

文章编号 :1003-8701(2004)03-0047-04

山羊胚胎移植研究进展

丁 威¹, 元美玉¹, 高树文², 康 萍², 李 武¹

(1.东北农业大学动物科技学院,黑龙江 哈尔滨 150030;

2.讷河市畜牧水产局,黑龙江 讷河市 161300)

摘 要:概述了山羊胚胎移植的研究进展,包括同期发情、超数排卵、胚胎分割、体外受精、核移植、胚胎移植、胚胎冷冻及其存在的问题和展望。

关键词:山羊;胚胎;移植

中图分类号:S852.1

文献标识码:A

绵、山羊的胚胎移植自1933年B.L. Warrick和R.O. Berry首次研究成功以来,已经历了近70年,期间各项相关技术也有了很大发展。就近些年来山羊胚胎移植的研究进展进行如下综述。

1 同期发情

供体超排、鲜胚移植以及冻胚移植,都需要供受体或受体间发情同期化。近些年来,山羊的同期发情处理主要有孕酮(Pr)多次注射法、阴道海绵栓+PG或其类似物法以及一次或两次注射PG或其类似物法。这几种方法在其应用效果及操作方便程度上各有优缺点。岳奎忠(1999年)^[2]实验表明,用Pr多次注射后山羊发情时间很不集中,而用PG处理的超排山羊发情时间较集中,大多数(70%)都于注射PG后24~30h发情。而谭景和(1993年)^[1]比较了多次注射孕酮和一次注射PGF_{2α}对超排绵羊同期发情的效果。结果表明,绵羊超排用Pr法优于PGF_{2α}法。两者结果可能是羊品种以及注射时间不同所致。屈中泽等^[3]两次注射氯前列烯醇对山羊进行同期化处理,两次注射间隔一周,第1次发情率为86.7%,第2次为97.8%。李裕强等^[4]用15-甲基PGF_{2α}和氯前列烯醇作比较,其有效率分别为89.28%和83.33%,两者无显著差异。但因在实际操作中特别是生产应用时,采用Pr多次注射法费时费力,而且多次抓羊对供受体造成应激性刺激,因此,多采用阴道海绵栓+PG及其类似物法。

马保华等^[5]研究发现,供受体同时植撒栓时,受体发情开始时间长于供体约0~16h,且供受体发情持续期相似(P<0.05)。胚胎移植供受体同期发情的实质应该是排卵时间的同期化,而山羊排卵时间一般在发情结束之前的一段时间,发情同期化应以发情结束来判断。因此,可以考虑受体比供体植撒栓时间早几个h。在胚胎移植中,供受体发情同步差在一定时间范围内是允许的。赵霞等(2001)^[6]的实验结果显示,±12h、0h同步差移

收稿日期:2003-06-05

作者简介:丁 威(1979-),男,黑龙江省巴彦县人,东北农业大学动物遗传育种与繁殖专业在读硕士研究生。

植受体受胎率显著高于 ± 24 h同步差的移植受体受胎率,但0 h同步差和 ± 12 h同步差移植差异不显著。因此,当供受体同步差在12 h以内时,移植受胎率会获得很好的结果。

2 超数排卵

超数排卵是胚胎移植的一个基础和重要环节。动物超排主要以FSH或PMSG为主。由于FSH半衰期短,使用时需多次注射,而且其价格也比PMSG昂贵。但FSH超排山羊效果优于PMSG^[7,8],故目前山羊超排多用FSH多次注射法。但即使使用FSH,也可因不同纯度而影响超排效果^[9]。有人提出国产FSH不同厂家和不同批次的超排效果差异较大。但杨蔼云等^[10]却认为,不同厂家不同批次间FSH超排效果无显著差异,只是有效卵数不够理想。说明国产FSH纯度稍差,应进一步提高产品质量。为克服FSH多次注射的缺点,有人提出用聚乙烯吡咯烷酮(PVP)来延长FSH的半衰期。PVP是一种缓释剂,用它溶解FSH可延长FSH在动物体内的半衰期。用15%PVP+FSH200~300IU一次注射,超排有效率可达80%^[11]。王希朝等^[12]用PVP(300 g/L)溶解FSH250~300IU一次注射与分次注射生理盐水溶解的FSH回收可用胚差异不显著。

PMSG价格较低,操作简便,只需1次注射。但它的半衰期长,奶牛为120 h,羊为21 h,易在动物体内残留,导致第2次卵泡波的出现。Armstrong对安哥拉山羊的研究说明,PMSG处理山羊会因发生黄体过早退化而使发情后5 d冲胚率大大下降。为解决这一缺点,有人用注射抗APMSG来消除PMSG的残余,结果大大提高了冲胚率^[13-15]。但Boland等人(1991)的实验表明,APMSG并没有显著提高胚胎质量。

个体对超排处理的不同反应还与遗传特性、年龄、营养状态、季节、开始超排日期激素制剂中FSH/LH比例、给药途径、剂量和频率等因素有关^[9,16-18],这些因素都需进一步研究。此外,由于外援激素和手术等因素的刺激,使供体的重复利用受到了限制,因此,如何减少重复超排过程中对供体的刺激与损伤,提高重复超排的有效率,最大限度的利用优秀供体的繁殖机能也是我们今后研究的一个方向。

3 胚胎分割

最早的胚胎分割实验是在家兔上进行的。1968年Mular等^[19]对家兔8细胞胚进行二分,移植给受体兔,并生产出仔兔。到目前为止,通过分割孵化囊胚之前不同发育阶段的胚胎,国外已分别在牛、绵羊、山羊、马和猪等家畜上取得同卵双生实验的成功。1984年6月,Tsunoda等报道了关于山羊胚胎的显微操作和冷冻山羊胚胎的结果。我国学者张涌^[20]于1986~1987年进行了山羊胚胎分割和半胚移植实验,获得同卵双生羔。1991年^[21]又进行了半胚琼脂包被、培养、冷冻、解冻和移植实验,并获得一对异龄同卵双生羔和一对同龄同卵双生羔。可见,胚胎分割技术可成倍增加优良家畜胚胎数量,对提高优良家畜的有效利用率是行之有效的办法。

4 体外受精

体外受精是将动物的卵母细胞与精子在体外培养,使其结合为受精卵的过程,即人类医学上的“试管婴儿”。最早获得试管山羊的是日本学者Hanada.A(1985年),他将母羊体内成熟的卵母细胞在体外受精后移入受体羊输卵管获得世界上第1只“试管山羊”。

我国钱菊芬等 1991 年也以同样方法获得我国首只“ 试管山羊 ”。旭日干^[22]对山羊进行超数排卵 ,回收卵母细胞体外受精后也获“ 试管山羊 ”。

体外受精是解决胚胎来源的另一条重要途径。国外在牛胚胎的体外生产技术上已有很大发展 ,基本达到了商业化应用水平。从实验室的卵母细胞受精率 85%、囊胚发育率 40% ,到移植受体妊娠率超过 50% ,已得到了长足发展。从 1985 年获得第 1 只试管山羊之后 ,目前体外受精的卵裂率和囊胚率也达 80%和 49%。

5 核移植

1997 年 2 月 ,英国克隆绵羊“ 多利 ”的诞生 ,打开了体细胞核移植的大门。体细胞核移植是将供体的体细胞核与受体去核卵母细胞在体外进行融合培养的过程。用此法可获得遗传上完全相同的克隆动物。2000 年 6 月 ,我国学者张涌在成年山羊耳朵上采集细胞 ,将其细胞核注入去核卵母细胞中 ,获得克隆山羊“ 元元 ”。

到目前为止 ,虽然核移植技术发展很快 ,然而该技术还存在许多问题。如核移植成功率普遍很低、重构胚的发育率低、畸形胚比率高和体外培养时间过长或培养液成分可能导致移植胚流产以及出生后仔畜很快死亡等 ,这些都是亟待解决的问题。

6 胚胎移植

山羊由于受其个体小的限制 ,胚胎移植多采用手术法 ,即在其腹部中央(供体)或一侧(受体)做一切口 ,在供体则将其子宫及输卵管取出进行冲胚 ,而在受体只需根据胚胎日龄取出子宫角或输卵管的一部分进行输胚 ,术后缝合腹壁。常规手术法在重复手术中术后粘连较多 ,尤其是供体 ,这无疑会影响到供体的重复使用和母羊的繁殖。腹腔镜法最大的优点是供体应激小、术后很少发生粘连 ,可获得很好的移植结果。因此 ,对于羊胚胎的采集、受体移植及其它方面 ,腹腔镜是很有应用前景的一项技术。

由于手术法对母羊损伤大 ,因此也有许多人在尝试使用非手术法 ,但效果并不理想。张翊华等^[23]于 1995 年用自制采胚管和移植管对关中奶山羊进行非手术法采胚和移胚 ,8 只供体中有 6 只采出胚胎 ,采胚成功率 75% ,采胚率 35.8% ,头均采胚 4.00+3.41 枚(1~10)。非手术法移植受体 2 只 ,有一只怀孕。两只未采出胚胎的供体 ,有一只发生子宫穿孔 ,另一只冲胚顺利 ,但未捡到胚胎。非手术法虽然对供受体母羊损伤小但仍存在许多缺点 :采胚管和依胚管能否顺利通过子宫颈、能否到达子宫角尖端、冲卵液的回收率以及如何缩小冲胚区域减少胚胎丢失等。

影响胚胎移植成功率的因素有很多 ,如胚胎质量、胚胎日龄、供受体母羊生理状态的一致性、受体卵巢黄体状况和移胚数等都是胚胎移植过程中值得注意的问题。

7 胚胎冷冻

山羊胚胎冷冻的研究报道最早见于 1976 年 ,Bilton 等用 2 mol/L DMSO 和 1 mol/L 甘油作保护剂 ,采用干冰-乙醇浴降温 ,液氮保存 ,冷冻 48 枚胚胎。解冻移植后产羔 3 只^[24]。Chemineau 等^[25]采用冷冻仪慢速冷冻山羊胚胎 ,解冻移植后获得 24.4%的产羔率。Pendleton 和 Tsunod(1987 年)用甘油作保护剂快速冷冻山羊胚胎 ,分别于-32℃和-36℃投入液氮保存 ,解冻移植后获 25%和 20.8%的产羔率。在国内 ,王光亚等^[26]首次报道奶山羊胚胎冷冻移植成功。芮荣等^[27]获山羊胚胎简易冷冻成功 ,他们用 10%PBS 液加入 1

mol/L 甘油作冷冻液,对山羊胚胎简易冷冻,以 1℃/min 的速度从室温降至 10℃,将胚胎装管,0℃时放入试验管,-6.5~7℃诱发结晶,随后以 0.5℃/min 降温至-30℃投入液氮。解冻时置于 35℃水浴,然后间隔 5 min,胚胎依次通过 1、0.75、0.5 和 0.25 mol/L 甘油 PBS 液,最后通过 10%PBS,洗 2~3 次。结果胚胎解冻恢复率为 65%(13/20),移植妊娠率 80%,冻胚成羔率 46.2%(6/13),这也是目前国内山羊胚胎移植指标最高的实验结果。

传统的胚胎冷冻方法程序都比较复杂、费时,因此,寻求一种操作简便、冷冻速度快的冷冻方法是许多研究者的目标。1984年,G M. Fahy 等人报道了玻璃化保存胚胎的成功例证。此法操作简单,冷冻速度快,不需要昂贵的冷冻仪,具有很大的开发潜力,目前正处于研究开发之中。1990年,Yuswairi 等^[28]首次一步冷冻移植山羊胚胎成功。而我国学者刘伯宗等^[29]首次报道奶山羊胚胎一步冷冻成功。但玻璃化冷冻由于防冻剂浓度高,毒性大,冷冻-解冻-移植效果不稳定。因此,研究者目前正在寻找一些既能形成玻璃化液又没有毒性的溶质。

8 展 望

随着胚胎移植技术以及分子生物学技术的深入研究,胚胎移植过程中的各项问题一定会不断得到解决。山羊胚胎移植也会像牛胚胎移植一样走向商业化生产,并为性别鉴定基因转移等研究打下良好的基础。

参考文献:

- [1] 岳奎忠,于元松,等.改进山羊超数排卵方法的研究[J].东北农业大学学报,2000,31(1):72-75.
- [2] 谭景和,刘瑞祥,等.绵羊同步发情和超数排卵的研究[J].黑龙江畜牧兽医,1993,(6):6-10.
- [3] 屈中泽.应用氯前列烯醇诱导山羊同期发情形成同期黄体暨冷冻胚胎移植实验报告[J].当代畜牧,2000,(1).
- [4] 李浴强,张涌.山羊超数排卵和同期发情研究[J].西北农业大学学报,1997,25(3):77-81.
- [5] 马保华,王光亚,等.胚胎移植供受体山羊发情控制及配比问题的研究[J].动物医学进展,1999,20(3):35-38.
- [6] 赵霞,达来.胚胎移植技术在白绒山羊选育中的应用研究[J].草食家畜,2001,(增刊):125-140.
- [7] 张涌,刘灵,等.关中奶山羊超数排卵研究[J].西北农业大学学报,1992,20(增刊):125-128.
- [8] Armstrong D J, Pfitzner A P, Warns G W, et al. Superovulation treatment and embryo transfer in Angora goats. J Reprod Fert, 1983, 67: 403-410.
- [9] Boland M P, Roche J F. Embryo production in vivo. Problems and prospects. In: Luria A et al(ed). New trends in embryo transfer. London: Port land press, 1992, 195-206.
- [10] 杨蔼云,韩涛,等.安哥拉山羊超数排卵的研究[J].西北农业学报,1997,6(2):86-89.
- [11] 俞颂东,王友明,等.影响草食家畜超排效果的因素和几种超排方法.草食家畜,2002,(1):29-32.
- [12] 王希朝,王光亚,等.布尔山羊和布奶杂一代山羊超数排卵研究[J].动物医学进展,1999,20(2):40-42.
- [13] 张红,鲁大国,等.安哥拉山羊杂种胚胎移植建昌山羊研究[J].西南农业学报,1995,8(4):89-92.
- [14] 武浩.PMSG 及其抗血清对山羊超排效果的研究[C].陕西杨凌:西北农业大学动科院,1997.
- [15] 秦粉菊,任芳丽.山羊超数排卵方法概述[J].河南农业科学,2001,(4):31-32.
- [16] Armstrong D T. Recent advance in the superovulated cow. Therio, 1993, 39: 7-24.
- [17] Bindon B m, Piper L p, et al. Genetic and hormonal factor affecting superovulation. Therio, 1986, 25: 53-77
- [18] Nuti L C, Minhas B S, Baker W C, et al. Superovulation and recovery of zygotes from nubion and alpine dairy goats. Therio,1987, 28: 481-488.
- [19] Batteridge K J. An historical lood at embryo transfer[J]. Reprod Fert, 1981, 62: 1-13.
- [20] 张涌,钱菊汾,等.显微分割扩张孵化胚泡获同卵双生山羊羔[J].西北农业大学学报,1987,15(2).
- [21] 张涌,王建辰,等.山羊半胚冷冻实验[J].中国农业科学,1991,24(1):11-15.
- [22] 旭日干.山羊绵羊卵子的体外受精[M].呼和浩特:内蒙古人民出版社,1990.

(下转封三)

- [2] 郑建仙,丁霄霖.大豆膳食纤维化学与工艺学的研究[J].中国粮油学报,1995,(9):16-21.
- [3] 李来好,陈培基,杨贤庆.正交设计法提取江萸高活性膳食纤维[J].湛江海洋大学学报,1999,(12):33-38.
- [4] 陈五岭,陈邦.香菇膳食纤维挤压改性的研究[J].现代化工,2000,(9):45-48.
- [5] 王亚伟,张一鸣,等.大豆膳食纤维在面包中的应用[J].郑州粮食学院学报,2000,(9):75-77.

Study on Producing High Active Dietary from Soybean Residue

WANG Jing-hui, CAO Long-kui, MA Yu-xia, et al.

(Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, 136100, China)

Abstract: Methods of producing high active dietary fiber by acid, alkali and enzymolysis treatment were studied by orthogonal design method. The results showed that yield of soluble dietary fiber were raised by all treatment, but the color was dark, the expansion capacity and water holding capacity fell in acid and alkali treatment. Enzymolysis treatment was a ideal method.

Key words: Soybean residue; High active dietary fiber; Orthogonal design method



(上接第 50 页)

- [23] 张翊华,王强华,等.奶山羊非手术采胚和依胚技术的研究[J].西北农业大学学报,1996,24(1):5-8.
- [24] Bilton R J, Moor N W. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. J. Biol Sci., 1976, 29: 125-129.
- [25] Chemineau P, Procureur R, Cognie Y, et al. Production,Freezing and transfer of embryos from a blue tongue-infected goat herd without bluetongue transmission. Therio, 1986, 26(2): 275-290.
- [26] Wang G, Ma B, Wang J, et al. Embryo freezing and transfer in milk goat. Therio, 1988, 29(1): 322.
- [27] 芮荣,王建辰,等.山羊胚胎简易冷冻实验[J].畜牧兽医学报,1990,21(2):127-131.
- [28] Yuswiati E, Holtz W. Work in progress: Successful transfer of vitified goat embryos. Therio, 1990, 34(3): 629-632.
- [29] 刘伯宗,王光亚,等.奶山羊胚胎一步冷冻实验[J].畜牧兽医学报,1995,26(5):418-419.

A Review of Embryo Transfer in Goat

DING Wei¹, QI Mei-yu¹, GAO Shu-wen², et al.

(1. The Northeast Agricultural University, Haerbin 150030, China;

2. Department of Farming and Aquaculture of Nehe City, 161300, China)

Abstract: The advancement of embryo transfer in goat was briefly reviewed in the paper, which included oestrus synchronization, superovulation, embryo bisection, in vitro fertilization, nuclear transfer, embryo transfer and freeze embryo. Problems in the development of this technique were suggested and prospect proposed.

Key words: Goat; Embryo; Transfer; Advancement of study



良种奶牛任您选

本场为省农牧厅指定专业从事奶牛良种培育和推广的示范企业,常年面向全国出售优种荷斯坦高产奶牛:小母牛 1 500~2 000 元,怀胎牛 4 000~4 500 元(日产奶 30 kg)。本场承诺:购牛自由选择,先货后款,免费办理一切外运手续,购牛在 10 头以上专车护送,500 公里(内免费)外运费减半。动身前来电告知车次、时间,本场专车接站,下车后见本单位(农牧场)车为准接洽,谨防假冒(持此广告购牛,本场报销车费)。

满意到家再付款

地 址:华北地区晋宏良种奶牛场(国营农牧场 034016)

联 系 人:刘银康 畜牧师:张高怀

业务电话:0350-3672082(日夜热线)

客户热线:(0)13994135373(24 小时提供奶牛技术服务)