)%
	5	2	40.00*		75	7	9.33***	
	5	3	60.00*		75	10	13.33***	

注：与囊胚组相比，* $P<0.05$ ，*** $P<0.001$ 。
Note. Compared with the blastocyst group, * $P<0.05$ ，*** $P<0.001$.

2.4 不同品系对移植效率的影响

不同品系小鼠或野生型与基因修饰小鼠存在移植效率差别,为了比较不同品系移植效率是否存在差异,本研究选用 4 个品系小鼠(C57BL/6J、ICR、A 基因修饰、B 基因修饰)作为供体,假孕鼠均选择 ICR,使用移植器 A 进行非手术移植。对 4 组的生存率和怀孕率进行了对比。结果如表 4 所示,由于 C57BL/6J 是最常用的移植品系,大多数基因修饰小鼠品系为 C57BL/6J 背景,故分别分析了以下 3 个组别的怀孕率和生存率差异:C57BL/6J 和 ICR、C57BL/6J 和 A 基因修饰、C57BL/6J 和 B 基因型修饰,结果显示怀孕率均无差异,C57BL/6J 和 ICR 生存率差异显著($P <$

0.05),C57BL/6J 和 A 基因修饰、C57BL/6J 和 B 基因型修饰均无差异,可能与 A 基因修饰小鼠和 B 基因型修饰小鼠均为 C57BL/6J 背景有关,结果如图 4 所示。

2.5 不同手术类型对移植效率的影响

手术移植是最常用的操作方法,但手术过程相比非手术移植对小鼠伤害较大,而非手术移植操作相对简单,更能保障动物福利,我们对这两种类型的移植方法进行对比,本实验使用移植器 A 进行非手术移植,胚胎选用囊胚,非手术组每只鼠移植 15 枚胚胎,手术组单侧子宫移植 15 枚胚胎,结果如表 5 所示。两组的怀孕率和生存率均无显著性差异。

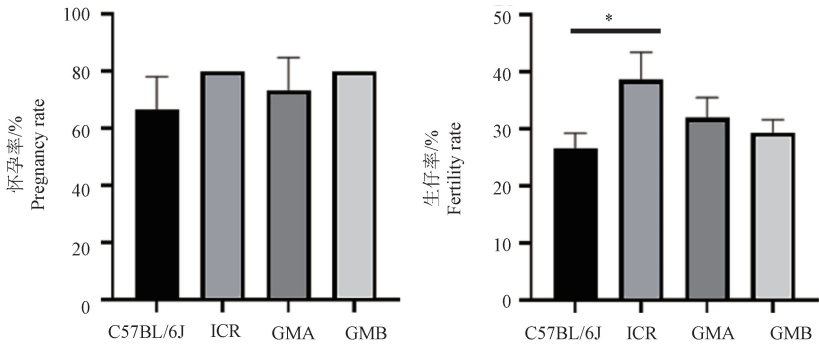
表 4 不同品系小鼠胚胎类型的移植数据

Table 4 Transfer data of different strains of mouse embryo types

胚胎类型 Embryo type	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值± 标准差 $\bar{x} \pm s$	移植囊 胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生存率/% Fertility rate	平均值±标准差 $\bar{x} \pm s$
C57BL/6J	5	3	60.00		75	18	24.00	
	5	3	60.00	(66.67±11.55)%	75	20	26.67	(26.67±2.67)%
	5	4	80.00		75	22	29.33	
ICR	5	4	80.00		75	30	40.00*	
	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	25	33.33*	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	32	42.67*	
基因修饰 A Genetically modified A	5	4	80.00		75	23	30.67	
	5	3	60.00	(73.33±11.55)%	75	22	29.33	(32.00±3.53)%
	5	4	80.00		75	27	36.00	
基因修饰 B Genetically modified B	5	4	80.00		75	20	26.67	
	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	23	30.67	(29.34±2.31)%
	5	4	80.00		75	23	30.67	

注:与 C57BL/6J 组相比,* $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the C57BL/6J group,* $P < 0.05$.



注:与 C57BL/6J 组相比,* $P < 0.05$ 。

图 4 不同胚胎类型移植效率比较

Note. Compared with the C57BL/6J group,* $P < 0.05$.

Figure 4 Comparison of efficiency at different embryo types

表 5 不同手术类型的移植数据
Table 5 Transfer data of different surgical types

手术类型 Surgical type	代孕鼠/ <i>n</i> Surrogate mice	怀孕鼠/ <i>n</i> Pregnant mice	怀孕率/% Pregnancy rate	平均值± 标准差 $\bar{x}\pm s$	移植囊胚数/ <i>n</i> Number of transfer blastocysts	出生数/ <i>n</i> Number of births	生存率/% Fertility rate	平均值± 标准差 $\bar{x}\pm s$
非手术移植	5	4	80.00		75	30	40.00	
Non-surgical transfer	5	4	80.00	(80.00±0.00)%	75	25	33.33	(38.67±4.81)%
	5	4	80.00		75	32	42.67	
手术移植	5	4	80.00		75	22	29.30	
Surgical transfer	5	5	100.00	(86.67±11.55)%	75	30	40.00	(36.00±5.82)%
	5	4	80.00		75	29	38.67	

3 讨论

非手术移植的方法最先在 1951 年被提出,但由于过低的植入率和妊娠率阻碍了其在胚胎移植上的应用^[15]。直到 2009 年, GREEN 等^[11]提出了一种非手术小鼠胚胎移植的新装置,这种方法基于在假孕雌鼠阴道内引入一次性锥形导管,将胚胎直接通过宫颈送入到小鼠的子宫角中,生存率达到 33%,提高了非手术移植效率。由此推进了非手术移植技术在胚胎移植中的应用,非手术移植器也不断得到改进^[16-18]。但这些国外研发可售的装置价格较高,作为实验室常用移植器将极大提高实验成本。本实验中使用了价格相对便宜的国产移植器,探讨国产移植器在不同移植实验中的应用。

在使用过程中发现,非手术移植器 B,使用移液枪将胚胎吸入移植器,有一定操作难度,且移液枪的吸样量是固定的,如果单次吸样时胚胎未全数吸入,需打出重新操作,可能影响胚胎质量。且控制移植器对准子宫颈口进入子宫颈操作对初学者也有一定难度。移植完成后一旦移液枪和子宫不在一条线上可能将胚胎带出,影响植入率,故使用此移植器需要更多操作练习。相比之下,非手术移植器 A 吸入胚胎以及进入子宫颈口更好操作,移植器轻便易上手。本研究使用的比较结果显示非手术移植器 A 组生存率为 46.11%,非手术移植器 B 组生存率为 18.89%。综上,后续实验选择非手术移植器 A。

使用非手术移植器只能移植一侧子宫,每次成功植入的胚胎数量较为重要,会对移植效率产生影响,优化的胚胎移植数量会减少假孕鼠和胚

胎的不必要浪费。在 2014 年, BIN ALI 等^[16]总结了 5 年的非手术移植效率数据,每只假孕鼠移植 12~20 枚胚胎,生存率为 21%~35%。2023 年有研究报道使用改进后的非手术移植器,每只假孕鼠移植 5~8 枚胚胎,着床率为 60.3%^[19]。本次实验中移植胚胎数分为 3 组,结果显示移植 15 枚生存率最高,移植效率最好,充分利用了假孕鼠和胚胎。

不同步发育是胚胎相关实验中经常遇到的问题,本研究观察了不同时期胚胎对移植效率的影响。2009 年的研究表明,桑葚阶段胚胎移植到子宫内生存率为 14.5%,在移植 166 枚二细胞到假孕鼠子宫内,仅有 1 只仔鼠出生^[11]。本研究移植了 225 枚桑葚胚到 15 只假孕鼠体内,仅有 23 只仔鼠出生。以上结果表明,在进行非手术子宫移植时,挑选使用囊胚期胚胎可保障一定的移植效率。

不同小鼠品系来源的胚胎以及不同品系的假孕鼠移植效率都会有所不同。有研究报道供体和假孕鼠均使用 ICR 小鼠时的移植产仔率最高可达 75.3%。而用 C57BL/6J 与 C3H F1/Hsd 杂交后代的胚胎供体移植到 ICR 假孕鼠体内的生存率为 33%^[16]。STEELE 等^[6]对非手术移植和手术移植方法进行比较同样也用了 ICR 小鼠做供体提供胚胎和假孕鼠。C57BL/6J 小鼠是目前用量最大的近交小鼠品系,并且近年来随着基因修饰小鼠的大量研制和广泛使用,很多实验需要进行基因修饰小鼠胚胎的子宫角移植,比较野生型小鼠和基因修饰小鼠非手术胚胎移植的效率将为该方法的更广泛应用提供数据支撑。因此,本实验选用 4 个品系 C57BL/6J、ICR、A 基因

修饰鼠、B 基因修饰鼠作为供体,假孕鼠均选择 ICR 小鼠。结果显示 ICR 小鼠作为供体鼠,生存率(38.67%)和怀孕率(80%)是 4 个品系中最高的。有研究报道使用 ICR 假孕鼠时,非手术移植器很难进入子宫角内,选用更瘦更安静的 B6CBAF1/OlaHsd 假孕鼠,5 年的数据总结生存率最高可达 35%^[16]。因此小鼠品系的选择还要结合具体实验和实验室的实际情况。本实验选用两种基因修饰小鼠模型进行移植,结果显示 A 基因修饰鼠和 B 基因修饰鼠在生存率和怀孕率上相差不大,且效率与相同背景的 C57BL/6J 小鼠接近。该结果说明对于没有产生显著的生殖或胚胎发育不良表型的基因修饰小鼠,利用非手术胚胎移植方法效率有所保障。

为了减少人为操作因素对实验结果的影响,研究中非手术移植操作由本中心具有两年和半年净化移植等操作经验的两名技术人员完成,非手术移植操作经过约 1 周的练习后即开展本研究,两人的移植操作以及操作后的怀孕率和出生率无显著差异。非手术移植操作时的注意要点有:①质量合格的胚胎与供体鼠准备,以及达标的小鼠饲养条件;②吸入移植器内液体 5~10 μL 为益,否则可能影响胚胎植入和着床;③移植器进入操作舒缓且深度适当,过深或过浅会影响植入效果;④器械无菌,避免造成小鼠感染;⑤移植后小鼠需保温、添加做窝材料、保证饲养环境安静。

目前胚胎移植应用最广泛的方法是手术移植,但手术移植程序繁琐,不利于假孕鼠的福利保障^[20-23]。相比手术移植,非手术移植方法大大降低了手术移植胚胎所带来的疼痛和痛苦,消除了手术和术后恢复以及感染等潜在并发症的风险,并减少了术后伤口恢复的时间^[24-25]。非手术移植技术相比手术移植技术操作简单^[24-26],对实验人员的操作要求相对低^[27-29]。研究表明手术和非手术移植效率相差不大,本研究结果也显示非手术实验组和手术实验组生存率和怀孕率均无显著差异。综上,非手术移植方法可广泛应用于小鼠胚胎移植操作与相关研究中。

参考文献:

[1] BOCKAMP E, MARINGER M, SPANGENBERG C, et al.

Of mice and models; improved animal models for biomedical research [J]. *Physiol Genomics*, 2002, 11(3): 115-132.

[2] CAPECCHI M R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century [J]. *Nat Rev Genet*, 2005, 6(6): 507-512.

[3] STONE B J, STEELE K H, FATH-GOODIN A. A rapid and effective nonsurgical artificial insemination protocol using the NSETTM device for sperm transfer in mice without anesthesia [J]. *Transgenic Res*, 2015, 24(4): 775-781.

[4] BURCKHARDT H A. Incorporation of analgesics into rodent embryo transfer protocols: assessing the effects on reproductive outcomes. [D]. Texas: A and M University, 2006.

[5] NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE ON RECOGNITION AND ALLEVIATION OF PAIN IN LABORATORY ANIMALS. Recognition and alleviation of pain in laboratory animals [M]. Washington, D. C. National Academies Press, 2009.

[6] STEELE K H, HESTER J M, STONE B J, et al. Nonsurgical embryo transfer device compared with surgery for embryo transfer in mice [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2013, 52(1): 17-21.

[7] 王苗苗, 张静, 陆晓雨, 等. 小鼠非手术胚胎移植技术 [A]. 第十六届中国实验动物科学年会论文集 [C]; 2023.

WANG M M, ZHANG J, LU X Y, et al. Non-surgical embryo transfer technology in mice [A]. *Proceedings of the 16th Annual Conference of Chinese Laboratory Animal Science* [C]; 2023.

[8] RICHARDSON C A, FLECKNELL P A. Anaesthesia and post-operative analgesia following experimental surgery in laboratory rodents: are we making progress? [J]. *Altern Lab Anim*, 2005, 33(2): 119-127.

[9] STOKES E L, FLECKNELL P A, RICHARDSON C A. Reported analgesic and anaesthetic administration to rodents undergoing experimental surgical procedures [J]. *Lab Anim*, 2009, 43(2): 149-154.

[10] RUSSELL W M S, BURCH R L. The principles of humane experimental technique [M]. London (UK): Methuen, 1959.

[11] GREEN M, BASS S, SPEAR B. A device for the simple and rapid transcervical transfer of mouse embryos eliminates the need for surgery and potential post-operative complications [J]. *Biotechniques*, 2009, 47(5): 919-924.

[12] ABELSON K S P, ADEM B, ROYO F, et al. High plasma corticosterone levels persist during frequent automatic blood sampling in rats [J]. *In Vivo*, 2005, 19(5): 815-819.

[13] CUI L, ZHANG Z, SUN F, et al. Transcervical embryo

- transfer in mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014, 53 (3): 228-231.
- [14] LAMASS, FRANQUINHOF, MORGADO M, et al. C57BL/6J and B6129F1 embryo transfer: unilateral and bilateral transfer, embryo number and recipient female background control for the optimization of embryo survival and litter size [J]. Animals (Basel), 2020, 10(8): 1424.
- [15] BEATTY R A. Transplantation of mouse eggs [J]. Nature, 1951, 168(4284): 995.
- [16] BIN ALI R, VAN DER AHÉ F, BRAUMULLER T M, et al. Improved pregnancy and birth rates with routine application of nonsurgical embryo transfer [J]. Transgenic Res, 2014, 23(4): 691-695.
- [17] 蒋瑞, 刘若男, 苗艳平, 等. 影响小鼠非手术胚胎移植技术的因素 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2017, 68(21): 75-78, 293.
- JIANG R, LIU R N, MIAO Y P, et al. Factors affecting non-surgical embryo transfer technology in mice [J]. Heilongjiang Anim Sci Vet Med, 2017, 68 (21): 75 - 78, 293.
- [18] TARKOWSKI A K. Experimental studies on regulation in the development of isolated blastomeres of mouse eggs [J]. Acta Theriol, 1959, 3: 191-267.
- [19] 王苗苗, 王浩洋, 张静, 等. 小鼠非手术胚胎移植器及移植技术改进 [J]. 解剖学杂志, 2023, 46(1): 15-19.
- WANG M M, WANG H Y, ZHANG J, et al. Improving the transcervical embryo transfer devices and transfer technology of mice [J]. Chin J Anat, 2023, 46(1): 15-19.
- [20] 王芊芊, 刘迪文, 洪胜辉, 等. 小鼠生物净化技术平台的设计、运行及维护 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33 (8): 122-126.
- WANG Q Q, LIU D W, HONG S H, et al. Design, operation, and maintenance of the technology platform of mouse rederivation [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(8): 122-126.
- [21] WATANABEN, HIROSEM, HASEGAWAA, et al. Derivation of embryonic stem cells from wild-derived mouse strains by nuclear transfer using peripheral blood cells [J]. Sci Rep, 2023, 13(1): 11175.
- [22] STONEB J, SRODULSKIS J. Inducing pseudopregnancy in female mice without the need for vasectomized males prior to non-surgical embryo transfer or artificial insemination [J]. JVis Exp, 2023, 197: 10.3791/65477.
- [23] CHRISTODOULAKIA, HEH, ZHOU M, et al. Pronuclear transfer rescues poor embryo development of *in vitro*-grown secondary mouse follicles [J]. Hum Reprod Open, 2024, 2024(1): hoae009.
- [24] ZURLO J, RUDACILLE D, GOLDBERG A M. The three Rs: the way forward [J]. Environ Health Perspect, 1996, 104(8): 878-880.
- [25] KRUEGER K L, FUJIWARA Y. The use of buprenorphine as an analgesic after rodent embryo transfer [J]. Lab Anim (NY), 2008, 37(2): 87-90.
- [26] MAHABIR E, BAUER B, SCHMIDT J. Rodent and germplasm trafficking: risks of microbial contamination in a high-tech biomedical world [J]. ILAR J, 2008, 49(3): 347-355.
- [27] CHARLES OSTERMEIER G, WILES M V, FARLEY J S, et al. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation [J]. PLoS One, 2008, 3(7): e2792.
- [28] SHAW J M, NAKAGATA N. Cryopreservation of transgenic mouse lines [J]. Methods Mol Biol, 2002, 180: 207-228.
- [29] 高晓茜, 陈培勇, 张帅, 等. 小鼠非同步胚胎移植技术 [J]. 解剖学杂志, 2019, 42(2): 111-115.
- GAO X Q, CHEN P Y, ZHANG S, et al. Asynchronous embryo transfer technique in mice [J]. Chin J Anat, 2019, 42(2): 111-115.

[收稿日期]2024-10-15