

# 生物技术在动物遗传育种中的应用

柳楠 张明新

(吉林省农科院畜牧分院,公主岭 136100)

**提 要** 本文综述了现代生物技术在动物遗传育种中的应用研究与进展,包括分子水平上的基因组分析、标记辅助选择和转基因动物、细胞水平上的精液胚胎的超低温保存、MOET 技术以及胚胎分割、克隆、性别控制等方面。

**关键词** 生物技术;QTL;MAS;转基因;MOET;胚胎分割;克隆;遗传育种

现代生物技术主要包括基因工程、细胞工程、酶工程、发酵工程等内容,与动物遗传育种关系比较密切的生物技术主要是基因工程和细胞工程,这些技术的研究开发与应用为保存、利用优秀家畜种质资源,寻找新的有用基因并将其应用于育种,提高动物产品的数量和质量提供了广阔的前景。本文主要对生物技术在动物遗传育种中的研究与应用问题进行综述。

## 1 基因组分析及标记辅助选择

家畜的许多重要经济性状都是数量性状(Quantitative Character),1908年 Nilsson 提出控制数量性状基因是微效多基因的假说。Karlsax(1923)认为基因效应并非是微小的、等效的。数量性状的基因型值是一些大效基因与微效基因的效应值之和。在生产实践中发现一些数量性状确有起主要作用的基因存在。近些年科学家们进行了大量的研究工作,力图找到这种基因,并确定其在染色体上的位点(QTL, Quantitative trait locus),从而达到对该基因进行分离、克隆,进而实现对数量性状进行遗传操作的目的。为了实现这一目的,需要借助于已知染色体上座位的遗传标记,以确定基因的位置,提高选择的准确性。

本世纪 50 年代,随着蛋白质电泳技术的发展,人们发现了蛋白质多态性的存在,于是便开始利用蛋白质多态性作为遗传标记,使遗传标记研究深入到了分子水平,遗传分析的准确性得到进一步提高。1980年 Botstein 首先提出了 DNA 限制性片段长度多态性可以作为遗传标记,从而开创了直接应用 DNA 多态性发展遗传标记的新阶段。由于 DNA 分子遗传标记的应用,使标记辅助选择、QTL 定位取得了突破性的进展,使遗传学进入了一个新的发展阶段。

分子遗传学与数量遗传学相结合所产生的一些新的生物技术已成为动物遗传育种研究的热点。主要包括:

### 1.1 数量性状基因组分析及遗传标记与 QTL 连锁关系的测定

近 20 年来人们一直致力于定位一些数量性状的主效基因或基因簇的研究,如绵羊的 Booroola 基因、肉牛的双肌基因等主效基因;Rothschild 等(1994)以雌激素受体位点的 RFLP 为标记,测定了影响猪窝产仔数的主效基因。此外,人们还测定了一些遗传标记与 QTL 的

连锁关系,如位于小鼠 2 号染色体远端 1/3 处,影响小鼠体重及体脂的 DNA 标记可提高体重 9.8%,体脂 38%;与奶牛高产相连的 Weaver 基因;与鸡生长和产蛋有关的分子标记等。

### 1.2 数量性状标记辅助选择(MAS)

标记辅助选择就是在动物选种中将遗传标记与多基因效应合并使用,育种值公式演变为:育种值(A) = 微效多基因值 + QTL 值。QTL 值的引入可大大提高育种值的准确性,尤其对低遗传力性状的选择更为有用。QTL 本身的准确性取决于 MAS 的结果,可选择的多态性标记越多, MAS 越接近 QTL 本身的选择。

虽然利用遗传标记育种对遗传改变所需要的时间比繁殖技术长,可是一旦 QTL 被克隆, DNA 测定的商业化,将大大提高遗传改良进程,使直接预测公牛的产奶量、种用动物活体肉质及未来胚胎质量等成为可能,其育种效益是显著的。

### 1.3 抗病育种

抗病育种是研究不需动物患病就能鉴别出其抗病性能的育种方法。它主要通过对抗病性能的遗传型进行直接选择或通过测定某疾病候选基因(Candidate gene)附近的遗传标记进行间接选择来实施,这些标记包括 RFLP、小卫星、SSR、RAPD、单基因突变、同工酶等。

## 2 转基因动物研究

转基因即从一个基因组上鉴别并分离出单个基因,然后将其转移到另一个体的基因组上。基因转移可在同一物种内进行,也可在不同物种间进行。目前大多数哺乳动物基因转移试验都以小鼠为对象。应用转基因技术改良畜禽的生产能力正得到越来越多的重视(First, 1991; Gibson and Smith, 1989; Wagner, 1986)。与转基因密切相关的技术是建立 DNA 文库。

动物基因组文库即单个基因组克隆片段的集合。在一个基因组文库中,来自某一动物的基因以 DNA 片段的形式被整合到某个简单生物如噬菌体的基因上,随着宿主生物的细胞增殖,在复制宿主细胞的同时,也复制了被联结在其基因组上的附加片段,这样,克隆 DNA 片段的集合即组成了基因组文库。

基因组文库可通过从生物活体组织中分离出 DNA 而得以建立。用特定的 DNA 限制性内切酶将 DNA 切割成小的片段,然后把所有随机片段插入到某一病毒(如噬菌体)完整的基因组上,该病毒能在细菌宿主细胞内迅速繁殖,随着每个细菌细胞内噬菌体的复制,联结在噬菌体上的 DNA 片段也随之增殖(克隆)。这些噬菌体以克隆形式分别增殖,形成单个“转基因”噬菌体。每个噬菌体都携带着来自动物组织的一个或多个基因,将转基因噬菌体置于大肠杆菌基体上,每个转基因机体都会形成一个菌落。从理论上说,每个克隆都包含一段原来动物的 DNA,并能分离出来用于进一步的生长和测试,这些克隆即代表着各个 DNA 片段。

在哺乳动物中克隆的 DNA 片段可显微注射到受精卵的副核中。胚胎 DNA 的维持和修复酶将注入的 DNA 拼接到染色体上。这样克隆的 DNA 片段即永久地被整合到动物的遗传组成中,这种动物称之为转基因动物。近几年已开发了把克隆基因引入畜禽育种的方法(Brumbaugh, 1989; Freeman and Bumstea, 1987; Gannon 等, 1990)。采用显微注射受精卵,转基因胚胎的成功率尚很低。在畜禽中成功率一般在 2% 以下。因为无法控制插入的位置, DNA 片段可能被整合到基因组的任何地方,这可能损害基因组中另一个基因的功能。现在只能够对小鼠的一些克隆基因的插入位置实行控制(Capecchi, 1989)。

也许有时能成功地将 DNA 片段整合到基因组上,但有时转基因的基因可能并不表达,

有些得到表达的基因值的大小依赖于基因注入的位置、时间和表达强度。截止目前,尚未有任何转基因畜禽成功地应用于商品生产,但却有许多转基因动物表现出了基因转移的有害影响(Pursel等,1989)。所以,虽然以基因组文库 DNA 形式进行基因移植,可能打破物种界限,高效地获取人们所需要的动物产品,但仍需要进行更多的研究和开发工作,以使转基因成为利用动物基因的有效工具。

### 3 精液和胚胎的超低温保存

50年代,科学家们发现精液可免受冷冻和解冻的伤害,形成了冷冻精液和人工授精技术,对动物育种领域产生了重大影响。人们通过这一技术最大限度地提高了优秀种公畜的利用率,使全世界家畜的生产性能在短期内得到迅速提高。

动物精液和胚胎通常储存于 $-196^{\circ}\text{C}$ 的液氮中做超低温保存。目前,超低温冷冻技术已在大多数畜禽的精液中应用。黄牛精液的采集和冷冻方法已很完善,人工授精广泛应用,特别是奶牛的人工授精更为普及。水牛的冷冻精液已经商品化。而绵羊、山羊、家禽精液的超低温冷冻效果尚不令人满意,还不能应用于商业化生产。但是,冷冻精液在这些动物上的特殊应用还是可行的。对于其他稀少畜种,冷冻保存的效率尚较低或了解不多(Graham等,1984)。

育种中冷冻精液与活体保种相结合,可减轻自然选择、近交和遗传漂变带来的影响。冷冻精液的缺点是:如果要获得纯种畜群,则需对现有畜群进行一系列回交。而冷冻胚胎可以克服这一缺陷,可迅速获得纯种畜群,并通过建立冷冻基因库使畜群得到保存。所以,理想的冷冻保存方法是既保存少量胚胎,又保存一定量的精液。

### 4 超数排卵和胚胎移植(MOET)

MOET技术最早由澳大利亚人和英国人提出,进入70年代这项技术逐步发展成熟,目前已成为应用于动物育种中的一项新技术,尤其在奶牛育种中已进入商业化生产阶段。

MOET技术能够充分发挥优秀母畜在育种改良中的遗传作用。通过外源激素诱发母畜超数排卵,供体发情后,经过输精,回收多个胚胎,然后冷冻或移植给受体。一般对牛、马等大家畜采用非手术方法收集胚胎,而对羊、猪等中小动物则采用手术法才能收集到胚胎。对各种不同的动物,能够回收到的胚胎数量是不同的。据报道,对黄牛一次超排可获得6~8个胚胎,鲜胚移植的受胎率为60%~70%,冻胚移植的受胎率为40%~50%。

在我国,家畜胚胎移植研究工作从70年代起步,自80年代开始了MOET技术的消化、吸收和研究工作,现在已作为一种成熟的生物技术应用用于牛、羊等家畜育种体系。“八五”期间实施了奶牛MOET核心群育种工作,目前绵羊的MOET核心群育种方案正在实施。张沅(1995)应用MOET技术对中国黑白花奶牛进行选育研究,通过对MOET核心群育种系统与常规人工授精育种方案(AI育种方案)育种成效的对比研究,结果(见表1)表明,不管是在多性状选育的育种进展上,还是育种效益上,MOET核心群育种系统都高于AI育种方案,同时MOET核心群育种系统明显地为次级性状的遗传改进提供了更大的可能。在一个范围很大的人工授精育种组织中实施MOET核心群育种方案,其优点主要在于缩短了世代间隔;对母牛可进行高效率的选择;青年公牛在第一阶段选择中得到较高的选择压。研究还表明,在胚胎移植技术中提高供体母牛提供可用胚胎的数量,对改善育种值估计的准确性远远大于由于提高供体母牛数量所带来的效益。这主要由于来自全同胞组的信息对育种值估计准确性

要高于半同胞组的作用。在 MOET 核心群育种系统中尽可能改进胚胎移植技术的效率,供体母牛提供的可用胚胎数和胚移成功率是关系育种方案成败的主要因素。王立贤(1993)对中国美利奴羊 MOET 核心群优化育种规划进行研究,分析了影响 MOET 核心群育种规划的各种因素的作用方式和大小,提出了几种综合 MOET 育种方案。探讨了 MOET 核心群育种

表 1 MOET 核心群育种系统与常规 AI 育种方案的育种成效对比

	胚移核心		人工授精育种系统	
	群育种系统	起始状态 3 万头	经过进一步 3 万头	发展的群体 24 万头
育种产出(元/母牛·年)	286.46	133.67	173.00	227.14
育种投入(元/母牛·年)	13.73	12.26	17.5	59.50
育种效率(元/母牛·年)	272.73	121.40	155.45	217.63
育种进展(元/年)	35.76	16.70	20.66	27.39
单个性状遗传进展乳脂量(kg)	1.65	1.00	1.23	1.57
生长能力(kg)	-1.56	-1.26	-1.32	-1.30
日增重(g)	5.40	2.86	3.13	3.40
胴体价值(%级)	-0.86	-1.01	-1.28	-1.64
配妊时间(日)	-0.21	0.16	0.18	0.21
使用年限(年)	11.55	2.81	4.55	9.19
乳房炎发病率(%)	-0.14	0.88	0.66	0.18

体系近交系数、遗传进展的计算问题,对影响 MOET 核心群育种体系遗传进展的各种因素进行了系统分析。研究得出了与奶牛 MOET 育种核心群相类似的结论,即 MOET 核心群的育种进展和效益等均优于传统的 AI 育种体系。

MOET 技术在育种中应用可以改进母畜的繁殖力,增加选择的广泛性和准确性,缩短世代间隔,因而可以提高家畜的改良速度,虽然诸多学者在 MOET 核心群育种理论的研究中所用的模型、计算方法、核心群规模和所考虑的因素各不相同,所得结果差别也很大,但是 MOET 核心群育种体系的遗传进展高于常规育种体系的结论却是共同的。

此外,对卵母细胞的采集和催熟培养技术及体外授精技术,也主要应用于奶牛和肉牛。卵母细胞可以从母畜的卵巢吸取或从刚刚屠宰的母畜卵巢上采集,然后催熟卵母细胞,并使之在人工环境中授精,这种方法能产生正常胚胎,并移植给受体母畜。目前,这些技术仍处于发展阶段,可以预测在不久的将来,这些技术的应用会大大提高优秀母畜在群体中的遗传贡献。

## 5 胚胎分割和克隆

将胚胎进行显微切割或将多细胞胚胎的细胞核移植到无核卵母细胞中。胚胎的分割和克隆试验目前主要在牛和绵羊上进行(First, 1991),并已获得少量遗传基础完全相同的个体。

胚胎可用机械方法分割,产生遗传上完全一致的胚胎,分割通常在胚胎处于 60~250 个细胞期进行,分割后胚胎成活率较低,冷冻后成活率将进一步降低。对分割后产生的胚胎可再次分割,从而产生更多的同质后裔,但多次分割的胚胎成活率显著下降。

用核移植方法克隆胚胎,已在牛、猪、兔和绵羊上获得成功,不仅产生出成活胚胎,而且获得了后裔(First,1991;Malter,1992)。1997年英国报道了采用细胞核移植技术,成功地用绵羊乳腺细胞和卵母细胞质,在体外组建了绵羊克隆胚,经过移植产出世界首例用体细胞乳腺细胞复制的克隆绵羊。1997年一头克隆牛在日本出生。我国克隆技术研究也取得了重要进展,自1990年克隆山羊(西北农大)诞生以来,1991年克隆家兔(江苏农科院)、1995年克隆牛(广西农科院、西北农大、中国农科院)相继诞生。但是,利用核移植技术克隆胚胎,胚胎的成活率仍然很低,并且这一过程尚只进行了3个世代。

## 6 性别控制

目前,科学家们尚不能准确地鉴定胚胎的性别,X、Y精子的分离还没有找到理想的方法,但是可以相信在不久的将来,这一技术会有突破性进展。胚胎性别鉴定是在受精卵处于16~32个细胞时,从中取出3~4个细胞测定。White(1987)获得了用免疫荧光法测定牛胚胎性别的准确性为90%的结果,测定操作对妊娠率没有影响。最近,特定雄性抗原已用于测定从16个细胞到囊胚早期胚胎的性别。DNA探针已用于测定各个发育阶段胚胎的性别,并且这种DNA探针在澳大利亚、法国和美国的市場有售(Herr等,1990;Nibart,1992)。

## 参 考 文 献

- 1 吴光宗,戴桂康.现代科学技术革命与当代社会.北京航空航天大学出版社,1991
- 2 徐云碧.分子数量遗传学研究进展.上海农学院学报(增刊),1995
- 3 徐云碧,朱立煌.分子数量遗传学
- 4 王立贤.中国美利奴羊MOET核心群优化育种规划的研究.北京农业大学博士学位论文,1993
- 5 张沅等.应用MOET技术选育高产黑白花奶牛的研究论文集.中国奶牛协会,1995
- 6 张沅.中国荷斯坦牛MOET核心群育种方案效率的研究.中国畜牧兽医学界第十届全国会员代表大会暨学术年会论文集(畜牧卷),1996,112-117
- 7 Seidel G F.未来100年胚胎移植.草食家畜,1994,2
- 8 邹华等译.Managing Global Genetic Resources.Livestock,1996
- 9 Rothschild M F, et al. A major gene for litter size in pigs. Proceedings, 5th World Congress on Genetic Applied to Livestock Production. University of Guelph, Ontario, Canada, 7-12 August, 1994, 21: 225-228
- 10 Hill W G. Order statistics of correlated variables and implications in genetic selection programmes II. Response to selection. Biometrics, 1997, 33: 703-712
- 11 Jugn J, Maki-Tanila A. Genetic change in a nucleus breeding dairy herd using embryo transfer. Acta. Agric. Scand, 1987, 37: 511-519
- 12 Keller D S, Gearheart W W, Smith C. A comparison of factors reducing selection response in closed nucleus breeding schemes. J. Anim. Sci., 1990, 68: 1553-1561
- 13 Kinghorn B P, Smith C, Dekkers J C M. Potential genetic gains in dairy cattle with gamete harvesting and in vitro fertilization. J. Dairy Sci., 1991, 74: 611-622
- 14 Land R B, Hill W G. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. Anim Prod. 1976, 21: 1-12
- 15 Leitch H W, Smith C, Burnside E B. Implication of in vitro fertilization technology on genetic response in dairy cattle, proc. 4th World Congr. of Genet. Appl. to Lives Proc. Vol. XIV. 1990, 271-282
- 16 Meuwissen T H E. The use of increase female reproductive rates in dairy cattle breeding schemes. Anim. Prod., 1991, 52: 21-31
- 17 Meuwissen T H E. The effect of the size of MOEF nucleus dairy cattle breeding plans on the genetic gain and its variance. Proc. 4th World Congr. of Genet. Appl. to Livest. Proc. Edinburgh. Vol XIV, 1990, 217-274

- 18 Nicholas F W. The genetic implications of multiple ovulation and embryo transfer in herds. Proceedings of the 30th Annual Meeting of the AAAP. Harrogaie. CGI. 11, 1979
- 19 Nicholas F W, Smith C. Increased rates of genetic change in dairy cattle by embryo transfer and splitting. Animal production, 1983, 36: 341 - 353
- 20 Ruane J. The importance of family sizes in adult multiple ovulation and embryo transfer (MOET) nucleus breeding schemes in dairy cattle. Anim. Prod., 1991, 52: 33 - 47
- 21 Smith C. Use of embryo transfer in genetic improvement of sheep. Anim. Prod., 1986, 42: 81 - 88
- 22 Teepker G, Smith C. Efficiency of MOET nucleus breeding schemes in selection for traits with low heritability in dairy cattle. Anim. Prod., 1990, 50: 213 - 219
- 23 Teepker G, Smith C. Combining clonal response and genetic response in dairy cattle improvement. Anim. prod., 1989, 49: 163 - 169
- 24 Toro M H, Silio L. Genetic simulation of juvenile MOET breeding schemes in dairy cattle. Proc. 40th Ann. Mtg. EAAP. 1989, p. 43 Dublin, Ireland
- 25 Willadsen S M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twin. Nature. 1979, 277: 298 - 300
- 26 Wooliams J A. Modifications to MOET nucleus breeding schemes to improve rates of genetic progress and decrease rates of inbreeding in dairy cattle. Anim. Prod., 1989, 49: 1 - 14
- 27 Wray N R, Simm G. The use of embryo transfer to accelerate genetic improvement in beef cattle. Proc. 4th World Congr. of Genet. Appl. to Livest Prod. Edinburgh. Vol. XV. 1990, 315 - 318

(责任编辑:任 禾)

## 《河南农业科学》1998 年征订启事

《河南农业科学》是河南省农业科学院主办的综合性农业科技期刊,主要报道粮食作物、经济作物、土壤肥料、植物保护、果蔬园艺、畜牧兽医、农经区划、农产品贮存保鲜及综合加工利用、立体种植、庭院经济、家庭副业等方面新的研究成果和先进技术,内容丰富,务实求新,为全国农学主要核心期刊之一。创刊 20 多年来,本着立足本省,热忱为发展农业生产和科研服务,既重视科技信息交流,又重视实用技术推广;还以优惠的条件刊登广告和传递需求信息,深受省内外农业科技人员、基层干部和农民的好评,赢得广大订户和厂商用户的信赖与欢迎。曾多次受到省有关部门的奖励,1996 年获河南省第二届优秀期刊评比一等奖。

《河南农业科学》为月刊,16 开 40 页彩封,每期定价 2.00 元,全年 24 元。全国各地邮局(所)订阅,邮发代号:36-32。如错过订期,可随时和本刊编辑部联系订购。

地址:郑州市农业路 1 号 邮编:450002