

分 类 号 : S823.913.6

U D C : 636.2

密 级 : 公开级

学校代码 : 10712

研 究 生 学 号 : B02127

西北农林科技大学

2005 届攻读博士学位研究生学位 (毕业) 论文

胚胎工程技术在奶牛繁育中应用的研究

学科、专业 : 临床兽医学

研 究 方 向 : 动物胚胎工程

研 究 生 : 刘 俊 平

指 导 教 师 : 张 涌 教授

完 成 时 间 : 2005 年 5 月

中国 陕西 杨凌

Classified code : S823.913.6

University code : 10712

UDC : 636.2

Graduate student number : B02127

Confidential degree : Non Confidential

Dissertation for Doctoral Degree (Graduation) of

Northwest A&F University in 2005

STUDY ON APPLICATION OF EMBRYO ENGINEERING TECHNOLOGY FOR REPRODUCTION OF DAIRY COWS

Discipline, major : Clinical Veterinary Science

Research direction : Animal Embryo Engineering

Postgraduate : Liu Junping

Supervisor : Prof. Zhang Yong

Submitted time : May, 2005

Yangling Shaanxi China

独 创 性 声 明

本人声明：所呈交的博士学位论文是我个人在导师指导下独立进行的研究工作及取得的研究成果，并符合《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，如果违犯此规定，一切后果均由本人承担。

尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得西北农林科技大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文的致谢中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：刘俊平

时间：2005 年 6 月 22 日

导 师 承 诺

本人承诺：我的博士研究生刘俊平所呈交的博士学位论文是在我指导下进行的研究工作及取得的研究成果，属于我现岗职务的成果，并符合《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》。如果违犯《关于规范西北农林科技大学研究生学术道德的暂行规定》，我愿接受按学校有关规定的处理并承担相应导师责任。

导师签名：张彦

时间：2005 年 6 月 22 日

关于论文使用授权的说明

任何收存和保管本论文各种版本的单位和个人未经本论文作者或导师授权，不得对本论文进行复制、修改、发行、出租、改编等有碍作者著作权益的行为，否则，将追究并承担法律责任。

经本论文作者及其导师同意，授权西北农林科技大学可向主管上级有关单位送交论文的纸质件和电子文档，允许论文被查阅和借阅，可以采用复印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。

研究生签名：刘俊平

时间：2005 年 6 月 22 日

导师签名：张彦

时间：2005 年 6 月 22 日

西北农林科技大学

博士学位研究生学位论文

胚胎工程技术在奶牛 繁育中应用的研究

论文评阅人：_____

答辩委员会主席：_____

提交论文日期： 2005 年 5 月

论文答辩日期： 2005 年 6 月

学位授予日期： 2005 年 7 月

本研究由

**国家奶业重大科技专项
科技部重大攻关项目**

提供资助

This work supported by grants from State Key S & T Project
of the Dairy Industry in the “Tenth Five-Year Plan”

胚胎工程技术在奶牛繁育中应用的研究

摘 要

本试验对应用胚胎工程技术提高奶牛繁育效率进行了系统的研究,包括 MOET 技术、IVP 技术、性别控制技术以及引起奶牛繁殖障碍疾病的防治等几方面,得到如下结果与结论:

- 1 共超排供体奶牛 1127 头次,回收胚胎共 10900 枚,可用胚胎数量为 6942 枚,平均每头次获得胚胎数量为 6.73 枚。应用 3 种超排处理方案,即 PSO1、PSO2 和 PSO3,超排成功率分别为 89.50%、90.02%和 98.54%,平均回收可用胚胎数分别为 6.12、5.98 和 7.56 枚,利用发情周期 9~11 d 的自然发情奶牛直接超排,效果最好。
- 2 对青年奶牛进行超排处理,应限制超排起始时间,15 月龄以上的青年奶牛超排效果较好;供体牛连续重复超排控制在 3 次以内,连续 4 次超排处理后极大降低胚胎可利用率;另外超排处理的间隔最短时间应该选择 46~60 d;经产牛 1~3 胎次超排效果较好,7 胎次以上差;产后间隔时间选取 80~90 d 为宜。
- 3 供体奶牛采用性控精液进行超排处理,平均回收胚胎数为 9.02 枚,平均可用胚胎为 4.70 枚,受胎率与正常体内胚胎移植后的受胎率接近,说明采用性控精液生产性控胚胎可行。
- 4 研究中共处理受体牛 5083 头,二次 PG 法、CIDR 法和一次 PG 法处理受体牛同期发情率分别为 75%、78.33%和 72%,受体移植后的妊娠率鲜胚达到 55%以上,冻胚受胎率也在 46%~47%,3 种处理方法结果相近。同期发情处理后青年受体牛比经产牛的利用率高,同时受体的营养水平严重影响受胎率。认为受体牛同期发情以较为简便的二次 PG 法处理为宜。自然发情受体的利用率达到 85%,显著高于二次 PG 法注射同期处理组,选取自然发情牛作为受体显著提高胚胎移植成功率。
- 5 采用直接解冻和分步解冻 2 种方法解冻胚胎,移植后受体受胎率分别为 45.22%和 47.64%,表明以 EG 作为冷冻介质冷冻保存胚胎并于 35℃解冻后可以直接移植。
- 6 未孕受体牛以中医中药调理后进行同期发情处理,受体利用率显著提高,受胎率也有所增加;经产牛在产后 20~25 d 应用 GnRH 联合 PG 调节激素水平,受体利用率和自然恢复组相近,而分娩到同期发情处理间隔缩短。
- 7 直径为 3~6 mm 的卵泡所获得卵母细胞体外成熟,受精率和囊胚形成率较高;在成熟液中添加 10 ng/mL 的 EGF,利于核质成熟;卵母细胞成熟过程中,颗粒细胞保持至少 3 层以上,可以为其成熟提供必要条件,并能促进精子获能和正常受精。
- 8 Percoll 法速度快,活精子数量多,但是多精子受精多,而上浮法回收精子数量少,可是精子的总体活力要高于 Percoll 法;在获能液中添加咖啡因对精子的活力和受精能力无显著的影响,甚至降低了精子的存活时间。

- 9 在无蛋白质培养液（添加PVA）中，囊胚形成率为12.0%，扩张囊胚形成率为0，而添加BSA和FBS，囊胚率和扩张率分别为25.6%/ 28.0%和10.0%/ 19.8%；添加2%NEaa和1%Eaa能显著提高牛胚胎体外发育和胚胎质量；使用CR1aa+0.3%BSA培养牛胚胎3 d，再在SOFaa+5%FBS中培养，获得胚胎囊胚形成率高，胚胎细胞数也增加；添加IGF-I改善囊胚的扩张能力；细胞共培养体系能够提高胚胎的发育潜力（2.0% vs 39.0%）。
- 10 使用性控精液进行体外受精，受精率略下降，对胚胎的发育能力无明显影响。将体外生产的性控胚胎 127 枚移植给 107 头受体牛，妊娠率达 36.5%。
- 11 本研究采用连续复合式 PCR 共鉴定了普通精液授精产生的体内胚胎 998 枚（其中鲜胚 163 枚，解冻胚胎 835 枚），性控精液授精产生的体内胚胎 10 枚；鉴定了 351 枚体外胚胎的性别，其中普通精液授精产生的 235 枚，性控精液授精产生的 116 枚。普通精液体内胚胎性别鉴定后移植受胎率分别为鲜胚 41.03%，冻胚为 37.72%，性控精液体内胚胎的受胎率为 40%；普通精液和性控精液体外胚胎性别鉴定后移植的受胎率分别为 27.78%和 25.00%；体内胚胎性别鉴定符合率达 97.85%。
- 12 卵巢囊肿的诊断以卵巢上存在时间超过 10 d，直径 25 mm 的囊泡性结构，且发情周期和发情表现异常为诊断标准。激素疗法中 GnRH 一次治疗的治愈率为 83.0%，GnRH + PG 治愈率为 86.4%，中药内服一个疗程治愈率为 73.8%，GnRH + 中药内服治愈率为 87.4%；各治疗组治愈后第一情期受胎率分别为 52.3%、54.4%、58.1%和 55.3%。
- 13 黄体退化不全形成硬肿的供体奶牛经 2 个疗程内服中药治疗，总治愈率 91.3%，治愈母牛再次用于超排，所获胚胎数量及可利用率与正常母牛没有显著差异。对持久黄体的治疗以促孕灌注液和激素疗法中 PG 注射效果最好，治愈率分别为 85.9%和 89.1%，治愈后 2 个情期受胎率分别为 77.6%和 75.5%。
- 14 卵巢机能减退 4 个治疗组 FSH + LH 组、PMSG + hCG 组、促孕灌注液组和中药内服组的治愈率分别为 75.6%、63.8%、73.8%和 82.5%；治愈后 2 个情期受胎率分别为 62.9%、58.2%、65.7%和 67.3%。
- 15 治疗慢性子宫内膜炎以土霉素油剂和促孕灌注液效果较好，治愈率分别为 85.4%和 84.8%，治愈后 2 个情期受胎率 83.9%和 82.0%；PG 注射治愈率为 76.3%，治愈后 2 个情期受胎率为 78.9%；中药内服组治愈率为 79.4%，治愈后 2 个情期受胎率 84.7%。
- 16 为预防胚胎死亡采取 3 种控制措施，对照组、P₄ 补充组、hCG 组和内服中药组人工授精后的受胎率分别为 53.3%、56.1%、62.1%和 58.3%；胚胎移植后受胎率分别为 43.3%、49.2%、53.3%和 55.3%。治疗组的受胎率均有不同程度的提高。

关键词：超数排卵与胚胎移植，性别控制，胚胎体外生产，繁殖障碍，奶牛

STUDY ON APPLICATION OF EMBRYO ENGINEERING TECHNOLOGY FOR REPRODUCTION OF DAIRY COWS

ABSTRACT

This dissertation studied systematically how to utilize embryo engineering technology to improve reproductive efficiency of dairy cows, including the techniques of MOET, IVP, sex control and the prevention and cure of reproductive disorder. The result showed:

1. 1127 donor cows were superovulated. The total number of recovered embryos was 10900 , available embryos 6942 , and average number of available embryos 6.73 per cow per time for successful superovulation. Three protocols including PSO1, PSO2 and PSO3 were applied in this experiment and the success rates of superovulation were 89.50%, 90.02% and 98.54%, respectively. The best result of superovulation was obtained in cows when initial injection of FSH directly without pre-treatment on day 9 to 11 of spontaneous estrus.
2. The age of the first time for superovulation of heifers should be restricted and optimal age of superovulation should be above the 15 months old. The continuous repeat superovulation to donor cows should be less than 3 times because the proportion of available embryos decreased evidently after treatment over 4 times. In addition, the interval between two superovulations should be 46 to 60 days. In multiparous cows, 1 to 3 parities were optimal to superovulation and it was not suitable for cows more than 7 parities. The interval between parturition and superovulation should be 80 to 90 days.
3. Superovulated donor cows were inseminated artificially by sexed semen. The average number of recovered embryos and available embryos was 9.02 and 4.70, respectively. The ET pregnancy rate of sexed embryos was closed to that of normal embryos. The result suggested that the sexed embryo might be produced by sexed semen.
4. In the study, 5083 recipient cows were treated by three synchronization protocols: double PG injection, CIDR+PG treatment and the single injection of PG. The synchronization rates were 75%, 78.33% and 72% correspondingly. The pregnancy rate of fresh embryo was 55% after embryo transfer, and that of frozen embryos was 46~47%, the result of the three groups was closed. The utilization rate of heifer recipients was higher than multiparous recipients after treatment of estrus synchronization. It was concluded that the protocol of double PG injection was better than the two others. However, the recipient utilization rate of spontaneous estrus was 85%, significantly higher than the double PG injection group, so the success rate of embryo transfer can be remarkably improved by utilizing recipient of spontaneous estrus.
5. The frozen embryos were thawed by direct and programed methods, the pregnancy rate after embryo transfer was 45.22% and 47.64%, respectively. The result showed that the

embryos frozen by EG as freezing medium might be directly transferred after thawing in 35 .

6. The recipient utilization rate and the pregnancy rate of nonpregnancy cows were improved after adjusting the reproductive functions with Chinese traditional medicine before synchronization. The utilization rate of parturient recipient cows treated by GnRH combined with PG during 20 to 25 days postpartum was closed to that of the natural recovered parturient cows, the interval between parturition and synchronization could be shortened by treatment of GnRH with PG.
7. The *in vitro* maturation rate, fertilization rate and blastocyst rate of oocytes from follicles with diameter of 3 to 6 mm were higher than that from others. Adding EGF 10 ng/mL to maturation medium benefitted the nuclei and cytoplasm maturation. In the process of the oocyte maturation, at least three-layer granule cells were necessary , and it could improve the sperm capacitation and fertilization.
8. In the sperm capacitation processes, the treatment time of Percoll method is shorter and the number of survival sperm is higher than that of swim-up method, but frequent polysperm was occurred. While swim-up method recovered few sperm but sperm viability is higher than Percoll method. Adding caffeine to capacitation medium had no significant effect on viability and fertilization capacity of sperm, even decrease the survival time of sperm.
9. The blastocyst rate was 12.0% and expanded blastocyst rate was 0% in protein-free medium (added PVA), the blastocyst rate and expanded blastocyst rate in media added BSA and FBS were 25.6%/28.0% and 10.0%/19.8%, respectively. Adding 2%Neaa and 1%Eaa to medium can significantly improve the development potential and the embryo quality. The embryos cultured in CR1aa+ 0.3%BSA medium for three days, then in SOFaa+5%FBS medium can get higher blastocyst rate and more embryo cells. Adding IGF-I to medium can improve the expanding potential of blastocyst. The co-culture system could improve the development potential of embryos (2.0% vs. 39.0%).
10. The fertilization rate of sexed sperm is slightly lower than that of the normal sperm when used for IVF, but there was no significant difference to the development potential of embryos between two groups. 127 sexed IVF embryos were transferred to 107 recipient cows, the pregnancy rate was 36.5%.
11. 998 *in vivo* embryos (including 136 fresh embryos and 835 thawed embryos) from normal sperm ,10 *in vivo* embryos from sexed sperm, 235 *in vitro* embryos from normal sperm and 116 *in vitro* embryos from sexed sperm were identified by consecutive and multiplex PCR. The pregnancy rate of identified *in vivo* fresh and thawed embryos from normal sperm was 41.03% and 37.72% , respectively, and from sexed sperm was 40%. The pregnancy rate of identified *in vitro* embryos from normal and sexed sperm was 27.78% and 25.00%, respectively. The coincident rate between the birth gender and identification

result was 97.85%.

12. Ovarian cysts are defined as anovulatory fluid-filled cystic structures ≥ 25 mm in diameter that persist on the ovaries for more than 10 days. The cure rates of hormonal therapy with single GnRH injection, GnRH+PG injection, one treatment period of orally traditional Chinese medicine, GnRH+traditional Chinese medicine were 83.0%, 86.4%, 73.8% and 87.4%, respectively. The pregnancy rates by AI of cured cows of first estrus were 52.3%, 54.4%, 58.1% and 55.3%, respectively.
13. After two courses of treatment with the traditional Chinese medicine, the total cure rate of donor cows with hard tumidness formed from incomplete corpus luteum degeneration after superovulation was 91.3%. When cured cows were superovulated again, there was no significant difference of average available embryo number and available rate between cured cows and normal cows. Pregnant-urge perfusion fluid and hormonal therapy with PG injection for persistent corpus luteum had the best effect. The cure rates were 85.9% and 89.1% and the pregnancy rate by AI after two estruses of cured cows was 77.6% and 75.5%, respectively.
14. Four treatment groups of hypovaria were FSH + LH group, PMSG + hCG group, pregnant-urge perfusion fluid group and the traditional Chinese medicine taken group. The recovery rates were 75.6%, 63.8%, 73.8% and 82.5%, respectively, and the pregnancy rates of cured cows after two estruses were 62.9%, 58.2%, 65.7% and 67.3%, respectively.
15. The terramycin oil and pregnant-urge perfusion fluid were preferably for treatment of chronic endometritis in this experiment. The cure rates were 85.4% and 84.8%, and the pregnancy rates by AI of cured cows after two estruses were 83.9% and 82.0%, respectively. The cure rates of PG injection group and traditional Chinese medicine taken group were 76.3% and 79.4%, and the pregnancy rate by AI of cured cows after two estruses was 78.9% and 84.7%, respectively.
16. Three treatments were taken for prevention of embryonic loss. The pregnancy rate of the control group, P₄ supplementation group, hCG group and the traditional Chinese medicine taken group after AI was 53.3%, 56.1%, 62.1% and 58.3%, respectively; the rate after embryo transfer was 43.3%, 49.2%, 53.3% and 55.3%, respectively. The pregnancy rates of the treated groups were improved.

KEYWORDS: MOET, sex control, IVP of embryos, reproductive disorder, dairy cow

目 录

摘要	i
ABSTRACT	iii
综述部分	1
第一章 奶牛繁育技术的研究进展	1
1.1 牛胚胎移植技术研究进展	1
1.1.1 国内外牛胚胎移植的状况	2
1.1.2 牛同期发情技术的研究进展	3
1.1.3 牛超数排卵技术的研究进展	5
1.1.3.1 超数排卵技术	5
1.1.3.2 超数排卵技术的优化	6
1.1.3.2.1 主动增加用以超排的卵泡数	6
1.1.3.2.2 延长排卵前卵泡的发育来增加排卵数	6
1.1.3.2.3 小剂量 FSH 预处理	7
1.1.3.2.4 抑制素主动免疫	7
1.1.3.2.5 GnRH 及其类似物的应用	7
1.1.4 同期发情与超数排卵研究的热点与难点	7
1.1.4.1 超数排卵前对超排效果的预测	7
1.1.4.2 影响超数排卵效果的因素	8
1.1.4.3 卵泡发育、排卵机理以及其动力学研究	8
1.2 新型人工授精的研究发展	9
1.2.1 程序化人工授精技术	10
1.2.1.1 程序化人工授精技术理论基础 - 卵泡发育波	10
1.2.1.1.1 牛发情周期中的卵泡发育特点	10
1.2.1.1.2 卵泡发育波的产生机制	11
1.2.1.2 程序化人工授精处理程序	11
1.2.1.2.1 PGF _{2α} +PGF _{2α} 法处理程序	11
1.2.1.2.2 GnRH+ PGF _{2α} 法	12
1.2.1.2.3 OvSynch 法	12
1.2.1.3 以 P ₄ 为基础药物的处理程序	13
1.2.1.3.1 CIDR+EB 法	13
1.2.1.3.2 CIDR+PGF _{2α} +EB 法	14
1.2.2 定时人工授精的时间	14
1.3.1 牛体外受精技术的研究简介	15
1.3.1.1 体外受精技术发展简史	15
1.3.1.2 牛 IVF 技术发展	16
1.3.2 卵母细胞的体外成熟及调节	16
1.3.3 精子的体外获能与体外受精	18
1.3.3.1 受精作用机制	18
1.3.3.1.1 精子获能与顶体反应	18
1.3.3.1.2 精卵识别的分子基础	18
1.3.3.1.3 原核的形成与融合	19

1.3.3.2 精子体外获能	19
1.3.3.2.1 精子的洗涤处理	19
1.3.3.2.2 精子体外获能的主要途径	20
1.3.3.3 精卵受精准备同步化	21
1.3.4 早期胚胎体外培养 (IVC) 研究进展	21
1.3.4.1 胚胎体外发育阻滞	21
1.3.4.2 物理性因素对胚胎发育的影响	21
1.3.4.3 化学性培养液对胚胎发育的影响	22
1.3.4.4 共培养系统对胚胎发育的作用	22
1.4 牛活体采卵 (Oocyte recovery from live cows)	22
1.4.1 内窥镜进行活体采卵技术	23
1.4.2 B 超介导的活体采卵技术	24
1.5 牛胚胎性别控制技术的研究进展	24
1.5.1 精子分离技术的研究	25
1.5.1.1 X、Y 精子的不同点比较	25
1.5.1.2 X、Y 精子的分离技术	26
1.5.1.3 免疫学分离法	26
1.5.1.4 流式细胞分类法	28
1.5.2 早期胚胎性别鉴定	28
1.5.2.1 细胞学方法	29
1.5.2.2 免疫学方法	29
1.5.2.2.1 细胞毒性分析法	29
1.5.2.2.2 间接免疫荧光法	29
1.5.2.2.3 囊胚形成抑制法	29
1.5.2.3 分子生物学方法	30
1.6 细胞核移植和转基因技术在家畜繁育中的应用	32
1.6.1 动物核移植和转基因技术概述	32
1.6.2 细胞核移植和转基因技术的应用	33
1.6.2.1 乳腺生物反应器的制作	33
1.6.2.2 在医学领域中的应用	33
1.6.2.3 在畜牧业中的应用	34
1.6.2.3.1 促进动物生长, 提高畜产品品质	34
1.6.2.3.2 动物抗病育种	34
1.6.2.4 存在的问题	35
1.7 奶牛繁殖障碍管理体系研究进展	35
1.7.1 引起奶牛繁殖障碍的因素与疾病	35
1.7.1.1 机能紊乱引起的奶牛繁殖障碍	36
1.7.1.2 泌乳和增高产奶量引起繁殖下降	36
1.7.1.3 能量负平衡引起的繁殖障碍	36
1.7.2 产科疾病引起的奶牛繁殖障碍	37
1.7.2.1 卵巢囊肿	37
1.7.2.2 异常的黄体期延长	38
1.7.2.3 第一次排卵间隔延长	38
1.7.3 导致奶牛繁殖障碍的其他因素及解决策略	39

1.7.3.1 管理水平	39
1.7.3.2 全球环境变化	39
1.7.3.3 发情鉴定和定时授精	39
1.7.4 早期胚胎死亡	39
1.7.4.1 胚胎死亡时间的确定	40
1.7.4.2 影响早期胚胎损失发生的因素	40
1.7.4.3 降低牛胚胎死亡的策略	41
1.7.4.3.1 孕酮补充	41
1.7.4.3.2 延迟黄体溶解(退化)	41
1.7.4.3.3 定时排卵与定时授精	41
1.7.4.3.4 繁殖管理	42
1.8 动物繁育技术的产业化战略分析	42
试验部分	53
前言	53
第二章 奶牛超数排卵与胚胎移植(MOET)技术	55
2.1 材料与方法	56
2.1.1 供受体奶牛选择及试验地点	56
2.1.1.1 供体牛的选择	56
2.1.1.2 受体牛的选择	56
2.1.1.3 试验地点	56
2.1.2 主要试验药物与仪器设备	56
2.1.3 奶牛的超排方法	57
2.1.4 牛胚胎的回收采集	57
2.1.5 胚胎质量和级别的判定	58
2.1.6 胚胎的冷冻与解冻	58
2.1.6.1 胚胎的冻前处理	59
2.1.6.2 胚胎装管	59
2.1.6.3 胚胎冷冻程序选择	59
2.1.6.4 冷冻胚胎解冻	59
2.1.7 胚胎移植	59
2.1.7.1 受体牛同期发情处理	59
2.1.7.2 胚胎移植	59
2.1.8 试验分组及统计	60
2.2 结果	60
2.2.1 不同超排方案对超排结果的影响	60
2.2.2 青年奶牛发情周期不同阶段对超排结果的影响	61
2.2.3 不同月龄青年奶牛超排结果	61
2.2.4 重复超排次数和超排处理的间隔时间对超数排卵的影响	62
2.2.5 超排处理时卵巢状态对超排结果的影响	62
2.2.6 胎次与产后间隔时间对超排效果的影响	63
2.2.7 体内性控胚胎的生产和移植结果	63
2.2.8 冷冻胚胎解冻方式对移植结果影响	64
2.2.9 受体营养及生育状况对胚胎移植成功的影响	64
2.3 讨论	65

2.3.1 供体牛的选择和超排方案的确立	65
2.3.2 利用青年奶牛进行超数排卵结果分析	66
2.3.3 超排间隔时间与产后间隔时间对超排效果的影响	67
2.3.4 影响奶牛超排效果的其他因素分析	67
2.3.5 胚胎冷冻和解冻在 MOET 中的应用	68
2.3.6 受体牛的因素对受胎率的影响	68
2.4 小结	69
第三章 受体牛同期发情控制的研究	73
3.1.2 胚胎来源	74
3.1.3 试验用药品及器械	74
3.1.4 同期发情处理方法	74
3.1.5 胚胎解冻与胚胎移植	74
3.1.6 中药对受体牛生殖生理的调理	75
3.1.7 试验分组与统计学分析	75
3.2.1 不同方法处理受体牛的同期发情效果观察	75
3.2.2 自然发情与同期处理后受体牛的利用	76
3.2.3 移植未孕受体牛和经产受体牛再次同期发情处理的利用	76
3.3.1 受体牛同期发情处理激素的选择及应用	78
3.3.2 提高受体牛同期发情利用率的措施	78
3.3.3 影响受体牛胚胎移植受胎率的因素分析	79
3.4 小结	79
第四章 奶牛体外胚胎批量生产的研究	81
4.1 材料与方法	81
4.1.1 试验使用药品与设备	81
4.1.2 试验时间与地点	82
4.1.3 牛卵泡卵母细胞复合体的采集与体外成熟	82
4.1.4 精子获能与体外受精	82
4.1.5 胚胎培养	82
4.1.6 胚胎细胞计数	82
4.1.7 数据处理	82
4.2 结果	83
4.2.1 卵泡直径与卵母细胞的成熟	83
4.2.2 EGF 对卵母细胞成熟的影响	83
4.2.3 颗粒细胞与卵母细胞成熟	84
4.2.4 精子处理方法与受精能力的比较	84
4.2.5 咖啡因对精子活力和获能的影响	85
4.2.6 不同蛋白质添加物对体外受精胚胎发育的影响	85
4.2.7 不同浓度 NEaa(非必需氨基酸)与 Eaa(必需氨基酸)对胚胎发育的影响	86
4.2.8 不同培养液组合对胚胎发育的影响	86
4.2.9 IGF-I 对牛胚胎体外发育的影响	87
4.2.10 颗粒细胞共培养对胚胎发育的影响	88
4.2.11 性控精液生产体外受精胚胎及移植	88
4.3 讨论	89
4.3.1 不同直径卵泡卵母细胞体外受精后的卵裂	89

4.3.2 EGF 对卵母细胞成熟的影响	89
4.3.3 颗粒细胞层对卵母细胞及胚胎发育的影响	89
4.3.4 Percoll 法与上游法对精子获能和活力的影响	90
4.3.5 咖啡因对精子活力和受精能力的影响	90
4.3.6 不同蛋白质添加物对体外受精胚胎发育的影响	91
4.3.7 NEaa 与 Eaa 对胚胎发育的影响	91
4.3.8 不同培养液组合对胚胎发育的影响	92
4.3.9 IGF-I 对胚胎发育的作用	92
4.3.10 颗粒细胞共培养体系对胚胎发育的影响	92
4.3.11 性控胚胎的体外生产与批量移植	93
4.4 小结	93
第五章 应用 PCR 技术鉴定奶牛胚胎性别的研究	97
5.1 材料与方法	98
5.1.1 材料	98
5.1.1.1 精液和胚胎	98
5.1.1.2 主要试剂与设备	98
5.1.2 方法	99
5.1.2.1 体内胚胎的生产和性别鉴定前处理	99
5.1.2.2 体外胚胎的生产和性别鉴定前处理	99
5.1.2.3 牛基因组 DNA 的提取	99
5.1.2.4 PCR 反应进行早期胚胎性别鉴定	100
5.1.2.4.1 引物的合成	100
5.1.2.4.2 胚胎基因组 DNA 的准备	100
5.1.2.4.3 连续复合式 PCR	100
5.1.2.4.4 扩增产物的检测	101
5.1.2.5 胚胎移植	101
5.1.3 试验数据的统计学分析	101
5.2 结果与分析	101
5.2.1 牛 SRY 基因片段 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果	101
5.2.2 牛体内胚胎性别鉴定结果	102
5.2.3 牛体外胚胎性别鉴定结果	103
5.3.1 引物设计和 PCR 反应条件是保证胚胎性别鉴定的基础	103
5.3.2 性别控制技术在实际应用中存在的问题	104
5.3.3 性别控制技术在畜牧业中的应用	105
5.4 小结	106
第六章 几种常见影响奶牛繁殖效率疾病的防治研究	109
6.1 材料和方法	109
6.1.1 实验动物	109
6.1.2 药品	109
6.1.3 实验方法	110
6.1.3.1 卵巢囊肿的诊断和治疗	110
6.1.3.1.1 卵巢囊肿及其诊断标准	110
6.1.3.1.2 卵巢囊肿的治疗方案	110
6.1.3.2 供体超排冲胚后黄体退化不全形成硬肿的治疗和预防	111

6.1.3.2.1 黄体退化不全形成硬肿及诊断	111
6.1.3.2.2 黄体退化不全形成硬肿治疗方案	111
6.1.3.3 持久黄体的诊断和防治	111
6.1.3.3.1 持久黄体及其诊断标准	111
6.1.3.3.2 持久黄体的防治方案	112
6.1.3.4 卵巢机能减退的治疗	112
6.1.3.4.1 卵巢机能减退及其诊断标准	112
6.1.3.4.2 卵巢机能减退的防治方案	112
6.1.3.5 慢性子宫内膜炎的诊断和防治	112
6.1.3.5.1 慢性子宫内膜炎及其诊断标准	112
6.1.3.5.2 慢性子宫内膜炎的防治方案	113
6.1.3.6 胚胎死亡的控制	113
6.1.3.6.1 胚胎死亡及其临床诊断	113
6.1.3.6.2 胚胎死亡的防治方案	114
6.2 结果与分析	114
6.2.1 卵巢囊肿的治疗结果	114
6.2.1.1 卵巢囊肿的治愈标准	114
6.2.1.2 临床治疗效果	114
6.2.2 黄体退化不全形成硬肿的治疗结果	115
6.2.2.1 黄体退化不全形成硬肿的治愈标准	115
6.2.2.2 临床治疗效果	115
6.2.2.3 黄体退化不全形成硬肿治愈牛与正常奶牛冲胚效果比较	115
6.2.3 持久黄体的治疗结果	115
6.2.3.1 持久黄体的治愈标准	115
6.2.3.2 临床治疗效果	115
6.2.4 卵巢机能减退的治疗结果	116
6.2.4.1 卵巢机能减退的治愈标准	116
6.2.4.2 临床治疗效果	116
6.2.5 慢性子宫内膜炎的治疗结果	116
6.2.5.1 慢性子宫内膜炎的治愈标准	116
6.2.5.2 临床治疗效果	117
6.2.6 早期胚胎死亡的预防效果	117
6.2.6.1 对胚胎死亡控制效果的评价	117
6.2.6.2 对胚胎死亡控制的效果	117
6.3 讨论	117
6.4 小结	120
结论	125
附录	129
致谢	
作者简介	

综述部分

第一章 奶牛繁育技术的研究进展

我国的传统养牛业以役用为主，改良牛的比例只占 30%，牛的生产性能很低，远远不能满足人们生活水平以及现代化农业发展的需要。到 2001 年，全国存栏良种及改良奶牛达 566.2 万头，牛奶产量为 1025.5 万吨，占世界总量的 1.9%。2001 年我国人均占有奶类 8.8 kg。与世界先进国家比较，我国鲜奶产量仅为美国的 15%，人均占有奶量仅为世界平均水平的 1/13，为发达国家的 1/37。2002 年我国共有良种及改良种奶牛 687.3 万头，比上年的 566.2 万头增长 21.5%；全国奶类总产量达到 1,400.4 万吨，比上年的 1,122.9 万吨增长 24.7%。2004、2005 年我国奶业生产形势良好，奶牛存栏稳定增长，且品种结构已较前几年有较大改善，加上技术水平的提高，牛奶生产仍将保持良好的发展势头。但我国的牛奶产量仍不能满足国内的需求，2005 年 1~3 月份，乳制品进口金额占乳制品进出口总金额的 89.1%。所以就我国目前奶业的现况来看，应用奶牛的繁育技术快速扩大高产良种奶牛的种群是解决我国乳制品不足的根本途径。

繁育技术包括人工授精、胚胎移植、体外受精、性别控制、核移植和转基因等胚胎工程技术。在近现代畜牧业发展过程中，随着繁育技术的不断改进，畜牧业的生产规模和生产效率大幅度提高。在我国，家畜繁育技术，尤其是牛的胚胎移植技术发展很快，已基本具备产业化条件，发展前景广阔。胚胎的体外生产技术体系集成活体采卵和体外受精、性别控制/性别鉴定、体外培养、胚胎冷冻、胚胎克隆等技术，最终可获得大量优良遗传性状的已知性别胚胎，用于胚胎移植。胚胎的体外生产技术体系主要在优良奶牛的快速繁育上有重要意义。目前体外生产技术体系得到的胚胎普遍存在移植后妊娠率低、流产率和产后死亡率高、出生动物畸形率也较高等问题，给产业化带来许多负面作用。国内外正在致力于提高胚胎体外生产技术体系最终成功率的研究，已在胚胎发育的基本原理和技术体系的完善方面积累了大量的成果，随着这些成果的应用，胚胎体外生产技术体系可望在 2010 年前，全面达到产业化阶段。

1.1 牛胚胎移植技术研究进展

胚胎移植最早于 1890 年在兔子上试验成功，至今已有 100 多年的历史。牛胚胎移植技术的商业化应用已有 30 多年的历史，国际上，牛的胚胎移植所占比例最大，其次为绵羊和山羊的胚胎移植，其它种类家畜和动物的胚胎移植（如：猪、马、鹿、美洲驼、羚羊等）的研究和应用也十分活跃。胚胎移植作为畜牧产业中的一个新兴产业，无论在育种领域，还是在提高畜群整体遗传水平上，都会发挥越来越大的作用。根据国际胚胎移植协会（IETS）的统计，2000 年全世界移植牛胚胎总数达 528,540 枚，绵羊胚胎总数达 13,769 枚，山羊胚胎总数达 9,912 枚。可以看出胚胎移植已经发展成为畜牧业中最具生机

和活力的应用技术领域之一^[3~8]。随着活体采卵、卵母细胞体外成熟、体外受精、胚胎体外培养技术的完善,体外生产胚胎的商业化应用会进一步提高;冷冻胚胎的使用率会越来越高,将会有大量冷冻胚胎库(Frozen embryo bank)的出现;国际间的胚胎贸易也会随着全球经济一体化的进程而日益繁荣。中国在未来几年中,胚胎移植的规模会进一步扩大。由于中国已经加入WTO,国内相关专业的公司和科研技术人员也应充分发挥自身的优势,积极参予这个大市场的竞争,推动中国畜牧业快速健康的发展。

1.1.1 国内外牛胚胎移植的状况

国际胚胎移植协会(IETS),作为一个促进家畜胚胎移植及相关技术发展的全球性组织,其数据来源于美国胚胎移植协会(AETA)、加拿大胚胎移植协会(CETA)、欧洲胚胎移植协会(AETE)和其他国家的胚胎移植协会或相关机构。主要提供各大洲及一些国家和地区的胚胎移植相关数据,如各种动物的供体数、可用胚数、冻胚数、鲜胚数、储存和进出口的胚胎数等。根据IETS 2000年的统计,平均每头供体牛采得可用胚约6枚,鲜胚妊娠率平均为62%,冻胚妊娠率平均为54%,以IETS提供的胚移妊娠率为参考(按60%计),全世界在该年有30多万头胚移牛产生。可以看出胚胎移植已成为畜牧业中最具前景的繁殖技术之一^[3,8]。

畜牧业的现代化(即家畜良种化、饲养管理科学化、生产方式工厂化)的实现,其中心是提高优良家畜的繁殖效率。胚胎移植可以使优良母畜的繁殖率得到很大的提高,从而给养殖者带来更大的收益。2000年全世界冻胚移植总数为282,284枚,约占移植总数的53%(282,284/528,540),可见冻胚比例在不断升高。应用IVF(体外受精)生产胚胎的技术还没有达到大规模商业化应用的程度。日本在这个方面具有优势,1999年大约有8,000枚体外生产胚胎用于移植,其中60%为冻胚移植。2000年,在欧洲通过体外方式生产的可用胚胎(均为囊胚)为26,520枚。其中通过活体采卵技术(OPU),从1,035头供体牛上共采卵8843次,平均每头供体8.54次,经过体外培养共得到14,079个囊胚用于移植,平均每头供体每次获得可用胚1.59枚。对于胚胎移植技术成熟的国家,其妊娠率相对较高,如1999年法国鲜胚移植妊娠率为64%,冻胚移植妊娠率为50%;2000年加拿大(资料来源于全加拿大64所兽医诊所的胚移报告总结)鲜胚移植妊娠率为62.1%,冻胚移植妊娠率为58.9%^[9]。对于通过体外受精方法生产的胚胎,其妊娠率的资料较少,2000年,加拿大胚移总结中,体外生产胚胎的妊娠率:鲜胚为48%,冻胚为37%^[9]。

在国内,家畜胚胎移植技术起步较晚。牛的胚胎移植从1975年开始,1978年在上海牛奶公司第七牧场产出第一头犊牛(当时每头供体牛采胚约1.5枚,妊娠率约为28%)^[10]。近年来,国内牛胚胎移植技术的研究与推广应用步伐很快,“八五”期间,由北京奶牛中心等单位承担农业部攻关项目“奶牛MOET核心群的建立”,截止1995年9月底累计处理供体牛278头次,平均获可用胚6.3枚;以荷斯坦牛为受体移植1,214头次,妊

娠 658 头次,总妊娠率为 54%,其中青年受体牛鲜胚的妊娠率高达 70%,冻胚为 53%。“863”中试项目“牛胚胎移植技术产业化研究”由新疆新科力生物技术与宁夏农业科学院畜牧研究所联合承担,从新西兰、加拿大、美国进口安格斯肉牛、西门塔尔牛、利木赞牛胚胎 1,762 枚(新疆 1,300 枚,宁夏 462 枚)。其中新疆鲜胚移植妊娠率为 53.38%,冻胚移植妊娠率为 50.11%。农业部的重点项目由内蒙古家畜改良工作站承担,从加拿大进口 3,000 枚肉牛胚胎,累计处理供体肉牛 435 头次,平均获可用胚 5.15~6.78 枚;该站自 1992~1999 年累计移植受体牛 4862 头次,总妊娠率为 47.84%^[11]。

1.1.2 牛同期发情技术的研究进展

母畜发情周期的发生,外部受光照、温度、营养等因素的影响;内部受母畜体内的神经和激素变化的影响。母畜在受外部环境的影响下,丘脑下部的某些神经纤维释放促性腺激素释放激素,沿着垂体门脉循环至脑下垂体前叶,调节其促性腺激素的分泌,所分泌的促卵泡激素(FSH)通过血液循环至卵巢,促进卵泡的发育并分泌雌激素。雌激素由血液循环到大脑皮质,引起母畜的发情,同时雌激素对下丘脑和垂体具有反馈作用,以调节促性腺激素的释放,当雌激素分泌量大时抑制垂体前叶分泌促卵泡素;另一方面又促进促黄体素的释放,出现排卵前的促黄体素高峰,引起卵泡的排卵。

排卵后,在促黄体素的作用下,原来卵泡腔颗粒细胞和卵泡膜转变为分泌孕酮的黄体细胞形成黄体。同时,雌激素还可以作用于垂体,阻止多巴胺(DA)进入催乳素分泌细胞的分泌颗粒,从而引起催乳素(PRL)的大量分泌。促黄体素和催乳素对促进和维持黄体分泌孕酮具有协同作用。当分泌的孕酮量到达一定程度,有负反馈作用,它能抑制垂体前叶分泌促卵泡素,以致卵泡不再发育,母畜不会发情。母畜怀孕时由于孕酮水平高,也不会发情。如果母畜发情后未配种受孕,则子宫内膜产生前列腺素 $F_2\alpha$,破坏黄体组织,使黄体逐渐退化萎缩,孕酮分泌量急剧下降。垂体由于脱离孕酮的抑制作用,又开始分泌促卵泡素,同时引起排卵前的促黄体素的释放,另一个发情周期开始。正常发情周期就是这样周而复始地进行着。同期发情技术作为胚胎移植的配套技术,在生产上有着重要的实用价值。

同期化排卵(Ovsynch)程序及其改进程序是近些年来研究较多的同期发情程序。卵泡生长的同期化可用以下几种药物处理: P_4 、 E_2 、 P_4+E_2 、GnRH 及其类似物^[12]。Ovsynch 程序是:注射 GnRH 的时间记为 0 d,第 7 d 注射 PGs,第 9 d 注射 GnRH,注射 GnRH 后 8~18 h 后配种。它可以提高排卵的同期化程度和实现定时的人工输精(Fixed-time AI),且在泌乳母牛的应用上得到了较好的妊娠率^[13]。Martinez 等人研究了在注射 GnRH 后,第一个卵泡波的优势卵泡排卵之后(排卵记为 0 d)的第 3 d、第 6 d 和第 9 d 诱导肉牛卵泡波出现的能力,发现只有那些对 GnRH 处理发生反应的母牛可以诱导出现新的卵泡波。并且在处理后的第 7 d 有 74%的牛存在一个优势卵泡,其中 85%的优势卵泡大于 9 mm 和有排卵能力。说明在 GnRH 处理后 7 d 可以出现功能性优势卵泡^[14]。在 GnRH

处理后 7 d 次 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 与单一注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 比较其发情同期化程度,结果提高了在注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 后 2~3 d 发情的同期化程度^[15],而且两组实验的妊娠率没有区别。Pursley 等人证实在注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 之后 48 h 注射 GnRH 可以诱导大约 30 h 后的排卵^[16]。这个程序不需要发情鉴定,通过对卵泡和黄体发育的控制,可以及时准确地实施人工输精。以应用 P_4 或 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 控制黄体期长度为基础的同时发情程序在生产中已经应用了许多年,并取得了良好的效果。

但是这些程序没有考虑开始处理时卵泡所处的发育阶段,因而会出现发情不够集中的现象。因此,通过使卵泡生长和黄体退化均同期化,可以实现动物集中发情,提高同期发情的效果。卵泡的发育是下丘脑-垂体-卵巢轴作用下的一个复杂生理过程。卵泡波从出现到“分离期”(Deviation),主要与血液循环中的 FSH 有关。随着卵泡的生长,FSH 浓度逐渐下降(由于抑制素和 E_2 抑制),到卵泡生长至“分离期”时 FSH 浓度降到了最低点。大剂量孕酮处理可以抑制 LH 的分泌从而引起优势卵泡的闭锁和卵泡波的更替(Turnover); E_2 单独处理,或者结合 P_4 处理,可以引起卵泡波的更替;GnRH 或其激动剂(Deslorelin)能诱导 FSH 峰出现可以使在用激素处理存在的大卵泡排卵和黄体化^[17]。优势卵泡排卵后,内源性的 FSH 峰可以产生一个新的卵泡波。在美国和欧盟,类固醇激素禁用于泌乳奶牛,因此用 GnRH 及其激动剂作为调控卵泡发育的药物成为该项研究的首选。

理想阶段是母牛处于发情周期的第 5~10 d。这是因为在发情周期早期(例如:第 2 d 或 3 d 处理),自发的排卵已经发生而潜在的优势卵泡太小(≤ 9 mm),对注射 GnRH 的反应不足以诱导排卵^[18],当第二次注射 GnRH 时,优势卵泡可能已经老化(优势化时间超过 5 d),这些老化的优势卵泡不发生排卵,即使排卵其卵母细胞也很少是可发育的,因此母牛在发情周期早期阶段应用 Ovsynch 程序会产生一个很低的妊娠率^[18]。在接近发情时处理(例如第 15 d),有两波周期的母牛一般会有一个小的优势卵泡,对 GnRH 处理没有反应,不能引起排卵,在注射 GnRH 2~4 d 后,母牛子宫会自发地分泌 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 引起黄体的退化。这样,在 GnRH 处理后 7 d 注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 后,母牛的黄体已经退化、甚至发情,在固定时间的人工输精之前即会排卵。

因此,在应用 Ovsynch 程序时,通过预同期发情程序处理,使奶牛处于发情周期中的理想阶段得以提高该程序的效果。有实验表明:随机开始处理的妊娠率为 36%;用预同期发情程序(间隔 14 d 注射 2 次 $\text{PGF}_{2\alpha}$)处理后第 12 d 首次注射 GnRH,妊娠率为 48%。同期发情预处理会使在 Ovsynch 程序开始实施时,90%的母牛处于发情周期的理想阶段,即 5~10 d。总之,对牛的同时发情程序人们已经进行了深入的研究。同期发情的优点主要有:(1)促进人工授精(AI)技术广泛迅速地应用;(2)可以诱发乏情状态的母畜发情,提高家畜繁殖力,缩短产犊间隔;(3)使妊娠、分娩等过程相对集中,节约人力、物力、时间,方便配种工作;(4)便于管理;(5)作为胚胎移植技术的重要环节,使供体与受体处于相同的生理状态,可提高胚胎移植效益。当然同期发情技术也

存在缺点,主要包括:(1)增加了成本;(2)需要有技术的操作人员;(3)增加了短期的管理强度。在生产应用中,要严格按照程序执行,才会取得良好的效果。但是提高饲养管理水平,最大限度地减少应激和疾病,是实现这一目标的先决条件。至于方案的优劣并不是绝对的,应根据自己牛场的实际情况选择合适的方案。

用于同期发情的药物,根据其性质大体分为三类:1、孕激素类—如孕酮、甲孕酮、18-甲基炔诺酮等这类激素能抑制卵泡生长,延长其黄体期;2、前列腺素及其类似物—如15-甲基前列腺素、氯前列烯醇等。;3、促性腺素—如FSH、LH、PMSG等。

同期发情的方法主要包括如下3种:

1、孕激素埋植法:牛一般埋入耳部皮下9~12 d取出,取出同时注射500~800 IU PMSG。

2、阴道栓塞法(CIDR法):牛在任意一天放入CIDR,放入CIDR 9~12 d取出,取出前2 d注射PG。

3、前列腺素法(二次PG法):第一次注射在任意一天,第二次注射在第一次注射后的第11 d。

1.1.3 牛超数排卵技术的研究进展

牛是单胎动物,产犊数量少,因而一直都很重视对母牛超数排卵的研究。但是母牛个体间大的超排反应差异使得人们在生产实践中无法准确预测其超排效果,这样大大影响了胚胎移植的效益。目前大量使用的超排程序是上个世纪80年代初成型推广的,20多年来没有大的改进^[19]。目前,超数排卵主要应用于两个方面:一是为了获得用于移植的胚胎;另一是为了获得卵母细胞(活体采卵),进行体外生产胚胎。

超数排卵和胚胎回收工具的改进上个世纪60年代至80年代进行了大量的研究工作。如英国的固定距离的三路式胚胎回收器,德国的两路式采胚器,美国的三路式采胚器,丹麦的三路式胚胎回收器,中国的EP-3型采胚管,和法国的单人现场采胚器(把柄上有若干按钮,可控制冲胚液进出)等。应用新材料和新技术制造新型采胚器械是提高采胚效果的一个重要环节。

1.1.3.1 超数排卵技术

牛超排用的促性腺激素有三类:FSH、PMSG、hMG(人绝经期促性腺激素)。现在最常用的是FSH,而PMSG和hMG很少用,因为PMSG在牛体内的半衰期太长(40 h左右),hMG的价格太贵且仅有少数文献报道其效果好。常用的超排方案大同小异,一般为以递减剂量每天两次注射FSH,连续注射3~5 d(因为未使用缓释剂的情况下,FSH在牛体内的半衰期为5 h以下);或一次PMSG注射^[20]。

改进的超排程序:陈静波等报道,在供体牛超排注射的第5天早再注射FSH 0.2~0.5 mg,其它处理与常规4天8次注射相同。结果改进方案与常规方法的可用胚数分别为7.79枚和5.58枚,显著提高了超排效果。其分析原因为:在超排的第5天早(供体即将发情)

再次注射FSH，支持了卵泡的充分发育和成熟，使一些发情较晚的供体母牛不会因促卵泡素不足而使卵泡退化，故显著改善了超排效果^[21]。Moreira和Thatcher等报道用牛生长激素（bST，bovine somatotropin，Posilac）处理超排母牛，可以促进超排效果的提高，其原因可能是增强了早期胚胎的发育能力^[13, 22]。

1.1.3.2 超数排卵技术的优化

近年来，随着超声成像技术的发展，对卵巢进行超声扫描使得人们对动物个体间的超排反应差异的原因有了更深一步的认识，不断尝试寻找预测超排效果的标准或简单实用的方法。此外，研究者也从激素、程序、饲养管理等方面进行了大量的试验。这些研究的目的是为了提髙卵泡波发育的同期化程度，提高超排的卵泡数和排卵率及胚胎的可用率^[23]。

1.1.3.2.1 主动增加用以超排的卵泡数

这种设想主要是通过刺激早期有腔卵泡和腔前卵泡数量来增加反应的卵泡数，使得在开始超排处理时有更多较大的、反应能力一致的卵泡存在。牛的初级卵泡贮库是在胎儿时期建立起来的，该贮库建立之后，卵泡就逐渐地和持续地离开该贮库而继续生长，一生中其总数只会减少。母犊出生时大约有68,000个原始卵泡，而在母牛一生中能发生排卵的卵泡数只有几十个，其余的均发生闭锁和退化。因而如何有效地增加用以超排的卵泡数，是进一步发掘卵巢潜能的手段之一。以往的研究发现，对外源性激素反应不好的母牛每个卵巢只含有50~200个生长卵泡（直径在0.7 mm以上），而反应好的牛卵巢的生长卵泡数则在600个以上^[20]。因此造成超排反应差异的原因之一可能是动物遗传或生理状况不同。改善这种类型母牛超排效果的方法之一是设法促使更多的卵泡变为有腔卵泡。Cushman RA等人研究发现通过长期使用bST和E₂可以增加有腔卵泡数目和改善超排效果^[24]。

1.1.3.2.2 延长排卵前卵泡的发育来增加排卵数

研究发现，当母牛进行超排处理后有一个明显的变化是排卵前卵泡的发育期变短，从黄体退化到排卵前LH峰出现的时间间隔由61 h减少到44 h^[25]。在超排反应中，并不是所有的卵泡可以同期化成熟和排卵。当发育较早的卵泡诱导LH峰出现时，还存在没有成熟的卵泡，这样导致了卵泡和卵母细胞发育的不同步性^[26]。通过延长排卵前卵泡的发育，从理论上讲可以减少卵泡发育的不同步性，并能使更多的卵泡获得对LH信号发生反应的能力。现在延长排卵前卵泡发育的方法主要有以下二种：一是通过使用外源性孕酮栓可以阻止排卵前的内源性LH峰的出现，在孕酮栓去除之后注射GnRH，2小时后可以诱导LH峰的出现；二是使用GnRH拮抗剂(GnRH agonist)处理牛，可以消除垂体分泌LH的作用，然后用纯化的LH处理可以人为地产生LH峰^[27]。延长排卵前卵泡的发育时间增加了成熟卵泡的数量且提高了排卵率，但是最终可用胚的数目没有增加，其分析认为这可能是由于外源性激素处理使得输卵管环境发生紊乱而导致胚胎的发育受到了不利

的影响^[28]。

1.1.3.2.3 小剂量FSH预处理

一些研究认为,在第一个卵泡波出现后的第2次FSH峰与下一个卵泡波(即开始超排处理时)中存在的对FSH敏感的2~6 mm卵泡的群体大小有关^[29]。因此,在发情周期的初期用小剂量FSH对母牛进行预处理,使得更多的储备卵泡〔腔前卵泡〕变为有腔卵泡,可以提高周期9~13 d有腔卵泡的数量,从而改善超排效果。但是Gray BW等人发现用FSH预处理会导致在开始超排处理时卵巢上存在优势卵泡,而引起排卵数降低^[29]。可能是因为个体间的巨大差异,造成无法得到一个合适的处理时间和剂量来增加处理时有效的卵泡数目。

1.1.3.2.4 抑制素主动免疫

卵巢颗粒细胞释放的抑制素(Inhibin, INH)可以选择性地作用于垂体抑制FSH的分泌。INH是由 α 、 β 2个亚基构成的异质二聚体,化学成分是糖蛋白,比较容易制成免疫原。用抑制素免疫动物后,内源性抑制素被抗体中和,血液中FSH浓度升高,达到增加排卵率的目的^[30]。研究表明,使用抑制素免疫后获得超排反应可以维持较长时间,而且使用较少剂量的FSH即可获得较好的超排效果,但也有相反的报道^[30]。因而如何用抑制素免疫来改善超排效果还需要进一步研究。

1.1.3.2.5 GnRH及其类似物的应用

GnRH是由10个氨基酸组成的肽类激素。它可以促使垂体释放LH,提高奶牛多卵泡排卵的同期化程度。奶牛发情后(正常的非超排奶牛),血浆LH水平迅速上升,发情后10 h达到高峰,约25 h时排卵。超排奶牛发情后的LH水平低于非超排奶牛,而且超排母牛的排卵期较长,有的甚至长达24 h^[29]。朱玉林等在试验牛静立发情后6~8 h第一次输精时肌注LRH-A₂200 μ g,结果排卵数和获卵率比对照组均有所提高。此外,有报道认为GnRH还具有改善超排牛输卵管及子宫环境的作用,有利于胚胎的发育,促进子宫内膜的进一步成熟^[31]。但对超排牛注射GnRH的报道的观点并不一致。Mapletoft RJ等人研究发现,在接近发情开始时给超排牛注射GnRH(或者17 β -E₂)并没有提高排卵率和改善胚胎质量^[20]。Kohram等人研究表明,在超排前2天注射GnRH 200 μ g可以增强卵巢反应能力和提高排卵率,但是可用胚胎数并没有增加^[32]。

1.1.4 同期发情与超数排卵研究的热点与难点

1.1.4.1 超数排卵前对超排效果的预测

胚胎移植中可以看出母牛对超排的反应变异范围很大,使得在生产实践中无法预测母牛个体的超排反应,以至于许多研究者认为超排反应是无法预测的,这方面有许多探索性研究。Mapletoft RJ等发现,每个供体母牛的排卵率和可用胚胎数是相对稳定的,一次处理反应好的牛以后各次处理反应都好^[20]。Tonhati H等人统计了2 941头母牛的5387

次超排反应,认为超排反应不具有遗传性^[33]。因此,可以用上一次超排的结果来预测下一次超排反应,而不能依据遗传特性推测。Driancourt MA的研究表明,母牛卵巢对超排处理的反应依赖于超排时存在的对促性腺激素敏感的卵泡数量,也就是说在用促性腺激素处理时母牛卵泡所处的阶段对超排有重要的影响^[34]。

随着超声成像技术的应用,人们希望统计出一个合理的标准,通过卵巢上黄体 and 卵泡的形态,来实现对超排效果的预测。Ali等人通过超声扫描技术确定卵泡的形态(卵泡直径 $<4\text{ mm}$ 为小卵泡, $4\sim 9\text{ mm}$ 为中等卵泡, $\geq 10\text{ mm}$ 为大卵泡),通过抽吸卵泡的卵泡液并测定其中 E_2/P_4 的比例来区别生长卵泡和闭锁卵泡,通过注射前列腺素,诱导黄体退化来促使优势卵泡的排卵来评估卵巢的功能^[35]。研究结果表明:卵泡在出现后的前2天或者在出现后的6 d以后(处于退化阶段),其形态(大小)和功能是一致的;当优势卵泡处在生长期 $4\sim 6\text{ d}$ 时,一部分卵泡是生长的,而另一部分是闭锁的,其形态和功能似乎没有联系。这项研究说明,超排只能挽救那些处于生长期的中小卵泡,使其同优势卵泡一样生长到排卵时的体积。应用超声技术来预测超排效果是一个有希望的辅助手段。在处理前对供体母牛进行分类,对卵巢反应好的母牛进行常规超排;对不排卵的母牛进行活体采卵(OPU);对卵巢反应不好的母牛可以用 E_2 和bST长期联合处理(3个月以上)后再行超排^[36,37]。;吴铁荣依据超排前母牛黄体的状态与超排效果相关,认为A,B级黄体的供体母牛超排效果较好^[38]。目前对超排效果的预测还只是停留在经验水平上,准确地预测超排反应还需要进一步的研究。

1.1.4.2 影响超数排卵效果的因素

要提高超排效果,很重要的一点是进一步明确有利于超排效果提高的因素。这方面的研究报道较多。胎次以 $2\sim 6$ 胎较好;超排季节春夏秋冬均可,但冬季比夏季效果好;促卵泡素剂量以常规剂量较好;非泌乳牛比泌乳牛超排效果好;产后间隔一般认为在60 d以上较好,这时母牛生殖器官和机能已恢复,开始超排即可,若供体母牛的子宫环境和机能未完全恢复,则获可用胚比例较低;输精次数和输精量:一般输2次,每次使用 $2\sim 3$ 支精液即可;超排处理次数:超排处理次数对胚胎的回收数没有显著影响,但超排处理会延迟配种受胎的时间,增加了母牛的空怀天数;营养状况:研究表明过多的能量摄入会减弱超排反应,减少胚胎产量和改变胚胎发育过程中某些基因的表达。高浓度的精料摄入对胚胎生产的质和量都不利,而超排前和超排期间正常能量摄入可以产生更多的卵泡和提高胚胎的质量;环境也是一个很重要的因素,提供最好的环境条件,最大程度地减少应激,尽可能提供舒适的条件和保持一个好的健康体况是取得良好超排效果的基本保障。

1.1.4.3 卵泡发育、排卵机理以及其动力学的研究

在超排处理开始时除去有功能的大卵泡。许多试验结果证明,超排处理时存在大卵泡会抑制相对较小的卵泡的生长,从而影响超排效果。Kim IH等人的研究表明在超排前

48 h用超声介导抽吸除去优势卵泡可以促进其它卵泡的生长，并提高排卵率和胚胎的产量。以上几种设想均是改变卵泡的发育波，使其在超排处理时出现尽可能多的2~6 mm的卵泡数。而把用FSH处理安排在最佳时间，人为地控制同期化卵泡的出现，也是改善超排效果的重要方法之一。目前控制同期化卵泡波出现的方法是，使用特定的激素处理或者通过去除大卵泡的方法获得。在激素处理方法中， 17β -E₂和P₄的联合使用比较成功。目前的研究表明， 17β -E₂+ P₄会抑制优势卵泡的生长，并且在 4.3 ± 0.1 d 产生一个新的卵泡波，用这种方法处理，可以在4d后开始注射FSH，结果与在发情后8~12 d出现第二个卵泡波时处理获得的胚胎数没有区别，但明显可以缩短时间间隔^[39]。在用超声引导除去2个大卵泡与除去所有直径大于5 mm的卵泡效果也一样。Baracaldo等人分析认为，应用物理方法处理（超声引导除去优势卵泡）优于激素处理，因为激素处理引起大卵泡闭锁的同时也影响了下一个卵泡发育波中卵泡的发育^[40]。

近年许多研究表明，在第一次人工输精时同时注射500mg bST(bovine somatotropin, Posilac)，可以提高可用胚的数量。Moreira F等人的研究表明bST通过提高受精率和早期胚胎发育的能力提高了可用胚的数量^[37]。在许多组织中，包括卵巢，bST可以刺激IGF-I（胰岛素样生长因子-I）的合成。Katz等人发现在卵巢内部存在IGF-I、受体和结合蛋白体系，通过增强颗粒细胞的功能，来改善超排反应^[41]。在配种后第3 d，阴道内放置海绵栓，对防止黄体早期退化而导致的胚胎变性有一定作用。

1.2 新型人工授精的研究发展

人工授精技术自从上世纪 40 年代问世以来，首先在奶牛育种中，其后在其他畜种的育种中得到广泛应用。近几十年来，人工授精技术始终在不断地发展和完善，尤其是精液低温冷冻保存技术的出现，使之成为目前在家畜育种中最重要的生物技术。可使优秀种公畜获得大量的后代，迅速地扩大其优良遗传特性和高产基因在群体中的作用。每头种公畜可以承担更多头母畜的配种任务，增加了公畜的选择强度，从而加快了群体的遗传进展。使得对公畜遗传评定更准确。

牛产业化生产是饲养业发展的必然趋势。近年来，随着国内外商品牛生产规模不断扩大，产业化生产步伐日益加快，对牛的繁殖技术就提出了更高的要求。奶牛育种经过多年的研究与实践，已经形成一套完整的应用人工授精技术的育种方案，称之为“AI 育种方案”。该方案的要点是：（1）人工授精技术的广泛应用，以及世界范围地选用优秀种公牛精液；（2）实施大规模的、规范化的生产性能测定；（3）实施科学、严格的公牛后裔测定，并在牛群中全部使用验证公牛；（4）应用先进的数据统计分析方法，并通过计算机数据处理，提高选种的准确性。由于长期实施“AI 育种方案”，使得美国和加拿大等奶牛发达国家，在过去的 30 余年中全国的奶牛的平均生产水平由 5,000 kg 左右，提高到了接近或超过 9,000 kg。经分析，北京市自 1972 年建立公牛站，开始推广冷冻精液以来，牛群每年的遗传进展平均为 50 kg 产奶量。也就是说，在过去的 30 多年间，奶牛

平均单产净增 2,200 kg。牛群的遗传水平已接近国际水平。

此外，农村开展冷冻精液人工授精，由于畜群分散、交通不便，加上自然发情出现时间参差不齐和配种人员较少，也严重阻碍人工授精技术的推广和品种改良进程。因此，如何简单易行、高效率地繁殖商品牛已成为亟待解决的重大繁殖技术课题。解决办法之一就是使发情同期化，提高发情发现效率，使人工授精做到成批、集中、定时。该方法在发情同期化程度、繁殖率和工作效率方面已不能满足商品牛产业化生产的需要。可以说，观察发情和适时输精这两个自人工授精一出现就存在的问题、迄今仍是现代产业化生产中面临的一大难题。

1.2.1 程序化人工授精技术

在发情同期化的同时控制排卵，就能预测排卵时间，从而能在更准确的时间里进行有效的人工授精，获得高受胎率。“卵泡发育波（Follicular waves）”的阐明，为解决上述问题提供了重要理论依据。目前，人们正尝试运用“卵泡发育波”设计新的人工授精技术方案——程序化人工授精技术（Program Artificial Insemination）。所谓程序化人工授精技术，是指利用外源激素人工控制母牛的生殖状况，使之出现同期发情/排卵，并进行定时人工授精的技术。

对母牛实施程序化人工授精技术，不但能使处理牛发情时间高度集中、提高发情发现效率，更主要的是，即使没有观察到发情或者说不需要观察发情就能比较准确、有效地进行定时人工授精，而不降低受胎效果。从而使观察发情和人工授精更省力，便于组织生产和集中进行配种，并能使产后预期内（两个月）的人工授精实施率接近 100%，提高繁殖效率，满足商品牛产业化生产需要。

1.2.1.1 程序化人工授精技术理论基础 - 卵泡发育波

程序化人工授精技术，是建立在缩短或延长黄体期的基础上，通过人工控制母牛卵巢上卵泡发育波，达到同期发情/排卵和定时人工授精的目的。在控制卵泡波和同期排卵方面，研究者们对奶牛程序化人工授精技术中的激素组合、处理程序、激素剂量、定时人工授精时间作了大量研究^[16,42]，基本上解决了程序化人工授精奶牛的受胎率不如自然发情牛受胎率高的问题，有效提高了母牛繁殖率和牛场繁殖管理效率，使得程序化人工授精技术研究有了突破性进展。

1.2.1.1.1 牛发情周期中的卵泡发育特点

一般认为，牛的发情是从卵巢上无数的原始卵泡中，选择一个卵泡发育成熟、排卵。但是，近年来随着繁殖诊查工作的积极实施和间情期卵巢活动受抑制机理的阐明，以及超声波断层扫描仪的普及、激素研究的发展，现在发现，在一个发情周期中，卵泡的发育和退化进行着波样有规律的变化，周而复始发生。这种在发情周期中的卵泡周期性发育现象，称之为卵泡发育波。卵泡发育波也受激素调控，是激素综合作用的结果。

尽管决定一个发情周期中产生的卵泡波数的因素尚未完全查明，但业已判明，在牛

的每个发情周期中,卵巢上一般能观察到两个或三个卵泡发育波。并且,卵泡发育波数多的牛发情周期偏长,在妊娠牛卵巢上也存在卵泡发育波^[43]。在一个卵泡波中,3~6个直径为4~6 mm的卵泡一起开始发育,数天后一般只有其中一个卵泡发育较快而成为该波中最大的一个卵泡,直径可达到11 mm,称之为优势卵泡(Dominant Follicle, DF)。卵泡波中其余卵泡则发育较慢,它们的出现与优势卵泡相差不超过两天,并且在出现后至少延续生长一天,但最终没有达到11 mm,称为次要卵泡。自然发情情况下,仅最后一个卵泡波中的优势卵泡发育成熟并排卵,其余的卵泡全部发生闭锁。

1.2.1.1.2 卵泡发育波的产生机制

卵巢主要受垂体前叶分泌的FSH和LH的调控,而这些促性腺激素又受到丘脑下部分泌的GnRH的调节。但是,血浆中的激素浓度并不总是维持在一定水平,而是呈脉冲式分泌。卵泡波产生前,FSH分泌增加,诱发大量卵泡开始发育、形成卵泡波,并出现优势卵泡。同时,从优势卵泡的颗粒层细胞产生了具有抑制FSH分泌作用的抑制素(Inhibin)。随着优势卵泡的发育,血中抑制素浓度升高,抑制了次要卵泡的发育,使次要卵泡发育到直径为6~9 mm左右即闭锁退化^[44]。当优势卵泡排卵或开始闭锁后,抑制素的分泌逐渐停止,从而解除了对FSH分泌的抑制作用,新的卵泡波开始形成。在黄体期出现的卵泡发育波,由于P₄抑制FSH、LH的分泌,卵泡的发育和发情、排卵均受到抑制。

到了发情前几天,在子宫分泌的PGF_{2α}的作用下黄体溶解,引起P₄浓度下降。此时孕酮和雌激素均处于低水平,对丘脑下部和垂体的负反馈作用减弱,引起丘脑下部GnRH分泌逐渐增加,刺激垂体FSH和LH的合成和分泌。开始主要是FSH分泌量增高,促使数个卵泡迅速发育,形成发情周期中最后一个卵泡波,出现排卵优势卵泡并产生大量的E₂。当血液中雌激素达到一定水平(即排卵优势卵泡发育成熟)时,一方面刺激性中枢引起发情表征,另一方面又正反馈于丘脑下部促使GnRH分泌脉冲发生改变,诱导LH突发性释放、形成LH排卵前峰,诱发排卵。

1.2.1.2 程序化人工授精处理程序

迄今为止所有的处理程序,根据所用基础药物和作用机理不同总的可分两类:一类是用PGF_{2α}缩短黄体期的方法^[16];第二类是应用孕激素延长黄体期的方法。此外,最近又研究出了在缩短或延长黄体期的基础上人工控制卵巢上卵泡发育波的方法,大大推进了程序化人工授精的实用化进程。以PGF_{2α}为基础药物的处理程序有:(1)PGF_{2α}+PGF_{2α}法;(2)GnRH+PGF_{2α}法;(3)OvSynch法。

1.2.1.2.1 PGF_{2α}+PGF_{2α}法处理程序

前列腺素PGF_{2α}有显著的溶黄体作用,黄体溶解后、P₄水平下降,解除了对FSH、LH的抑制,在FSH的作用下卵巢上就会有卵泡发育,所以其作用仅限于黄体期的母畜。由于新生黄体(排卵后0~5 d的黄体)对PGF_{2α}不敏感,并且一个群体中自然情况下总

有 30%左右的母畜处于非黄体期,所以理论上一次用药只能使约 70%的母畜集中表现发情。为了获得全群母畜同期发情的效果,一般需要间隔 11 d 进行两次 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理,以使第一次处理时处在非黄体期的对 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 无效的母牛能在第二次处理时对 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 产生反应。

空怀母牛(不包括分娩后七周内的母牛)用 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 或其类似物(如国产氯前列烯醇 ICI80996,国外多用 Lutalyse)处理一次后,间隔 11 d 再处理一次;发情后 12 h 进行人工授精。为保证较高的受胎率,可间隔 12 h 进行第二次输精。

1.2.1.2.2 GnRH+ $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法

$\text{PGF}_{2\alpha}$ 能迅速溶解黄体,但从使用 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 到发情之间的时间间隔个体差异很大。这种差异并不是由于 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理后个体间黄体溶解快慢造成的。在牛的正常发情周期中,仅最后一个卵泡波中的优势卵泡发育到卵泡发育波中 6~7 d 时才引起黄体退化,而后经过 2~3 d 优势卵泡发育成熟分泌雌激素,引起发情。但是,如果恰巧在卵泡发育波的第 1~2 d 应用了 $\text{PGF}_{2\alpha}$,黄体虽能迅速溶解,但要使优势卵泡发育成熟引起发情还需 5~6 d。而且,在卵泡发育波开始闭锁退化时应用了 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理,也必须要等到下一个卵泡波的优势卵泡发育成熟才会引起发情排卵。起到人工有效控制卵泡发育的药物就是促性腺激素释放激素(Gonadotropin Releasing Hormone, GnRH)及其类似物。GnRH 处理后 2~7 d 内抑制出现发情。超声波扫描和组织学观察表明,在 GnRH 处理后抑制出现发情是由于在处理期间改变了大卵泡的直径所致^[44]。用 GnRH 处理能诱发 LH 释放,从而导致功能性优势卵泡(Functionally dominant follicle)在此卵泡发育波的生长期发生排卵,并产生新黄体^[45]。GnRH 处理诱发排卵又会产生外周血液中 E_2 浓度的下降,这与卵泡正常破裂时发生的情形一致。所以, GnRH 处理能抑制出现自然发情。

用这种方法处理,一般有 70%~83%的奶牛在 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理后 3 d 内发情^[46],约有 60%~70%的牛发情集中在处理后的 36 h 范围内^[16]。因为,不论卵泡处在卵泡发育波的哪一阶段,用 GnRH 处理后 2 d 内都会有一批新的卵泡开始发育。当再用 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理时,这批卵泡正处在卵泡波中第 5~6 d,所以处理后 2~3 d 内可诱发集中发情。这样,从 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理到开始发情之间的时间间隔的个体差异就明显缩小,发情同期化精确度提高了,观察发情比较容易。但是,由于黄体退化后卵泡发育至成熟、排卵的时间仍不一样,所以仍不能实现定时人工授精,还需要观察发情。因此,这种方法也没能得到普及。

1.2.1.2.3 OvSynch 法

它是在 GnRH+ $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理的基础上,间隔 30~48 h 追加一次 GnRH 处理,并在处理结束后 16~20 h 进行定时人工授精的方法。“OvSynch”一词为“Ovulation(排卵)”和“Synchronization(同期化)”的复合词。这种即使没有发现发情也能准确的进行人工授精、而且有高受胎率的方法,是程序化人工授精的新方法。

在 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 处理后的第二天再次用 GnRH 处理的目的是,使发育起来的优势卵泡在一

定时间内全部发生排卵。血浆促性腺激素测定表明,注射 GnRH 后可同时刺激 LH 和 FSH 的释放,诱导内源性 LH 排卵前峰提前出现,诱导峰和自然合二为一,借此使发情和排卵同期化。所以其最大优点就是,不需要观察发情就能准确的进行人工授精且不降低受胎率^[16]。OvSynch 处理可使分娩后一定时间内(两个月)几乎 100%的牛实施人工授精,所有处理牛不需要观察发情就能进行定时人工授精,而且与自然发情后适时人工授精有着同样高的受胎率。有报道称,对卵巢静止牛用此程序也有可能使之妊娠^[42, 47]。不过,在生产实践中 OvSynch 处理经产牛效果好,而处女牛效果差,原因目前还不清楚。是否是因为第一次 GnRH 处理后排卵率较经产牛低,还是因为经产牛卵巢上多为 3 个卵泡发育波、而处女牛多为 2 个卵泡发育波的缘故,仍未有研究定论。但有报道称,处女牛采用 OvSynch 处理时,GnRH 与 PGF_{2α} 的处理间隔为 6 d 时,可获得满意的受胎率^[47]。此外,OvSynch 牛也存在处理后能观察到发情的牛较少的问题。

1.2.1.3 以 P₄ 为基础药物的处理程序

用外源性的孕激素进行处理,使血中孕激素水平上升,造成人为黄体期,作用一段时间后终止其作用,就能造成与黄体退化相同的生理变化,从而诱发发情。但是,过去应用孕激素制剂(CIDR, PRID, Synchro-Mate-B)诱导母牛发情,同期发情效果好、但受胎率低,早已少有应用。随着近年来对牛卵巢上卵泡发育波这一生理现象机理的阐明,应用孕激素诱导发情时母牛受胎率低下的原因也渐清楚。这种方法再次受到人们的重视。

1.2.1.3.1 CIDR+EB 法

在放置 CIDR 的同时,肌注一次 EB(Estradiol benzoate,苯甲酸雌二醇)或在 CIDR 栓内放有少量 EB 制剂),8~10 d 后撤去 CIDR,观察到发情后进行人工授精。

CIDR(Controlled internal drug release device)为孕酮释放阴道置入剂型,与 PRID(Progesterone Releasing Intravaginal Device,PRID)类似,在母畜阴道内放置 3~5 d 能产生与黄体期同样的孕酮浓度,而后逐渐下降,并保持在黄体期孕酮浓度一半的水平。CIDR 阴道内放置 12~15 d,一旦除去,通常会在 4 d 内诱发发情。

近年来研究发现,当用 CIDR 处理 8~10 d 以上时,由于受 P₄ 长时间抑制作用,会致使已发育成熟的优势卵泡既不能排卵、也不能闭锁而残留在卵巢上,也不产生新的卵泡发育波,从而造成优势卵泡内卵子老化、受精能力下降,导致受胎率降低^[48]。而且,放置时间愈长,受胎率愈低。所以 CIDR 长周期处理时,同期发情效果好、而受胎率低。自那以后,研究主要集中在 CIDR 短周期处理方法上。

但是,由于缩短 CIDR 的作用时间,并不能保证撤栓后所有处理牛黄体会随着孕酮水平的突然下降溶解^[49],所以单纯靠缩短 CIDR 的处理时间来达到提高诱发发情率和受胎率的目的很难做到。E₂ 为业已证明了的具有促使黄体退化和促发新的卵泡发育波的作用的激素,配合 CIDR 处理能使黄体退化,2~3 d 后开始出现打捞的卵泡发育波。因此,

在处理时间为 10~12 d 时,建议用含 10mg EB 的胶囊放在 CIDR 内一起置入阴道内的处理方法。

1.2.1.3.2 CIDR+PGF_{2α}+EB 法

即用 CIDR 处理 7~8 d,在除去 CIDR 时追加一次 PGF_{2α} 处理,再间隔 24 h 注射少量 EB,于处理结束 24 h 后进行定时人工授精。

在单独用 CIDR 或上述 CIDR+EB 法诱导发情时,要获得 90%以上的同期发情率需要 4~5 d 的时间,发情出现时间非常分散,波动范围大。当在应用 CIDR 处理后,为了促进黄体溶解退化,宜在 CIDR 除去时或除去前 1 d 注射 PGF_{2α},以提高诱发发情效果可以使 92.3%的处理牛发情集中在 PGF_{2α} 注射后 36~48 h 内。并且,有 PGF_{2α} 的 CIDR 处理组奶牛的第一情期受胎率显著高于无 PGF_{2α} 的对照组(35.94% vs 25.00%, $P<0.05$)。EB 处理的诱发排卵效果,用 CIDR 配合 PGF_{2α} 处理 ET 受体牛,也能显著提高体外受精胚胎移植的受胎率(64.3% vs 33.3%, $P<0.05$)^[50]。

PGF_{2α} 注射后用少量 EB 处理的目的是,拟通过 EB 对下丘脑—垂体的反馈调节,促使垂体 LH 的释放,产生 LH 峰,诱发同期排卵。因为,在生理状态下,卵泡排卵前外周血液中会出现 LH 峰和 E₂ 峰,且 E₂ 峰要比 LH 峰早出现约 15~24 h。因此,E₂ 也被认为可能是诱发排卵的一种因素。

同时 PGF_{2α} 和 EB 配合 CIDR 处理,也能同 OvSynch 处理一样,不需要观察发情就能集中进行定时人工授精。

1.2.2 定时人工授精的时间

在什么时间实施人工授精,关系到能否使有受精能力的优质卵子和已获能精子在最适时期内受精,直接影响到受胎率的高低。

生理条件下,排出的卵子在输卵管内保持有受精能力的时间为 10~12 h,但只有排卵后 2~3 h 内具有高受精能力。另一方面,人工授精输入到母畜生殖道内的精子,获能需要 5~6 h,然后保持 12~18 h 的受精能力。而母牛发情一般持续 18 h 左右,排卵多发生在发情结束后 12 h 前后。因此,人工授精的最佳时机应在发情结束前 6 h 至发情结束后 6 h 之间。输精太早易造成精子老化,太迟又会造成卵子老化,这两种情况下即使能够受精,胚胎早期死亡率也会很高。

OvSynch 法可控制排卵发生在 GnRH 第二次处理后 36 h 内^[16]。因为 GnRH 处理会模拟体内 GnRH 脉冲式分泌改变、产生 GnRH 大量释放的生理反应,6~8 h 后 LH 峰出现、持续 6 h 左右,大约 24 h 后发生排卵。所以,多数研究结果倾向于在 GnRH 第二次处理后第 12~20 h 内人工授精能够获得高的受胎率。Pursley 等^[16]对 GnRH 第二次处理后第 0、8、16、24、32h 不同的时间进行人工授精的效果作了对比研究,试验以第 16 h 人工授精的受胎率为最高(44%),第 32 h 人工授精的受胎率最低(32%)。正是因为第 32 h 输精时卵泡早已发生排卵,待精子获能后卵子已发生老化、受精能力降低的缘

故。

1.3 胚胎体外生产体系的产业化研究进展

奶牛胚胎体外生产 (*in vitro* production, IVP) 指利用体外受精 (*in vitro* fertilization, IVF) 技术完成胚胎的早期发育阶段, 对胚胎质量评估后进行移植的技术体系。应用 IVF (体外受精) 生产胚胎的技术还没有达到大规模商业化应用的程度。胚胎体外生产技术体系的开发及其产业化推进是目前我国胚胎工程领域重点解决的问题。我国家畜体外受精技术于上世纪 80 年代末期取得成功, 90 年代中期成熟。1989 年, 我国首例试管牛在内蒙古大学诞生。广西大学曾利用 IVM-IVF-IVC-FC 路线, 生产了大批牛胚胎, 并经过胚胎移植, 获得了 200 余头试管黄牛犊; 内蒙古大学在澳大利亚和加拿大的胚胎生产基地上, 利用体外受精技术, 生产了近 4 万枚胚胎, 并在国内进行胚胎移植, 获得了良种试管牛犊 350 余头。日本在 1999 年大约有 8,000 枚体外生产胚胎用于移植, 其中 60% 为冻胚移植。2000 年, 在欧洲通过体外方式生产的可用胚胎 (均为囊胚) 为 26,520 枚。其中通过活体采卵技术 (OPU), 从 1,035 头供体牛上共采卵 8,843 次, 平均每头供体 8.54 次, 经过体外培养共得到 14,079 个囊胚用于移植, 平均每头供体每次获得可用胚 1.59 枚。对于胚胎移植技术成熟的国家, 其体内胚胎移植妊娠率相对较高, 如 1999 年法国鲜胚移植妊娠率为 64%, 冻胚移植妊娠率为 50%; 2000 年加拿大 (资料来源于全加拿大 64 所兽医诊所的胚移报告总结) 鲜胚移植妊娠率为 62.1%, 冻胚移植妊娠率为 58.9%^[51]。对于通过体外受精方法生产的胚胎, 其妊娠率的资料较少, 2000 年, 加拿大胚移总结中, 体外生产胚胎的妊娠率: 鲜胚为 48%, 冻胚为 37%^[51]。

体外受精是指在体外环境完成精卵结合的过程。目前, 受精过程的各个步骤都可在体外成功进行。例如, 卵母细胞的体外成熟、精子的体外获能、卵母细胞的体外受精、受精卵的体外发育以及配子和胚胎的冷冻保存等。体外受精研究的深入开展, 一方面加深了人们对受精机制的认识, 另一方面为动物育种、治疗人类不孕症提供了技术支持。

1.3.1 牛体外受精技术的研究简介

1.3.1.1 体外受精技术发展简史

早在 1878 年, 德国科学家 Schenk 就开始进行哺乳动物卵子体外受精的尝试, 他将排卵前的卵母细胞和附睾内精子放入子宫液内进行孵育, 观察到第二极体释放和卵裂现象。1951 年, Chang 和澳大利亚的 Austin 几乎同时发现只有在雌性生殖道停留一定时间的精子才能成功地与卵结合, 进行体外受精。Austin 于次年将这种现象命名为“获能 (capacitation)”^[52]。精子获能现象的发现是体外受精史上的一个里程碑。自此, 体外受精研究蓬勃开展起来。1954 年家兔体外受精成功, 1959 年张明觉首次获得体外受精“试管兔”; 1959 年 Dauzier 进行绵羊体外受精, 获得原核期受精卵, 但 1985 年才得到 IVF 后代; 1973 年猪 IVF 获得成功, 于 1986 年产出仔猪, 1989 年得到 IVM-IVF 仔猪; 1982 年 Brackett 等得到世界首例试管犊牛; 1985 年日本学者花田章等获得世界首例试管山羊,

刘灵在 1992 年获得首批山羊卵母细胞 IVM-IVF 试管山羊；国内旭日干（1989）、范必勤（1989）、朱裕鼎（1989）、卢克焕等（1990）、秦鹏春等（1990）相继得到试管犊牛，现在已有三十余种哺乳动物获得 IVF 后代^[52~55]。

1978 年 7 月 25 日，第一例试管婴儿 Louise Brown 在英国诞生^[56]，这是体外受精技术走向全面应用的标志性事件，是医学和生物学上的一次伟大的革命。近 20 年来，世界上已有几万例试管婴儿降生，体外受精技术为不育家庭带来了福音。Gould 于 1983 年进行黑猩猩体外受精，可观察到卵裂^[57]。1989 年陈大元等首次成功进行大熊猫精子体外获能，体外获能的大熊猫精子能与金黄地鼠卵子相互作用^[58]。1990 年 Miller 和 Ax 相继进行了美洲虎和美洲豹的体外受精，并于同年获得美洲虎体外受精后代^[59]。随着卵母细胞体外成熟技术越来越发展，使得体外受精技术和理论不断丰富，并对生产实践起指导作用。该技术的成功可以为精卵结合过程、原核形成、细胞分化与决定等研究向更高层次发展提供便利条件，再现体内受精过程，大大丰富了生殖生物学、发育生物学、胚胎学、分子生物学的内容，对珍稀动物的早期胚胎发育研究具有重要意义，而且在生产中可提供特定品种的胚胎，有利于提高家畜的生产力。

1.3.1.2 牛 IVF 技术发展

爱尔兰的 Sreenan 最早尝试了牛成熟卵母细胞的体外受精，把公牛精子放入含有 α -淀粉酶的培养液中预先培养，然后用于人工授精。然而真正牛的 IVF 是日本的 Niwa 在 1977 年获得成功。几年后，第一例 IVF 牛（Virgil）在美国出生，这是宾夕法尼亚州兽医学院的 Brackett 和他的助手们的杰作^[60]。加拿大用腹腔镜技术收集排出的卵母细胞，这些卵母细胞在体外受精不久移入兔输卵管培养，结果生下 6 只 IVF 牛，证明兔的输卵管能够用于牛的早期胚胎的培养。

1985 年日本的 Hanada 等^[61]报道了世界首例以体外成熟卵母细胞进行 IVF 而得到的体外受精牛，他们是将移植前的早期胚胎在兔输卵管内培养到囊胚阶段再进行移植。爱尔兰的 Lu 及其合作者首次用完全体外程序（卵细胞体外成熟，IVM；体外受精，IVF；早期胚胎的体外培养，IVC）得到了两头孪生 IVF 牛。

1.3.2 卵母细胞的体外成熟及调节

卵母细胞的成熟是一个逐步完成的过程。首先，卵母细胞染色质充分浓缩；然后，卵母细胞形成第一次减数分裂中期板（MI plate）和功能性纺锤体。初级卵母细胞完成第一次减数分裂后，形成次级卵母细胞，并排出第一极体。再进展到第二减数分裂中期板（MII plate）和排出第二极体。最后，减数分裂停滞在 MII 期。从核网期到 MII 期所需时间因动物不同而异，停滞在 MII 期的卵母细胞需要精子等的激活才能恢复其内源性生理过程。多数动物排出的是次级卵母细胞，受精后才能完成第二次减数分裂，排出第二极体。但犬和狐排卵时仍为初级卵母细胞，排卵后才恢复第一次减数分裂，精子入卵后才排出第一极体。在正常情况下，在减数分裂过程中卵母细胞排出的 1~3 个极体

(Polarbody, Pb) 一般不参与胚胎发育而退化, 但极体内的染色体和留在卵母细胞内的染色体具有同样的遗传和生殖潜力^[62]。将 PbI 注入去核卵母细胞后采用 ICSI (intracytoplasmic sperm injection) 或将 PbII 注入去雄原核的受精卵都产生了具有生殖能力的后代。

卵母细胞的成熟不仅包括核的成熟, 也包括卵胞质的成熟以及卵母细胞特异性 mRNA 的积累, 即分子成熟。目前的卵母细胞体外成熟 (IVM) 技术中常采用核的成熟作为卵母细胞成熟的判定标准, 而相对忽略了卵胞质的成熟和分子成熟, 可能是导致 IVM 卵母细胞受精率和胚胎发育率低的一个原因。卵母细胞从核网期的减数分裂停滞状态中恢复, 表现为核崩解, 即生发泡破裂 (germinal vesicle breakdown, GVBD)。卵母细胞的胞质成熟包括所有细胞器从生发泡期 (GV 期) MII 期分布和组织状态发展。停止生长并获得了减数分裂能力的卵母细胞, 接受 FSH 或 LH 刺激后, 一方面促使卵丘细胞产生和释放 Ca^{2+} , 通过胞桥连接运送到卵母细胞内, 诱导 GVBD 发生, 一方面, FSH 能促进卵母细胞分泌促卵丘因子, 通过胞桥连接运送到卵丘细胞内, 卵丘细胞合成透明质酸和使卵丘扩展。LH 能促进颗粒细胞与卵丘细胞分离, 使卵母细胞成熟抑制因子 (Oocyte maturation inhibiting factor, OMI) 和 cAMP 等抑制性物不能进入卵内, 有助于卵母细胞减数分裂的启动。卵泡颗粒细胞和膜细胞分泌 OMI 能使卵母细胞减数分裂停留在核网期。次黄嘌呤、cAMP 等均可抑制卵母细胞的减数分裂。

成熟促进因子 (Maturation promoting factor, MPF) 和细胞静止因子 (cytostatic factor, CSF) 对卵母细胞的减数分裂成熟起着十分重要的调节作用。MPF 是一种丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶, MPF 由 Cyclin B₁ 和 P34cdc2 组成。MPF 具有导致卵母细胞恢复减数分裂直至成熟的作用, MAP 激酶的主要而广泛作用是控制周期素 B 的水平, 而 Cyclin-B-Cdc2 激酶水平的维持是抑制第一次和第二减数分裂之间的 DNA 复制的一个基本条件, 也是维持其染色体双倍性的重要条件。MPF 本身的活性也是由一系列复杂的蛋白质磷酸化作用 (Phosphorylation) 和去磷酸化作用 (Dephosphorylation) 来调节的。在第一极体排出后, MPF 的活性在 MII 阶段又重新出现并处在高水平上。MPF 活性的维持及其降解, 受 CSF 的调控。当卵母细胞减数分裂进行到 MII 期时, MPF 活性达到峰值, 并受 CSF 的调控而得以稳固和维持, 因而使卵母细胞再次休止于 MII 期。由于 CSF 使细胞周期素 B 维持在磷酸化状态, 从而维持 MPF 活性, 阻止细胞离开 M 期, 使之停滞在 M 期的中期。在卵母细胞受精后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度迅速增加, 使 CSF 活性消失, 细胞周期素 B 被降解, MPF 活性消失, 细胞离开 M 期。

哺乳动物卵母细胞成熟过程中还出现一种调节物质, 称促细胞分裂激动蛋白 (MAP) 激酶, 它也属于丝氨酸 / 苏氨酸蛋白激酶的一种。MAP 激酶能将 MPF 修饰过的一些基质磷酸化, 可防止小鼠卵母细胞在 MI 和 MII 期之间出现间期。LH 也能促进卵母细胞的减数分裂恢复和成熟。LH 可刺激卵丘细胞 2 个独立的信号系统。一方面, LH 激活腺苷酸环化酶的活性, 使细胞内 cAMP 短暂上升; 另一方面 LH 激活磷脂酶 C,

磷脂酶 C 水解磷脂酰肌醇, 产生三磷酸肌醇 (Inositol triphosphate IP_3), IP_3 可使细胞内贮存的 Ca^{2+} 释放。LH 的双重作用通过相同的受体发挥效应, 卵丘细胞 LH 受体激活后, 能同时刺激腺苷酸环化酶和磷脂酶 C 活性, 导致 cAMP 上升和 Ca^{2+} 释放。紧接着 Ca^{2+} 通道开启, 导致细胞外 Ca^{2+} 内流, 同时引起腺苷酸环化酶抑制, 使 cAMP 的产生受到抑制。随着 LH 刺激卵丘细胞, 卵丘细胞内的 Ca^{2+} 和 IP_3 可转运到卵母细胞, 引起卵母细胞 Ca^{2+} 浓度增加。LH 作用的另一个可能途径是促进卵丘细胞合成孕酮, 孕酮再作用于卵母细胞, 参与 MPF 的激活。FSH 也能以类似的机能, 引起卵母细胞内贮存 Ca^{2+} 从内质网释放到胞浆中。EGF 则通过与具有酪氨酸蛋白激酶活性的受体结合, 进而激活磷脂酶 C, 促进细胞内 Ca^{2+} 释放。卵母细胞内 Ca^{2+} 浓度增加抑制 cAMP 的产生, 使卵母细胞能够发生生发泡破裂, 减数分裂恢复。而细胞内 Ca^{2+} 浓度受钙调素(CaM)调节。细胞内 CaM 过度表达, 导致细胞内 Ca^{2+} 浓度下降, 而 CaM 不足, 也会影响减数分裂进程。

1.3.3 精子的体外获能与体外受精

近年来, 随着精子获能机制的逐渐解析, 生殖道液体中诱发获能和顶体反应因子的明确, 人们应用改变精子培养条件或添加诱导精子获能的有效成分的特定培养液来使其完成体外获能^[63]。常用于精子获能的物质有肝素、钙离子载体和血清白蛋白等。精子获能是一个依赖于钙离子的过程, 只要能诱发或促进精子钙吸收的物质都能使精子获能并发生顶体反应, 完成受精过程。

1.3.3.1 受精作用机制

卵子和精子相遇, 精子进入卵子内部, 激活卵子, 精原核与卵原核融合而形成合子, 这种生物学现象称为受精 (Fertilization)。受精过程包括两种不同的活动: 性活动 (源自双亲基因的组合) 和复制活动 (新生物体的产生)。因此, 受精的功能一方面是将父母的基因传递给子代, 另一方面是在卵母细胞质中激发一些确保发育正常进展的系列反应^[64]。不同动物的受精过程有所差异, 但一般都包括以下几个方面: 卵母细胞成熟、精子获能与顶体反应、精卵识别、卵的激活、原核融合和遗传物质融合等。

1.3.3.1.1 精子获能与顶体反应

大多数哺乳动物精子在刚一进入雌性生殖道中时是不能使卵子受精的。精子在穿透卵丘细胞团—放射冠, 特别是穿透透明带之前, 必须在母畜生殖道内经过一个生理变化及形态变化的阶段, 以增强呼吸和活动能力, 为穿透卵子提供动力, 这种变化称为精子的获能 (Capacitation)。精子获能后, 其头部顶体的结构随之出现明显的形态变化, 并将贮存在该处的酶系统依次陆续释放出来, 使精子能够进入卵子的相应各层膜, 特别是透明带。这种现象叫顶体反应 (Acrosome reaction)。精子获能与顶体反应是精子完成受精必须经历的两个重要阶段。

1.3.3.1.2 精卵识别的分子基础

精卵识别 (Recognition of egg and sperm) 有距离识别和接触识别之分, 距离识别见

于体外受精的水生动物，其卵母细胞在完成第二次减数分裂后，可以分泌具有物种特异性的趋化因子，构成卵周特有的微环境，这种环境不仅可以控制精子的类型、刺激精子尾部的摆动，使精子向卵母细胞移动，而且可以使其与卵母细胞在合适的时间内发生受精作用。接触识别指的在受精过程中，精子与卵丘细胞、透明带和卵质膜等在三个独立的水平上准确的相互作用。其中精子与透明带的相互作用为专一反应，精子表面蛋白与透明带特异的糖蛋白结合，诱发顶体反应。现已知的精子表面蛋白有半乳糖基转移酶（GalTase）、SP56、P95等。获能精子在穿透透明带之前，必须附着于透明带上。精子表面蛋白充当受体作用与透明带上的糖蛋白发生特异性结合。

成熟的卵母细胞处于休眠状态，表现为代谢降低，蛋白质和核酸的合成大幅度降低，其中DNA的合成完全停止。经精子刺激，成熟卵从休眠状态进入活动状态，称为卵激活（Activation）。关于精子诱导卵母细胞活化的假说主要有两种：一种是受体假说，认为精子与卵母细胞表面特异性受体（G蛋白偶联的受体或酪氨酸酶偶联的受体）结合，引发信号转导和相应的生物学效应。具体过程为：精卵相互作用活化磷酸脂酶（PLC），作用于 PIP_2 ，使其水解为 IP_3 和DAG。其中 IP_3 与 Ca^{2+} 贮存位点结合，促使 Ca^{2+} 从内质网释放；DAG则激活蛋白激酶C（PKC），加速 Na^+ 的流入和 H^+ 的流出，使PH上升，从而诱导卵的激活。另一种假说为融合假说，伴随精子与卵质膜的融合，一种可溶性精子因子进入卵母细胞，引起 Ca^{2+} 的上升和波动、皮质反应、原核形成和卵裂。精子抽提物并无种属特异性。直接把活精子注射入人卵和其他动物卵中，也可诱发卵激活。迄今虽尚未分离出精子因子，但其活性对热和胰蛋白酶敏感，暗示可能是一种蛋白。卵激活过程中皮质反应非常显著，在精卵融合瞬间发生，其生理意义在于改变卵质膜和透明带的特性，阻止多精受精，确保胚胎正常发育。

1.3.3.1.3 原核的形成与融合

精子入卵后，精子核膨大，由于泡样化而破裂并分散在卵细胞质中，其中的染色质也从致密状态开始松散成为颗粒或细丝状，以后泡状的核膜在分散的染色质四周集中形成许多小囊，然后相互合并组成一双层结构的核膜，即雄原核。与此同时，卵母细胞完成第二次减数分裂，染色体首先分散，沿着分散的染色体的边缘汇集了一些小囊，它们逐渐融合形成一双层包膜，从而形成了一些内含染色体的小囊，称为染色体泡（Kayomeres）。随后这些小泡相接近，包膜彼此合并形成一个形状不规则的雌原核。以后雌雄原核移向卵的中央，相遇，核膜消失，染色体彼此混杂在一起，使配子的单倍体恢复成为合子的双倍体。从而使父母本的特征得以遗传给后代，并完成遗传物质的重组

[63, 64, 65, 66]

1.3.3.2 精子体外获能

1.3.3.2.1 精子的洗涤处理

精子洗涤是精子完成体外获能非常关键的一步，通过洗涤可以筛选出高质量、高活

力的精子；同时可有效地去掉精浆蛋白、死精或弱精、冻精的冷冻保护剂。但是，精子洗涤离心中容易对精子造成损伤，常表现为随时间延长精子活力下降^[64]。因此，在精子洗涤离心中，尽可能是在最小离心力作用下，最短离心时间内筛选出高效的活精子。一般洗涤液为 BO 和 m-Tyrodé's 两种液体。常用的洗涤处理方法为浮游法、Percoll 密度梯度分离法和直接洗涤法。鲜精一般用 BO 或 mTALP 直接离心洗涤；而冻精用浮游法和 Percoll 密度梯度分离法进行分离效果较为理想。

浮游法 浮游技术在 IVF 中成为普遍接受的步骤，可分为上游法（Swim up）和潜游法（Swim down）两种。上游法是由 Parrish（1986）等首次建立的，后经研究者的不断改进，现已成为牛精子洗涤与体外获能的主要方法^[64]。基本程序为将解冻后的冻精缓慢加到盛有 2 mL 获能溶液（BO 或 TALP 液）的小试管底部，倾斜 30° 或 45°，静置 30 ~ 60 min，这期间有活力的精子浮游到溶液中。然后取上 1.5 mL 的浮游溶液（含有精子）离心 1500 转/min，5 min。可再重复 1 ~ 2 次，便能获得高活力精子。Ing 等将浮游技术改为潜游技术，发现后者省事、更简单，而且可获得更多更好的高活力精子^[64]。

Percoll 密度梯度分离法 Percoll 密度梯度通过平衡分离精子，离心后精子按密度大小分布于不同密度的梯度中。该法的前提是形态好的精子比形态差的精子密度大，因而高活力的精子可以在 Percoll 梯度的高密度区获得。

直接洗涤法 该法常用于处理鲜精子，但也有研究者将冻精解冻后直接经 BO 液或 TALP 液离心洗涤后进行受精。这种方法的优点是对精子处理的时间较短，损伤较小。但不能完全除去冷冻保护剂，对精液洗涤不彻底，故影响受精效果。

1.3.3.2.2 精子体外获能的主要途径

凡能促使 Ca^{2+} 进入精子顶体和使精子内部 pH 升高的刺激，均可诱发获能。现在普遍采用的体外获能方法主要有肝素处理法、离子载体法和高离子强度液等。

肝素处理法：First 和 Parrish（1988）发现，牛精子体内获能的活性物质是存在于发情期输卵管中的氨基多糖（Glycosaminoglycans, GAGs），GAGs 可促进精子对钙离子的吸收，从而诱发顶体反应，GAGs 诱发精子体外获能有赖于其硫酸化。肝素是硫酸化程度最强的 GAGs^[64]。自从 Parrish 等^[67]首次报道了应用肝素诱导牛精子体外获能成功以来，相继在牛、山羊、猪上获得成功。在牛精子的各种体外获能处理中，肝素引起了人们的重视。其重复率和成功率是其它方法无法比拟的。一般说来，肝素的浓度以 10 ~ 20 $\mu\text{g/mL}$ 为宜，处理时间 5 ~ 60 min，如再加入一定剂量的咖啡因，还可以提高获能效果^[63]。

离子载体法：Yanagimachi 发现精子在体反应是 Ca^{2+} 依赖过程，这一发现导致 Ca^{2+} 载体 A23187（IA）的广泛应用。据认为胞外 Ca^{2+} 内流对精子获能十分重要。IA 可与 Ca^{2+} 形成复合物，携带 Ca^{2+} 进入精子内部^[68]，从而诱发精子的顶体反应并激活顶体酶。咖啡因可加强 IA 的作用。IA 作用强烈，处理时间过长或浓度过高会导致精子的急剧死亡^[69]。

1.3.3.3 精卵受精准备同步化

精卵相遇的时间对体外受精效果产生重要的影响。如果精子在遇到卵子之前已经发生了完全的顶体反应,则顶体酶过早释放,可能被抑制因子或自身水解酶灭活,精子便失去了穿透卵子的能力。卵母细胞不成熟或老化,也不能完成正常的受精过程^[64]。所以说只有精子获能准备与卵母细胞成熟准备呈同步化,才能保证较高的受精效率。

另外,精卵比例及共育时间显著影响体外胚胎的发育率。在 IVF 中精子的密度通常为 0.5×10^6 — $5.0 \times 10^6/\text{mL}$,如果转换为精卵比,则为 10,000 ~ 20,000 : 1,有时可降到 500 : 1;而在体内受精时,受精部位的精卵比一般为 1 ~ 15 : 1^[70]。这或许是体外受精容易出现多精受精的一个因素。秦鹏春等(1995)用了三种不同浓度的精子密度($2 \times 10^5/\text{mL}$, $1 \times 10^6/\text{mL}$, $5 \times 10^6/\text{mL}$)进行猪的体外受精试验,受精后 48 小时,卵裂率分别为 48.5%、45%、30.5%,证明精子密度对受精率有显著影响^[71]。有研究表明,精子浓度为 0.25×10^6 ~ $0.5 \times 10^6/\text{mL}$ 时较适合牛卵母细胞的体外受精。精卵共育时间因受精液不同有所差异,在 BO 液中一般为 6 ~ 8 h;而在 TALP 液中需要 15 ~ 20 h,不足 16 h 会降低受精率。时间过长会引起多精子受精。

1.3.4 早期胚胎体外培养(IVC)研究进展

早期胚胎的体外培养系统比较复杂,对胚胎发育起关键作用的因素有温度、湿度、pH、渗透压、离子浓度、能量来源、血清成分、光气象、水质等多种因素,目前,在家畜进行的大量研究表明,一般为胚胎和其体细胞共同培养的方法来提高胚胎的发育率,国内外的学者们应用化学性限定培养系统来分析胚胎体外发育所需要的必要营养成分,因为胚胎在不同时期要求的培养环境不同,尽管使用相同的体细胞共培养,但不同的培养液得到的发育率不同。在体外受精胚的发育对于完全体外化生产体系的建立至关重要。

1.3.4.1 胚胎体外发育阻滞

胚胎体外发育阻滞是一个普遍存在的现象,因动物品种不同而异,小鼠为 2-细胞,牛和绵羊为 8 ~ 16 细胞,马和山羊为 1 ~ 2 细胞和 8-细胞,猪为 4-细胞,其它动物也研究得较为清楚。研究指出,动物胚胎发育阻滞与基因组激活关系密切。如小鼠、牛、山羊的胚源基因于 2 ~ 8 细胞时激活,猪在 4-细胞期激活。这提示只有在胚源基因激活的情况下,受精卵或胚胎才能进一步发育。

1.3.4.2 物理性因素对胚胎发育的影响

渗透压和离子浓度变化:培养液的化学成分不同,就会形成不同渗透压。不同动物的胚胎适应不同的渗透压。小鼠和兔胚胎培养的发现,稍低渗透压的培养液比等渗液在较大程度上支持胚胎发育^[72],但猪胚培养发现渗透压在一定范围内变化,对发育无影响。培养液的离子强度在不同 K^+ 浓度(2.5 ± 0.02 ~ $27.8 \pm 0.75 \text{ mmol/L}$)的培养液中培养发现, $13.4 \pm 0.18 \text{ mmol/L}$ 之上时对胚胎发育有害, Ca^{2+} 浓度在 1.3 ± 0.01 ~ $5.5 \pm 0.01 \text{ mmol/L}$ 之间

时,不显著影响绵羊胚胎发育。 Na^+ 浓度对胚胎发育的影响尚有争议,最初认为 Na^+ 浓度对胚胎发育并不重要,但近期在猪胚培养上发现较高 Na^+ 浓度对胚胎发育有害。

pH 值大小:胚胎在稳定的环境中发育,需要适宜的酸碱度,哺乳动物胚胎要求为 7.2~7.4, pH 值偏离过大,影响胚胎细胞质的活性物质,基因的转录和翻译受到阻止,细胞膜的离子通道发生失调,Na/K 交换、Ca 泵等由于膜内外电压的紊乱不能正常发挥作用。培养液的酸碱性在培养箱内平衡后测定。

氧气含量变化:胚胎培养上研究最热门的领域之一就是氧气含量变化对胚胎发育的影响。在母畜生殖道中氧气约为 5%,所以体外培养胚胎一般用 5%氧比用空气(20%氧)更好,但这也因培养系统和采用的方法不同而异。在小鼠、仓鼠、猪、绵羊、和牛的研究表明 5%~10%的氧对早期胚胎发育有利。但 Fukui^[73]用 M199+10%FCS+输卵管上皮细胞在 5%和 20%氧浓度中培养牛胚胎,结果无差异。最近用水牛大鼠肝细胞(BRL)培养牛胚胎,结果为用 20%氧浓度比用 5%氧浓度的效果好(29% vs 5%)。

1.3.4.3 化学性培养液对胚胎发育的影响

1956 年,Whitten^[74]在化学合成培养液内首次成功地使小鼠 8-细胞发育至胚泡。后来在培养液添加适当浓度的丙酮酸钠,使 2-细胞小鼠胚发育成为可能,在牛使用合成培养液获得囊胚,其它动物也取得不同程度的进展。由于动物种类的不同,胚胎发育机理存在差异,为能找到合适的合成培养液系统,有必要对各种动物胚胎体外发育所需营养成分进行试验,为实现胚胎生产规模化奠定基础。在研究过程中发现,营养物质供应不平衡和胚胎发育过程代谢产物的增加及毒性积累严重影响胚胎的质量和发育率,因此对一些营养因素更需探讨。

1.3.4.4 共培养系统对胚胎发育的作用

共培养系统指将胚胎与其它组织细胞一起培养,组织细胞产生对胚胎发育有利的物质,能够使胚胎克服发育阻滞,某些因子调节胚源性基因表达,这是目前较为通用的体外培养方法。

细胞单层作为胚胎的滋养层可以起到调节和营养作用,已经证明单层体细胞与体内细胞的生长情况相似。输卵管单层合成分泌输卵管蛋白、胰岛素样生长因子、表皮生长因子、金属蛋白酶-1 组织抑制剂等,均能刺激胚胎的发育。可以降低培养液中毒性物质的作用,在高氧条件下,共培养体系能消除培养过程中多余的过氧化物,保持膜的稳定性和酶活性。共培养系统在胚胎生物工程中具有极大的应用前景。人们在努力研究用合成培养液(如 SOF)培养胚胎,但结果仍不理想。在较长一段时间内,体细胞共培养还是获得大量优良胚胎不可缺少的手段。

1.4 牛活体采卵(Oocyte recovery from live cows)

牛活体采卵(Ovum pick-up, OPU)技术是继牛体外受精(IVF)、胚胎移植(ET)

技术之后又推出的一项胚胎工程技术。牛的活体采卵技术于90年代后期开始研究,采用的主要方法有:简易牛活体采卵器及盲采法、超声波法采卵及内窥镜法采卵,这些方法被证明均可用于牛的活体采卵。2001年,活体采卵、体外受精的牛胚胎移植后成功获得犊牛出生。此项新技术与牛IVF及ET技术的配套综合利用,将更充分地挖掘优良母畜的遗传潜力,缩短家畜的世代间隔,扩大遗传背景清楚、价格低廉的胚胎来源,从而加速养牛业的遗传改进。同时,也可作为牛的基因工程研究提供大量的试验材料,以促进动物基因工程研究迅速发展。迄今为止,牛的活体采卵主要用B型超声波系统和内窥镜系统两种方法进行,由于后者的卵母细胞回收率明显高于前者,故采用内窥镜进行活体采卵的技术进一步受到重视。

上世纪80年代初, Sirard等^[75]多次将内窥镜技术用于牛的卵母细胞采集,并将获得的成熟卵母细胞进行体外受精,在经过胚胎移植后,得到了牛犊。1993年, Reichenbach等^[76]开始尝试用内窥镜采卵结合卵母细胞体外成熟(IVM)、体外受精(IVF)技术进行牛胚胎的商业性生产。1994年Stubbings和Waeton等^[77]甚至开始将活体采集的牛卵母细胞经IVM和IVF后用于转基因的研究。中国农业科学院畜牧研究所生物工程室朱裕鼎教授根据国外资料改进设计的我国第一台牛用内窥镜活体采卵仪进行牛活体采卵。

1.4.1 内窥镜进行活体采卵技术

本技术主要设备包括内窥镜镜筒、组合套管针,采卵针及接卵离心管。用无水乙醇棉球擦净内窥镜前端进出光源的玻璃面;磷酸盐缓冲液(PBS)预热配制成冲卵液;用4 mL 2%利多卡因进行荐尾间隙硬膜外麻醉,根据牛体格大小肌肉注射静松灵1~3 mL,待尾根松弛后再进行操作。

套管针插入:操作者将钝套管针插入套管,旋转套管针固定卡使两者固定为一体,然后将钝套管针小心插入阴道,通过直肠把握的引导将套管导向阴道穹隆预定刺入的位置上,套管的方向与牛纵向长轴平行,然后撤出钝套针,插入有刃套针,并调整穿刺角度,使套针的方向与母牛的长轴略向右腹壁偏向10°的夹角,略向上用力刺穿阴道穹隆。压力突然减小则表明已经刺穿阴道穹隆到达腹腔,而后取出套针。当听到有空气进入的声音,同时直肠把握的手感到腹腔膨胀,则表明刺入的位置正确。

插入卵巢穿刺针:将穿刺针穿入内窥镜的进针孔中,穿刺针针尖与内窥镜光源截面平行,转动螺栓将针固定,注射器将冲卵液注入采卵针中,以润滑采卵针管壁,并给接卵管中注入2~3 mL吸卵液,将吸卵针和负压泵管连接到接卵管的橡胶塞上。

采卵:将二氧化碳充气管从套管拔掉,立即把准备好的内窥镜插入套管中调节固定卡将两者固定,联结好摄像机连线,把内窥镜接入冷光源。操作者一手在直肠隔肠壁握住欲采一侧卵巢,另一手握内窥镜柄不断调整内窥镜与卵巢的位置,在卵巢与内窥镜之间不能有肠壁等阻隔,操作者根据屏幕上的图像,改变卵巢的位置来展示卵巢上卵泡、黄体大小形态及其卵巢表面的情况,并确定要穿刺的卵泡,穿刺卵泡的大小一般直径为

2~8 mm。确定好要采的卵泡后，操作者让助手推进吸卵针，进针的长度为5~15 mm。拧紧螺栓将针的后端固定，操作者一手把握卵巢，一手把握内窥镜镜柄前后移动，并将针头的斜面贴近卵泡壁，在将要穿入卵泡时，脚踩真空泵开关，将卵泡液、卵母细胞吸出，从屏幕上可看到卵泡立即塌陷，为了防止卵母细胞的流失，真空泵的启动应先于穿刺进行，采完卵后，将内窥镜从套管中取出，用采卵针抽吸冲卵泡液，防止卵母细胞粘附于针管壁。

1.4.2 B超介导的活体采卵技术

在超声波扫描仪的指导下，用双孔型采卵针以14.7 kPa抽吸压经阴道对高产奶牛实施活体采卵，卵子经过体外培养、体外受精、胚胎外发育培养，于体外受精后48 h、168 h统计的卵裂率、囊胚发育率分别为75.2%和29.7%。利用B型超声波导引采集牛卵母细胞简便、可靠，对牛阴道、卵巢造成的损伤小，对牛的健康和生殖机能无不良影响。在超声波扫描仪指导下对奶牛连续进行活体采卵是可行的，所得卵子应用体外成熟、体外受精、体外培养技术，可生产用于冷冻或移植的胚胎。

活体采卵方法采卵之前，先往收集管中注入5 mL DPBS+肝素液（5 $\mu\text{g/mL}$ ），置恒温槽中，温度39℃。将长针与导管用DPBS+肝素液冲洗2遍后准备采卵。母牛站立保定，用8 mL 2%利多卡因硬膜外腔麻醉。

将带有采卵针的探头插入到阴道深部，到达阴道穹窿后，根据所要穿刺的卵巢是左侧还是右侧而把探头放在穹窿的相应一侧。操作人员一手持探头，另一手通过直肠隔着直肠壁将卵巢牵引至贴在探头端部。在B超监视器上能清楚地看到卵巢，根据图象区分卵泡和黄体，调整卵巢和探头位置，使监视器上卵泡位于穿刺导引线上之后，推进穿刺针，对卵泡进行穿刺。同时，用脚踏开关控制真空泵抽取卵泡液，真空泵压力在60~80 mm汞柱之间调整。从监视器上可观察到被抽取卵泡液的卵泡开始缩小，变得不规则，直至卵泡液被完全抽取，卵泡在图像上消失，退出穿刺针，再对第二个卵泡进行穿刺。

用DPBS+肝素液冲洗采卵针及导管，冲洗液也放入收集管。将采得的卵泡液用胚胎收集滤杯过滤，卵母细胞留在滤杯中，用PBS液反复冲洗几遍，将滤杯中卵母细胞倒入表面皿中。在体视镜下进行观察、检卵，将检出的符合要求的卵母细胞放进成熟液中，在39℃、5% CO₂饱和湿度的培养箱中进行成熟培养。

1.5 牛胚胎性别控制技术的研究进展

性别控制（Sex control）通过人为地干预使雌性动物按人们的愿望繁殖所需性别后代的技术。哺乳动物特别是家畜的性别控制主要从两方面进行研究，即受精前的性别控制和胚胎性别鉴定，前者主要指分离X与Y精子，在受精时便决定了性别；后者是通过鉴定胚胎的性别，以影响出生的性比。胚胎性别鉴定于上世纪90年代初取得突破，应用PCR技术扩增SRY序列进行牛胚胎性别鉴定获得成功，准确率为100%^[1]，90年代中期取得性别鉴定牛羊胚胎移植成功，性别鉴定符合率达到100%。我国在牛SRY基

因的分子克隆及鉴定胚胎性别方面已达到国际先进水平。试图控制家畜后代性别是人类一直梦寐以求的目标，随着分子生物学、细胞遗传学、免疫组织学等学科的迅速发展，在家畜胚胎性别鉴定方面，已进入实用阶段。

1.5.1 精子分离技术的研究

通过分离 X 精子和 Y 精子达到控制家畜性别的目的是最经济、最有意义的性控途径。为此，人们做了很多尝试，进行了大量的研究，随着流式细胞分类器(Flow cytometer sorter) 的问世，人们根据 X 精子与 Y 精子 DNA 含量的差别，成功地分离出含 DNA 多的 X 精子和含 DNA 少的 Y 精子^[78, 79]。

1.5.1.1 X、Y精子的不同点比较

有关 X 精子和 Y 精子的不同点已报道了很多，可将这方面面容归纳于表 1-1。

表 1-1 X 精子和 Y 精子的不同点

	不同点	评定
DNA	以 X 精子较多	可以测定，并已得到证明
大小	X 精子的头部较大	头部的大小有很大变异，但不能确切证明 X 精子就大
重量、密度或比重	X 精子重且比重大	仅根据性染色体大小的不同所做的推测，没有确切证实
鉴定	认为 Y 精子中存在 F 体	在有种特异性的人中使用此方法判断 Y 精子，还没有确切证据表明 F 体=Y
活力	Y 精子速度快	用 F 体法判断精子在人的子宫颈粘液中游动速度不同，但不确定
膜电荷	X 精子比 Y 精子带负电荷多	精子表面带负电荷，没有确切证实 X 和 Y 精子上存在电荷差
细胞膜表面	H-Y 抗原	在 X、Y 两类精子上都有 H-Y 抗原，尚不清楚在量的方面是否有差别
酶	LDH 同工酶	LDH-X ₄ 不能使性比偏向于雄性一方，以后又被否定
特异 DNA	存在于 Y 染色体上	分布在 Y 染色体长臂的正中间到远端处

Y 精子特有的 F 小体 (F-body)，Caspersson 等^[80]在用芥子喹吖因 (MQ) 对男性的染色体进行染色时，发现 Y 染色体的长臂与其他染色体相比能发出特别强的荧光，并确认在静止细胞中有强的发光点。后来人们将在核的分裂期间所观察到的强荧光小点称为 F 小体。Barlow 和 Vosa 等^[81]发现在用喹吖因染色的精子中 39% ~ 47% 存在 F 小体，并认为 F 小体精子就是 Y 精子。因为在家畜的 Y 染色体上没有观察到这样的特征，未

能通过试验证明存在 F 小体的精子就一定是 Y 精子,不存在 F 小体的精子就是 X 精子。

牛的 X 染色体的面积为 $7.85 \mu\text{m}^2$, Y 染色体为 $3.47 \mu\text{m}^2$, 前者是后者的 2 倍多。但精子头部的大小受多种因素影响,例如,精子头部大小依精子成熟程度不同而异,射出精子的大小往往因悬浮液的渗透压不同而变化,在低渗食盐溶液中牛精子头部比正常膨大近 3 倍,而在高渗溶液中精子头部从 $25 \mu\text{m}^3$ 缩小到 $20 \mu\text{m}^3$ 。因此,目前还很难确定精子头部大小与 X、Y 精子的相关关系。精子的重量和比重能够判明 X 精子和 Y 精子之间确实存在不同之处是 DNA 含量的差异。密度梯度离心法就是利用精子的重量或比重的不同来分离 X、Y 精子。精子的细胞膜表面带有负电荷,在常用的中性缓冲液中向正极移动。研究表明,X 精子与 Y 精子间膜电荷量差异不大。一种推测认为,精子中尾部负电荷多的精子为 X 精子,而头部负电荷多的精子为 Y 精子。有人就试图利用精子膜电荷性质,设计出各种各样的电泳装置,以进行分离 X、Y 精子的实验。但实验结果不一,尚需进一步研究。

精子的抗原性一直是研究的热点。20 世纪 50 年代 Eichwald 和 Silmsker^[82]发现了雄性特异性弱组织相容性抗原 (Male specific minor histocompatibility-Y antigen, 简称 H-Y 抗原)。认为 H-Y 抗原来自 Sertoli 细胞,但也有一种观点认为 H-Y 抗原是在精母细胞阶段遗留下来的。前些年用 H-Y 抗体处理精子以控制性比的尝试几乎没有成功,但最近 Jones 等^[83]将 H-Y 单抗、羊抗鼠二抗与超磁化多聚体小珠相结合,创立了免疫磁力法,以此法分离的 X 精子纯度达 98%。

1.5.1.2 X、Y 精子的分离技术

人们根据 X、Y 两种精子上的不同点或微小差异,先后采用了流式细胞分类法、沉降法、离心沉降法、密度梯度离心法、凝胶过滤法、电泳法、免疫学方法等种类繁多的精子的分离技术,对人和家畜的精子进行分离。现将前人有关牛精子 X、Y 的分离技术归纳于表 1-2。

从表 1-2 可以看出,以往人们采用沉降法、离子交换法、电泳法、密度梯度法等分离 X 或 Y 精子均未成功,目前具有一定重复性、进展较好的精子分离方法主要有免疫学方法和流式细胞分类法。

1.5.1.3 免疫学分离法

精子表面存在雄性特异性组织相容性抗原(H-Y 抗原)最早是 Goldberg 等^[93]在一项细胞毒性实验中发现的,迄今已确认有 70 多种动物存在 H-Y 抗原。随着高效价 H-Y 抗体技术的建立,人们致力于用 H-Y 抗体选择性结合 Y 精子来改变动物性比率的研究^[94, 95],但都未获得满意的结果。直到 1980 年 Bryant 等应用 H-Y 抗体免疫亲和柱层析法首次成功地分离了人和小鼠的 H-Y 阳性和 H-Y 阴性精子,利用 H-Y 抗体进行动物性控的研究才有了实质性进展。Bradley^[90]用免疫亲和柱层析法分离绵羊的 H-Y 阳性和 H-Y 阴性精子,发现未结合到层析柱上的精子有 70%~80%为 H-Y 阴性,结合到层析柱

表 1-2 为分离牛的 X、Y 精子所试用的主要技术

方法	结果
沉降法：将由脱脂乳、盐类及卵黄组成的液体，调制成黏度为 7~10 CP、比重 1.037~1.044 的 10~12 份。沉降时间在 60 min 以内，使用最下层的部分 ^[84]	雌性 60 头，雄性 26 头雌性比率为 69.8%
沉降法 ^[85]	用底层精子，得到的雌性犊牛为 63.2%，用上层部分精子，雄性犊牛为 61.8%
沉降法：将卵黄和奶粉液的混合液放入内径 1 cm，长 32 cm 量筒内，将精子澄清。2~4 下放置 1~5 h，按小时划分 ^[86]	用沉降速度快的 I、II 部分的精子进行输精，雌性比率为 53.9%，高于对照组（46.8%，用缓慢沉淀后的精子输精，雄性比率没有提高
电泳法：10%卵黄磷酸缓冲液稀释的精液 3.5 mL 置于滑动式间隔槽内，以 8 V/cm 和 21 V/cm 在 35 下移动 1 min ^[87]	用正极处的精子得到 121 头犊牛，55%为雄性；用负极处的精子得到 137 头犊牛，44%为雄性，而对照组的 59 头犊牛中也是 44 为雄性
沉降法和电泳法：将精子移入以 6 的温差而形成逆流的柱内，分成上、中、下部分，再分别进行电泳 ^[88]	上层电泳后聚集在正极的精子，71%为 B 体阳性，得公犊 81.1%；下层电泳后聚集在负极的精子，29%为 B 体阳性，得母犊 91.9%
无传递体连续电泳法：以蔗糖和三乙醇胺-乙酸缓冲液的混合液作为移动用缓冲液，50~60 V/cm，10 下移动 ^[89]	用第一峰值的精子输精，雌性 36 头，雄性 19 头
Percoll 的浓度为 30~90% 密度分为 7 个梯度（间隔 10%）进行分离；以及用浓度为 50%~80%，分 7 个梯度（间隔 5%）进行分离。沉淀精子冷冻保存，然后人工授精 ^[89]	在 30%~90%的分离中，分娩了 15 头犊牛，雌性 10 头；在 50%~80%的分离中，分娩了 6 头犊牛，雌性 2 头
免疫学方法：用免疫亲和性层析法分离绵羊的 H-Y 阳性和 H-Y 阴性精子，用以 FTTC 标记的抗鼠二抗结合，并做荧光显微镜检查 ^[90]	未结合到层析柱上的精子 70%~80%为 H-Y 阴性；结合到层析柱上的精子 75%~78%为 H-Y 阳性。对照组 H-Y 阳性和阴性精子分别为 43%~44%和 56%~57%
免疫学方法：使用 H-Y 抗血清 IgG 与牛精液发生感作后进行输精 ^[91]	妊娠 10 头，产犊 11 头，其中母犊 9 头，公犊 2 头，差异显著
生物素探针法：用 PCR 扩增牛的 Y 染色体特异性重复序列，用生物素标记探针对 19000 个牛精子进行 X、Y 精子分离 ^[92]	Y 精子出现率 50.1%，但分离速度低于流式细胞分类器
流式细胞分离法：分离前将精子用荧光染料 Hoechst33342 对精子染色，之后放入流动小室，以每秒 100~800 个精子的速度从一个 76 μ m 的小孔中流出，由于着色量与 DNA 量成正比，因此 X 精子发出的荧光比 Y 精子强。DNA 含量不同的精子通过高压电场后便可发生偏转，分别流入不同收集管中 ^[98] 。	改进后流式细胞分类器在分离牛精液时，X 精子和 Y 精子分离的准确率可达 90% 以上。

上而后被洗脱下来的精子 75%~78%为 H-Y 阳性。而对照组的 H-Y 阳性和 H-Y 阴性精子分别为 43%~44%和 56%~57%。免疫亲和柱层析的基本方法是：用兔抗鼠 IgG 二抗

与琼脂糖-6MB (Sepharose-6MB) 小珠偶联构筑分离柱。将绵羊精子与大鼠抗 H-Y 血清 (一抗) 进行预培养, 然后洗涤预培养的精子以除去过量抗体。将洗涤后的精子用免疫亲和柱层析, 其中一抗 H-Y 阳性精子能与柱内二抗包被的琼脂糖小珠结合, 而 H-Y 阴性精子则可被大量的缓冲液洗脱下来, 收集 H-Y 阴性精子进行人工授精。然后用过量的非免疫血清洗脱结合到层析柱上的 H-Y 阳性精子, 收集 H-Y 阳性精子进行受精。不过, 柱层析后幸存的精子相对较少, 且活力较低, 所以免疫亲和性层析法不适于大规模精子分离, 难以在生产中应用。

1.5.1.4 流式细胞分类法

X 精子头部的 DNA 含量比 Y 精子要高出 3% ~ 4% (猪为 3.5%, 牛为 3.9%, 羊为 4.2%), 根据两类精子头部 DNA 含量的差异, 利用流式细胞分类器分离牛的精子^[96], 经输卵管输精或体外受精后, 已获得了预期性别的牛的活的后代。在兔 Y 精子子宫内输精后, 预测雄性兔比例为 81%, 实际亦为 81%; X 精子输精后预测雄性兔比例为 14%, 实际产雄性兔 6%^[97]。牛精子分离后用于体外受精, 将胚胎移植给 9 头受体牛, 其中 4 头妊娠产犊 6 头, 3 头雄性, 3 头雌性, 均与预测性别相符^[96]。

用流式细胞分类器分离 X 和 Y 精子的方法是: 分离前用双苯并咪唑 (Bisbenzimidazole) 荧光染料 Hoechst33342 对精子染色, 在 35℃ 培养 1h 以增进染料的渗透, Hoechst 染料可渗入精子膜从而使 DNA 着色。经荧光着染的精子悬浮在等渗缓冲液中放入流式细胞分类器的流动小室, 以每秒 100 ~ 800 个精子的速度从一个 76 μm 的小孔中流出, 在 5W 的氩激光前通过。此激光是在 351 ~ 364 nm 波长的紫外光和 200 mW 功率下产生的。由于着色量与 DNA 量成正比, 因此 X 精子发出的荧光比 Y 精子强。DNA 含量不同的精子通过高压电场后便可发生偏转, 分别流入含不同卵黄量 (10% ~ 20%) 的 Test 缓冲液的收集管中^[98]。改进后流式细胞分类器在分离牛精液时, X 精子和 Y 精子分离的准确率可达 90% 以上。但是用流式细胞分类器分离精子时需要使精子一个一个地通过, 这样必须稀释精液, 造成精子的运动能力下降。该方法不失为一种有效分离 X、Y 两类精子的技术。

1.5.2 早期胚胎性别鉴定

Palmer^[99]、Sinclair 等^[100]研究发现睾丸决定基因位于 1A1 区, 并将其范围从 60kb 缩小到 35kb, 在这个片段上发现了一个单拷贝基因, 称之为 SRY (Sex determining region of the Y)。SRY 基因经克隆后被认为是 Y 染色体上的睾丸决定因子 (TDF)。该基因的 DNA 序列在哺乳动物中具有极高的同源性, 编码主结构由 80 个氨基酸组成, 具有 HMG (High mobility group protein) 特征的 DNA 结合蛋白质。为了证实 SRY 基因的确是睾丸决定基因, 1991 年 Koopman 等^[101]进行了小鼠性反转试验。将含有 SRY 基因的 14kb Y 染色体片段显微注入 XX 雌性小鼠胚胎中, 在整合了 SRY 基因的转基因小鼠上实现了性反转, 其大小、体重、交配行为与正常 XY 雄鼠无异。这个试验充分证明了 SRY 基因就是辜

丸决定基因。SRY 基因的发现及其序列的解析,使人们对哺乳动物的性别决定问题有了明确的认识,性别分化的诱发和决定都受性别决定因子 SRY 的支配。因此,科学家们确认对雄性遗传根源的探索已探明,从而结束了 30 多年对性别决定基因的研究,也为早期胚胎性别鉴定提供理论基础。早期胚胎性别鉴定方法主要有细胞学方法、免疫学方法、分子生物学方法等。每种方法各有利弊,鉴别准确率也因研究者不同而大相径庭。

1.5.2.1 细胞学方法

细胞学方法是经典的胚胎性别鉴定方法。胚胎的核型是固定的 (XX 或 XY),各种家畜的染色体数目虽然不一样,但在早期胚胎发育过程中雌性胚胎中的一条 X 染色体处于暂时失活状态,因此,从胚胎取出部分细胞直接进行染色体分析或阻断培养在细胞分裂中期进行染色体分析,可对胚胎进行性别鉴定。此法的优点是准确率可达 100%,但采集细胞对胚胎有伤害,且获得高质量的中期染色体分裂相也很困难,不适用于生产实际,目前主要用于验证其他性别鉴定方法的准确率。

1.5.2.2 免疫学方法

该方法是利用 H-Y 抗血清或 H-Y 单克隆抗体检测胚胎上是否存在雄性特异性 H-Y 抗原,从而鉴定出胚胎性别的一种方法。检测胚胎的 H-Y 抗原有三种方法,即细胞毒性分析法、间接免疫法光分析法和囊胚形成抑制法。

1.5.2.2.1 细胞毒性分析法

细胞毒性分析是将胚胎和 H-Y 抗血清及补体混合培养,在培养过程中继续发育的胚胎分类为雌性,将出现个别卵裂球溶解以及不能发育的胚胎分类为雄性。由于这种方法是破坏雄性胚胎为代价,目前已很少采用。

1.5.2.2.2 间接免疫荧光法

间接免疫荧光法是将胚胎在 H-Y 抗血清或单克隆抗体中培养,再用异硫氰酸盐荧光素 (FTTC) 标记的第二抗体处理,在荧光显微镜下观察有无特异荧光。有荧光者为雄性胚胎,无荧光者为雌性胚胎。此法的优点是不损伤胚胎且具有较高的鉴别准确率。牛的雌性胚胎鉴别准确率达 89%,雄性胚胎为 85%^[102];绵羊雌性胚胎鉴别准确率为 85%,雄性胚胎为 84%;猪的雌性胚胎鉴别准确率为 86%,雄性胚胎为 77%。根据国内外的大量研究结果,用免疫学方法鉴别家畜胚胎性别准确率一般在 85%左右。因为 H-Y 抗原是个弱抗原,H-Y 抗血清的特异性较差,H-Y 单克隆抗体代替 H-Y 抗血清也未能提高鉴别准确率,而且对荧光强度的估价人为因素很大,所以间接免疫荧光法在实际应用中还有一定的局限性。

1.5.2.2.3 囊胚形成抑制法

囊胚形成抑制法是利用 H-Y 抗体对雄性桑椹胚向囊胚发育具有可逆性抑制的原理而发展起来的一种胚胎性别鉴定法。将大鼠 H-Y 抗体与大鼠桑椹胚共同培养 6 min,形

成囊胚者判为雌性胚胎,未形成囊胚者判为雄性胚胎。将此法鉴别的两种胚胎移植后分别获得了 79.1%的雌鼠和 91.3%的雄鼠。Utsumi 等^[103]用这种方法鉴别胚胎性别,获得雄性胚胎鉴别准确率达 90%以上,雌性胚胎准确率达 80%以上。

1.5.2.3 分子生物学方法

分子生物学方法是近十年发展起来的一种利用雄性特异性基因探针和 PCR 扩增技术鉴别家畜胚胎性别的崭新方法。由于这种方法灵敏度高,准确率达 90%以上,对胚胎的损伤极小,所以被国内外研究人员广泛用于家畜,尤其是牛胚胎的性别鉴定,是目前较为成熟、最理想的性别鉴定技术。1987 年首次报道用牛 Y 染色体特异性 DNA 多重复序列探针鉴定牛囊胚期胚胎获得成功,他们从胚胎取 10~20 个细胞作原位杂交,共取 150 枚胚胎样品,胚胎性别鉴定准确率为 95%。Herr 等^[104]首先采用 PCR 技术扩增 Y 特异多重复序列鉴定了牛、羊等家畜胚胎性别,准确率分别达到 91.6%和 96.5%。曾溢滔等^[105]用直接测序技术测定了奶牛 SRY 的 DNA 序列,在此基础上设计并合成了牛的 SRY 特异引物,通过 PCR 直接扩增牛胚胎的 SRY 特异 DNA 序列,鉴定了 17 枚牛胚胎的性别,其中雌性胚胎 7 枚,雄性胚胎 10 枚。经过性别鉴定的胚胎进行移植后,结果有 4 枚移植成功,犊牛性别与鉴定结果一致,准确率达 100%。使用 SRY 引物通过 PCR 扩增对牛的全胚、半胚和部分胚胎细胞进行性别鉴定,其准确率分别为 100%、100%和 92%。由于 PCR 分析准确率高,不管胚胎细胞类型如何,都能鉴别出其性别,因此该法可用于牛胚胎移植前的性别鉴定。

应用 SRY-PCR 技术,通过扩增牛的体细胞 DNA 及胚胎 DNA 进行性别鉴定的具体步骤如下:

(1)从肝脏组织和血细胞中提取 DNA,用于 PCR 程序的 DNA 量应为 100~200ng。再将牛的桑椹期或囊胚期的胚胎进行分离,取出一个或几个卵裂球用于 DNA 的提取。

(2)根据牛的 SRY 序列测定结果,合成出牛的 Y 染色体特异 DNA 序列引物,扩增特异性片段。

(3)将提取的 DNA 与引物、dNTP、PCR 缓冲液和 Taq 聚合酶混合,其中基因组 DNA 为几个 pg 至 1 μ g,引物为 50 pmol, Taq 聚合酶为 1.5~2.5 U,混合成 50 μ L。再分别加入 200 μ mol 的 dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP。

(4)使用 PCR 仪进行体细胞 DNA 扩增。首先在 90 或 95 停留 30 s 或 1 min,使 DNA 失活,双链分开;然后退火,55 30 s 或 2 min,使 DNA 复性;再在 70~72 下停留 1.5~3.0 min,使引物延长,反复进行 30 个周期,完成 DNA 合成。

(5)扩增 DNA 的检测。将扩增的 DNA 样本 10 μ L 在 2%~2.4%的琼脂糖凝胶上电泳,用 1~2 μ L 经 λ -Hind 消化的 DNA 作为分子标记。电泳后经溴化乙锭染色后,在紫外线下观察。

(6)性别鉴定分析。在牛的雄性细胞 DNA 扩增产物电泳图可见到一条 144bp 的带,

而雌性细胞中无此条带，据此可鉴定牛细胞的性别。

此外，鉴别家畜胚胎性别的另一种分子生物学方法是 LAMP 法。LAMP 法是一种简便、快速、准确、廉价的基因扩增法，它可以取代 PCR 法，由日本荣研化学株式会社发明。其特点是对目标基因的 6 个区段设定 4 种引物，利用链置换反应在等温条件下使其发生反应。只要把基因检样、引物、链置换型 DNA 聚合酶、基质等放在一定温度条件（63~65℃）下保温，至完成反应检定为止的过程一步工艺就可以完成。操作完成约需 40 分钟，此法具有很高的特异性，它采用雄性特异性以及雌雄共同引物，因此，可以最大限度地排除误判；只需一台 Loopamp 终点浊度仪，就能完成扩增、检出、判定整个过程。有无扩增反应是通过反应过程中获得的副产物焦磷酸镁所形成的白色沉淀的浑浊度来判定。其操作步骤如下（以一个样品为例）：

（1）胚胎样品制作：从被检测胚胎上切下 10% 活组织（10 个细胞以上），将切下的活组织连同切割液 6 μ L 放入灭菌的 0.5 mL 离心管中，再加入 6 μ L 抽提液室温下停留 5 min 以上。充分混合后离心。

（2）阴性对照样品制作：取 6 μ L 切割液（Holding Medium）放入灭菌的 0.5 mL 离心管中，再加入 6 μ L 抽提液充分混合后离心，做好标记。

（3）雄性反应用 Mastermix（即反应混合 I 液）：将反应 I 液从试剂盒中取出，化冻后离心。取出 20 μ L 加入到灭菌的 1.5 mL 离心管中，再加入 1 μ L 酶（Bst DNA Polymerase）充分混合后离心，做标记为 I。

（4）雌雄共通反应用 Mastermix（即反应混合 II 液）：将反应 II 液从试剂盒中取出，化冻后离心。取出 20 μ L 加入到另一个灭菌的 1.5 mL 离心管中，再加入 1 μ L 酶（Bst DNA Polymerase）充分混合后离心，做标记为 II。

（5）一份检品用 2 支反应离心管（雄性反应用和雌雄反应用）。将反应离心管从包装袋中取出（8 个联在一起），剪下 6 个放在离心管架上，在前 3 个（1、2、3）反应离心管中分别加入 20 μ L 反应混合 I 液、后 3 个（4、5、6）反应离心管中分别加入 20 μ L 反应混合 II 液。

（6）加入样品：将阴性对照样品、胚胎样品、阳性对照样品（Control DNA）各 5 μ L 分别加入到反应离心管 1、2、3 中；同样再取 5 μ L 分别加入到反应离心管 4、5、6 中。样品加入后，充分混合再离心，注意不要产生气泡。

（7）LAMP 扩增反应

打开终点浊度仪开关，预热，待温度显示 63℃ 时，将反应管放入仪器反应区中，盖紧机盖，按下 Start 开关既可开始反应。倒记时 40 min 后报警。反应结束。

（8）结果检测

反应结束后，将反应离心管从反应区中取出，放入到检测区中，按下 Start 键即可打印出试验结果，连接计算机进行结果分析。

（9）根据判定结果进行胚胎移植。

由上述介绍可见,牛胚胎性别鉴定技术已较成熟和完善,但要用于生产尚有一些相关技术需加以解决。如良种胚胎来源问题,目前多采用超数排卵技术获取胚胎,成本较高,每头牛年获胚胎数量较低。美国、德国等已开始采用活体采取卵母细胞的方法获取胚胎,可提高每头牛的年获胚胎数量,但需与体外受精和体外培养技术加入配套。另外,如何简化胚胎的冷冻保存技术和进一步提高细管冷冻解冻直接移植的妊娠率,也是使胚胎性别鉴定技术尽快在我国养牛业生产中推广应用的一项重要工作。随着以上各项配套技术的不断深入研究,动物的性别控制技术必将很快在生产中发挥作用。

1.6 细胞核移植和转基因技术在家畜繁育中的应用

1.6.1 动物核移植和转基因技术概述

哺乳动物细胞核移植(Nuclear transfer 或 Nuclear transplantation)是指通过显微操作的方法,将供体细胞的细胞核放入预先去核的成熟卵母细胞或早期合子内,形成一个新的核质重组体,移入的核在受体胞质的作用下,发生发育程序重编(Reprogramming),使得核质重组体与正常受精卵一样,经细胞分裂、分化并在母体内发育成一个新的个体。广义讲动物的克隆技术包括卵裂球分离、胚胎分割、孤雌生殖和细胞核移植。其中以胚胎细胞和体细胞作供体进行的核移植可以从一个胚胎和一小块组织得到理论上无限个后代,因此动物的克隆主要指细胞核移植技术。哺乳动物胚胎克隆技术的研究起始于上世纪80年代,1986年取得胚胎细胞核移植绵羊成功,西北农林科技大学张涌教授于90年代中率先在国际取得山羊胚胎克隆成功,胚胎克隆已完成了5代^[2],胚胎连续克隆的成功标志着胚胎克隆技术已趋成熟,并于2000年首先获得体细胞克隆山羊。

哺乳动物转基因技术是通过遗传工程的手段对动物基因组的结构或组成进行人为的改造,有目的地对生物的遗传物质基础进行修饰,并通过相应的动物育种技术使得这些经修饰改造后的基因在世代间得以传递和表达^[106]。随着现代研究手段的改善以及分子生物学技术的发展,拓宽了转基因动物研究领域,研究内容和研究方法不断丰富和改进,这项技术逐渐显示出其巨大的经济效益和社会效益。目前转基因技术已经在农业、医学和生物制药等领域得到广泛的应用,如功能基因组研究、定向育种、建立人类疾病的病理模型、转基因生物反应器等^[107]。

哺乳动物体细胞核移植的成功是二十世纪生物学领域的又一重大成绩,为生物学及相关学科的发展注入了新的活力,对畜牧业的生产和发展产生了深远的影响,为人类医学工程的研究开辟了新的研究方向,为濒危、珍稀动物的保护展示了新的可能性措施。体细胞核移植的成功为转基因动物的生产提供了新的方法。利用体细胞核移植,在核移植前先把外源目的基因导入培养的体细胞中,在体外培养条件下对整合外源基因的体细胞进行筛选和大量扩增,并对外源基因的体外表达进行分析,然后将整合外源基因而且高效表达的体细胞移植到去核卵母细胞内,出生的动物在理论上应该全部为阳性转基因动物,而且外源基因的表达稳定。利用体细胞核移植的方法已获得了转基因羊^[108, 109]、

牛^[110]、山羊^[111]和猪(PPL公司),这些研究表明对供体细胞进行基因改造后用于核移植可以提高转基因效率。另外,通过体细胞核移植可以克隆转基因动物,可以获得无限个转基因动物后代;即用已出生且高效表达外源基因的动物体细胞作供体进行核移植,可以获得具相同特性的后代,大大提高了生产转基因动物的效率、降低了成本。通过基因打靶技术,可以将外源基因定点整合到体细胞的基因组内,由这些细胞克隆就可以获得定点整合的动物^[112]。

转基因小鼠的制作技术之所以得以较广泛的应用,是基于完善的胚胎干细胞系统和胚胎重建技术,由于大多数动物尚未建立胚胎干细胞系统以及胚胎重建技术发展缓慢,大动物转基因研究发展受到了很大限制。早在1985年第一例转基因家畜就已诞生^[113],通过近几十年转基因技术的不断发展与完善,成功率逐步提高,并且和各种技术相结合,为揭示生命科学奥秘作出巨大贡献。

1.6.2 细胞核移植和转基因技术的应用

1.6.2.1 乳腺生物反应器的制作

乳腺生物反应器,即动物个体乳腺表达系统,又称作转基因动物制药(Transgenic Animal Pharming),其核心内容是通过各种转基因技术,将某种具有重要价值的生物活性蛋白的基因导入动物的受精卵中,在乳腺组织特异性启动子驱动下,使外源基因在动物的乳腺中高效表达并分泌到乳汁中,并从转基因动物的乳汁中获得生物活性蛋白^[114~116]。外源基因在转基因动物体内最理想的表达场所是乳腺,由于乳腺是一个外分泌器官,乳汁不进入体内循环,不必考虑外源蛋白高表达诱导的相关激素升表达,此法基本上不会影响转基因动物本身的生长和生理代谢^[117]。另外,从乳汁中获取的目的基因产物产量高,提纯相对简单(有时甚至不需要提纯),并且表达的蛋白已经经过了乳腺细胞的修饰加工,稳定性和生物活性均比较理想。利用乳腺生物反应器生产药用蛋白具有投资成本低,药物开发周期相对较短和经济效益高的优点。

1.6.2.2 在医学领域中的应用

特定基因功能的研究:采用转基因小鼠和基因剔除小鼠系统进行分析特定基因功能时,基本的要求是目的基因的高表达和关键基因插入突变的避免^[118]。在遗传连锁图谱分析中,应用转基因研究目的基因功能,目前确定与毛色相关的褪黑素受体^[119]和KIT基因^[120]的遗传定位。由于同源重组能实现基因的定点突变,从而改变单个碱基或几个碱基,导致核苷酸序列的改变,最终改变基因的功能。所以可以对一些涉及诸如发育、细胞周期、分子免疫等重要的基因功能进行深入研究^[121]。

制造人类疾病的转基因动物模型:完整的转基因动物模型可以模拟人类疾病的起始和发展,并为测试各种可能的治疗提供一个统一有效的方案。用小鼠ES细胞进行基因打靶,所建立的小鼠模型多与人类遗传性疾病有关^[122]。已产生的模型包括与癌基因和肿瘤抑制基因、免疫相关基因、生长因子与受体基因模型等^[123]。目前,已建立了30多

种人类遗传疾病的鼠模型,如老年性痴呆,糖尿病,镰刀型贫血症等^[124]。

组织器官移植:利用转基因动物作为组织器官的来源,不仅供量大,而且费用低廉,产业化前景甚为乐观。目前对器官供体动物研究较多的是猪^[125]。通过调节补体免疫系统的基因(如 DAF 基因)克隆后,转移到猪的基因,产生的转基因后代就会表达人类的该基因,这可以相对缓和异种动物器官移植过程中的趋急型排斥反应^[126]。通过得到 α -1,3 半乳糖苷转移酶(GGTA1)的基因敲除家猪可以有很好的效果^[127]。在利用异种器官移植时,是否存在传播潜在危险病毒的可能性,其安全性尚未肯定^[128]。随着这方面研究工作的深入,利用转基因动物作为组织器官移植供体的开发前景,会更加光明。

1.6.2.3 在畜牧业中的应用

1.6.2.3.1 促进动物生长,提高畜产品品质

牛、绵羊及人的 GH 基因先后被导入小鼠基因组,得到的转基因小鼠在快速生长期(5~11 周龄)的生长速度为对照组的 4 倍^[129]。Bernard 等^[130]用乳腺特异性表达启动子(α -乳清蛋白基因启动子)与大鼠乳糖酶(根皮苷水解酶)基因 cDNA 构建了表达载体并通过了显微注射制作了转基因小鼠。结果乳糖酶使小鼠乳汁中的乳糖含量减少了 50~85%,而脂肪和其他蛋白质的含量则没有变化,吃这种低乳糖奶的小鼠能正常发育。这种情况一旦出现在奶牛上,必然会减轻或消除人服用后出现的乳糖酶缺乏症。

Damak 等^[131]将小鼠超高硫角蛋白启动子与绵羊的 IGF-I cDNA 融合基因显微注入绵羊原核期胚胎,移植后生出 5 只羔羊,其中两只(一公一母)为转基因阳性。用转基因公羊与 43 只母羊交配,生出 85 只羔羊,其中 43 只(50.6%)为转基因阳性。羔羊在 14 月龄剪毛时,转基因羊净毛平均产量比其半同胞非转基因羊提高了 6.2%,公羔羊产毛量提高的幅度(9.2%)高于母羔羊(3.4%)。在毛纤维直径,髓质以及周岁体重方面无显著差别。此外, Powell 等^[132]将毛角蛋白 II 型中间细丝基因导入绵羊基因组,转基因羊毛光泽亮丽,羊毛中羊毛脂的含量得到明显的提高。

1.6.2.3.2 动物抗病育种

与提高家畜生产性能和改变畜产品品质一样,利用转基因技术提高动物的抗病性也具有十分乐观的应用前景。在对各种动物的抗病基因转移研究中,以对鸡的抗病效果较显著^[133]。Garba 等^[133]将 MX1 基因转移到鸡细胞中,使鸡获得对禽流感的抗性。Kmamura 等^[40]用马立克氏病病毒(MDV) mRNA 互补的一段寡核苷酸转移至鸡体内也使鸡获得阳性。对动物生殖细胞或早期胚胎细胞的基因修饰改造,可产生一些人类需要的动物新品种^[134],如进行生长速度、喂食效率(Feed efficiency)等特性的改造。Myostatin 基因敲除小鼠比野生型小鼠具有明显多的骨骼肌^[135],双肌牛也是由于 Myostatin 基因外显子 3 个碱基突变造成的。因而如果能在绵羊或猪上敲除 Myostatin 基因将可产生骨骼肌明显增大的品种,这具有很高的经济价值^[66]。又如成纤维生长因子 5(FGF5)是一种分泌型信号蛋白,该基因能控制毛发生长,是毛发生长的抑制因子。因为敲除了该基因后的纯合型

小鼠表现为非正常的长毛^[47]。Muller 等研究指出 Mx1 表达产物能提高转基因猪的抗病毒能力^[96]。如果能将绵羊中的 FGF5 基因敲除,可能会产生羊毛异常长的绵羊新品种。

1.6.2.4 存在的问题

无论是胚胎细胞核移植还是体细胞核移植都存在许多共同的缺陷,体细胞核移植突出表现在以下几个方面:一、核移植的总体效率低。Wilmut 等(1997)用绵羊乳腺上皮得到克隆羊“Dolly”的总效率仅为 0.2% ($63.8\% \times 89.2\% \times 11.7\% \times 3.4\%$);二、妊娠流产率高和受体产仔率低。Wells 等将 100 枚核移植胚胎移植到 50 头受体,在 60 d、100 d 和 180 d 时受体的妊娠率为 45%, 21%和 17%,而仅有 10 头受体维持到分娩,囊胚发育到出生个体的比例为 10% (Wells 等,1999);三、出生动物死亡率高。在已发表的文献中共出生体细胞核移植牛犊 207 头,发表论文时已明确标明死亡的有 54 头 (26.1%),而且这些死亡的个体大多是在出生后数小时到 1 周时间内死亡,死亡率显著高于正常胚胎移植或体外受精胚胎移植后出生的个体。

由于外源基因的导入,可能会引起宿主细胞染色体插入突变,突变发生率约为 7%^[136]。最终可能会影响动物的生长发育,从而也影响它作为食品时的安全性。另外,在制作转基因动物的过程中有时要用病毒做载体,这就可能导致一些新的病毒毒株的产生与传播。

科学家在寻求解决转基因动物存在问题的同时,也提出各种新的设想,如依靠克隆技术拯救濒危动物,全世界范围内转基因技术产业化等。但转基因动物尚处于实验研究阶段,离产业化还有一段路要走。相信未来转基因技术作为认识和改造生命的手段将为人类做出更大的贡献。

1.7 奶牛繁殖障碍管理体系研究进展

在过去的10年中,世界范围的奶牛业在遗传和管理方面的高速进步创造了一个新的纪元,奶牛数量减少的同时满足了人们对奶产品增加的需求。同时奶牛业在现代化发展过程中,也产生了许多难题和挑战,影响未来奶牛业效益的难题之一就是奶牛存在不同程度的繁殖障碍,即繁殖力和繁殖效率下降^[137,138]。

世界各国都发生奶牛繁殖效率的下降,但对现代奶牛群中可能存在的引起繁殖效率下降的因素尚未系统研究。目前,在国内奶牛饲养管理条件较差的地区,奶牛不孕症的发病率为30%,即使是饲养管理较好的大型国营奶牛场,其不孕症的发病率也达10%以上。因此,不孕症仍然是困扰我国奶牛业迅速发展和影响奶牛业经济效益的主要因素。目前,奶牛繁殖障碍最新的研究领域主要包括发情周期的控制,泌乳对生殖的代谢影响分析,与生殖有关疾病的机理研究和降低早期胚胎死亡率,从而为解决奶牛繁殖障碍中出现的难题。

1.7.1 引起奶牛繁殖障碍的因素与疾病

繁殖效率是奶牛场成功运作的一个关键部分,而繁殖效率低下是当今奶牛业面临的最严峻的问题,特别在哺乳奶牛中发生率很高。这些不同的繁殖障碍有一个共同的特点,就是均能降低奶牛的繁殖机能。另外,对于奶牛场运作过程中这些障碍带来的经济损失以及最有效的管理或对这些障碍的治疗干预,在奶业科技工作者和兽医之间存在着很大的争议。鉴于这一争议,奶牛场管理者应该关注于和任何一种繁殖障碍疾病有关因素的预防和控制,而不是关注于治疗干预。可能对奶牛繁殖效率具有严重影响的因素包括各种生理的、遗传的、环境的和管理的因素,最常见的繁殖疾病包括卵巢囊肿、黄体期延长和早期胚胎流失等,下面讨论对奶牛繁殖具有潜在影响的几种因素。

1.7.1.1 机能紊乱引起的奶牛繁殖障碍

奶牛生殖是一个复杂的过程,成功的牛群繁殖需要关注各个细节。繁殖生理学家的关注点是高产奶牛,但是产量中等的母牛同样具有生殖障碍,因此存在泌乳对奶牛繁殖的普遍影响。围产期健康、子宫和卵巢健康、发情鉴定、与发情有关的授精的时间、精液操作、AI 技术、以及妊娠诊断等,在这些程序中,很小的错误对牛群繁殖也会具有累积效应,产前、产后营养对繁殖效率具有大的影响^[139]。

1.7.1.2 泌乳和增高产奶量引起繁殖下降

在过去的10年中,美国奶牛的产奶量增加了大约20%,但繁殖效率指标下降更快,从这些资料可以得到增加每头牛的产奶量与恶化的繁殖机能直接的直接相关性^[140]。处女牛具有高的一次配种受孕率,假设分娩和随后的泌乳引起受孕率的轻微降低,但是分娩和泌乳对繁殖的负面影响不应该很高。泌乳肉牛可以发生不发情的现象,但一旦它们进入周期,其受孕率要比奶牛高出大约20%^[141]。有几项研究结果提出奶产量对繁殖的影响只能在最高产的奶牛观察到,也许反映了现在高产奶牛群体中繁殖机能下降的越来越大的百分比。基于提高奶产量,由增高的奶产量导致越来越差的繁殖这种趋势还要持续下去,而且从理论上说,在母牛获得更高产量的时候,将会更差。

最近的奶牛繁殖表现流行病学报告指出,对大多数美国 Holstein 奶牛奶产量水平的累积来说,最初 60 天奶产量的危害比率影响不显著,只有最高水平奶产量的表现危害比率增加。因此奶产量对繁殖力适度的影响是重要的,需要对奶产量和繁殖力的**对抗**关系的生理基础有更深刻的了解。一旦这种关系的生理基础搞清,可以通过采用饲养和管理策略来抵消过高奶产量对繁殖的影响。这可以部分地纠正现今奶牛繁殖力的下降。然而,在奶牛繁殖下降被扭转之前,需要致力于其它因素的解决。

1.7.1.3 能量负平衡引起的繁殖障碍

母牛在泌乳早期要经历一个正常的营养分配和脂肪组织动员过程。当维持和泌乳的营养需求超过母牛饲喂消耗能量的能力时,在泌乳早期发生能量负平衡、体重降低和BCS下降。Stahl 等^[142]的研究证实头胎泌乳母牛有更低的能量平衡,除了泌乳以外还需要用于生长的能量需求。头胎泌乳母牛太低的能量平衡与第一次排卵间隔的延迟有关

^[143]，这可以解释为什么有些研究将头胎定为第一次AI失败的危险因素^[144]。能量负平衡和体重降低对卵泡的生长和发育具有抑制作用。能量负平衡对卵泡的作用是通过LH和IGF-I起作用的，在能量负平衡母牛中LH脉冲降低。LH和IGF-I相互协同共同促进卵泡发育^[145]，而两种激素水平降低会对产后期早期的卵泡生长造成危害。Beam^[146]对能量负平衡对早期怀孕后期卵泡生长的作用进行了研究，优势卵泡需要更长的时间和更大的体积来确保启动排卵能力的雌二醇浓度，但能量负平衡母牛的卵泡会处于低雌激素水平，外周血雌激素代谢也会加强以使更高的雌激素合成水平为获得等量血液雌二醇浓度所必需。

1.7.2 产科疾病引起的奶牛繁殖障碍

流行病学研究显示，疾病因素（如酮血症，乳房炎，胎盘滞留，囊肿性卵巢）与非疾病因素（如奶产量和BCS）相比对牛群繁殖力具有更大的作用。虽然生殖激素类药物治疗不孕症效果很好，但它需要对各类不孕症的确诊正确无误，否则不但效果不佳，而且可能导致不良后果。

1.7.2.1 卵巢囊肿

卵巢囊肿是指未排卵、直径 ≥ 25 mm、充满液体且在卵巢内存在时间超过10 d以上^[147]的囊性结构。已报道，卵巢囊肿是奶牛场经营当中引起经济损失和繁殖机能障碍的主要原因^[148]，诊断为囊肿的奶牛常表现为产犊间隔延长^[149]。统计显示奶牛发生卵巢囊肿的比例从10%~13%不等^[149,150]，而有问题的牛群可在短时间内具有更高的发病率，可达30%~40%^[147]。

卵巢囊肿可分为卵泡囊肿和黄体囊肿。卵泡囊肿壁薄、充满液体、囊肿直径 ≥ 25 mm。多数母牛在一侧或两侧卵巢存在1个以上的囊肿性结构。早期的研究报道，患有卵泡囊肿的母牛大多表现出强烈而持久的发情表现，称为慕雄狂（nymphomania）^[151]，这是由于缺乏功能性CL，导致孕酮分泌降低，而从囊肿性卵泡分泌的雌二醇增多引起的。在个体奶牛中，由于包囊形成的不可预见性，研究卵泡囊肿的病因学还是很困难的^[148]，造成这种内分泌失衡的精确机制还知之甚少。黄体囊肿的壁稍厚、充满液体、囊肿直径 ≥ 25 mm，分泌正常至超过正常数量的孕酮。大多数黄体囊肿可能通过卵泡囊肿黄体化形成^[148]，若持续存在并维持全身孕酮浓度LH释放和排卵，就会引起不孕。黄体囊肿的厚壁是由黄体组织组成的，与卵泡囊肿相比，囊肿性黄体充满液体的腔体中常常含有相互交织的小梁，可以很容易的用超声波探测判定。黄体囊肿不应与腔中充满液体的正常CL相混淆。根据近来应用超声波探测，对泌乳奶牛的卵泡囊肿又趋向于一种新的分类。这些囊肿超声波检查与卵泡囊肿相似，但不会破坏卵泡波的正常进程及正常优势卵泡的排卵，一般不表现慕雄狂，不影响正常的生殖功能，我们将其定义为良性卵泡囊肿。良性卵泡囊肿的存在，使得泌乳奶牛卵泡囊肿的诊断和治疗变得复杂。

引起卵巢囊肿发生的因素包括产奶量的增加, 饲草中雌激素含量和子宫感染等方面。Garverick^[148]还提出, 饲草料中含有的具有雌激素样活性的化合物可能在囊性卵巢疾病中发挥作用。玉米赤霉烯酮(Zearalenone)对牛的作用不是那么敏感, 其含量也应该限制在总日粮DM的500 ppb以下^[152]。干乳期母牛体重过大、过胖时, 发生卵巢囊肿的可能性为正常母牛的2.5倍, 初产母牛乳汁中酮体的浓度增高, 卵巢囊肿的危害性也增加^[153]。Harrison等^[154]报告, 母牛在干乳期饲喂缺硒饲料发病率为50%, 而对照组饲喂添加硒、维生素E或硒/维生素E的母牛发病率分别为19%、44%和19%。

对卵巢囊肿理想的治疗方案有Ovsynch方案, 第二次注射GnRH时73%的母牛存在卵泡排卵, 而不是囊肿。约37%的这些囊肿牛在定时AI后怀孕。这些原始资料支持了Ovsynch可用于所有类型囊肿母牛的治疗, 而且在应用直肠触诊进行囊肿诊断时可选择Ovsynch用于治疗^[138,155]。

1.7.2.2 异常的黄体期延长

Opsomer等^[156]检查了中等产量的Friesian奶牛和高产Holstein奶牛的产后黄体功能, 他们发现高产奶牛乏情(第一次排卵延迟间隔)发生率高出3倍, 此外, Holstein母牛更容易发生延长的黄体期(高孕酮水平增长20 d; Friesian母牛和Holstein母牛分别为3%和20%)。美国Holstein母牛具有比新西兰Friesian母牛更长的黄体期, 而且密苏里大学的异性研究显示母牛的平均发情周期长度为24 d到28 d^[157]。

现代奶牛黄体期长度的变化能使繁殖管理变得复杂, 延长的黄体期推迟了母牛的配种, 而且造成对周期母牛何时返情预测的困难。Opsomer等^[156]完成的一项流行病学研究得出结论, 能量负平衡, 围产期障碍和产后疾病是推迟发情周期和延长黄体期的危险因素。在热应激母牛和青年母牛中的延长的黄体期^[158]。热应激使血浆雌二醇浓度降低而且使泌乳母牛黄体溶解的时间延长了9 d。延长的黄体期反映出卵巢机能低下、雌二醇分泌减少和通过卵泡雌二醇依赖机理的障碍。

1.7.2.3 第一次排卵间隔延长

现在认为对奶牛的第一次排卵间隔发生在产犊后14 d到21 d, 伴随有配种季节的开始牛群中有5%乏情^[159]。一般认为现在平均第一次排卵间隔大概延长了10 d, 而且在配种季节开始时乏情百分比有相当大的增加^[160]。在美国明尼苏达州的一项研究中发现, 母牛的第一次排卵间隔从1964年到上世纪末从29.3 d增加到43.5 d。近年确认了产后奶牛第一次排卵间隔明显延长这些趋向^[143,161]。虽然平均第一次排卵间隔增加, 但对第一次排卵间隔的划分认识不一, 在Vries and Veerkamp^[161]的研究中, 平均第一次排卵间隔是29.7d。因此现代奶牛第一次排卵间隔的增加可能是由特别长的第一次排卵间隔分组母牛引起。

第一次排卵间隔延迟的原因可以用现代奶牛增大的能量负平衡来部分地解释。泌乳母牛在产后初期一般处于能量负平衡, 因为它们不能够消耗日粮中充足的能量^[162]。能

量负平衡降低产后期的LH脉冲，因而推迟了卵巢活动的重建^[146,163]。有几位调查者证明能量负平衡引起第一次排卵间隔延迟和第一次发情间隔延迟这个事实。然而，在他们对275头第一次泌乳青年母牛的研究中，Vries and Veerkamp^[161]发现，通过泌乳早期总能量不足或平衡最低点解释第一次排卵间隔只有3~4%的变异。

1.7.3 导致奶牛繁殖障碍的其他因素及解决策略

1.7.3.1 管理水平

某些奶牛场中繁殖效率的下降也可以归咎于随着牛场的扩大，还用小牛群建立起来的管理方法进行。经典的文献定义了一个人们所知的“屡配不孕”的奶牛类型；母牛经过多次授精（通常4次或更多）而没有怀孕。在泥土地面上要比混凝土地面上的发情持续期更长，爬跨和竖立活动更多。Vailes and Britt^[164]认为现在奶牛出现发情表现降低的最可能的原因就是混凝土地面奶牛圈舍应用过多。所以要加强管理水平。另外繁殖管理的责任心也落到了工作人员身上，吸引和保持高素质员工，以使它们能全身心的投入到牛群的管理中。

1.7.3.2 全球环境变化

造成奶牛繁殖下降的另一个原因就是全球环境变化。1990s的10年是自有气温记录以来最热的年份^[165]。由于高的代谢率和泌乳有密切的关系，泌乳奶牛繁殖对热应激极度敏感^[166]。在夏季周围环境温度升高会通过引起热应激并随着发生热应激的地区范围扩大而使繁殖损失增加。Al-Katanani等^[167]检查了全年返情率并且发现在最高奶产量母牛中夏季不孕症最高。

1.7.3.3 发情鉴定和定时授精

在现代奶牛管理中要想准确地鉴定发情有必要采取时间更长，更频繁的观察期，因此如果采取仅仅每日两次少于30 min外部观察对母牛进行发情鉴定是困难的。此外对于发情的误判也是一个问题。Sturman等^[168]发现，有19%的授精是在母牛处于黄体期或怀孕早期进行的，对怀孕母牛的授精引17%起胚胎损失。

定时授精是有规律的注射PGF2 α 控制第一次授精时间的好方法，但是定时AI之后胚胎死亡率增高，而且奶牛一次定时AI之后的产犊率大约是35%。比自然发情后授精的百分比（大约45%）要少^[169]。因此，奶牛定时AI的方法仍然需要优化。澳大利亚建立起一种包括一个孕酮置入、苯甲酸雌二醇注射和PGF2 α 注射的方法用于在一个56天时间内三次授精的同期化。类似的方法在现代奶牛业中值得推广。

1.7.4 早期胚胎死亡

即使是在正常牛，在受孕和母体识别期间也有高的胚胎死亡率（大约在授精后17~19 d）^[170]。在这一时期之后的损失较少，但仍然影响受胎率。对奶牛胚胎死亡率估计大约有10%的胚胎在妊娠的28 d到75 d之间损失^[171]。在这一时期胚胎损失在屡配不孕母牛非

常高^[137,172]。更新的借助于超声妊娠探测器研究表明,在28 d和60 d之间胚胎损失率至少在20%^[173]。在大多数现代奶牛胚胎死亡的研究中涉及的是属于定时授精方案的母牛,自然发情授精的现代奶牛的胚胎死亡率应该较低。Smith和 Stevenson^[174]报道自然发情授精的母牛28 d后胚胎损失率为12.4%。

1.7.4.1 胚胎死亡时间的确定

对牛的早期胚胎死亡研究表明,AI后肉牛的受精率是90%,在第8 d胚胎存活率为93%,而在AI后第12 d胚胎存活率仅为56%^[175]。在奶牛,AI后第7 d,只有48%的胚胎被认为是正常的^[176]。因此,真正的妊娠损失可能发生在AI后2周之内。最近,有人利用超声波扫描来确定泌乳母牛从配种后28 d到产犊时不同时间的妊娠损失^[173]。AI后的28 d的受孕率为32%,从28 d到产犊所有的妊娠损失将近25%,最大的损失发生在怀孕期的最初60 d内。

孕体的附着在19日龄发生,在21日龄时可以看到模糊的子宫阜-子叶的附着点。在42日龄,胚胎期随着分化的完成而结束。在奶牛妊娠诊断中,最常用的方法是AI后40~60 d进行直肠触诊。泌乳母牛与青年母牛相比,妊娠损失要大10%^[177,178]。此外,在妊娠损失的危害性方面,整个怀孕期第一阶段的3个月要比第二和第三阶段的3个月高4倍以上^[178]。青年奶牛受精率范围在97~100%之间,而成年奶牛变化大些,其范围在85~100%。Sreenan等^[198]从早期文献中对胚胎损失分期评估进行了总结(即21年以前)。受精率据估测为90%,平均产犊率为大约55%。这表明胚胎和胎儿死亡率大约是39%。从受精到妊娠第8天有很少的胚胎损失。总损失的明显增加是发生在授精后的第8~16天之间(27~31%),总损失的3.8%是发生在第16~42天之间,此外还有1.9%到3.1%发生在第42天到分娩期之间。一个主要的问题是当时的胚胎和胎儿损失的模式是否在当今高产泌乳的Holstein牛群中发生了变化。

1.7.4.2 影响早期胚胎损失发生的因素

引起胚胎早期损失的相关因素可能和引起繁殖力低下的因素相似。营养对奶牛繁殖力的影响可能是最主要的,营养方面导致繁殖力低下的原因中,能量消耗占第一位,第二位的是蛋白饲料过多,第三位为微量元素和维生素缺乏。此外,从产犊到配种期间过高的体况评分也引起繁殖力下降^[179]。

泌乳奶牛发生早期胚胎损失的确切生理机制还不是很清楚,但可能和产奶量增高有关的泌乳应激^[180]、能量负平衡^[181]、尿素及氮的毒性作用^[182]或对增高的环境温度反应能力降低^[140,141]有关。体重降低比体重增加的肉用母牛的早期胚胎损失率更高^[183],表明能量负平衡在观察到的奶牛早期胚胎流失的高发病率中起一定的作用。饲喂高含量的可降解蛋白(DIP)会加剧能量负平衡和相应的生殖机能问题。Ferguson^[179]的研究认为,给母牛饲喂高含量DIP的日粮显示出更多的第1次和第2次配种之间的无规律性间隔,饲草料中DIP的含量应该控制在10%~12% (NRC, 1989; DM basis)之间。另外,在

育种群中出现高的流产或早期胚胎流损失率时,应该对饮水和草料中的硝酸盐含量进行评估^[184]。

从遭受热应激的奶牛采集的卵母细胞在体外的发育能力降低^[185]。Gwazdauskas等^[186]在整个泌乳期通过每两个星期抽吸采集卵母细胞,认为泌乳和日粮能量影响卵母细胞质量。体况 (body condition) 影响卵母细胞的发育潜力,因为由低体况母牛得到的卵母细胞与好体况母牛而来的卵母细胞进行体外受精相比,卵裂率和发育能力降低。

1.7.4.3 降低牛胚胎死亡的策略

1.7.4.3.1 孕酮补充

研究发现在授精后第5到12 d (n=28) 或第10到17 d将孕酮释放阴道内装置 (CIDR P₄-1.9g孕酮) 放置于泌乳奶牛的阴道中时,受胎率增加。处理母牛的受胎率增加到60%,而对照组 (n=30) 的受胎率为30%。很明显对照组受胎率低,表明孕酮补充对低繁殖力母牛有利。孕酮处理能够诱导发育更好的孕体。同时还发现在发情后1~2 d放置,7天后取出CIDR,与对照组相比,受胎率下降。可能是CIDR突然较大量的释放孕酮与注射孕酮稍和缓的释放相比较,发挥了不同的生理效应。例如配子和/或胚胎的运送可能被不同的改变。

1.7.4.3.2 延迟黄体溶解 (退化)

CL退化延迟能使发育减慢的孕体有额外的24~48 h延长生长期,主要是阻断引起溶黄体反应的前列腺素的短暂释放。基于热应激条件下人工授精早期胚胎死亡发生率高^[189, 193, 194],这在某些情形中确实有利^[188]。在第10 d或第15 d,一次注射hCG (10,000 IU) 能够使发情周期延长,但在第17 d注射却无此效果^[196],因为这正好是在妊娠识别之前的一个窗口^[197]。在一奶牛青年后备母牛群进行的繁殖力试验来确证授精后第15 d注射hCG是能响受胎率,hCG处理可以提高10.9%的繁殖力,在天气逐渐变凉的时期,当总繁殖力提高^[190]。泌乳奶牛在夏季热应激期,当胚胎死亡胚胎发育延缓率最高时,在发情后第15 d给予hCG会延缓CL退化从而增大受胎率。

1.7.4.3.3 定时排卵与定时授精

促性腺激素释放激素可以用于通过精确的定时排卵来提高人工授精后的受胎率^[191, 192, 195]。第一次注射GnRH (第0 d) 能引起一个 (优势) 卵泡在发育的适当时期排卵和/或引起卵泡黄体化。一周之后给予前列腺素 (第7 d) 能引起黄体组织退化,包括一个以前存在的CL,可能的形成的CL,允许一个新的卵泡波开始。在两天中 (第9 d) 这一新的卵泡波中的优势卵泡可以在第2次GnRH注射作用下发生排卵。15~16 h后 (第10 d) 人工授精,预计在LH峰 (被诱导的) 之后24 h卵子释放。这一系列的事件保证了一枚最理想的卵母细胞的释放。

在进行 AI 时,应对母牛使用发情鉴定辅助器,如 Kamar 装置,或发情鉴定尾根染料,这有助于对由于怀孕失败或早期胚胎损失而在 AI 后 18~28 d 恢复发情的母牛进行

鉴别。在 AI 后 28 d, 兽医师应用超声波可以鉴定出任何未孕母牛, 这些牛可以规划到下一批母牛应用 Ovsynch 进行再次同期化, 这可以消除依靠发情鉴定来进行下一次配种, 因而也就缩短了从妊娠诊断到再次配种的间隔时间。这是一个主动性的繁殖管理系统, 将会通过在牛群中最大可能的实施 AI 配种率而提高繁殖效率, 通过应用超声波进行早期妊娠诊断而完成的。尽管应用这一系统进行发情鉴定没有被完全排除, 但可以通过应用 Ovsynch 和定时 AI(timed AI)使之达到最小化。

1.7.4.3.4 繁殖管理

认识到早期胚胎流失的存在和普遍性, 在奶牛群中采用新繁殖技术提高 AI 效率可以降低这种机会的发生。应用超声波可以将在妊娠中由于直肠触诊时对生殖道和孕体触摸造成的胚胎损失降到最低^[187]。在牛群中应用超声波进行常规的早期妊娠检查时, 重点要放在鉴别未孕母牛而不是妊娠母牛; 在妊娠诊断后必须尽可能快地提出未孕母牛配种的管理策略, 包括对具有反应性黄体的母牛应用 PGF_{2α}, 应用发情检测辅助仪或者将二种方法相结合。

1.8 动物繁育技术的产业化战略分析

我国动物胚胎移植技术本身已经成熟, 但是推广还受到一定限制, 一是成本太高, 二是专业技术人员不足。因此大量培训胚胎移植专业技术人员和试剂材料的国产化是此后一个时期动物胚胎移植发展需要解决的主要问题。目前看来, 这一问题可通过市场机制逐步得到解决。

国家支持的重点应放在奶牛胚胎体外生产技术体系的研发和产业化推进上。由于我国人民生活水平的提高和消费结构的改变, 市场对奶制品的需求日益增高, 而我国奶牛的年头均单产量与发达国家有明显差距, 良种奶牛的快速繁育是我国畜牧业目前急需解决的问题。因此, 胚胎体外生产技术体系的产业化开发对我国奶牛业的发展具有更加重要的意义。在发展战略上, 可将胚胎的体外生产技术体系主要用于加速改良“生产群”奶牛, 快速提高奶牛单产, 使中国母牛在数量上和质量上迅速赶上发达国家水平。在“育种群”, 由于数量要求不象生产群那么大, 可考虑以体内生产胚胎为主, 利用国内外优秀顶尖公牛的精液与优秀顶尖母牛配种, 体内生产胚胎再移植, 构建我国自己以顶尖母牛为主的育种群^[32]。

国家应设立专题进行奶牛胚胎体外生产技术体系的研究, 选择研究技术基础好的单位(公司)建立奶牛胚胎体外生产产业化基地。重点在活体采卵、卵母细胞的质量控制、提高胚胎的体外培养效率、降低性别鉴定对胚胎的损伤等方面攻关研究。通过这些研究, 将全面提高奶牛胚胎体外生产技术体系的生产效率和生产应用水平, 预计在 2010 年前, 达到良种奶牛体外生产胚胎囊胚发育率 50%以上、移植成功率 40%左右的水平, 实现该项科技成果的产业化。

在克隆技术的产业化方面, 目前的主要技术瓶颈是克隆胚基因再程序化的不完全。

国外已在这方面进行了较深入的研究,但还未取得关键性突破。国内尚无公开报道。基础理论研究不够是我国同国外领先水平的主要差距之一,创新不足,缺乏新概念、新思路、新技术路线。在发展战略上,国家应继续鼓励对动物克隆技术的各个具体环节进行研究完善,这些研究应结合生产转基因动物进行,如高附加值生物药物或生物产品的动物生物反应器(牛羊)生产,器官移植动物(猪)生产,病理模型动物(大鼠)生产。

国家对转基因动物的产业化推进研究可分阶段进行。针对目前和未来几年动物克隆技术能达到的成功率,国家投资策略应放在优先研究制造能够生产高附加值和战略价值的生物新材料(如“生物钢”)以及影响畜牧业发展的主要动物传染性疾病的病原抗体的动物生物反应器,使该技术在向产业化完善的过程中即产生经济效益。此外,引起人类免疫排斥反应抗原基因敲除的猪是用于人类器官移植的理想器官供体,我国又是一个人口大国,器官移植的需求量很大,但我国尚未见到有关报道,应予启动。

参考文献:

- [1] Weikard R, Kuhn C, Brunner RM, et al. Sex determination in cattle based on simultaneous amplification of a new male-specific DNA sequence and an autosomal locus using the same primers. *Mol Reprod Dev.* 2001 Sep; 60 (1): 13 ~ 9.
- [2] Yong Z and Yuqiang L. Nuclear-cytoplasmic interaction and development of goat embryos reconstructed by nuclear transplantation production of goats by serially cloning embryos. *Biol. Reprod.* 1998,58:266 ~ 269.
- [3] Thibier M. 1995 Statistics on the World Embryo Transfer Industry. *Embryo Transfer Newsletter*, 1996, 14 (4): 27 ~ 33.
- [4] Thibier M. The 1996 Embryo Transfer Statistics Around the World. *Embryo Transfer Newsletter.* 1997.16 (4): 26 ~ 33
- [5] Thibier M. The 1998 Statistical for the world embryo transfer industry. *Embryo Transfer Newsletter.* 1999.17 (4): 25 ~ 31
- [6] Thibier M. The Animal Embryo Transfer Industry in Figures. *Embryo Transfer Newsletter.* 2001.19 (4): 14 ~ 22
- [7] Thibier M. The PETS Statistics of in livestock in the world for the year 1999. *Embryo Transfer Newslenec* 2000.18 (4): 24 ~ 28
- [8] Thibier M. World Statistics of Embryo Transfers, the 1997 Report. *Embryo Transfer Newsletter.* 1997. 15 (4): 26 ~ 34
- [9] Mapletoft R B Summary of Embryo Transfer Activity in Canada for the Year 2000. *Report of Embryo Transfer in Canada.* 2001
- [10] 王建辰.从家畜胚胎移植展望畜牧业的发展前景. *陕西省科技情报研究所科技水平动向参考资料.* 1980.21 (2): 49 ~ 60
- [11] 郭志勤.中国牛胚胎移植技术产业化前景, *草食家畜(增刊).* 2001.8:10 ~ 14
- [12] Diskin M G, Austin E J, Roche J F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*, 2002, 23, 211 ~ 228
- [13] Thatcher W W, Moreira F, Santos J E P. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology*, 2001, 55:75 ~ 89.

- [14] Martinez M F, Adams G P, Mapletoft R J. Effect of LH or GnRH on dominant follicle of the first follicular wave in beef heifers. *Animal Reproductive Science*, 1999, 57: 23 ~ 33.
- [15] Stevenson J S, Kobayashi Y, Thompson K E. Reproductive performance of dairy cows in various programmed breeding systems including Ovsynch and combinations of GnRH and PGF. *J Dairy Science*, 1999, 82, 506 ~ 515.
- [16] Pursley J R, Mee M O, Wiltbank M C. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF and GnRH. *Theriogenology*, 1995, 44, 915 ~ 923.
- [17] Macmillan K L, Thatcher W W. Effects of an agonist of GnRH on ovarian follicles in cattle. *Biol Reprod*, 1991, 45, 883 ~ 889.
- [18] Moreira F, Diaz T, Thatcher W W. Effect of day of the estrous cycle at the initiation of a timed artificial insemination protocol on reproductive responses of dairy heifers. *J Animal Science*, 2000, 78, 1568 ~ 1576.
- [19] 朱玉林. 改善奶牛超数排卵效果的方法. *中国奶牛*, 1994, (4): 31 ~ 33.
- [20] Mapletoft R J, Pierson R A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. *Embryo Transfer Newsletter*, 1993, 11: 14 ~ 24.
- [21] 陈静波, 罗应荣, 宣柏华等. 供体母牛超数排卵在荷斯坦奶牛育种的应用效果及影响因素分析. *全国首届动物胚胎生物技术学术研讨会论文集*, 乌鲁木齐. 2001, 93 ~ 101.
- [22] Moreira F, Bandinga L, Burnley C. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactation recipient cows. *Theriogenology*, 2002, 57: 1371 ~ 1387.
- [23] 杨伟峰, 高志敏, 龚忠英. 母牛超数排卵的研究进展. *西北农林科技大学学报*, 2003, 31(2): 166 ~ 169.
- [24] Cushman R A, Desouza I C. Effect of long-term treatment with recombinant bovine somatotropin and estradiol on hormone concentrations and ovulatory response of superovulated cattle. *Theriogenology*, 2001, 55: 1533 ~ 1547.
- [25] Bevers M M, Dieleman S I. Superovulation of cows with PMSG: Variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim Reprod Sci*, 1987, 15: 37 ~ 52.
- [26] Hggtel P, Callesen H, Greve J. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle. *Theriogenology*, 1991, 35: 91 ~ 108.
- [27] Occhio M, Sudha G, Jillella D. Use of a GnRH agonist to prevent the endogenous LH surge and injection of exogenous LH to induce ovulation in heifers superstimulated with FSH: a new model for superovulation. *Theriogenology*, 1997, 47: 601 ~ 613.
- [28] Vande E E, Vos PLAM, Hggtel P. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/prostaglandin treated heifers. *Theriogenology*, 2001, 55: 573 ~ 592.
- [29] 朱玉林. 改善奶牛超数排卵效果的方法. *中国奶牛*, 1994, (4): 31 ~ 33.
- [30] 曹步凯, 黄永宏, 汪河海. 抑制素免疫与超数排卵. *中国畜牧杂志* 2000, 36 (4): 54 ~ 55.
- [31] Smith A K. Pregnancy rates for Grade 2 embryos following administration of synthetic GnRH at the time of transfer in embryo-recipient cattle. *Theriogenology*, 2002, 57(8): 2083 ~ 2091.
- [32] Kohram H, Bousquet D, Durocher J. Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. *Theriogenology*, 1995, 43 (1): 252.
- [33] 钱宏光. 国内外肉羊发展趋势及国内肉羊业存在的问题. *中国饲料工业信息网*. 2002

- [34] Driancourt M A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. *Theriogenology*, 2001,55(6): 1211 ~ 1239.
- [35] Ali A, Lange A, Gilles M. Morphological and functional characteristics of the dominant follicle and corpus luteum in cattle and their influence on ovarian function. *Theriogenology*, 2001, 56: 569 ~ 576.
- [36] Gong J G. Influence of metabolic hormones and nutrition on ovarian follicle development in cattle: practical implications. *Domest Anim Endocrinol* 2002 Jul, 23 (1 ~ 2) : 229 ~ 241.
- [37] Moreira F, Bandinga L, Burnley C. et al. Bovine somatotropin increases embryonic development in superovulated cows and improves post-transfer pregnancy rates when given to lactation recipient cows. *Theriogenology*, 2002, 57: 1371 ~ 1387.
- [38] 吴铁荣. 供体母牛卵巢上黄体状态与超数排卵效果的关系黑龙江动物繁殖. 1996, 15 ~ 16.
- [39] Bo G A, Baruselli P S, Moreno D. The control of follicular wave development for self- appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*, 2001, 57: 53 ~ 72.
- [40] Baracaldo M I, Martinez M F, Adams G P. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. *Theriogenology*, 2000 ; 53: 1239 ~ 1250.
- [41] Katz, Ricciarelli E, Adashi E Y The potential relevance of growth hormone to female reproductive physiology and pathophysiology. *Fertil Steril*, 1993, 59: 8 ~ 34.
- [42] 山田恭嗣. OVSYNCHによる牛の定时人工授精法の实用上の問題点とその対策. 臨床獣医, 1998, 16(8): 7~11
- [43] Adams G P, Evans A C O, Rawling N C. Follicular waves and circulating gonadotrophins in 8-month-old prepubertal heifers. *J. Reprod. Fertil*, 1994, 100 (1) : 27 ~ 33.
- [44] Twagiramungu H L, Guibault L A, Dufour J . Synchronization of ovarian follicular waves with a Gonadotropin-Releasing Hormone agonist to increase the precision of estrus in cattle: A Review [I]. *J. Anim. Sci.*, 1995, 73: 3141 ~ 3151.
- [45] Guibault L A, Lusier L G, Grasso F et al. Influence of a GnRH analogue on follicular dynamics in cows pretreated or not with FSH-P [J]. *Theriogenology*, 1990, 33 (1) : 240.
- [46] Silcox RW, Powel KL, Kiser TE. Ability of dominant follicles (DF) to respond to exogenous GnRH administration is dependent on their stage of development. *J Anim Sci*, 1993, 71 (1) (Suppl 1) : 219 (A)
- [47] Pursely J R, Kosorok M R, Wiltbank M C. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation [J]. *Dairy Sci*, 1997, 80: 303 ~ 306
- [48] 中尾敏彦, CIDR の髮情誘起への応用. 臨床獣医, 1997, 15 (6) : 13 ~ 18
- [49] 佐藤太郎, 中川浩, 佐藤義政. 卵胞嚢腫採卵牛に膣内挿入型プロゲステロン製剤 (CIDR) を用いて採卵に供試した症例. 新潟県農業総合研究所畜産研究センター研究報告 (Bulletin of the Niigata Animal Husbandry Experiment Station) 掲載論文 第 13 号 June 2001
- [50] 笠正二郎, 森美幸, 上田修二. CIDR と PGF 2α の併用による髮情誘起及び受精卵の受胎率向上. <http://www.pref.fukuoka.jp/nosei/organ/tarc/seika/seika09/10seino04.htm>
- [51] Mapletoft R B Summary of Embryo Transfer Activity in Canada for the Year 2000. Report of Embryo Transfer in Canada. 2001.
- [52] Ausin CR. The capacitation of mammalian sperm. *Nature*, 1952, 170: 326.
- [53] DAUZIER L, THIBAUT C. New data on the in vitro fertilization of rabbit and ewe ova. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1959 May 4, 248 (18) : 2655 ~ 2656.
- [54] 刘灵, 钱菊汾. 家畜体外受精的研究进展. 西北农业学报. 1993 (4) : 38 ~ 41
- [55] Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA. Normal development

- following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 1982 Aug ; 27 (1) :147 ~ 158.
- [56] Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the implantation of a human embryo. *Lancet* ,1978,2:366
- [57] Could KG. Ovum recovery and in vitro fertilization in the chimpanzee. *Fertil Steril*,1983,40(3) :378 ~ 383.
- [58] 陈大元,石其贤,宋祥芬等.大熊猫与金黄地鼠体外异种受精的研究. *动物学报* 1989,35:376 ~ 380.
- [59] Miller DJ, Ax RL. Carbohydrates and fertilization in animals. *Mol Reprod Dev* ,1990,26:184 ~ 198.
- [60] Brackett RG, Bousquet D, Rioce ML et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod*,1982,27:147 ~ 158.
- [61] Hanada A. In vitro fertilization in cattle, with particular reference to sperm capacitation by ionophore A23187. *Jpn J Anim Prod*,1985,31:56 ~ 61.
- [62] Wakayama T, Hayashi Y, Ogura A. Participation of the female pronucleus derived from the second polar body in full embryonic development of mice. *J Reprod Fertil.* 1997 Jul ; 110 (2) :263 ~ 6.
- [63] 郭志勤主编.家畜胚胎工程.中国科学技术出版社.北京,1998.
- [64] 张红卫主编.发育生物学.高等教育出版社.北京,2001.
- [65] 陈大元主编.受精生物学.科学出版社.北京,2000.
- [66] 冯伯森,王秋雨,胡玉兴编著.动物细胞工程原理与实践.科学出版社,2000
- [67] Parrish DA, Mitchell BC, Henson PM, Larsen GL. Pulmonary response of fifth component of complement-sufficient and deficient mice to hyperoxia. *J Clin Invest.* 1984 Sep,74 (3) :956 ~ 65.
- [68] Byrd W. In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. *J Exp Zool.* 1981 Jan,215 (1) :35 ~ 46.
- [69] Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. Oxon: CAB International , 1994.
- [70] Holm P, Booth PJ, Schmidt MH, et al. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*,1999,52 (4) :683 ~ 700.
- [71] 秦鹏春.猪卵巢卵母细胞体外成熟与体外受精的研究. *中国农业科学* , 1995 , 28 (3) :58 ~ 66.
- [72] Moore RW, Brinster RL. Activity of mitochondrial enzymes in mouse embryos. *J Reprod Fertil.* 1973 Oct,35 (1) :37 ~ 43.
- [73] Fukui Y, McGowan LT, James RW, et al. Factors affecting the in-vitro development to blastocysts of bovine oocytes matured and fertilized in vitro. *J Reprod Fertil.* 1991 May,92 (1) :125 ~ 31.
- [74] Whitten WK. Culture of tubal mouse ova. *Nature.* 1956 Jan 14,177 (4498) :96.
- [75] Sirard MA, Lambert RD. Birth of calves after in vitro fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. *Vet Rec.* 1986 Aug 23,119 (8) :167 ~ 9.
- [76] Reichenbach HD, Modl J, Brem G. Piglets born after transcervical transfer of embryos into recipient gilts. *Vet Rec.* 1993 Jul 10,133 (2) :36 ~ 9.
- [77] Stubbings RB, Walton JS, Armstrong DT, Basur PK. Recovery of bovine oocytes from small vesicular follicles for in vitro maturation and fertilization. *Vet Res Commun.* 1994,14 (1) : 71 ~ 81.
- [78] Pinkel D, Garner DL, Gledhill BL, et al. Flow cytometric determination of the proportions of X- and Y-chromosome-bearing sperm in samples of purportedly separated bull sperm. *J Anim Sci.* 1985 May,60 (5) :1303 ~ 7.
- [79] Johnson L A. Flow cytometric determination of sperm sex ratio in semen purportedly enriched for X or Y bearing sperm[J]. *Theriogenology*,1988,29:2655.
- [80] Caspersson T, Farber S, Foley GE, et al. Chemical differentiation along metaphase chromosomes. *Exp Cell Res.* 1968 Jan,49 (1) :219 ~ 22.

- [81] Barlow, P and Vosa, C. G. The Y-chromosome in human spermatozoa. *Nature*, 1970, 226:261 ~ 262
- [82] Eichvald, E. F. and silmser, C. R. , Untitled Communication, *Transplant, Bull*, 1955, 2:148 ~ 149
- [83] Jones 等.用免疫磁力法分离 X 精子与 Y 精子. *国外畜牧科技*, 1993, 20 (2) :10 ~ 11
- [84] Schilling E. Experiments in sedimentation and centrifugation of bull spermatozoa and the sex ratio of born calves. *J Reprod Fertil*. 1966 Jun, 11(3): 469 ~ 72.
- [85] Knaak J. Arbitrary influence on sex by sedimented bull sperm. Results of a large-scale test. *Fortpflanz Besamung Aufzucht Haustiere*. 1968, 4 (4 ~ 5) :279 ~ 82.
- [86] Krzanowski M. Dependence of primary and secondary sex ratio on the rapidity of sedimentation of bull semen. *J Reprod Fertil*. 1970 Oct, 23 (1) :11 ~ 20.
- [87] Hafs HD, Boyd LJ. Sex ratios of calves from inseminations after electrophoresis of sperm. *J Anim Sci*. 1974 Mar, 38 (3) :603 ~ 4.
- [88] Bhattacharya BC, Shome P, Gunther AH, et al. Successful separation of X and Y and spermatozoa in human and bull semen. *Int J Fertil*. 1977, 22 (1) :30 ~ 5.
- [89] 楔田博司.家畜性别控制研究的现状. *新疆人民出版社:家畜生物技术*. 张继慈等译. 1989 年第 1 版.
- [90] Bradley MP. Immunological sexing of mammalian semen: current status and future options. *J Dairy Sci*. 1989 Dec, 72 (12) :3372 ~ 80.
- [91] 罗承浩等.应用生殖免疫学技术控制乳牛性别的研究. *黑龙江动物繁殖*, 1993, (3) :19 ~ 21
- [92] Toder R, Rumpler Y, von Holst D, et al. An X-Y homologous pairing segment in tree shrews (*Tupaia*). *Cytogenet Cell Genet*. 1993, 63 (2) :135 ~ 40.
- [93] Goldberg EH, Boyse EA, Bennett D, Scheid M, Carswell EA. Serological demonstration of H-Y (male) antigen on mouse sperm. *Nature*. 1971 Aug 13, 232 (5311) :478 ~ 80.
- [94] Lappe M, Schalk J. Necessity of the spleen for balanced secondary sex ratios following maternal immunization with male antigen. *Transplantation*. 1971 May, 11 (5) :491 ~ 5.
- [95] Ohno S. The role of H-Y antigen in primary sex determination. *JAMA*. 1978 Jan 16, 239 (3) :217 ~ 20.
- [96] Cran DG, Johnson LA, Miller NG, et al. Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation. *Vet Rec*. 1993 Jan 9, 132 (2) :40 ~ 1.
- [97] Johnson LA, Flook JP, Hawk HW. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting. *Biol Reprod*. 1989 Aug, 41 (2) :199 ~ 203.
- [98] Johnson L A. Gender preselection in domestic animals using flow cytometrically sorted sperm[J]. *J Anim Sci*, 1992, 70 (suppl 1) : 8 ~ 18.
- [99] Palmer MS. Sex determining genes. *Sci Prog*. 1989, 73 (290 Pt 2) :245 ~ 61.
- [100] Sinclair AJ, Lonigro R, Civitareale D, et al. The tissue-specific expression of the thyroglobulin gene requires interaction between thyroid-specific and ubiquitous factors. *Eur J Biochem*. 1990 Oct 24, 193 (2) :311 ~ 8.
- [101] Koopman P, Gubbay J, Vivian N, et al. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991 May 9, 351 (6322) :117 ~ 21.
- [102] White KL, Anderson GB, Pashen RL, et al. Detection of histocompatibility-Y antigen: identification of sex of pre-implantation ovine embryos. *J Reprod Immunol*. 1987 Jan, 10 (1) :27 ~ 32.
- [103] Utsumi K, Hochi S, Iritani A. Cryoprotective effect of polyols on rat embryos during two-step freezing. *Cryobiology*. 1992 Jun, 29 (3) :332 ~ 41.
- [104] Herr C M , M atthaei K I, Petrzak U, et al. A rapid Y-chromosome-detecting bovine embryo sexing assay[J]. *Theriogenology*, 1990, 33 (1) :245 ~ 247
- [105] 曾溢滔, 张美兰, 胡明信, 等应用 PCR 扩增牛 SRY 序列进行奶牛胚胎性别鉴定[J] *中国科学(B*

- 辑), 1993, 14 (3) : 371 ~ 376
- [106] 李育阳. 基因表达技术. 北京, 科学出版社, 2001.
- [107] 程炜中 刘应伯. 转基因动物的遗传修饰与应用 (下). 遗传, 1995, 17 (3) : 46 ~ 48.
- [108] Schnieke AE, Kind AJ, Ritchie WA, et al. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. 1997, 19, 278 (5346) : 2130 ~ 3.
- [109] McGrath MJ, Campbell KM, Parks CR, et al. Glutamatergic drugs exacerbate symptomatic behavior in a transgenic model of comorbid Tourette's syndrome and obsessive-compulsive disorder. *Brain Res*. 2000 Sep 15, 877 (1) : 23 ~ 30.
- [110] Cibelli JB, Stice SL, Golueke PJ, et al. Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells. *Nat Biotechnol*. 1998 Jul, 16 (7) : 642 ~ 6.
- [111] Behboodi E, Groen W, Destrepes MM, et al. Transgenic production from in vivo-derived embryos: effect on calf birth weight and sex ratio. *Mol Reprod Dev*. 2001 Sep, 60 (1) : 27 ~ 37.
- [112] Polejaeva IA, Campbell KH. New advances in somatic cell nuclear transfer: application in transgenesis. *Theriogenology*. 2000 Jan 1, 53 (1) : 117 ~ 26.
- [113] Hammer RE, Pursel V.G, WauR.J, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pig by microinjection. *Nature*, 1985, 315: 680 ~ 683.
- [114] Houdebine LM. Transgenic animal bioreactors. *Transgenic Res*. 2000, 9(4 ~ 5): 305 ~ 20.
- [115] Revel M. Ongoing research on mammalian cloning and embryo stem cell technologies: bioethics of their potential medical applications. *Isr Med Assoc J*. 2000 Jul ; 2 Suppl: 8 ~ 14.
- [116] Ziomek CA. Commercialization of proteins produced in the mammary gland., *Theriogenology*, 1998, 1, 49 (1) : 139 ~ 144.
- [117] Wilmut I, Whitelaw CBA. Strategies for production of pharmaceutical proteins in milk. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6: 625 ~ 630.
- [118] Kappes SM. Utilization of gene mapping information in livestock animal. *Therio*, 1999, 51: 135 ~ 147.
- [119] Klungland H, Vage DI, Gomex-Raya L, et al. The role of melanocyte -stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. *Mamm Genome*, 1993, 6: 631 ~ 639.
- [120] Johansson M, Chaudhary R, Hellmen E, et al. Pigs with the dominant white coat color phenotype carry a duplication of the KIT gene encoding the mast/stem cell growth factor receptor. *Mamm Genome*, 1996, 7: 822 ~ 830.
- [121] Potcnlk AJ, Nielson PJ, Eichmann K. In vitro generation of lymphoid precursors from embryonic stem cells. *EMBO J*, 1994, 13 (22) : 5274 ~ 5283.
- [122] Clarke AR, McWhir J. Transgenic models of disease. *Progress in pathology* (2th, Kirkham N eds) 1995, Churchill .
- [123] Joyner A. Gene targeting. A practical approach. Oxford University Press, NY.
- [124] Retter RL. Transgenic livestock as genetic of human disease. *Reprod Fertil Dev*, 1994, 6: 643 ~ 645.
- [125] Robertson JA. Embryos, families and procreative liberty: the legal structure of the new reproduction. *South Calif Law Rev*. 1986, 59 (5) : 939 ~ 1041.
- [126] Langford GA, Yannoutsos N, Cozzi N, et al. Production of pig transgenic for human decay audevating factor. *Transplant Proc*, 1994, 26: 1400 ~ 1401.
- [127] 王继英, 杜立新. 转基因动物制作及提高外源基因表达的策略. *中国畜牧兽医 (试刊)*, 2002, 29(2): 3 ~ 7.
- [128] Patience C, Takeuchi Y, Weiss RA. Infection of human cells by an endogenous retrovirus of pigs. *Nat*

- Med,1997,3:282 ~ 286.
- [129] Clark AJ, Simons JP, Wilmut I. GermLine manipulation application in agriculture and biotechnology. Transgenic mice (Grosveld F eds) ,Academic London, 1993, 247 ~ 270.
- [130] Bernard JF , Peschanski M , Besson JM. Afferents and efferents of the rat cuneiformis nucleus:an anatomical study with reference to pain transmission. Brain Res.1989,490 (1) :181 ~ 185.
- [131] Damak S , Su H , Jay NP , Bullock DW. Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. Biotechnology (N Y) .1996 ,14 (2) :185 ~ 188.
- [132] Powell BC, Walker SK, Bawden CS, et al. Transgenic sheep and wool growth: possibilities and current status. Reprod Fertil Dev,1994,6,615 ~ 623.
- [133] Garba SA , Terry RJ , Adegboye DS et al. The choice of adjuvants in Mycoplasma vaccines. Microbios. 1989,57 (230) :15 ~ 19.
- [134] Eyestone WH. Production and breeding of transgenic cattle using in vitro embryo production technology. Therio,1999,5 (2) :509 ~ 517.
- [135] McPherron AC , Lawler AM , Lee SJ , Regulation of skeletal muscle mass by a new TGF-B superfamily member. Nature , 1997 , 387:83 ~ 90.
- [136] 朱广香,马恒东. 基因技术及其应用.四川畜牧兽医, 2003,30 (2) :4345.
- [137] Casida LE, Chapman AB, 1951. Factors affecting the incidence of cystic ovaries in a herd of Holstein cows. *J Dairy Sci* 34:1200 ~ 1205.
- [138] Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC, 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci* 80:301 ~ 306.
- [139] Butler WR. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *J Dairy Sci* , 1998,81:2533 ~ 2539.
- [140] Hansen PJ, Thatcher WW, Ealy AD. Methods for reducing effects of heat stress on pregnancy. In: VanHorn HH, Wilcox CJ (eds), Large Dairy Herd Management. American Dairy Science Association, Champaign, IL, 1992:116 ~ 125.
- [141] Stevenson JS, Schmidt MK, Call EP.Stage of estrous cycle, time if insemination, and seasonal effects on estrus and fertility of Holstein heifers after prostaglandin F_{2α}. *J Dairy Sci*, 1984, 67:1798 ~ 1805.
- [142] Stahl TJ, Conlin BJ, Seykora AJ, Steuernagel GR. Characteristics of Minnesota dairy farms that significantly increased milk production from 1989 ~ 1993.*J Dairy Sci*. 1999 Jan;82(1):45 ~ 51.
- [143] Lucy MC, Savio JD, Badinga L et al., Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle.*J Anim Sci*. 1992 Nov;70(11):3615 ~ 26.
- [144] Loeffler SH, de Vries MJ, Schukken YH et al., Use of AI technician scores for body condition, uterine tone and uterine discharge in a model with disease and milk production parameters to predict pregnancy risk at first AI in Holstein dairy cows.*Theriogenology*. 1999,May;51(7):1267 ~ 84.
- [145] Lucy MC. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle.*J Dairy Sci*. 2000 Jul;83(7):1635 ~ 47.
- [146] Beam SW, Butler WR. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows.*J Reprod Fertil Suppl*. 1999;54:411 ~ 24.
- [147] Archibald LF, Thatcher WW. Ovarian follicular dynamics and management of ovarian cysts. In: Large Dairy Herd Management. Van Horn HH, Wilcox CJ, eds. Am Dairy Sci Assoc, Champaign, IL. 1992.
- [148] Garverick HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* , 1997,80:995 ~ 1004.

- [149] Bartlett PC, Ngategize PK, Kaneene JB et al. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology, and economic impact. *Prev Vet Med*, 1986,4:15.
- [150] Erb RE, White ME. Incidence rates of cystic follicles in Holstein cows according to 15-day and 30-day intervals. *Cornell Vet*, 1981,71:326.
- [151] Kessler DJ, Garverick HA. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Anim Sci*, 1982,55:1147.
- [152] Whitlow LW, Hagler WM. Effects of mycotoxins on dairy cattle. In: *Molds, Mycotoxins and Their Effects on Agricultural Animals*. University of Wisconsin-Extension., 1993.
- [153] Andersson L, Gustafsson AH, Emanuelson U. Effect of hyperketonaemia and feeding on fertility in dairy cows. *Theriogenology*, 1991,36:521 ~ 536.
- [154] Harrison JH, Conrad HR. Effect of dietary calcium on selenium absorption by the nonlactating dairy cow. *J Dairy Sci*. 1984 Aug,67(8):1860 ~ 4.
- [155] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH. *Theriogenolog*, 1995,44:915 ~ 923.
- [156] Opsomer G, Laurier L, de Kruif A et al., Left displaced abomasum: considerations of treatment method and a case report of mesenteric torsion after rolling. *Vet Q*. 1998 Jan,20(1):22 ~ 4.
- [157] Kirby CJ, Wilson SJ, Lucy MC. Response of dairy cows treated with bovine somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F2 alpha. *J Dairy Sci*. 1997 Feb,80(2):286 ~ 94.
- [158] Wilson SJ, Kirby CJ, Koenigsfeld AT et al., Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. 2. Heifers. *J Dairy Sci*. 1998 Aug,81(8):2132 ~ 8.
- [159] Marion GB, Gier HT, Choudary JB. Micromorphology of the bovine ovarian follicular system. *J Anim Sci*. 1968 Mar,27(2):451 ~ 65.
- [160] Stevenson MA. Disease incidence in dairy herds in the southern highlands district of New South Wales, Australia. *Prev Vet Med*. 2000 Jan 5,43(1):1 ~ 11.
- [161] Vries MJ, Veerkamp RF. Energy balance of dairy cattle in relation to milk production variables and fertility. *J Dairy Sci*. 2000 Jan,83(1):62 ~ 9.
- [162] Kensingers RS, Bauman DE, Collier RJ. Season and treatment effects on serum prolactin and milk yield during induced lactation. *J Dairy Sci*. 1979 Dec,62(12):1880 ~ 8.
- [163] Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci*. 2000 Jul 2,60 ~ 61:449 ~ 57.
- [164] Vailes LD, Britt JH. Influence of footing surface on mounting and other sexual behaviors of estrual Holstein cows. *J Anim Sci*. 1990 Aug,68(8):2333 ~ 9.
- [165] Bradley R. Veterinary research at the Central Veterinary Laboratory, Weybridge, with special reference to scrapie and bovine spongiform encephalopathy. *Rev Sci Tech*. 2000 Dec,19(3):819 ~ 30.
- [166] Wolfenson D, Roth Z, Meidan R. Impaired reproduction in heat-stressed cattle: basic and applied aspects. *Anim Reprod Sci*. 2000 Jul 2,60 ~ 61:535 ~ 47.
- [167] al-Katanani YM, Webb DW, Hansen PJ. Factors affecting seasonal variation in 90-day nonreturn rate to first service in lactating Holstein cows in a hot climate. *J Dairy Sci*. 1999 Dec,82(12):2611 ~ 6.
- [168] Sturman H, Oltenacu EA, Foote RH. Importance of inseminating only cows in estrus. *Theriogenology*. 2000 May,53(8):1657 ~ 67.
- [169] Nebel RL, Jobst SM. Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows: a review. *J Dairy Sci*. 1998 Apr,81(4):1169 ~ 74.
- [170] Mann GE, Lamming GE, Robinson RS et al., The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl*. 1999,54:317 ~ 28.

- [171] Kummerfeld HL, Oltenacu EA, Foote RH. Embryonic mortality in dairy cows estimated by nonreturns to service, estrus, and cyclic milk progesterone patterns. *J Dairy Sci*. 1978 Dec;61(12):1773 ~ 7.
- [172] Ayalon N. A review of embryonic mortality in cattle. *J Reprod Fertil*. 1978 Nov;54(2):483 ~ 93.
- [173] Vasconcelos JLM, Silcox RW, Lacerda JA et al. Pregnancy rate, pregnancy loss, and response to heat stress after AI at 2 different times from ovulation in dairy cows. *Biol Reprod*, 1997;56(Suppl 1):140 abstr.
- [174] Smith MW, Stevenson JS. Fate of the dominant follicle, embryonal survival, and pregnancy rates in dairy cattle treated with prostaglandin $F_{2\alpha}$ and progestins in the absence or presence of a functional corpus luteum. *J Anim Sci*, 1995;73:3743 ~ 3751.
- [175] Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination. *J Reprod Fertil*, 1980;59:463 ~ 468.
- [176] Weibold JL. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows. *J Reprod Fertil*, 1988;84:393 ~ 395.
- [177] Thurmond MC, Picanso JP, Jameson CM. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows. *JAVMA*, 1990;197:1305 ~ 1312.
- [178] Markusfel-Nir, O. Epidemiology of bovine abortions in Israeli dairy herds. *Prev Vet Med*, 1997;31:245 ~ 255.
- [179] Ferguson JD. Diet, production, and reproduction in dairy cows. *Anim Feed Sci Tech*, 1996;5:173 ~ 184.
- [180] Oltenacu PA, Rounsaville TR, Milligan RA et al.. Relationship between days open and cumulative milk yield at various intervals from parturition for high and low producing cows. *J Dairy Sci*, 1980;63:1317 ~ 1327.
- [181] Butler WR, Smith RD. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. *J Dairy Sci*. 1989 Mar;72(3):767 ~ 83.
- [182] Butler WR, Cherney DJR, Elrod CC. Milk urea nitrogen (MUN) analysis: Field trial results on conception rates and dietary inputs. *Proc Cornell Nutr Conf*, 1995:89.
- [183] Dunn TG, Moss GE. Effects of nutrient deficiencies and excesses on reproductive efficiency of livestock. *J Anim Sci*, 1992;70:1580 ~ 1593.
- [184] Davison KL, Hansel WM, Krook L et al. Nitrate toxicity in dairy heifers. I. Effects on reproduction, growth, lactation, and vitamin A nutrition. *J Dairy Sci*, 1965;48:1065 ~ 1073.
- [185] Rocha A, Randel RD, Broussard JR et al. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology*. 1998 Feb;49(3):657 ~ 65.
- [186] Gwazdauskas FC, Kendrick KW, Pryor AW et al., Impact of follicular aspiration on folliculogenesis as influenced by dietary energy and stage of lactation. *J Dairy Sci*. 2000 Jul;83(7):1625 ~ 34.
- [187] Vaillancourt D, Bierschwal CJ, Ogwu D et al., Correlation between pregnancy diagnosis by membrane slip and embryonic mortality. *J Am Vet Med Assoc*. 1979 Sep 1;175(5):466 ~ 8.
- [188] Biggers BG, Geisert RD, Wettemann RP, Buchanan DS. Effect of heat stress on early embryonic development in the beef cow. *J Anim Sci*, 1987;64:1512.
- [189] Lewis GS, Caldwell DW, Rexroad CE Jr et al. Effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on pregnancy rate in dairy cattle. *J Dairy Sci*, 1990;73:66.
- [190] McDermott JM, Thatcher WW, Drost M, Martin JM, Putney DJ. Effects of hCG on cycle length, response to $PGF_{2\alpha}$ and pregnancy rate in dairy cattle. *J Anim Sci*, 1986;63 (Suppl.1):354 (Abstr).

- [191] Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation. *J Dairy Sci*, 1997, 80:301~306.
- [192] Pursley JR, Wiltbank MC, Stevenson JS, et al. Pregnancy rates per insemination for cows and heifers at synchronized ovulation or synchronized estrus. *J Dairy Sci*, 1997, 80:295-300.
- [193] Putney DJ, Drost M, Thatcher WW. Influence of summer heat stress on pregnancy rates of lactating dairy cattle following embryo transfer or artificial insemination. *Theriogenology*, 1989, 31(4):765-778.
- [194] Putney DJ, Thatcher WW, Drost M, et al. Influence of environmental temperature on reproductive performance of bovine embryo donors and recipients in southwest region of the United States. *Theriogenology*, 1988, 30(5):905~922
- [195] Schmitt EJP, Diaz T, Drost M, Thatcher WW. Use of a gonadotropin releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin for timed insemination in cattle. *J Anim Sci*, 1996, 74:1084~1091.
- [196] Seguin BE, Oxender WD, Britt JH. Effect of human chorionic gonadotropin and gonadotropin releasing hormone on corpus luteum function and estrous cycle duration in dairy heifers. *Amer J Vet Res*, 1977, 38:1153.
- [197] Thatcher WW, Larson LE Jr, Drost M, Putney DJ. HCG-induced alterations in pregnancy rate of lactating dairy cows during summer months in South Florida. *J Dairy Sci*, 1984, 70(Suppl. 1):206
- [198] Sreenan JM, Diskin MG, Morris DG. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. *British Society of Animal Science Occasional Publication 2001*; No. 27 Volume 1: 93-104.

试验部分

前言

随着中国经济的稳定增长,居民收入不断提高,饮食营养意识不断增强,加上“学生饮用奶计划”等一系列促进奶类消费措施的实施,乳业的潜在发展空间将逐步转化为实际的市场需求。近几年奶类消费增长速度很快,大致在 30%。我国人均奶类消费量从上世纪末的 7 kg 增长到 2003 年的 13 kg,但还是远远低于世界人均 100 kg 和发达国家 300 kg 的水平,因此仍具有很大的增长空间。根据中国农业部资料,预计到 2015 年,全国奶类总产量将达到 2501.5 万吨,人均乳品消费量将达到 17.87 kg。

我国的奶牛业发展势头良好。2001 年,全国存栏良种及改良奶牛达 566.2 万头,牛奶产量为 1025.5 万吨,占世界总量的 1.9%。2002 年我国共存栏有良种及改良种奶牛 687.3 万头,全国奶类总产量达到 1400.4 万吨,2003 年,奶牛的存栏量有 800 万头,奶类总产量达到了 1700 万吨,但是奶牛及奶产量的增长却远远没有赶上消费的增长。从产奶量来看,目前我国奶牛平均年产奶量不超过 3 t,而新西兰、澳大利亚和欧美国家的奶牛平均产奶量却在 8 t、甚至 10 t 以上,我国本地奶牛产奶量较低,无法承担大规模产业化生产牛奶的重任。2004、2005 年我国奶业生产形势良好,奶牛存栏稳定增长,且品种结构已较前几年有较大改善,但牛奶产量仍不能满足国内的需求,2005 年 1~3 月份,乳制品进口金额占乳制品进出口总金额的 89.1%。奶源不足是我国乳品业发展的一大瓶颈,由于奶源严重不足,许多乳品企业设备闲置率很高。

为了解决奶源不足的问题,我国不得不从国外大量进口奶牛,引进国外优良奶牛品种并进行杂交改良成为理想的发展模式。其中 2003 年我国从新、澳两国进口奶牛数量创历史新高,达到了 4 万头。目前,澳大利亚、新西兰和美国奶牛存栏量 3000 万头左右,我国目前 1000 万头的奶牛缺口接近以上三个国家目前奶牛存栏数的 35%。通过大规模直接引进高产奶牛虽然能加速国内奶业发展,但所需成本极高,单纯依赖进口奶牛来改善我国奶牛的品种结构和提高产奶总量并不现实。

奶源的供给取决于奶牛的数量和质量。就目前我国奶业的现状来看,应用奶牛的繁育技术快速扩大高产良种奶牛的种群是解决我国乳制品不足的根本途径。2002 年,农业部实施了“万枚高产奶牛胚胎移植富民工程”项目,每年在全国九个省、市、自治区移植 10000 枚优质高产的奶牛胚胎,为提升我国奶牛种群起到积极的推动作用,同时也促进了全国各地推行胚胎移植技术的高潮。“十五”期间科技部启动了“国家奶业重大科技专项”,共投入经费总计达 4 亿多元人民币,是在畜牧科学与产业领域投入力度最大,产业化程度高,社会和经济效益最为显著,带动和示范效应最为明显的一个项目。其中胚胎工程技术产业化研究是高产奶牛良种繁育项目的重点。

在提高良种奶牛繁育效率的研究中,应用胚胎工程技术不仅增加良种存栏数,还可以改良地方奶牛的品质。胚胎工程技术主要包括超数排卵和胚胎移植 (multiple ovulation

embryo transfer, MOET)技术、胚胎完全体外化生产 (*in vitro* production, IVP) 技术、性别控制 (sex control) 技术以及动物克隆与转基因技术等。另外, 奶牛繁殖障碍是影响其繁育效率的严重因素, 在奶牛快速繁育技术产业化过程中, 必须要解决这一问题带来的危害。

动物 MOET 技术在育种计划中至少在 8 个国家得到全面实行, 奶牛胚胎移植的总数正在逐年增加, 全球现在每年大约移植奶牛胚胎 500,000 枚左右。在美国, 95% 以上的种公牛是胚胎移植获得的。我国现在每年只移植奶牛胚胎大约 1~2 万枚, 与我国养牛存栏数多和良种覆盖率低这一现状很不相称。采用非手术冲卵, 平均可用胚胎数为 5.5 枚/头, 还有提高的空间。现在 MOET 技术基本成熟, 但影响因素很多, 比如供体牛的饲养管理水平、超排结果的不确定性、不同地域气候的影响等。另外在提高良种胚胎移植效率的研究中, 对如何提高受体牛的利用率, 还涉及到受体牛同期发情处理和再利用等方面。

胚胎体外生产技术在发达国家已得到广泛应用, 我国目前还未形成产业化规模, 还存在许多问题需要解决。例如卵母细胞的来源、体外成熟和体外受精等都有待于进一步优化, 特别是如何提高 IVP 胚胎的质量从而达到与体内胚胎相近的受胎率。在 IVP 生产系统中应用性控精液来获得性控优良胚胎, 构建性控胚胎产业化技术体系, 是国内外研究的热点之一。应用 PCR 技术鉴定奶牛胚胎性别是在上世纪 90 年代逐渐发展起来的新型技术, 对奶牛胚胎性别鉴定的准确率可达到 100%。性别鉴定技术与胚胎移植、胚胎冷冻等技术的结合, 推动胚胎工程技术在家畜繁育中的应用, 但在我国未见利用该技术大规模推广的报道。

在良种奶牛高效繁育技术的实际应用中, 常常会遇到一些导致母牛生殖机能紊乱的疾病, 使得在对供体进行超排得到的胚胎数量少或者冲不到胚胎, 或者胚胎质量差导致回收的胚胎可利用率降低; 有些疾病还会引起受体母牛利用率和受胎率下降。这些均可以使胚胎移植的成功率降低而造成大的经济损失, 也影响到胚胎移植技术的推广和应用。特别是高产奶牛的繁殖障碍发生率比普通奶牛更高, 严重地影响了生产效益。有效地控制这些疾病对提高胚胎移植成功率具有重要意义, 也可以提高供体母牛和受体母牛的再利用率, 而且对奶牛人工授精受胎率的提高也具有决定性的作用。

本试验针对上述关键技术研究中存在的问题开展工作, 共分如下几个部分: 研究在奶牛 MOET 技术实施过程中, 不同条件和不同处理方式下对供体奶牛有效利用和重复利用的影响, 提高胚胎生产效率; 对受体牛同期发情控制进行研究, 旨在提高受体利用率和移植妊娠率; 奶牛体外胚胎批量生产的研究, 对影响胚胎体外生产环节进行探讨, 建立了奶牛胚胎 IVP 体系, 并且利用性控精液来生产性控体外胚胎进行初步研究;

主要应用 PCR 技术鉴定奶牛胚胎性别的实验研究, 针对奶牛繁殖障碍中几种常见影响繁育效率的疾病开展研究, 提出防治措施和管理方案。

第二章 奶牛超数排卵与胚胎移植 (MOET) 技术

动物胚胎工程技术是以超数排卵(multiovulation)、胚胎移植(embryo transfer, ET)、胚胎体外生产(*in vitro* production, IVP)、胚胎冷冻保存(embryo cryopreservation)、胚胎克隆(embryo cloning)和性别鉴定 (sex identification) 等为核心内容的系列化工程技术。其中超数排卵和胚胎移植技术是胚胎工程的重要组成部分,目前已成为一项比较成熟的生物技术^[1]。上世纪 60 年代,英、法、加、美、日等国对牛胚胎移植的采集、保存、移植等技术环节进行了大量的试验研究,70 年代发达国家开始进入奶牛、肉牛生产的实际应用阶段。1976 年,首次报道了采用导管高效采集胚胎的非手术方法。随后,胚胎移植在奶牛中的应用得到了飞速发展^[2]。随着非手术采胚法和移植技术的改进以及胚胎冷冻保存技术的发展,大部分荷斯坦优秀种公牛是由胚胎移植培育的。近几年来,胚胎移植在亚洲和南美一些国家中增长速度很快。我国对牛胚胎移植研究起步较晚,1978 年在牛上试验成功,上世纪 80 年代在牛的胚胎移植冷冻和胚胎分割等方面取得成功^[3]。应用牛 MOET 技术,能充分发挥优良母畜的遗传资源,尽可能多地生产优秀种畜,加速牛群改良和纯种繁育进程,迅速提高我国奶牛群体水平^[4]。超数排卵技术是牛胚胎移植获取大量胚胎最有效的方法,超排效果的好坏直接影响胚胎移植技术的推广应用^[5],因此,高效率的超排技术是胚胎移植技术能否在生产中推广应用的关键,在实际生产中必须提高良种母牛的超排采卵率^[6,7]。

应用现代生殖技术加速品种改良及扩大种群是目前国际上推动畜牧业、尤其是养牛业发展的重要途径之一。通过胚胎移植产生人们所需要的个体乃至群体,而移植后胚胎在母体子宫的着床率直接影响着生殖技术应用的效率^[8]。胚胎着床涉及到胚胎和受体牛子宫之间的相互作用,是一种高度进化和完善的生理过程。胚胎的质量、受体牛的生理状况、子宫内环境、母牛的健康状况、年龄以及胚胎与子宫生理状态的同步程度等方面都影响着这一过程^[9]。

胚胎冷冻技术现在基本成熟,冻胚移植结果较鲜胚移植的受胎率一般降低 5%~10%,但冷冻胚胎技术在推广应用中能够极大提高胚胎工程产业化的进程,促进奶牛繁育效率^[10]。2001 年,美国生产的冷冻胚胎占 67%,而用乙二醇(EG)生产的冻胚占 79%,冷冻效果比较稳定,并且适宜于直接移植(DT),是一种行之有效的胚胎冷冻方法。我们在前期研究工作中也得到类似结果,本研究推广过程中,采用含 1.5 mol/L EG 的 PBS 液作为冷冻介质,使用相同的胚胎冷冻和解冻方法。

本研究针对 MOET 技术在奶牛繁育应用推广工作中的重点技术难题进行试验,从供体奶牛超数排卵、胚胎移植、胚胎质量与受胎关系等方面进行了系统的分析,旨在提高良种高产奶牛的繁殖效率。

2.1 材料与方法

2.1.1 供受体奶牛选择及试验地点

2.1.1.1 供体牛的选择

供体奶牛主要是杨陵科元生物工程有限公司奶牛场从美国、加拿大和澳大利亚进口的高产奶牛群中选取，体质健康，膘情在中上，经检查确定无生殖系统疾病、无传染病和寄生虫病。拥有正常的发情周期，超排时卵巢上至少有一个黄体存在。

供体牛饲养管理标准：按奶牛的饲养管理标准饲喂。在超排前 2 个月进入固定胚胎采集与移植场地，保证充足的维生素和微量元素，如注射 V_{ADE} ，冬季每日补充胡萝卜 2 kg 等，单独组群、编号、保持饲养环境相对稳定。

2.1.1.2 受体牛的选择

受体牛大部分为陕西关中地区秦川牛，主要以青年牛为主，部分选取经产牛，年龄在 1.5~6 岁之间。拥有正常的发情周期，无繁殖机能疾病，经检疫无传染病、健康，膘情在中上。经产牛一般应在分娩后 90 d 以上，且断乳，无流产史。

受体牛在胚胎移植前 2 个月进入固定胚胎移植场地；受体牛在胚胎移植前 8 周加强饲养管理同时补饲，编号，保持饲养环境相对稳定。

2.1.1.3 试验地点

供体牛的超排处理地点在杨陵科元生物工程有限公司生物园和西安北郊草滩牛场进行(北纬 34.2 度)。受体牛胚胎移植地点主要为陕西关中地区，包括西安市的临潼区、蓝田县、户县，宝鸡市的岐山县、凤翔县、陈仓区，咸阳市的礼泉县、三原县、武功县、泾阳县，渭南市的合阳县、大荔县、富平县，铜川市耀州区，杨凌示范区杨凌科元生物园区。此外还在内蒙古呼和浩特市蒙牛乳业公司及和林格尔县 辽宁大连三环乳业公司，浙江宁波科元畜牧有限公司，山东淄博农业局，重庆渝中区畜牧改良站，江西南昌金牛公司等地进行了胚胎生产和移植。

2.1.2 主要试验药物与仪器设备

FSH	中国科学院动物研究所
FSH (Folltropin)	Vetrepharm Cananda Inc,加拿大
EAZI-BREED CIDR (1.9 g Progesterone)	Pfizer Pty. Limited, New Zealand;
氯前列烯醇 (PG, 0.2 mg)	上海市计划生育科学研究所;
促排卵素 3 号 (LHRH-A3)	宁波激素制品有限公司 ;
2%利多卡因	泗水希尔康制药有限公司
移植枪	法国卡苏公司;
塑料硬外套	法国卡苏公司;
无菌软外套	法国卡苏公司;

实体显微镜	日本 OLYMPUS 公司产
CL5500 胚胎冷冻仪	澳大利亚 cytologic 公司
Millipore 超纯水仪	英国 Whattman 公司
0.5-10 μ L 微量计量器	美国, Gilson 公司
10 ~ 18 Fr 冲卵管	日本富士平公司
35 ~ 60 塑料培养皿	瑞士 Nunc 公司
集卵杯 (侧漏式)	日本富士平公司
集卵杯 (底漏式)	法国卡苏公司

试验用无机盐试剂除特别说明外, 均购自 Sigma 公司。

性控精液购自内蒙古赛科星生物科技有限责任公司生产的性控冻精, 0.25 mL 塑料细管, 每支含 200 万个 X 精子。

2.1.3 奶牛的超排方法

本研究采用常规的 FSH 逐次递减法进行超排处理。首先检查供体牛子宫及卵巢的状态, 然后采用同期发情与超数排卵结合进行。

应用 CIDR 进行同期发情后的超排程序为: CIDR 放置供体牛当天计为 0 d, 在第 9 d 开始注射超排药, 连续 4 ~ 5 d 采用递减法注射 FSH, 每日 2 次间隔 12 h, 并在注射 FSH 的第 3 d 注射 PG, 最后一天取出 CIDR。观察动物发情并预测排卵时间, 发情后 12 h 第一次人工授精, 间隔 12 h 后第二次人工授精, 发情后第 7 d 采用非手术法冲胚。采用性控精液进行人工授精时, 采用子宫深部输精, 其它步骤相同。

应用 2 次 PG 法进行同期发情后的超排程序为: 第一次注射 PG 当天为 0 d, 第 2 d 和第 3 d 观察发情, 对有明显发情表现的母牛于第 11 d 开始每日 2 次连续递减法注射 FSH, 在注射 FSH 的第 3 d 注射 PG, 有部分母牛在第 5 d 早上再注射低剂量 FSH。

自然发情母牛的超排程序: 利用杨凌科元生物工程有限公司奶牛场从美国、加拿大和澳大利亚进口的 367 头育成牛和部分产后母牛, 仔细观察并记录牛群的发情状况, 根据发情记录选取发情后 9 ~ 11 d 的母牛经直肠检查卵巢上有功能性黄体者, 不经过预先的同期发情处理, 直接进行超排。即对选取的发情后第 9 ~ 11 d 的母牛直接每日 2 次连续递减法注射 FSH, 方法和剂量与上述两种程序相同。

具体同期发情与超数排卵方法见表 2-1。

2.1.4 牛胚胎的回收采集

供体牛超排发情后的第 7 d 采用二路冲卵管法进行非手术冲卵。首先将供体牛在保定架保定, 并用 2% 的利多卡因进行尾椎硬膜外麻醉, 剂量为 5.0 mL。用子宫颈粘液去除器吸除粘液。直肠把握法将带钢芯的冲卵管经生殖道插入子宫颈和子宫角, 直到冲卵管达到子宫角前端为止。冲卵管气囊充气后, 抽出冲卵管内芯, 用 50 mL 注射器依次加量吸取 20~45 mL 冲卵液从输入管注入子宫角, 然后将冲卵液吸回注射器, 回收液存放

到集卵杯，反复几次，每个子宫角用 300~400 mL 冲卵液；或者使用闭路式三通管进行冲卵液的回收，盛有回收液的集卵杯在室温下（18 ~22 ）静置片刻，上清液通过

表 2-1 供体奶牛超数排卵方案

Table 2-1 Superovulation schedules for Holstein donor cows

处理天数 Day	超排方案 1 （PSO1）	超排方案 2 （PSO2）	超排方案 3 （PSO3）
0	开始放置 CIDR	PG 6 mL	自然发情观察
2		发情观察	
3		发情观察	
9	FSH 早晚各 1.5~2.5 mg		FSH 早晚各 1.5~2.5 mg
10	FSH 早晚各 1.0~1.7 mg		
11	FSH 早晚各 1.0~1.5 mg PG 4~6 mg	FSH 早晚各 1.5~2.5 mg	FSH 早晚各 1.0~1.5 mg PG 4~6 mg
12	FSH 早晚各 0.6~0.65 mg 下午取出 CIDR	FSH 早晚各 1.0~1.7 mg	FSH 早晚各 0.6~0.65 mg
13	发情后 3 h 内第一次配种,隔 10~12 h 二次配种	FSH 早晚各 1.0~1.5 mg PG 4 ~ 6 mg	发情后 3 h 内第一次配种 隔 10~12 h 二次配种
14		FSH 早晚各 0.6~0.65 mg (FSH 早 0.5~0.65 mg)	10~12 h 后第三次配种
15		发情后 3 h 内第一次配种 隔 10~12 h 二次配种，	
16		10~12 h 后第三次配种	
20	Transcervical flush PG 4 mL		Transcervical flush PG 4 mL
22		Transcervical flush PG 4 mL	

过滤皿去除，最后将过滤皿内剩下的 30~50 mL 回收液，侧漏式集卵杯可以直接在显微镜下拣胚，底漏式摇动后倒入 100 mm 培养皿内，镜检、回收胚胎。二次检查用 PBS 液冲洗集卵杯 2~3 次，清洗后再镜检、回收胚胎。

2.1.5 胚胎质量和级别的判定

胚胎质量和级别的判定分为两个方面：一方面是胚胎的形态；另一方面是胚胎的发育阶段与受精后的时间^[11]。胚胎形态标准包括胚胎的形状、细胞质的颜色、细胞数量和紧缩程度、卵周隙的大小、受挤压或退化细胞数等^[12]。根据胚胎的轮廓、细胞发育的均匀性、细胞的色泽等，可以将胚胎分为 4 级。A 级胚胎为优良胚胎，特征为卵裂球的轮廓清晰，细胞质致密，色调和分布均匀一致。B 级胚胎稍有变形，分裂球的轮廓清晰，细胞质较致密且分布均匀，变性细胞和细胞碎片不超过 10%~30%。C 级为不良胚胎，分裂球的轮廓稍不清晰或部分不清晰，细胞质不均匀，色调发暗，变性细胞和细胞碎片占 30%~50%。D 级为退化胚胎，分裂球大小不一，松散，细胞碎片占 50% 以上。

2.1.6 胚胎的冷冻与解冻

本试验采用 1.5 mol/L 乙二醇法程序化冷冻方法进行，仪器为 CL5500 型程序冷冻仪。将胚胎用冷冻保护剂平衡处理后，开始降温，在-6 ~-7 植冰，诱发结晶并停留

一定时间,再以缓慢的速度 ($0.1 \sim 1$ /min) 降温至 $-32 \sim -35$,而后直接投入 -196 液氮保存。

2.1.6.1 胚胎的冻前处理

经超数排卵获得大量的新鲜胚胎,一部分直接用于鲜胚移植,相当一部分进行胚胎冷冻,用于以后移植。胚胎在培养液中清洗数次,去除细胞碎片及异物,并且保证无菌。分步法将胚胎依次由低浓度向高浓度冷冻液中进行平衡。

2.1.6.2 胚胎装管

将细管先伸入解冻液中先吸取一段解冻液后吸取小段气泡,再在冷冻液中吸取小段冷冻液后吸取气泡,然后在实体显微镜下吸取处理好的胚胎及冷冻液,再以气泡间隔后吸取小段冷冻液,最后吸取气泡和一段解冻液。装好的细管进行封口,封口办法采用细管塞或热封口。

2.1.6.3 胚胎冷冻程序选择

冷冻设备的具体操作步骤根据所带的手册指南进行。植冰时将细管的棉塞端露出一段,用在液氮中预冷的镊子轻夹液体部分,出现结晶即可,然后快速回缩到冷冻室内。最后达到 -30 以下后,将细管直接投入液氮,并分类保存。认真填写冷冻记录。

2.1.6.4 冷冻胚胎解冻

快速解冻时应避免在 $-50 \sim -15$ 致死区停留时间过长,胚胎要在 $20 \sim 30$ s 内由 -196 升高到 $30 \sim 35$ 。将胚胎拿离液氮面,首先空气中停留大约 $7 \sim 10$ s,投入 35 水浴中解冻 $10 \sim 15$ s,预先准备温度为 30 左右的解冻液和培养液,在实体显微镜下直接将胚胎置于解冻液中,注意胚胎数是否与细管标签的标注一致,平衡 10 min。观察胚胎的形态^[13],将胚胎移入培养液后,准备移植用。

2.1.7 胚胎移植

2.1.7.1 受体牛同期发情处理

同期化处理之前对受体牛进行直肠触摸,检查卵巢是否处于活动状态,处于活动状态的牛方可进行同期化发情处理,调整发情周期与供体牛一致。使用氯前列烯醇进行肌注,或放置 CIDR 后一定时间再肌注 PG。注射后 $24 \sim 96$ h 观察发情,以受体牛稳定站立接受其它牛爬跨为发情标准。受体牛发情之日记为 0 d, $6 \sim 8$ d 内进行胚胎移植。

2.1.7.2 胚胎移植

选择与供体母牛发情同步而且在移植前直肠检查有功能性黄体的受体牛用于移植。受体牛施行 $1 \sim 2$ 尾椎间隙硬膜外麻醉,清洗消毒外阴部。含有胚胎的细管装入移植枪,再套上移植硬外套,最后套上无菌隔离外套,保持移植枪的前端无菌。将胚胎移植到受体牛有黄体侧子宫角内^[14]。做好受体牛移植记录。受体利用率计算:直肠检查卵巢状态符合移植个体数/同期发情处理后发情个体数 $\times 100\%$ 。

2.1.8 试验分组及统计

试验一：对青年奶牛的利用效果进行分析，根据青年育成牛生长月龄分组，组别为 13 ~ 14 月龄，15 ~ 16 月龄，17 ~ 18 月龄，19 ~ 20 月龄，比较不同月龄超排效果；采用连续超排方法，试图充分利用青年奶牛适配前发育时期，对比连续超排 2 ~ 4 次胚胎回收结果，以及不同重复超排间隔时间对超排效果的影响；再者对自然发情的供体牛进行超排处理，分析与同期发情处理组是否存在差异。

试验二：比较不同胎次经产牛的超排效果，即 1 到 7 胎次；对产后不同间隔时间的经产牛进行超排后胚胎回收率和利用率对比分析（30 ~ 40 d，50 ~ 60 d，80 ~ 90 d）。

试验三：受体秦川牛同期处理采用 CIDR + PG 法和 2 次 PG 法，同期发情的受体牛移植同步发育时期的胚胎，并比较不同营养状况受体牛的受胎率关系；育成和经产秦川牛受体移植后胚胎着床比例。

试验数据结果统计用方差和 *t* 检验进行显著性检验。

2.2 结果

2.2.1 不同超排方案对超排结果的影响

根据不同激素联合应用分组进行超排，供体牛发情后采用两次人工授精法。结果见表 2-2。本研究中共超排荷斯坦供体牛 1127 头次，其中采用 PSO1 方案 238 头次，采用 PSO2 方案超排供体牛 392 头次，采用 PSO3 方案超排供体牛 497 头次，对卵巢上存在 3 个以上黄体者，判定为超排成功，三种方案成功率分别为 89.50%，90.02%和 98.54%，经统计分析显示，PSO1 和 PSO2 组之间差异不显著，但 PSO3 显著高于前二者（*P* < 0.05）。本试验中超排后卵巢无黄体、没有排卵或卵泡没有发育等认为卵巢反应不良，不进行胚胎回收。在试验统计中发现供体牛超排失败（主要指激素处理后卵巢反应弱，冲胚时直肠检查卵巢上黄体数低于 3 个）的主要原因由牛个体差异引起的，比如对激素的反应水平、卵泡发育状态等。因此在下述试验中只统计卵巢状态反应良好的供体奶牛数量。

表 2-2 不同超排方案对供体牛超排成功率的影响
Table 2-2 Influence of superovulation scheduals on success rate of donor cows

超排方案	供体数量（头）	卵巢状态反应良好牛数（枚）	超排成功率（%）
PSO1	238	219	89.50 ^a (196/219)
PSO2	392	370	90.02 ^a (334/371)
PSO3	497	481	98.54 ^b (474/481)

注：表中同列数据后字母为显著性标记。字母相同差异不显著，字母不同差异显著（*P* < 0.05），下表同。

试验同时对比 3 种超排方案的处理效果，结果见表 2-3。用三种方案处理母牛后，平均回收胚胎数量相近（*P* > 0.05），但 PSO3 回收的可用胚胎数明显高于 PSO1 和 PSO3 的处理组（*P* < 0.05）。试验中对超排成功供体牛回收胚胎共 10900 枚，可用胚胎数量为

6942 枚, 平均每头牛次获得胚胎数量为 6.73 枚。尽管超排效果比较理想, 但同时在实验中发现某些不稳定因素, 需要进一步完善不同超排方案。

表 2-3 不同超排方案对奶牛超排效果的影响

Table 2-3 Influence of superovulation scheduals on embryo recovery results of dairy cows

超排方案	供体数量 (头)	平均回收胚胎数 (枚)	平均可用胚胎数 (枚)
PSO1	192	10.72±4.13 ^a	6.12±4.07 ^a
PSO2	364	9.90±5.24 ^a	5.98±3.44 ^a
PSO3	475	11.03±3.36 ^a	7.56±3.41 ^b

2.2.2 青年奶牛发情周期不同阶段对超排结果的影响

本试验中统计了供体牛在发情后第 7~8 d、第 9~11 d 和第 12~14 d 进行超排处理时对胚胎回收率的影响, 结果见表 2-4。第 9~11 d 进行超排时回收胚胎数明显增加, 平均每头为 11.34 枚, 第 7~8 d 平均每头为 9.44 枚, 而且平均可用胚数差异显著 ($P<0.05$)。报道在牛不同的发情周期阶段具有不同的超排方案, 9~14 d 为一阶段, 16 d 后为另一阶段, 大多数试验认为在 9~14 d 超排结果无差异^[15], 本试验认为应严格限制超排起始时间, 以获得良好的结果。

表 2-4 发情后不同超排起始时间对超排结果的影响

Table 2-4 Influence of different estrus stages on results of dairy cows superovulation

发情后天数	超排头数	回收胚胎总数 (枚)	平均胚胎数 (枚)	平均可用胚胎数 (枚)
7~8	54	510	9.44±5.13 ^a	5.87±4.22 ^a
9~11	304	3447	11.34±4.38 ^b	7.71±4.56 ^b
12~14	46	404	8.78±4.96 ^a	5.42±3.89 ^a

2.2.3 不同月龄青年奶牛超排结果

试验对不同月龄阶段的青年荷斯坦奶牛分组超排, 结果见表 2-5。由表可见, 13~14 月龄的育成牛在注射 FSH 时, 平均回收胚胎为 6.54 枚, 获得可用胚为 4.52 枚, 其他三组的平均可用胚胎比率分别为 86.09%、89.89%和 81.47%, 而且平均可用胚胎数显著高于 13~14 月龄处理组 ($P<0.05$)。结果表明月龄超过 15~16 月的青年奶牛用来超排, 效果稳定, 说明方法可行, 为挖掘胚胎资源提供另外一条途径。

表 2-5 不同月龄青年奶牛超排效果比较

Table 2-5 Comparison of superovulation results among ages of heifers

月龄组别	供体数量 (头)	平均回收胚胎数 (枚)	未受精卵子数 (枚)	平均可用胚胎数 (%)
13~14	40	6.54±4.19	2.51±2.06	4.52±3.51(69.11) ^a
15~16	116	8.73±4.71	1.66±1.42	7.07±4.23(80.99) ^b
17~18	159	8.62±3.11	1.43±1.41	7.19±3.61(83.41) ^b
19~20	53	9.39±2.91	1.25±0.93	8.14±3.07(86.69) ^b

2.2.4 重复超排次数和超排处理的间隔时间对超数排卵的影响

重复超排能够提高供体的利用和良种胚胎产量，本试验对部分青年奶牛进行连续重复超排研究，组 1 为对照组，组 2~组 4 分别为超排第 2~4 次。结果见表 2-6。结果表明，连续重复超排 2 次时供体的利用率和平均可用胚胎数略下降，差异显著。第 3 次处理结果供体利用率比首次处理组下降，胚胎可用比例降低明显 ($P<0.05$)。组 4 与其他 3 组结果差异显著 ($P<0.01$)，供体利用率仅为 65%，可用胚胎下降到平均每头 2.85 枚。试验表明连续重复超排次数控制在 3 次以内，第 4 次超排处理效果显著降低，不适宜对供体超排。

表 2-6 重复超排次数对胚胎回收效果的影响
Table 2-6 Influence of repeated superovulaion on results of embryo recovery

次数组别	供体牛数(头)	供体利用率(%)	胚胎回收总数(枚)	平均可用胚胎数(%)
1	278	91.73 ^a (255/278)	1988	6.88±±4.9 ^a 2(88.24)
2	244	84.02 ^a (205/244)	1537	5.15±3.38 ^b (86.01)
3	162	77.16 ^{a,b} (125/162)	818	4.53±3.42 ^b (69.23)
4	20	65.00 ^c (13/20)	68	2.85±3.03 ^c (54.49)

另外对不同超排处理的间隔时间进行比较，以第一次冲胚结束时计为 0 d，间隔时间分别为 30~45 d、46~60 d 和 61~75 d，供体牛超排结果见表 2-7。结果表明，尽管平均回收胚胎数没有显著差异，间隔时间适当延长后，平均可用胚胎数显著提高。另外，试验中发现，间隔时间短的情况下供体牛产科疾病发病率增加。

表 2-7 不同超排处理间隔时间对超排效果影响
Table 2-7 Influence of interval times on superovulation results

间隔时间 d	供体牛数(头)	回收胚胎数(枚)	平均回收胚胎数(枚)	平均可用胚胎数(%)
30~45	56	408	7.29±4.27 a	4.80±±4.19 ^a (65.93)
46~60	158	1303	8.25±5.04 a	6.81±5.34 ^b (82.58)
61~75	85	671	7.89±4.31 a	6.65±5.40 ^b (84.20)

2.2.5 超排处理时卵巢状态对超排结果的影响

本试验对供体牛进行超排处理时，检查卵巢的状态，卵巢上只有黄体的分为一组，黄体 and 卵泡同时存在的分为另一组。其超排结果见表 2-8。从表 2-8 可以看出，超排的 77 头奶牛共获得胚胎总数为 601 枚（平均每头胚胎 7.8 枚），可用胚胎数为 443 枚（平均每头可用胚胎 5.75 枚），占回收胚胎总数的 73.7%。

表 2-8 卵巢状态对超排结果的影响
Table 2-8 Influence of ovarian status on superovulation results

卵巢状态	供体牛 (头)	回收胚胎总数 (枚)	可用胚胎数 (枚)	退化及未受精 胚胎数(枚)	平均回收胚 胎数(枚)	平均可用胚 胎数(枚)
只有黄体存在	40	338	253	85	8.45±4.12 ^a	6.33±4.49 ^a
黄体和卵泡存在	37	263	190	73	7.11±5.87 ^a	5.14±5.40 ^a

2.2.6 胎次与产后间隔时间对超排效果的影响

本试验对经产牛不同胎次影响超排进行比较,育成牛设为对照组,选取经产胎次为 0、1~3、4~6、7~胎次的供体牛进行超排,结果见表 2-9。各组超排处理不同数量的供体奶牛,其中 1~3 胎次和 4~6 胎次与对照组在可用胚胎比率无显著差异 ($P>0.05$)。使用相同的 PSO1 处理方案,超过 7 胎次的经产牛超排效果不理想,回收胚胎及可用胚胎总数显著下降。

表 2-9 不同胎次影响供体牛超排效果分析
Table 2-9 Influence of parity on superovulation results of donor cows

经产牛胎次	供体数(头)	平均回收胚胎数(枚)	平均可用胚胎数(枚)
0	94	9.68±6.21 ^a	7.25±5.72 ^a
1~3	133	10.76±6.89 ^b	7.04±5.32 ^a
4~6	85	10.24±5.93 ^b	6.88±5.41 ^a
7~	21	6.03±5.83 ^c	4.26±8.77 ^b

本试验根据奶牛场实际情况,对奶牛在产后不同时间进行的超排效果进行了比较,结果表明随着产后时间的延长,超排效果逐渐改善,间隔 40~59 d、60~75 d 和 76~90 d 的平均可用胚胎数量分别为 4.82±4.47、5.25±3.92 和 6.49±4.63 枚,差异显著 ($P<0.05$)。

表 2-10 产后间隔时间对奶牛超排效果的影响
Table 2-10 Influence of postpartum intervals on superovulation results of dairy cows

产后间隔时间(d)	供体牛数(头)	平均回收胚胎数(枚)	平均可用胚胎数(枚)
40~59	55	6.25±5.34 ^a	4.82±4.47 ^a
60~75	127	7.88±4.49 ^a	5.25±3.92 ^b
76~90	234	10.30±6.04 ^b	6.49±4.63 ^c

2.2.7 体内性控胚胎的生产和移植结果

供体奶牛按照正常超排程序处理后,采用性控精液进行子宫深部输精,胚胎回收结果见表 2-11。性控精液授精和普通精液的相比,平均回收胚胎数分别为 9.02 和 8.87 枚,无显著差异 ($P>0.05$)。用性控精液授精后可用胚胎数显著下降 ($P<0.05$),平均仅为 4.70 枚,但若按 92% 的雌性后代比例计算,后代母犊出生率要高于采用普通输精

获得的胚胎移植后代。(4.324 vs 3.475)。

超数排卵得到的可用性控胚胎移植到同期发情受体牛子宫角，共移植受体牛 236 头次，鲜胚移植受胎率为 56.4%，冷冻胚胎受胎率为 44.7%，与正常体内胚胎移植后的受胎率接近，说明采用性控精液生产性控胚胎的可行性。

表 2-11 性控精液和普通精液受精对供体牛超排结果的影响
Table 2-11 the effects of using sexed and normal sperm on superovulation results

精液类型	供体牛数(头)	平均回收卵子总数 (枚)	平均可用胚胎数 (枚)
性控精液	89	9.02±6.23 ^a	4.70±4.36 ^a
普通精液	240	8.87± 5.43 ^a	6.95±5.07 ^b

2.2.8 冷冻胚胎解冻方式对移植结果影响

本试验采用含 1.5 mol/L EG 冷冻的 A 级高产奶牛胚胎 ,在解冻移植过程中分为直接解冻和分步解冻 2 种方法，结果表明，2 种方法解冻后的胚胎移植到受体牛子宫内，经 60 d 妊娠检查发现，二者对受胎率的影响差异不显著 ($P>0.05$)。分步解冻后，根据形态学对胚胎质量进行划分，按照胚胎分级 (参照方法 2.1.5)，B 级胚胎占解冻胚胎的 11.73%，但移植后的受胎率比 A 级略有降低，冻胚的整体利用率为 99.58% (见表 2-12)。

表 2-12 冷冻胚胎解冻方式和解冻后胚胎级别对受胎率的影响
Table 2-12 Effects of thawing process and grade of freezon embryos on pregnant rates

解冻方式	胚胎数量(枚)	胚胎级别	移植受体数(头)	胚胎利用率%	受胎率 (%)
直接解冻	533	-	533	100(533/533)	45.22 (241/533) ^a
分步解冻	1632	A	1632	100(1632/1632)	48.22 (787/1632) ^a
	484	B + C	463	95.66(443/463)	45.57 (211/463) ^a

2.2.9 受体营养及生育状况对胚胎移植成功的影响

受体秦川牛应用 2 种同期发情处理方法进行处理后移植，结果见表 2-13 。在同期发情处理中，CIDR + PG 法比 2 次 PG 法的受体利用率提高 (79.12% vs 71.93%)，受胎率无差异。其中营养状况不良指受体牛饲养条件差，被毛杂乱、消瘦等，其移植利用率较差，移植时直肠检查即使卵巢黄体合格，但受胎率仍显著下降 ($P<0.01$)。

将受体牛以育成牛和经产牛分组，统计其处理后的利用率和移植受胎率，结果表明育成牛的利用率比经产牛高 ($P<0.05$)，受胎率和产犊率无显著差异，但育成牛效果较好。

表 2-13 同期发情处理方法和受体牛营养对胚胎移植受胎率的影响
Table 2-13 Influence of 2 kinds of synchronization treatments and nutritional conditions of recipient cows on ET pregnant rate

同期发情 处理方法	营养 状况	处理受体 牛数(头)	发情率 (%)	受体利用率 (%)	受胎率 (%)
2 次 PG 法	良	2684	74.78(2007/2684)	78.92 (1584/2007) ^a	50.69 (803/1548) ^a
	差	535	59.25 (317/539)	42.90 (126/317) ^b	34.13 (43/126) ^b
CIDR + PG 法	良	754	79.05 (596/754)	80.70 (481/596) ^c	47.61(229/481) ^a
	差	128	61.72 (79/128)	43.04 (34/79) ^b	32.35 (11/34) ^b

表 2-14 育成受体牛和经产受体牛同期处理后胚胎移植效果分析
Table 2-14 Results of embryo transfer from synchronized recipient heifers and multiparous cows

受体组	受体数(头)	同期发情率(%)	受体利用率 (%)	受胎率 (%)	产犊率 (%)
育成牛	2566	76.07(1952/2566)	77.51 ^a (1513/1952)	48.58 ^a (735/1513)	98.50 ^a (724/735)
经产牛	487	72.90 (355/487)	70.99 ^b (252/355)	45.24 ^a (114/252)	96.49 ^a (110/114)

2.3 讨论

2.3.1 供体牛的选择和超排方案的确立

供体牛的主要从高产奶牛群中选择，在确定生产性能的前提下以供体牛的健康和营养状况为根本条件^[16]。选体质健康，膘情在中上，经直肠检查确定无生殖系统疾病，拥有二次以上正常发情周期的奶牛作为供体。供体的选择直接影响着规模化超数排卵和冲胚的效果^[17]。近年来对卵巢动力学的研究使人们对卵巢的功能有了进一步的了解，也推动了对牛超数排卵的研究。目前人们认识到牛的情期中有 2 个或 3 个卵泡发育波。在一个卵泡发育波中卵巢上的许多小卵泡同时发育，紧接着是一个优势卵泡继续发育而其他卵泡退化到原来的状态。优势卵泡的存在不但抑制其他卵泡的发育，而且还抑制下一个卵泡发育波的产生。通过采用孕酮或者雌激素抑制优势卵泡的发育来诱导下一个卵泡发育波的产生，并在第一个卵泡发育波发生的当天(发情当天)，或第二个卵泡发育波发生的当天(发情后第十天)对牛进行超排处理，促使更多的卵泡同时发育，可以大大地提高供体牛的超排效果^[18]。必须制定合理周密的超排方案来对动物个体进行处理。

超排中有人应用 PMSG + aPMSG (PMSG 抗血清) 处理，用抗体有效地中和了剩余的 PMSG^[19]，但 Boland 等(1991)试验表明，抗体并没有显著提高胚胎的质量，PMSG 的半衰期过长，可以导致卵巢的过度刺激以及对排卵、受精和随后的胚胎发育产生不利的影响，因此现在一般以不采用 PMSG 对奶牛进行超排处理。目前广泛应用于母牛的超排激素是 FSH，应用 FSH 联合氯前列烯醇对奶牛超排效果较为稳定^[20]，一般无卵巢囊肿和持续发情等情况，且卵巢机能恢复较快。在卵泡发育期 LH 和 FSH 起协同作用，共同促进卵泡的进一步生长和类固醇激素的合成。LH 和 FSH 的协同促卵泡生长

作用必须有一个合适的比例, LH 含量过高可以导致生长卵泡的闭锁或黄体化^[21]。李建栋等 (1997)认为国产的激素与进口的效果比较一致^[22]。根据上述研究报道结果, 本试验采用中国科学院动物研究所产 FSH 和加拿大产 FSH (Folltropin) 进行奶牛的超数排卵处理。超排中 FSH 的使用剂量也是重要影响因素^[23]。一般地, 经产牛 FSH 的用量要多于育成牛。调整 FSH 的剂量, 是超数排卵实践中非常重要的环节, 应该受母畜的年龄、胎次、产奶量、营养水平、体重等很多条件影响。超排剂量偏低容易造成卵巢不启动, 无法获得胚胎, 过量的 FSH 可能会抑制排卵或者影响卵子的质量和在输卵管内的受精能力, 而且也影响超排后卵巢的恢复^[24]。使用相同的超排方法和剂量, 超排结果不尽相同。因此具体剂量要根据牛的个体情况而定。

目前供体牛的超数排卵有几种不同的方法^[25,26], 主要是 FSH 递减法处理。在本试验采用的 3 种超排方案中, PSO1 法中应用 CIDR 主要是控制卵巢内卵泡同步发育, 从而达到同期发情目的。在阴道栓植入一定阶段加 FSH, 然后一次性注射 PG, 使发育的卵泡同时一次性排卵。PSO2 法则应用 PG 来进行供体同期发情处理。PSO3 主要利用供体牛的自然发情, 效果最好。供体牛在自然发情后第 9~11 d 直接进行超数排卵处理, 其效果要比经过同期发情后再进行超排要好。直接超排组无论是在胚胎产量还是在胚胎质量上, 都显著高于同期发情处理组。这种方法既可以简化胚胎生产程序, 缩短了从开始处理到胚胎回收的授精, 又可以降低前处理期间的饲养费用和药品消耗。在供体母牛比较多的条件下, 特别在有数百头青年母牛的情况下, 可以连续组织直接超排, 大量生产优良胚胎。

2.3.2 利用青年奶牛进行超数排卵结果分析

本试验说明青年牛可以用来超排, 这与其他报道不一致^[27]。李树静等对青年肉牛大规模的超排结果显示, FSH + PG 组的效果优于 PMSG 处理组^[28]。肉用西门特尔青年牛超排获得胚胎为 8.67 枚^[29], 经产牛平均回收胚胎比育成牛高, 差异显著, 而平均可用胚数育成牛比经产牛高, 但差异不显著。其原因可能是育成牛卵巢表面积较经产牛小, 因而发育的卵泡数和排卵数少于经产牛, 但育成牛患繁殖疾病少, 有利于卵子受精和胚胎的发育。经产牛的身体状况及生理状况已成熟, 所以回收胚胎比育成牛要高。另外青年牛比成年牛的生殖力旺盛, 性机能、卵巢体积等与成年牛略有不同所引起^[13]。为有效地提高超排效果, 必须加强经产牛群饲养管理, 加强经产牛的产后护理工作, 减少繁殖疾病的发生。

另外本试验对青年奶牛性周期不同阶段和不同月龄对超排结果的影响进行分析比较, 认为第 11 天进行超排时回收胚胎数明显增加, 报道在牛不同的性周期阶段具有不同的超排方案。试验认为月龄超过 15~16 月的青年奶牛可以用来超排, 说明方法可行, 为挖掘胚胎资源提供另外一条途径, 这与相关报道结果一致。不同情期导致的低受精率常常是由于卵母细胞成熟过程中的异常, 激素作用下的卵母细胞和卵泡成熟, 包括

排卵的不同步, 以及精子在超排动物生殖道内的运动力减弱, 而使受精时到达输卵管受精部位的精子数减少。

2.3.3 超排间隔时间与产后间隔时间对超排效果的影响

重复超排能够提高供体的利用和良种胚胎产量, 本试验对部分青年奶牛进行连续重复超排研究, 连续重复超排超过 2 次时供体的利用率和平均可用胚胎数略下降, 结果证实连续重复超排次数控制在 3 次以内, 连续 4 次超排处理效果差, 综合分析不适宜于对供体超排。Hasler 等(1983)报道奶牛超排 1~10 次的试验结果, 排卵数没有变化, 但受精率和采得胚胎数下降, 表明供体母牛重复超排是可行的, 但对重复次数需进一步研究。另外对不同超排处理的间隔时间进行比较, 以第一次冲胚结束时计为 0 d, 间隔时间分别为 30~45d 和 45~60 d 和 61~75 d, 结果表明间隔时间延长后回收胚胎数逐渐增加, 间隔时间太短效果较差, 同时发现产科疾病发病率增加。

对产后奶牛在不同时间进行超排效果的结果分析表明, 随着产后时间的延长, 超排效果逐渐改善, 可能是与产后奶牛生殖功能的恢复相关^[30]。胎次 2~4 胎的经产母牛, 超排处理后, 直肠检查卵巢上的黄体数, 较显著地高于其它胎次, 超排对象仍以 2~4 胎的母牛为佳。经产牛在泌乳高峰期超排效果差, 可能是营养水平不够好, 在哺乳期间有些激素 (如催乳素) 较高的原因, 还有待继续研究。

2.3.4 影响奶牛超排效果的其他因素分析

超排技术体系中, 供体牛自身的营养状况和身体状况、饲养管理条件、人工授精效果以及天气状况等许多因素都可影响胚胎回收数量和质量及超数排卵的效果^[31]。

供体牛营养水平: 营养状况对母牛的繁殖性能都有缓慢的、长期的作用, 而在一个情期内, 对排卵率则有更直接的影响。营养水平偏低, 使促性腺激素水平下降, 一方面容易造成超数排出的成熟卵母细胞发育不良丧失受精能力, 另一方面胚胎往往因营养供应不足而退化或发育迟缓^[32]。李颂孙等把牛按体况分为 10 等级, 认为中等膘情(4、5 级)供体牛超排处理后可获得理想的排卵数, 在超排时母牛处于增重过程中(即能量正平衡状况), 就有较好的超排效果^[33]。为了使奶牛多出胚胎, 应降低日粮的蛋白水平, 增加能量水平, 最理想的办法是在超排处理前 2 周时, 将蛋白水平降至 12%, 同时补饲大麦、玉米等高能量饲料。在我们研究中有部分供体牛营养水平偏低, 超排效果也不理想。所以用来作超数排卵的供体牛需加强饲养管理, 在超排前适当补充复合维生素制剂也有利于提高牛的超排效果^[27,34]。

卵巢发育状态: 本试验中超排处理时卵巢上只有黄体存在时超排效果较好, 这与其他研究结果一致^[22]。原因可能是优势卵泡的存在会降低胚胎回收率, 即使在未经产的青年奶牛发情周期中, 优势卵泡的出现仍会增加卵泡闭锁, PG 类药物的应用可能解决这一问题^[35]。在奶牛发情第 9 天开始用 FSH 处理, 结果排卵率和胚胎产量比第 3、6 或第 12 天时开始处理的明显提高。李建栋等研究了奶牛超排前卵巢状态对超排效果

的影响,发现卵巢上有卵泡存在的奶牛超排后发情不正常率比较高。优势卵泡的存在不但抑制其它卵泡的发育,而且还抑制下一个卵泡发育波的产生。从超排日期选择而言,在第一个卵泡发育波产生的当天(发情当天),第二个卵泡发育波产生的当天(牛发情后 10d)对动物进行超排处理,促使更多的卵泡同时发育,可以大大提高超排效果。

季节与气候:季节对超数排卵效果的影响显著,夏季炎热的天气对母牛的发情影响很大,通常会出现母牛的情期不正常,超数排卵失败等情况^[36]。在陕西关中地区进行的试验,7~9月份天气炎热,超数效果差(未统计)。可能是在热应激下,卵泡发育能力和发情表现下降,另外对胚胎的生长发育和附植不利^[37]。因此,胚胎移植工作应尽量避免在夏季炎热时进行。

另外人工授精技术、操作人员的技术水平和熟练程度与胚胎回收率和受胎率有着密切的关系,输精的部位,还有输精的时间要恰当。输精次数对胚胎可用率的影响 1~4 次输精无显著差别,如果母牛持续发情时间正常,常规输 2 次即可(张立资料,未发表)。动物品种不同,个体的差异的存在以及不同个体对药物敏感性不同,超排后的排卵数和回收胚胎数有差异。如果在胚胎移植工作中能尽量避免以上各种不利因素的出现,胚胎的质量将会得到很大的改善,可用胚胎率也可得到提高。

2.3.5 胚胎冷冻和解冻在 MOET 中的应用

本试验结果表明,一步法解冻与常规分步解冻法相比,移植结果差异不显著,该法简便易行,不用在显微镜下脱冷冻保护剂,可直接移植,说明冷冻胚胎一步法解冻后直接装入输胚枪内移植。为了检验胚胎冷冻解冻后质量,确保移植成功率,我们增加了镜检的步骤,解冻后 B 级胚胎占解冻胚胎的 11.73%,移植后的受胎率比 A 级略有降低,但差异不显著,冻胚的总利用率为 99.58%。解冻时若将胚胎自液氮中取出后,直接放入 35~38℃ 的恒温水浴中进行解冻,胚胎易出现透明带破裂现象。在放入水浴中前要在室温空气中停留 6~10 s,效果较好^[38]。

2.3.6 受体牛的因素对受胎率的影响

受体牛是接受胚胎并妊娠至产下牛犊的母牛,受体牛是否合格直接影响胚移的成功与否^[39]。必须选用发情周期正常、无繁殖疾病、无习惯性流产史、膘情良好,年龄在 2~8 岁之间,分娩牛在 60 d 后产道恢复正常的牛才能做受体牛。因为受体牛不同遗传型的种群在对疾病的抗性、对营养的需求、对环境的适应能力、繁殖能力以及价格等方面有着很大的差别,因此在选择受体牛时必须进行多方面综合考虑^[16,40]。通常认为杂种牛优于纯种牛,因为它们具有较高的繁殖能力和更强的生命力^[41]。青年牛优于经产牛,因为青年牛具有易于操作、繁殖力强、生殖系统疾病较少、脂肪层较薄、胚胎移植过程更容易完成等优点^[42]。

受体牛的营养状况:营养状况直接影响受体牛的情期、怀孕率、产犊率及产犊间隔。通常标准为产犊时牛的膘情指数应为 2.5,胚胎移植时应为 2,低于此标准的受体

牛在移植至产犊过程中应加强营养以达到此标准^[43]。由于营养不良,受体牛常不表现发情行为或卵巢静止,即使在 PGF_{2α} 处理后有发情表现,排卵和形成黄体,但通常不能形成功能黄体而分泌维持妊娠所需的激素水平,从而降低了胚胎移植的受胎率^[44]。本试验中其中营养状况不良的受体牛移植利用率较差,直检后即使认为卵巢黄体合格,受胎率仍显著下降。

胚胎移植前受体牛卵巢黄体状况直接影响着移植的效果。移植时卵巢增大,黄体直径达 1.2 ~ 2.0 cm 的受体牛容易妊娠。将胚胎移植到有明显黄体一侧的子宫角,可得到最好的受孕率。孕激素水平的高低代表了母牛的黄体功能。所以有人从黄体维持妊娠的功能出发,尝试提高受体牛妊娠率的研究。一是提高促黄体信号以刺激孕酮分泌,如注射人绒毛膜促性腺激素或长效孕酮;二是依据胚胎着床后黄体的继续维持(这种黄体的维持是由于怀孕后第 16 天母体接收了来自胚胎的信号)。给发情后 5~6.5 d 的受体牛注射孕酮或阴道放置孕酮释放装置可以提高胚移受胎率。Geisert 等 1991 年也报道,给发情后 5 d 的受体牛注射孕酮,同时给受体牛移植 8 日龄的胚胎,结果表明注射孕酮可以降低由于非同期性对受胎率的影响。

受体牛性周期的同步化是胚胎移植中受体牛受孕率高低的关键,要提高胚移受胎率必须从同期性上选择合适的受体牛,药物同期发情和自然发情都必须选择最佳发情时间,以确定移植时间^[45]。对于发情时间稍晚于供体胚胎日龄的受体(即不到发情后第 7 d 的受体),注射孕酮有利于受胎。胚胎发育阶段与受体牛子宫内环境的生理和生化状态的准确同步,有利于移植胚胎的着床。受体牛与供体牛发情同期差在 ± 1 天内时,即发情后 6~8 d 的受体牛受胎效果比较理想。发情后第 8 d 的受体牛,其移植受胎率高于发情后第 6 d 的受体牛。其原因可能是发情后第 8 d 的受体牛黄体功能更完善。结果都证明受体牛的发情早于供体时比晚于供体时的胚胎移植受胎率高^[46]。

受体牛的子宫内环境,产后的时间,泌乳或带犊与否都对受体受胎率影响显著。操作人员的技术熟练程度、输胚时间、输胚部位均对移植有较大影响^[47]。胚胎移植后受体牛的饲养管理也很重要,在妊娠期要进一步加强管理,合理搭配日粮,补充维生素与微量元素,防止流产。

2.4 小结

- 1 试验共超排供体奶牛 1127 头次,回收胚胎共 10900 枚,可用胚胎数量为 6942 枚,超排成功供体牛平均每头次获得胚胎数量为 6.73 枚。
- 2 应用 PSO1 和 PSO2 的超排成功率为 90% 左右,平均回收可用胚胎数分别为 6.12 和 5.98 枚,超排方案可行。利用自然发情后 9~11 d 奶牛制定超排方案 PSO3,超排成功率达到 98.54%,平均可用胚胎数为 7.56 枚,是效果最好的 MOET 方案。
- 3 对青年奶牛性周期的不同阶段分组进行研究,超排处理回收胚胎数不同,应控制超排起始时间。青年奶牛超排宜大于 15 月龄,并应准确制定超排时间。

- 4 进行连续重复超排以 3 次以下为宜,连续 4 次超排处理后极大降低胚胎可用率;另外超排处理的间隔最短时间应该选择 60~70 d,以利供体奶牛生殖机能的恢复。
- 5 超排处理时卵巢状态对超排效果具有影响,卵巢上只有黄体的母牛,超排效果比卵巢上黄体 and 卵泡同时存在的母牛效果好,尤其是卵巢上存在优势卵泡的母牛,有时会造成超排失败。
- 6 年龄、胎次及产后间隔时间对超排效果的影响表明,经产牛 1~3 胎次超排效果较好,7 胎次以上差;产后间隔时间选取 80~90 d,平均可用胚胎数达到 6.49 ± 1.63 枚,与较短间隔时间相比差异显著。
- 7 供体奶牛采用性控精液进行超排处理,平均回收胚胎数为 9.02 枚,平均可用胚胎为 4.70 枚,受胎率与正常体内胚胎移植后的受胎率接近,说明采用性控精液生产性控胚胎的可行。
- 8 采用直接解冻和分步解冻 2 种方法解冻胚胎,胚胎利用率相近,移植后受胎率无差异。以 EG 作为冷冻介质冷冻保存胚胎并于 35 解冻后直接移植,是一种适宜的胚胎移植推广方法。
- 9 受体同期发情处理 CIDR + PG 法比 2 次 PG 法的受体利用率高,但不影响受胎率。同期发情处理后青年受体牛比经产牛的利用率高,同时受体的营养水平严重影响受胎率。

参考文献:

- [1] Armstrong DT. Factors affecting superovulation success[J]. Embryo Transfer Newsletter,1991, (9): 11-17.
- [2] Armstrong DT. Recent advances in superovulation in cattle[J]. Theriogenology,1993,(39):7-24.
- [3] 王念功,马群山,于长江,等.奶牛胚胎移植实用技术的研究[J].黑龙江动物繁殖,1998,6(4):6-7.
- [4] 冯建忠,史远刚,张秀陶,等.牛胚胎移植技术的产业化研究[J].动物科学与动物医学,2001,18(3): 17~19
- [5] 卢春霞,刘长彬,石国庆.影响本地杂交黄牛胚胎移植妊娠率的因素分析[J].草食家畜,2005, 3(1):43~45
- [6] 谭年年,姚蔚,程康敏.等.应用激素提高母牛繁殖率效果研究[J].黄牛杂志,2000,26(5):19~21
- [7] LoosFde, Bevers MM, Dieleman SJ et al. Follicle and oocyte maturation in cows treated for superovulation. Theriogenology, 1991,35:573-546.
- [8] Hawk HW,1988.Gamete transport in the superovulated cow.Theriogenology,29:125-142.
- [9] 马群山,唐德江,祖文蕾,等.影响奶牛胚胎移植技术实际应用的因素分析[J].辽宁畜牧兽医,1999, 12,(6):37-38.
- [10] 刘丑生,李魁.胚胎移植技术在养牛生产中的应用研究[J].甘肃畜牧兽医,2000,2(151):39-41.
- [11] Wright RWJr, Ellington J,1995. Morphological and physiological differences between in vivo- and in vitro -produced preimplantation embryos from lives tocks pecies[J].Theriogenology,44:1167-1189.
- [12] Foote RH, Ellington JE. Is a superovulated oocyte normal?[J].Theriogenology,1988,(29):111-117.
- [13] Lindner GM, Wright RWJr. Morphological evaluation of bovine embryos[J]. Theriogenology, 1983, 20:407-416.

- [14] Sreenan JM, Diskin MG. The extent and timing of embryonic mortality in the cow. Embryo mortality in farm animals[R]. Current topics in veterinary medicine and animal science. The commission of the European communities. 1986.1-7.
- [15] 马群山, 唐德江, 王念功. 关于奶牛在性周期不同阶段超排方法的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2000, 12: 17
- [16] 靳胜新, 桑润滋. 谈牛胚胎移植供体与受体的选择[J]. 中国奶牛, 1998, 2: 35-36.
- [17] 杨俊奎, 王明奇, 李强, 等. 规模化采胚试验总结报告[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2001, 4: 7
- [18] Adams GP. Control of ovarian follicular wave dynamics in cattle: implications for synchronization & superstimulation [J]. Theriogenology, 1994, (41): 19-24.
- [19] Alfuraiji MM, Broadbent PJ, Hutchinson JS, et al. Superovulation using different doses of PMSG and Monoclonal Anti-PMSG in cattle[J]. Theriogenology, 1990, 33: 186.
- [20] 李树静, 余文莉. FSH 配合氯前列烯醇对黑白花奶牛超排处理的效果分析[J]. 四川畜牧兽医, 1997, 4: 8~9
- [21] Herrler A, Elsaesser F, Parvizi N, et al. Superovulation of dairy cows with purified FSH supplemented with defined amounts of LH[J]. Theriogenology, 1991, 35(3): 633~643
- [22] 李建栋, 柏学进, 董雅娟, 等. 奶牛超排前卵巢状态对超排效果的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2000, 36(2): 29-30.
- [23] 胡成华. 进口 FSH 不同剂量对供体牛超排效果的影响[J]. 黄牛杂志, 1995, 21(2): 15~17
- [24] Greve T, Callesen H, Hyttal Petal, 1995. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle[J]. Theriogenology, 43: 41-50.
- [25] 任芳丽, 秦粉菊, 马毅. 奶牛超排方法的研究进展[J]. 黄牛杂志, 2001, 27(2): 36~38
- [26] 唐德江, 魏德庆, 高玉海, 等. 奶牛超数排卵方法初探[J]. 黑龙江动物繁殖, 2000, 8(2): 17~18
- [27] 岳奎忠. 超排对供受体奶牛生产性能和繁殖的影响[J]. 黑龙江动物繁殖, 1996, (4): 16-18.
- [28] 余文莉, 李树静, 苏和, 等. 放牧条件下安格斯、海福特肉牛超排技术的研究[J]. 草食家畜, 2000, 4: 23~25
- [29] 李树静, 余文莉, 乌兰, 等. 牛胚胎移植技术在中国内蒙古的研究和应用[J]. 中国兽医学报, 2001(1): 92-95.
- [30] 朱玉林, 赵俊金, 赵小丽. 牛胚胎移植的发展概况[J]. 农牧产品开发, 2001, 3: 21-22.
- [31] 李剑军. 影响超数排卵的主要因素[J]. 黄牛杂志, 1998, 24(4): 46~47
- [32] 张俊功, 仲跻峰. 饲养水平对供体奶牛超数排卵的影响[J]. 山东农业科学, 2001, 4: 38~39
- [33] Siddiqui MA, Shamsuddin M, Bhuiyan MM, et al. Effect of feeding and body condition score on multiple ovulation and embryo production in zebu cows[J]. Reprod Domest Anim, 2002, 37(1): 37-41.
- [34] 李长春. 硒和维生素 E 对奶牛受胎率影响试验[J]. 黑龙江动物繁殖, 1999, (3): 25.
- [35] 吐尔逊. 司马仪, 梁洪云. 牛超数排卵处理前后卵巢发育情况与超数排卵的效果[J]. 新疆农业科学, 1995, 1: 40 - 41
- [36] 梁洪云, 吐尔逊. 影响奶牛超数排卵效果的因素分析和探讨[J]. 草食家畜, 1994, 4: 22~24
- [37] Newcomb R, Rowson LEA, 1980. Investigations of physiological factors affecting nonsurgical transfers[J]. Theriogenology, 13: 41-49.
- [38] Thibier M, Nibart M, 1992. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals[J]. Animal. Reprod. Sci., 28: 139-148.
- [39] Hasler JF, McCauley AD, Lathropetal, 1987. Effect of Donor-embryo recipient interactions on pregnancy rate in a large scale bovine embryo transfer program[J]. Theriogenology, 27: 139-168.
- [40] Broadbent PJ, Stewart M, Dolman DF. Recipient management and embryo transfer[J]. Theriogenology,

- 1996,35: 125-139.
- [41] 罗明玖,吴铁荣,柏学进.胚胎移植受体牛选择方法探讨[J].黑龙江畜牧科技,2000,2:41-42.
- [42] Broadbent PJ,Stewart M,Dolman DF,1991. Recipient management and embryo transfer[J]. Theriogenology, 35:125-139
- [43] Lowman BG,1985.Feeding in relation to suckler cow management and fertility[J]. Vet.Rec., 117: 80-85.
- [44] Bavister BD,1988.Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro[J]. Theriogenology, 29:143-154.
- [45] 王守岩,等.氯前列烯醇诱导奶牛发情的研究[J].黑龙江动物繁殖,2000,(2):9-10.
- [46] 童伟文,田永祥.牛胚胎移植技术发展概况[J]. 湖北畜牧兽医, 2004,6:15
- [47] 张磊.家畜超数排卵和胚胎移植影响因素[J].中国草食动物,2000,2(4):34-37.

第三章 受体牛同期发情控制的研究

同期发情又叫同步发情,是利用某些激素制剂处理,人为地控制并调整母畜发情周期,将群体母畜从不同的发情周期调整到同一进程,使它们在预定的时间内集中发情。近年来,对牛同期发情技术的研究很多,且取得了较好的同期发情效果^[1]。每一种处理方案都是根据动物的发情周期与激素作用的特点而设计,有利于合理组织配种,推广人工授精,提高繁殖率,也是胚胎移植必须的技术环节^[2]。家畜发情同期化的处理方法基本有两种途径,第一是对全群母畜用孕酮化合物控制其发情和排卵至一定时间,让这群母畜的黄体退化。在撤除外源性孕酮类化合物后,所有的处理母畜都应发情。第二种方法是注射 PGF2 α 及其类似物,溶解黄体,促使母畜发情、排卵^[3]。还有报道应用 GnRH 注射获得同期发情^[4]。

发情鉴定是家畜繁殖学中具有重要意义,特别在同期发情处理中,通过鉴定可以判断母畜发情是否正常,确定配种和胚胎移植时间,达到受胎率提高的目的,也是提高胚胎移植成败的关键^[5]。牛的发情期短,外部表现比较明显,因此母牛的发情主要通过观察,必要时辅以进行直肠检查。早晨观察尤其重要,因为凌晨发情的牛较多。

牛的发情周期平均为 21 天,假如不用同期发情处理,一周内会有 33% 的牛发情,受胎率大约为 65%~70%,那么在一周内会有 $33\% \times 65\% = 21\%$ 的母牛怀孕;同期发情处理会有 75%~90% 的牛发情,受胎率以 65% 计算,那么就至少有 $75\% \times 65\% = 49\%$ 的母牛怀孕。在胚胎移植工作中,同期发情的效果直接关系到移植后的受胎率,也就是影响到胚胎移植的最终效率^[6]。本试验针对高产奶牛繁育过程,特别是胚胎移植中受体牛的组织管理情况进行发情同期化研究,以提高受体牛的利用率,达到降低生产成本和提高工作效率的目的。

3.1 材料与方法

3.1.1 受体牛来源及试验地点

受体牛大部分为陕西关中地区秦川牛,还有部分作为受体牛的低产奶牛及黄牛和奶牛的杂交品种。受体牛的选择主要以青年牛为主,部分选取育成牛,在 1.5~6 岁之间,拥有正常的发情周期,无繁殖机能疾病,经检疫无传染病、健康,膘情中上。经产牛应在分娩后 90 d 以上,且断乳,无流产史。

受体牛饲养管理:受体牛在胚胎移植前 2 个月进入固定胚胎移植场地,在胚胎移植前 8 周加强饲养管理,每日补饲精料,同时补饲充足的维生素、矿物质和微量元素。受体牛单独组群、编号、保持饲养环境相对稳定。

试验地点:胚胎移植地区主要为陕西关中地区,包括西安市的临潼区、蓝田县、户

县,宝鸡市的岐山县、凤翔县、陈仓区,咸阳市的礼泉县、三原县、武功县、泾阳县,渭南市的合阳县、大荔县、富平县,铜川市耀州区,杨凌示范区杨凌科元生物园区。此外还在内蒙古呼和浩特市蒙牛乳业公司及和林格尔县,辽宁大连三环乳业公司,浙江宁波科元畜牧有限公司,山东淄博农业局,重庆渝中区畜牧改良站,江西南昌金牛公司等地进行了胚胎生产和移植。

3.1.2 胚胎来源

鲜胚主要来自于杨陵科元生物工程有限公司奶牛场,供体高产荷斯坦奶牛超排处理获得的可用胚胎。

冷冻胚胎采用杨陵科元生物工程有限公司保存的荷斯坦奶牛冷冻胚胎。

3.1.3 试验用药品及器械

EAZI BREED CIDR (1.9 g Progesterone)	Pfizer Pty. Limited, New Zealand
PG (氯前列烯醇, 0.2 mg)	上海市计划生育科学研究所
GnRH	宁波激素生产有限公司
移植枪	法国卡苏公司
塑料硬外套	法国卡苏公司
无菌软外套	法国卡苏公司
2%利多卡因	泗水希尔康制药有限公司

3.1.4 同期发情处理方法

本试验对受体牛采取 3 种同期发情处理方法, 3 种方法的处理程序见表 3-1。

- I: 二次 PG 注射法: 选择任意一天每头牛肌肉注射 0.4 ~ 0.6 mg 氯前列烯醇, 间隔 11 ~ 12 d 后再注射 1 次 PG, 第二次注射后 2~3 d 观察发情状况, 发情后第 7 天对受体牛进行直肠触诊, 以检查卵巢上是否有功能性黄体, 检验合格后采用非手术法胚胎移植。
- II: CIDR 法: 在周期的任意一天给受体牛放入阴道栓 CIDR, 此时定为第 0 天。放入 CIDR 后的第 10 d, 肌肉注射氯前列烯醇 0.5 ~ 0.6 mg, 第 12 d 取出 CIDR, 并观察发情。发情后第 7 天对受体牛进行直检, 合格后采用非手术法胚胎移植。
- III: 一次 PG 法: 首先通过直肠检查受体牛卵巢的卵泡和黄体情况, 对具有功能性黄体的受体牛肌肉注射氯前列烯醇 0.5 ~ 0.6 mg, 注射后 2 ~ 3 d 进行发情鉴定, 发情后第 7 天对受体牛进行直肠触摸, 合格后采用非手术法胚胎移植。

3.1.5 胚胎解冻与胚胎移植

冷冻胚胎解冻方法如下: 先准备温度为 30 左右的解冻液和培养液, 用镊子从液氮中取出细管, 首先在空气中停留 7~10 s, 然后将细管快速完全投入水浴内, 轻微摆动, 10~15 s 后将细管取出, 擦干净并记录细管胚胎的标签数据。在实体显微镜下直接将胚胎置于解冻液中, 平衡 10 min。将胚胎移入培养液后, 观察胚胎的形态并分级判定, 准

备移植用。

表 3-1 三种同期发情处理程序
Table 3-1 3 kinds of synchronization programmes

时间 d	二次 PG 法	CIDR + PG 法	一次 PG 法
0	第一次注射 PG	放入 CIDR	第一次注射 PG
2	-	-	同期发情观察
9	-	-	胚胎移植
10	-	注射 PG	
11	第二次注射 PG	-	
12	-	取 CIDR	
13	同期发情观察	同期发情观察	
20	胚胎移植	胚胎移植	

供体超排冲胚后获得的鲜胚在培养液中清洗数次，装管后直接用来进行胚胎移植。
采用常规牛胚胎非手术移植法将胚胎移植到受体牛黄体侧的子宫角深部(方法详见第二章)。

3.1.6 中药对受体牛生殖生理的调理

试验为提高受体牛利用率，对经同期发情未能移植的受体牛和妊娠检查未孕受体秦川牛进行生理性用药，主要以中医中药调理生殖机能为主。从补益肾元，调理冲任，养胞助孕入手，具体方案采用自拟方剂进行：主要成分为菟丝子、淫羊藿、枸杞子、肉苁蓉、巴戟天、当归、桃仁、红花、丹皮、熟地、牛膝、桑寄生、续断和女贞子等，粉碎后混于饲料中，隔日一次，连用 3 次。

3.1.7 试验分组与统计学分析

试验一比较 3 种不同方法对受体牛的同期发情处理效果观察，分别为二次 PG 法、CIDR 法和一次 PG 法。
试验二对比自然发情与同期发情处理后对受体受胎率的影响，自然发情组是受体牛群每天进行 3 次以上自然发情观察中选取自然发情的秦川牛，主要应用冷冻胚胎解冻后进行移植；同期发情处理组采用二次 PG 法进行处理。
试验三对移植未孕受体牛和经产受体牛的重复利用进行探索性研究，以中医中药调理生殖机能为主，改善牛生殖机能；应用 GnRH 联合 PG 缩短产后间隔时间等。
每个试验组至少重复 3 次以上，试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

3.2 结果与分析

3.2.1 不同方法处理受体牛的同期发情效果观察

受体牛经二次 PG 处理共 3144 头，发情率为 75.60%，利用率为 65.92%；CIDR+PG

法共处理 1526 头，发情率为 77.85%，受体利用率为 69.11%，一次 PG 法处理受体牛 413 头，同期发情率和受体利用率分别为 72.15%和 66.44%。由表 3-2 可知，3 种同期处理方法同期发情率和受体利用率结果差异不显著 ($P>0.05$)，但 CIDR 法较 PG 法结果要高。受体移植后的鲜胚妊娠率达到 55%以上，冻胚受胎率也在 46~47%，3 种处理方法结果相近。但一次 PG 法在受体牛前期选择过程中淘汰率较高（选取率大约为 45%），同期发情处理时牛只太少而影响胚胎移植效率，综合处理程序步骤和移植程序费用，本试验认为在关中地区受体牛的同期发情以较为简单的二次 PG 法处理为宜。

同时试验表明鲜胚和冻胚移植后的受胎率差异显著，鲜胚达到 55%，而冻胚受胎率维持在 46%~47%之间，与目前国内外报道结果基本相同。

表 3-2 3 种方法处理受体牛同期发情效果
Table 3-2 Synchronization results of recipient cows treated by three methods

同期处理方法	胚胎来源	受体数	同期发情率（%）	受体利用率(%)	妊娠率（%）
二次 PG 法	鲜胚	779	74.56 ^a (581/779)	65.94(383/581)	57.61 ^a (223/383)
	冻胚	2365	75.95 ^a (1796/2365)	65.89(1184/1796)	47.89 ^b (567/1184)
CIDR+PG 法	鲜胚	680	77.77 ^a (523/680)	70.56(369/523)	57.48 ^a (212/369)
	冻胚	846	78.61 ^a (665/846)	67.91(452/665)	46.38 ^b (210/452)
一次 PG 法	鲜胚	229	71.18 ^b (163/229)	66.87(109/163)	55.05 ^a (60/109)
	冻胚	184	73.37 ^a (135/184)	65.93(89/135)	44.94 ^b (40/89)

注：同一列中上标不同表示差异显著，下表同。

3.2.2 自然发情与同期处理后受体牛的利用

受体牛胚胎移植后，进行妊娠检查。结果表明（见表 3-3），自然发情受体的利用率和妊娠率都显著高于二次 PG 法同期处理组（85.49% vs. 65.91%；51.88% vs. 43.76%）($P<0.01$)。但自然发情受体牛数量较少，选取受到条件的限制，也不便管理，在产业化要求便捷推广的基础上，需要提高胚胎的质量和移植技术人员的操作水平和人员数量，实现人工授精技术的普及，才能完成自然发情状态下的胚胎移植。

表 3-3 自然发情与同期处理受体牛的利用比较
Table 3-3 comparison of recipient availability between spontaneous and synchronized methods

发情方式	受体牛数量	同期发情率（%）	受体利用率%	妊娠率（%）
自然发情	124	-	85.49 ^a (106/124)	51.88 ^a (55/106)
同期处理	839	75.10 (630/834)	65.91 ^b (553/839)	43.76 ^b (242/553)

3.2.3 移植未孕受体牛和经产受体牛再次同期发情处理的利用

为了提高胚胎移植受体效率，对首次移植后妊娠检查未孕受体秦川牛进行二次同期发情处理，结果见表 3-4。由表中可以看出，该处理组的发情率、受体利用率和受胎率都显著低于首次同期处理牛($P<0.05$)，部分受体牛在进行 3 次移植后仍然未受胎。经调

查畜主和分析受体组织管理情况，有部分牛以前为屡配不孕牛或者繁殖机能障碍，是造成该结果的主要原因。

表 3-4 首次移植未孕牛二次同期发情处理和胚胎移植结果
Table 3-4 Second synchronization and ET results of nonpregnant recipient after first ET

组别	受体数量	同期发情率（%）	移植利用率（%）	受胎率(%)
首次同期处理组	738	73.98 ^a (546/738)	64.10 ^a (350/546)	47.17 ^a (165/350)
未孕二次同期处理组	216	56.48 ^b (122/216)	48.36 ^b (59/122)	35.59 ^b (21/59)

试验为提高受体牛利用率，对经同期发情未能移植的受体牛和妊娠检查未孕受体秦川牛进行生理性用药，主要以中医中药调理生殖机能为主。采用自拟方剂进行，用药结束后 1 周对受体牛进行同期发情处理并胚胎移植，对照组为相同生理状况的受体牛常规同期发情处理，结果见表 3-5。由表可见，用药后受体牛的发情率和受体利用率都显著提高($P<0.05$)，但对移植后受胎率影响不显著 ($P>0.05$)。

表 3-5 受体牛中药用药后同期发情和胚胎移植结果
Table 3-5 Synchronization and ET results of recipients treated by Chinese traditional medicine

组别	受体数量	同期发情率（%）	移植利用率（%）	受胎率(%)
对照组	138	55.07 ^a (76/138)	47.10 ^a (65/138)	40.00 ^a (26/65)
用药组	89	68.54 ^b (61/89)	60.67 ^b (54/89)	42.60 ^a (23/54)

在比较经产牛的重复利用试验中，以从未进行移植的青年受体牛为对照组，产后处理组的处理程序为牛分娩产犊后，挤出初乳，饲喂犊牛 7 d 左右，并尽快使受体母牛断奶；在 20 ~ 25 d 应用 GnRH 联合 PG 使受体牛提前进入产后第一次发情。自然恢复组是让受体牛在产后自然恢复，大约在 90 d 进行同期发情处理。结果显示，处理组在产后第一次发情间隔时间缩短，减少了牛的饲养成本，经济效益明显。进行同期发情处理后，首次同期处理组（对照组）的发情率显著高于处理组和自然恢复组 ($P<0.05$)，但移植利用与受胎方面没有明显差别。处理组和自然恢复组同期发情率偏低（65%左右），但适应一定的饲养环境，养殖户或公司熟悉该家畜的生产情况，方便管理，因此具有一定的参考价值。另外我们在试验过程中发现，3 次移植后仍然未妊娠的受体，其生殖机能存在不同程度障碍，冷配后受胎率也极低。

表 3-6 经产受体牛通过处理后进行二次胚胎移植效果比较
Table 3-6 The second ET results of multiparous cows treated by GnRH+PG

组别	受体数	产后间隔时间 d	同期发情率(%)	移植利用率（%）	受胎率%
对照组	738	-	73.98 ^a (546/738)	64.10 ^a (350/546)	47.14 ^a (165/350)
处理组	248	20	64.11 ^b (159/248)	62.26 ^a (99/159)	48.48 ^a (48/99)
自然恢复组	96	90	65.63 ^b (63/96)	61.90 ^a (39/63)	46.15 ^a (18/39)

注：同一列中上标不同表示差异显著， χ^2 检验

3.3 讨论

3.3.1 受体牛同期发情处理激素的选择及应用

母畜发情周期的发生,受外部光照、温度、营养等因素的影响,内部受母畜体内的神经和激素变化的影响,而后者将起到主导作用^[7]。在促黄体素(LH)的作用下,卵泡的颗粒细胞和卵泡内膜细胞转变为分泌孕酮(P₄)的黄体细胞而形成黄体。LH和催乳素(PRL)对促进和维持黄体分泌具有协同作用^[8]。如果母畜发情后未配种受孕,则子宫内膜产生前列腺素F₂ α ,破坏黄体组织,使黄体逐渐退化萎缩,P₄分泌量急剧下降^[19]。垂体由于脱离P₄的抑制作用,又开始分泌促卵泡素(FSH),引起排卵前LH的释放,导致另一个发情周期开始。正常发情周期就是这样周而复始地进行着。母畜在受外部环境的影响下,丘脑下部的某些神经纤维释放促性腺激素释放激素,沿着垂体门脉循环至脑下垂体前叶,调节其促性腺激素的分泌,所分泌的FSH通过血液循环至卵巢,促进卵泡的发育并分泌雌激素(E₂)^[9,10]。雌激素由血液循环到大脑皮质,引起母畜的发情,同时雌激素对下丘脑和垂体具有反馈作用,以调节促性腺激素的释放,当雌激素分泌量大时抑制垂体前叶分泌FSH;另一方面又促进LH的释放,出现排卵前的LH峰,引起卵泡的排卵^[11]。

由于牛的发情周期和妊娠期长,加之胚胎移植时还要求受体牛的黄体质量好,因而在生产应用中仅靠选择自然发情牛来确保足够数量的可移植受体牛比较困难。所以同期发情处理已成为进行规模化胚胎移植的重要环节。同期发情的效果与所用药品的种类、剂量、使用方法有直接关系。本研究采用CIDR诱导受体牛同期发情,得出的结果与有关研究报道的结论基本一致^[12]。这说明应用CIDR加氯前列烯醇方法对同一品种受体牛进行同期发情相对集中,CIDR+PG法可以得到较高的同期发情和移植妊娠率^[6],故是行之有效的同期发情方法。同期发情的另一种方法是使用前列腺素(PG),其作用机理和孕激素类药物完全不同^[13]。一次PG注射法中,注射PG时卵巢上有黄体存在的牛发情率和可移植率分别极显著和显著高于无黄体存在牛。究其原因,一方面是母牛有功能性黄体的存在,使PG发挥其“溶黄体”的作用,从而获得较好的发情效果^[14];另一方面是排卵不久(0~5 d)的新生黄体对PG的感受性低,而发情后期(17~20 d)则因正处于黄体消退期,外源PG的效果未能表现^[15]。因此在本试验中采用一次PG注射法中,选择被处理受体牛时必须在注射时进行直肠触诊,检查有无功能性黄体,对于没有功能性黄体的受体牛就无须处理。而在二次PG注射法中,因为二次注射时间相隔11 d,从理论上说,无论第一次注射有无黄体,在第二次注射PG时受体应该都是处于有功能性黄体的时期,因此可以达到比较理想的发情同期化效果。本试验结果也证实了这一点。

3.3.2 提高受体牛同期发情利用率的措施

为了提高胚胎移植受体牛利用率,常对经过首次移植后妊娠检查未孕受体牛进行再次同期发情处理。但是,和首次移植的受体相比,这类受体牛发情率、受体利用率和受

胎率都显著下降,对于连续 2~3 次移植后仍然未受孕者应予以淘汰。对初选未移植和妊娠检查未孕的受体秦川牛进行生理性用药^[17],用药后受体牛的发情率和受体利用率都显著提高,但对受胎率影响不显著。说明本试验所应用的中药方剂有促进母牛生殖机能的作用,特别是能促进卵巢功能的恢复。

在比较经产牛的重复利用试验中,以从未进行移植的青年受体牛为对照组,结果显示,处理组产后间隔时间明显缩短,减少了牛的饲养成本,经济效益显著。因为经产牛已经适应了原来的饲养环境,养殖户或公司熟悉该家畜的生产情况,管理方便,因此具有一定的参考价值^[16]。另外我们在试验过程中发现,3 次移植后仍然未妊娠的受体,其生殖机能存在不同程度障碍,即使配种受胎率也很低。

3.3.3 影响受体牛胚胎移植受胎率的因素分析

牛的营养状况对同期发情影响显著。一般认为,为了保证受体牛同期发情率及其发情可用率,对受体牛一定要加强饲养管理,提高营养水平^[18]。本研究结果表明,在对受体牛同期发情处理中,无论是用二次 PG 法还是 CIDR + PG 法,受体发情率和移植受胎率与受体牛的营养状况有很密切的关系。若受体牛营养不良,无论采用何种方法,其发情同期化效果均很差。

受体牛的繁育状况也影响其利用率及移植受胎率。哺乳期黄牛不可作为受体使用,必须事先停止哺乳一定时期以后方可进行同期发情处理。牛的胎次对妊娠率有一定的影响。另外季节、天气变化等因素对受体牛の利用也具有重要影响,如炎热的夏季、寒冷的冬季以及恶劣的环境状况如噪音等都会影响受体牛的同时发情效果和移植受胎率。

3.4 小 结

1 研究中共处理受体牛 5083 头,二次 PG 法和 CIDR 法处理受体牛同期发情结果相近,受胎率差异不显著,一次 PG 法需要初选的受体数量要求较大。考虑到经济因素,认为受体牛的同时发情以较为简便的二次 PG 法处理为宜。

2 自然发情受体的利用率和妊娠率分别达到 85%和 52%,都显著高于二次 PG 法注射同期处理组,选取自然发情牛作为受体显著提高胚胎移植成功率。

3 未孕受体牛进行二次同期发情处理后再次移植,其发情率、受体利用率和受胎率都显著低于首次同期处理组。以中医中药调理用药后进行同期发情处理,受体利用率显著提高,受胎率也有所增加。

4 经产牛在产后 20~25 d 应用 GnRH 联合 PG 调节激素水平,使其提前进入产后发情,受体利用率和自然恢复组相近,但大大缩短产间距,经济效益明显。同时结果表明产后间隔时间延长妊娠率提高。

参考文献:

[1] 郭志勤,张沅,陈东,等.家畜胚胎工程.北京:中国科学技术出版社,1998.1-6

- [2] 张俊茵,仲跻峰,王文英. 引进良种肉牛胚胎规模化移植技术研究. 畜牧兽医学报, 2001,32(4):289-294.
- [3] 和占星 1,和协超,罗在仁等.云南水牛同期发情、超数排卵和胚胎移植试验. 动物学研究, 2005, 26(1):106-111
- [4] 吕津,桑润滋.牛羊超数排卵方法研究进展.黑龙江动物繁殖, 200513(1): 13~16
- [5] 黄光荣,谢鸿. 提高母牛同期发情受胎率的措施. 广西畜牧兽医,2005,21(2) :36~39
- [6] O'Callaghan D, Yaakub H, Hyttel P, et al. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. J Reprod Fertil, 2000, 118(2):303-313.
- [7] 卢春霞,刘长彬,石国庆. 影响本地杂交黄牛胚胎移植妊娠率的因素分析. 草食家畜(季刊),2005,,1:43 ~ 45
- [8] 李传学,王长涛,李曙光. 鲁西黄牛胚胎移植试验报告黄牛杂志 2005,3(1):12~14
- [9] 罗海玲.胚胎移植相关技术研究进展及存在的问题.中国畜牧兽医,2004,31(12):36~38
- [10] Ullah G, Fuquay J W, Keawkhong T. Effect of go-nadotropin-releasing hormone at estrus on subsequent luteal function and fertility in lactating Holsteins during heat stress . J Dairy Sci, 1996,79(11): 1950-1953.
- [11]滕春波,丁乃峰,杨增明. 黄体退化的分子机制及早期黄体钝化的某些原因探讨. 中国畜牧杂志,2002,38(4):55-57.
- [12] Lauderdale JW. Effects of $\text{PGF}_{2\alpha}$ on pregnancy and estrous cycle of cattle. J Anim Sci, 1972, 35(1):246.
- [13] Xu ZZ, Burton LJ . Estrus synchronization of lactating dairy cow with GnRH, progesterone, and prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$. J Dairy Sci, 2000, 83(3): 471-476.
- [14] 张忠诚,朱士恩. 正确使用生殖激素提高奶牛繁殖效率. 中国奶牛, 1997,3: 28-30.
- [15] 王守信,王吉吉,刘广文. 氯前列烯醇诱导奶牛同期发情的研究. 黑龙江动物繁殖, 2000, 8(2):9.[4] 滕勇. GnRH、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 诱导奶牛同期发情效果的比较.黄牛杂志, 2002, 28(5):122.
- [16] 罗明玖,吴铁荣,柏学进.胚胎移植受体牛选择方法探讨[J].黑龙江畜牧科技,2000,2:41-42.
- [17] 李俊生,桑润滋,马亚宾. 生殖激素提高母牛繁殖率的研究进展. 河北畜牧兽医, 2000, 16(5):14.
- [18] 苏和,刘长海,栗军,等. 放牧条件下受体牛同期发情技术研究. 中国畜牧杂志, 2001, 37(2):32-33.
- [19] Lucy MC , Billings HJ , Butler WR. Efficacy of an intravaginal progesterone insert and an injection of $\text{PGF}_{2\alpha}$ for synchronizing estrus and shortening the interval to pregnancy in postpartum beef cows, peripubertal beef heifers, and dairy heifers . J Anim Sci, 2001, 79(4): 982-995.

第四章 奶牛体外胚胎批量生产的研究

在早期哺乳动物胚胎体外生产 (IVP) 研究中,特别在体外受精 (IVF) 技术研究中,发现体外成熟的卵母细胞其发育潜力比体内成熟的卵母细胞低,主要存在“体外发育阻滞”,牛胚胎发生在 8-细胞期至 16-细胞期。如何提高囊胚期胚胎的质量和数量便成为 IVF 技术研究的焦点。目前应用已知成分培养液来研究卵母细胞体外成熟的调控机理和影响体外受精、体外发育的各种生理生化因素及其作用机理已取得了不少成果。

自从第一头 IVF 牛出生已有 20 年的历史^[1],而且在体外生产可移植囊胚也做了不少探索性工作。然而,从卵母细胞发育到囊胚阶段还保持在 10-30% 的水平,而在体内成熟,体外受精和胚胎培养的囊胚率在 50-80%^[2],因此,优化成熟环境、控制受精和培养条件对于提高体外胚胎生产及胚胎移植成功具有重要意义^[3]。如果牛卵母细胞体外成熟 (IVM),体外受精 (IVF) 及胚胎体外培养 (IVC) 要投入成功的商业化生产,须生产出高质量的胚胎,而且能够正常妊娠。目前为了保证卵母细胞的稳定来源,遗传背景清楚及质量可靠等,活体采卵技术也应用到生产当中,为体外获得优良胚胎提供了条件。但是大胎综合症 (Large offspring syndrome, LOS) 一直是体外生产胚胎所带来的后遗症,也限制了这项技术的应用。主要原因还是归结为体外培养体系不完善,如体外培养氧气浓度过高,血清的毒副作用以及共培养等都可能是造成 LOS 的原因^[3]。如何取其利,避其害,使得培养体系与体内环境相吻合,才是获得高质量胚胎的关键所在。同时性别控制成为畜牧业发展的亮点,X、Y 精子分离技术日益完善,应用 IVF 技术生产性控胚胎对推动高产奶牛群扩繁意义重大,并且使用性控冻精进行 IVF,目前国内鲜见报道。

本试验主要目的是通过借鉴已有成果,进一步优化胚胎体外生产 (IVP) 技术关键条件,生产高质量的胚胎 (包括性控胚胎的体外生产),为实现其产业化奠定基础。

4.1 材料与方法

4.1.1 试验使用药品与设备

试验用无机盐试剂除特别说明外,均购自 Sigma 公司。

DPBS (无钙、镁) 实验室自制; Mill-Q 超纯水; 45% Percoll; EGF; IGF-I; BSA; Hoechst33342 等。

卵母细胞成熟液: M199+10% FBS+10 mM Hepes+丙酮酸钠+10 $\mu\text{g/mL}$ FSH+10 $\mu\text{g/mL}$ LH+1 $\mu\text{g/mL}$ E₂;

精子获能和受精液: BO 液+50 $\mu\text{g/mL}$ Heparin (Sigma);

胚胎培养液: 采用 CR1aa 和 SOFaa 两种培养液;

性控精液: 购自内蒙古赛科星生物科技有限责任公司生产的性控冻精, 0.25 mL 塑

料细管，每支含 200 万个 X 精子。

4.1.2 试验时间与地点

试验时间：2001.9 ~ 2005.3。

试验地点：西北农林科技大学生物工程研究所和杨凌科元生物工程有限公司种牛场。

4.1.3 牛卵泡卵母细胞复合体的采集与体外成熟

牛卵巢采自西安屠宰场，置卵巢采集液中（20~30℃），3~4 h 内运到实验室。用卵巢采集液洗涤 3 次，并剪去输卵管组织，然后用 12 号针头抽吸卵巢表面 2~8 mm 卵泡，采集的卵泡液放入拣卵液中，体视显微镜下拣取卵丘卵母细胞复合体（cumulus oocytes complex, COC），COC 用洗卵液洗涤 3 次，放入直径为 35 mm 盛有 2 mL 经预先平衡的成熟液的平皿中，置 CO₂ 培养箱，38.5℃、5%CO₂、饱和湿度培养 22~24 h。

4.1.4 精子获能与体外受精

在 10 mL 离心管中先加入 90% Percoll 液 2 mL，然后加入 45% Percoll 液 2 mL，即制成 Percoll 不连续密度梯度液，置于 CO₂ 箱中平衡 1~2 h。冷冻精液（0.5 mL）在 39℃ 水浴中解冻后，置于经平衡的 Percoll 液上，400 g 离心 10 min 后，弃掉上清液，底部精子团用 5 mL SP-TALP 液稀释后，100 g 离心 10 min，洗涤 2 次并调整精子浓度。

或采用上浮法进行精子获能，将冻精轻轻的注入盛有 2~3 mL 获能液的试管底部，倾斜 30~45 度，在培育箱中孵育上游 30~60 min，然后取上清 1.5~2 mL，700 g 离心 5 min，底部所获高活力精子，将其按上述比例加入受精微滴中。受精液为 BO 液，受精液做成 100 μL 的微滴，上面覆盖灭菌石蜡油，放入 CO₂ 箱中平衡 1~2 h。将成熟的卵母细胞用受精液洗涤 3 次后，移入受精液滴中，每滴内放入 20~40 枚卵母细胞，并加入获能精子，使精子终浓度为 2×10^6 /mL 或 5×10^6 /mL，放入 CO₂ 箱中共培养 18 h。

4.1.5 胚胎培养

受精后，将受精卵在 PBS 液中洗数次，使得黏附在外周的精子全部脱落，但是外周还要保留部分颗粒细胞。培养于 4 孔板，分组对照培养，培养液用 CR1aa 和 SOFaa，培养液体积为 1 mL，在培养过程中，每 48 h 半量换液一次。记录卵裂和囊胚情况。

4.1.6 胚胎细胞计数

囊胚细胞的染色计数，用 Hoechst33342（Sigma）染色，在荧光显微镜下细胞计数。

4.1.7 数据处理

每批分组处理，采用方差分析和 t-检验，即 $P < 0.05$ 为差异显著。

4.2 结 果

4.2.1 卵泡直径与卵母细胞的成熟

本试验将不同直径卵泡中的卵母细胞进行体外成熟，比较发育能力。3~6 mm 的卵泡卵母细胞受精比例显著的高于 1~3 mm 组和 6 mm 以上组，受精率和卵裂率分别达 90.5%和 86.4%，并且平均发育时间也要比另外两组提前 5 h 以上（见表 4-1）。不同上标表示差异显著，即 $P<0.05$ 。以下各表相同。

表 4-1 不同直径卵泡中卵母细胞的成熟及发育能力的对比
Table 4-1 Comparison of maturation and developmental ability of oocytes from different diameter follicles

卵泡直径	卵母细胞数	受精率（%）	2 细胞卵率(%)	发育到 2-c 时间(h)
1~3 mm	120	43.3 ^a (52/120)	36.7 ^a (44/120)	56
3~6 mm	300	90.5 ^b (285/300)	86.4 ^{c*} (246/300)	43
6 mm 以上	136	75.8 ^c (103/136)	65.0 ^{b*} (67/136)	48

注：表中同列数据后字母为显著性标记。字母相同差异不显著，字母不同差异显著($P < 0.05$),下表同。

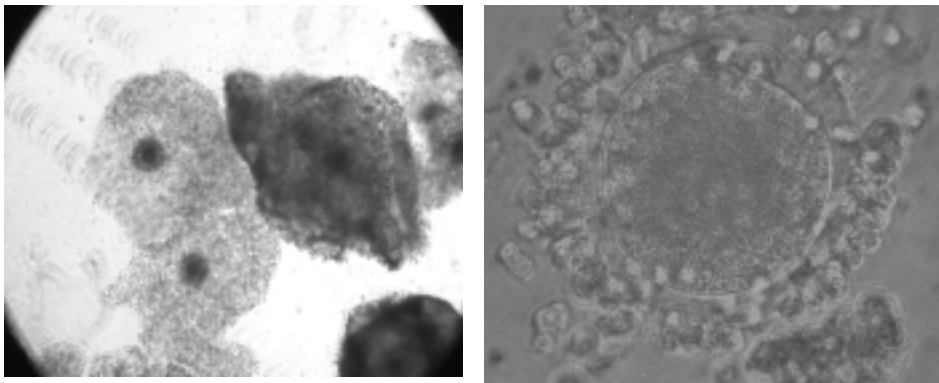


图 4-1,2 卵母细胞成熟与颗粒细胞层扩张
Fig4-1,2 Oocyte maturation and cumulus expansion

4.2.2 EGF 对卵母细胞成熟的影响

在成熟液中添加不同浓度的 EGF，对卵母细胞的成熟效果影响差异显著，添加 10 ng/mL EGF，第一极体率达 87.4%，正常受精率为 93.2%，囊胚发育率为 36.7%，都显著的高于未添加 EGF 组（ $P<0.05$ ），就添加组而言，没有发现差异，但从趋势上来说，添加 10 ng/mL EGF，卵母细胞的成熟、受精和发育效率较高。

表 4-2 成熟液中添加 EGF 对牛卵母细胞成熟及发育潜力的影响

Table 4-2 The effect of addition of EGF in maturation medium on oocyte development

EGF/mL	试验次数	卵母细胞	第一极体率(%)	正常受精率(%)	囊胚发育率(%)
0	5	200	63.0 ^a	65.0 ^a	19.0 ^a
5ng	5	243	82.7 ^b	85.6 ^b	33.2 ^b
10ng	5	196	87.4 ^b	93.4 ^b	36.7 ^{b*}
20ng	5	121	86.8 ^b	90.1 ^b	36.2 ^{b*}

4.2.3 颗粒细胞与卵母细胞成熟

本试验分四组，观察颗粒细胞与卵母细胞的成熟的关系，裸卵卵裂率显著的低于有颗粒细胞组 ($P<0.01$)，囊胚发育率和扩张率为 0。有 3 层以上的卵母细胞，卵裂率，囊胚率及扩张率都比其它组有显著的提高 ($P<0.05$)。机械去除颗粒细胞的卵母细胞成熟受精比裸卵高 (23.0% vs 3.6%)，但囊胚发育也为 0。

表 4-3 颗粒细胞在牛卵母细胞成熟中的作用

Table 4-3 The effect of cumulus cells on bovine oocyte maturation

颗粒细胞	卵母细胞	卵裂率 (%)	囊胚率 (%)	扩张囊胚率 (%)
无	100	3.6 ^{c*}	0	0
1-3 层	190	33.0 ^{b*}	4.7 ^b	0
3 层以上	300	85.5 ^a	37.8 ^a	34.6 ^a
机械剥离	100	23.0 ^{b*}	0	0

4.2.4 精子处理方法与受精能力的比较

Percoll 梯度离心法与上浮法，精子的回收率分别为 63.0%和 31.0%，差异显著 ($P<0.05$)。但是受精能力和后期胚胎的发育能力，差异不显著。

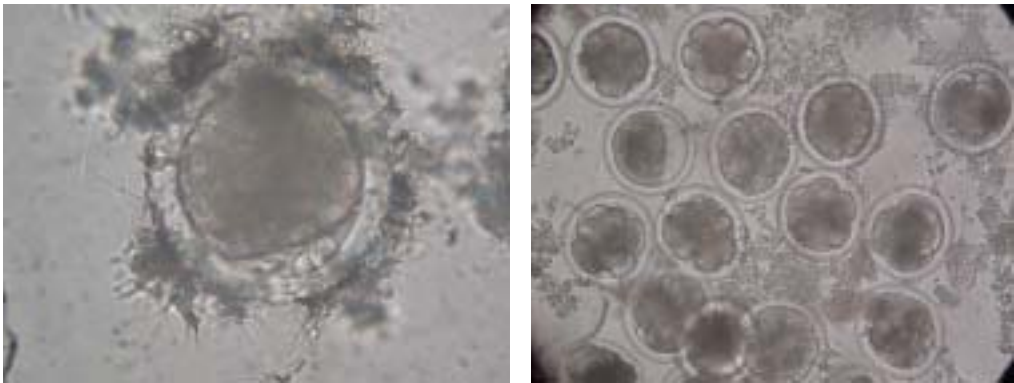


图 4-3,4 受精后第二极体排出和早期胚胎

Fig 4-3,4 The second polar body after fertilization and early embryo

表 4-4 精子的不同处理法对受精及卵裂的影响

Table 4-4 The effect of different treatments of sperm on oocyte fertilization and cleavage rate

处理方法	精子回收率(%)	成熟卵母细胞数	受精率(%)	卵裂率(%)	囊胚率(%)
Percoll 法	63 ^a	260	79 ^a	76 ^a	30.1 ^a
上浮法	31 ^b	230	71 ^a	65 ^a	28.7 ^a

4.2.5 咖啡因对精子活力和获能的影响

本试验将咖啡因分别以 0, 0.3 mmol/L, 3 mmol/L 加入精子获能液中发现其并未能有效的提高精子获能效率, 而且受精数下降, 特别是将其浓度调整为 3 mmol/L 时, 受精数下降为 53.0%, 显著的低于其它两组 ($P<0.05$), 但是单精受精在 0, 0.3 及 3 mmol/L 组中分别为 79.2%, 70.8% 和 39.5% ($P<0.05$), 在 3 mmol/L 组中, 多精子受精有所增加。

表 4-5 受精液中添加咖啡因对精子获能的影响

Table 4-5 The effect of addition of caffeine in fertilization medium on sperm capacitation

咖啡因浓度 mmol/L	卵母细胞	受精数(%)	单精受精(%)	多精子受精(%)
0	320	86.9 ^a (278/320)	79.2 ^a (253/320)	7.7 ^a (25/320)
0.3	130	80.0 ^a (104/130)	70.8 ^a (92/130)	9.2 ^b (12/130)
3	172	52.9 ^b (91/172)	39.5 ^b (68/172)	13.4 ^{ab} (23/172)

4.2.6 不同蛋白质添加物对体外受精胚胎发育的影响

本试验在培养液中, 添加 0.3% BSA, 5% FBS 和 0.1% PVA(蛋白质替代物), 发现 0.3% BSA 组卵裂率为 84.3%, 显著的高于血清组和 PVA 组, 囊胚发育率则是 BSA 和 FBS 组发育率分别为 25.6% 和 28.0%, 高于 PVA 组囊胚 12.0% ($P<0.05$); 观察扩张率时, PVA 中未获得扩张囊胚, FBS 组为 19.8%, BSA 组为 10.0%; 囊胚的细胞数分别为 PVA 为 53 ($P<0.05$), BSA 为 86, FBS 为 80(见表 4-6)。

表 4-6 不同蛋白质添加物对体外受精胚胎发育的影响

Table 4-6 The effect of different protein additives on embryo development in vitro

添加物质	卵母细胞数	卵裂率(%)	囊胚率(%)	扩张囊胚率(%)	囊胚细胞数
0.1%PVA	266	76.8 ^a	12.0 ^a	0	53.83±12.18 ^a (n=10)
0.3%BSA	331	84.3 ^b	25.6 ^b	10.0 ^b	86.74±7.26 ^b (n=10)
5%FBS	500	67.0 ^c	28.0 ^b	19.8 ^c	80.65±15.31 ^b (n=10)

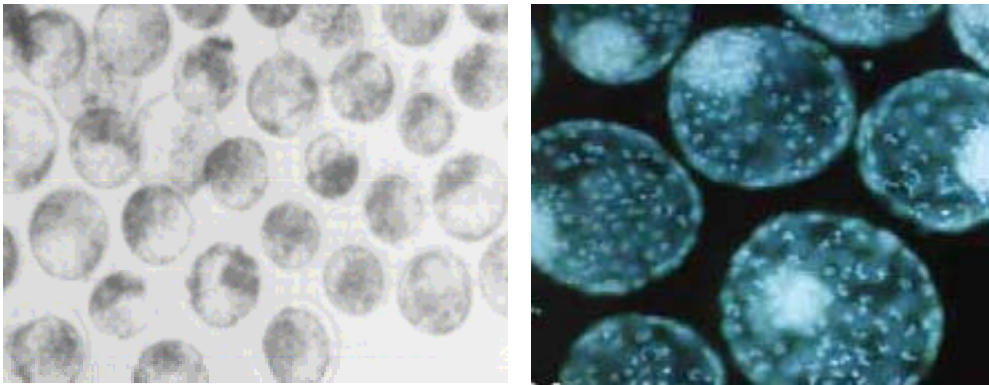


图 4-5,6 体外生产囊胚与囊胚的荧光染色

Fig 4-5,6 Blastocysts in vitro production and nuclei stained with Hoechst 33342

4.2.7 不同浓度 NEaa(非必需氨基酸)与 Eaa(必需氨基酸)对胚胎发育的影响

本试验在培养液中添加 0 , 1% , 2%浓度的必需和非必需氨基酸 , 发现 2%非必需氨基酸能显著的提高胚胎囊胚率和囊胚的细胞数 ($P<0.05$) , 囊胚率为 34% , 胚胎细胞数 93 ; 而对于必需氨基酸来说 , 不同添加浓度对胚胎的囊胚发育不显著 , 但当添加 1%的 Eaa 后 , 囊胚细胞数最高为 96 个 , 差异显著。

表 4-7 不同浓度的 NEaa 与 Eaa 对胚胎发育的影响
Table 4-7 The effect of different concentrations of NEaa and Eaa on embryo development

氨基酸种类	添加浓度(%)	2-cell 数	囊胚率 (%)	囊胚平均细胞数
NEaa	0	156	19 ^a (30/156)	76.11±11.78 ^a (n=10)
	1	177	29 ^b (51/177)	81.36±10.11 ^a (n=10)
	2	200	34 ^b (68/200)	93.59±8.96 ^b (n=10)
Eaa	0	143	25 ^a (36/143)	73.77±15.91 ^a (n=10)
	1	140	28 ^a (39/140)	96.29±18.21 ^b (n=10)
	2	157	23 ^a (36/157)	70.17±13.36 ^a (n=10)

4.2.8 不同培养液组合对胚胎发育的影响

本试验采用不同的培养液组合 , 所有培养液中在前 3 d 都添加 BSA 0.3g/100mL , 3 d 后添加 5%的 FBS。观察胚胎发育变化得出 , 在胚胎发育到 6d, CR1aa+SOFaa , 发育到囊胚最高 , 达 34.8% , 其次是 SOFaa+CR1aa 和 CR1aa , 分别为 31.6%和 26.3% , SOFaa 只有 17.0%发育到囊胚 ;发育到 7~9d , CR1aa+SOFaa 中 , 囊胚达 38.0% , 而最低在 SOFaa , 仅为 29.0% ; 囊胚总数也是在 CR1aa+SOFaa 中出现达 43.0% , 平均细胞数为 113 ($P<0.05$)。

表 4-8 不同培养液对胚胎发育的影响
Table 4-8 The effect of different culture media on embryo development

组别	培养液	受精卵	6 d 早期囊胚 发育率 (%)	7-9 d 囊胚 率 (%)	囊胚率 (%)	扩张囊胚平均细胞数
1	CR1aa	300	26.3 ^a	34.7 ^{ab}	39.0 ^a	97.35±12.41 ^{ab} (n=10)
2	SOFaa	300	17.0 ^c	29.0 ^b	36.5 ^b	85.32±15.14 ^b (n=10)
3	CR1aa (0-72h) +SOFaa(72-)	300	34.7 ^b	38.0 ^a	43.2 ^a	113.61±7.94 ^a (n=10)
4	SOFaa(0-72h)+ CR1aa(72-)	300	31.7 ^b	36.3 ^a	40.0 ^a	102.47±10.19 ^a (n=10)

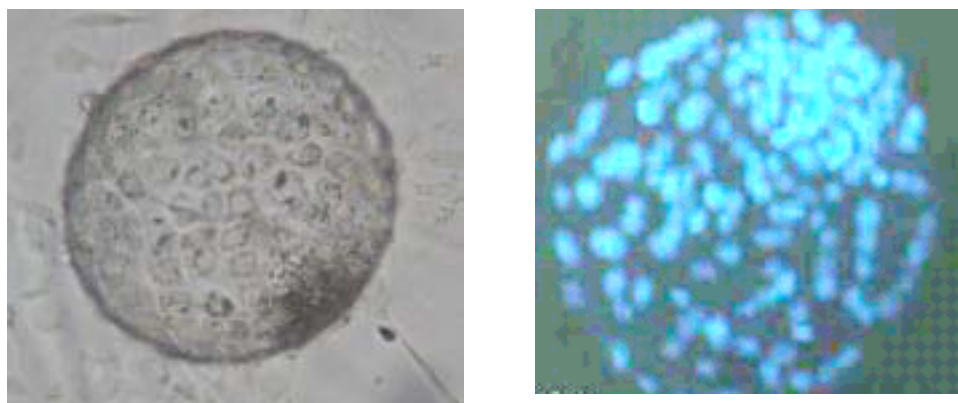


图 4-7, 8 扩张囊胚与荧光染色细胞计数
Fig 4-7,8 Expanded blastocysts and nuclear counts

4.2.9 IGF-I 对牛胚胎体外发育的影响

本试验观察添加IGF-I后，观察胚胎发育的变化。添加IGF-I，对胚胎的发育有显著的影响，添加50 ng/mL和100 ng/mL，囊胚率分别为49.7%和48.5%，显著的比未添加所获39.4%囊胚率高 ($P<0.05$)，而且添加100 ng/mL，囊胚的扩张效率最高达42.1%；但是它们对卵裂率无显著的影响 ($P>0.05$)。

表 4-9 IGF-I对牛胚胎体外发育的影响
Table 4-9 The effect of IGF-I on embryo development

培养液	卵母细胞	卵裂率 (%)	囊胚率 (%)	扩张囊胚 (%)	总囊胚率(%)
CR1aa	200	90.0 ^a (180/200)	18.3 ^a (33/180)	21.1 ^a (38/180)	39.4 ^a (71/180)
CR1aa+50 ng/mL	200	91.5 ^a (183/200)	11.4 ^b (21/183)	38.2 ^b (70/183)	49.7 ^b (91/183)
CR1aa+100 ng/mL	200	85.5 ^a (171/200)	6.4 ^b (11/171)	42.1 ^b (72/171)	48.5 ^b (83/171)

4.2.10 颗粒细胞共培养对胚胎发育的影响

本试验发现颗粒细胞共培养对胚胎的发育有着显著的影响($P<0.05$),牛颗粒细胞和山羊颗粒细胞共培养,囊胚发育率分别为39.4%和41.8%,扩张率分别为35.2%和39.0%,显著的高于无共培养组的23.0%和2.0%;但是共培养对卵裂率无显著影响($P>0.05$)。

表4-10 颗粒细胞共培养对胚胎发育的影响
Table 4-10 Effect of cumulus co-culture on embryo development

细胞类型	卵母细胞	卵裂率(%)	囊胚率(%)	扩张囊胚率(%)
无	300	86.0	23.0 ^{b*}	2.0 ^{b*}
牛颗粒细胞	300	83.9	39.4 ^a	35.2 ^a
山羊颗粒细胞	300	83.0	41.8 ^a	39.0 ^a

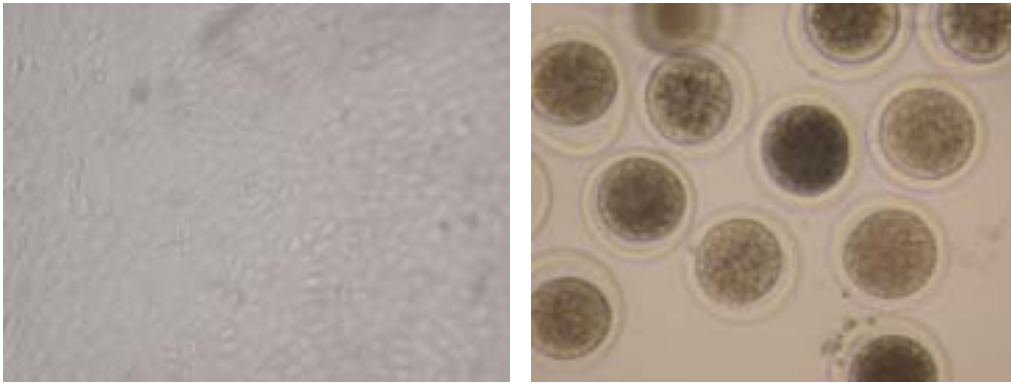


图 4-9,10 共培养细胞层和去除颗粒细胞的卵母细胞
Fig 4-9,10 Co-culture cells and oocytes without cumulus

4.2.11 性控精液生产体外受精胚胎及移植

本试验使用性控精液体外生产胚胎并且移植部分胚胎。不同批次间卵裂率无显著差异,平均为65.9%,低于普通精液(未列出数据)。囊胚率之间无限显著差异,平均为36.5%。共移植4批,107头受体,使用囊胚127枚,2月后直肠检查受体,妊娠42头,妊娠率为39.4%。说明这一培养体系较为稳定,能够生产出正常的胚胎。

表 4-11 性控精液生产体外受精胚胎及胚胎移植
Table 4-11 Embryo production *in vitro* by sexed sperm and embryo transfer

批次	卵母细胞	卵裂率(%)	囊胚率(%)	移植胚胎数	移植受体	妊娠受体数	妊娠率%
05211	210	71 (149/210)	36 (54/149)	26	21	9	42.8(9/21)
05219	233	63 (147/233)	39 (57/147)	33	26	9	34.6(9/26)
05222	198	75 (148/198)	35 (52/148)	40	33	13	39.0(13/33)
05225	355	60 (213/355)	36 (77/213)	28	27	8	29.6(8/27)
合计	996	66(657/996)	36(240/657)	127	107	39	36.5(39/107)

4.3 讨论

4.3.1 不同直径卵泡卵母细胞体外受精后的卵裂

朱淑文等^[4]研究结果表明,小卵泡内的卵母细胞在体外添加 FSH 和血清的培养基中培养 22 h,其体外受精后的卵裂率可达 63.7%,说明 FSH 和血清能促进卵母细胞的成熟和受精。而大卵泡内卵母细胞的卵裂率比较低,这可能是由于卵母细胞的老化引起受精率降低。本实验发现,1~3 mm 和 6 mm 以上卵泡卵母细胞的发育能力要比 3~6 mm 的差,而 3~6 mm 的卵泡卵母细胞不论从发育速度,受精能力和发育潜力都要强于另外两类卵母细胞。据报道,6 mm 以上的卵泡卵母细胞容易出现染色体变异,这也许是卵母细胞老化的原因。体外成熟培养的卵母细胞由于卵泡大小不同,受精后染色体异常发生率也不同,小卵泡所获胚胎染色体异常发生率明显高于中卵泡的发生率,但与大卵泡卵母细胞胚胎染色体异常发生率无显著差异^[]。因此,在选择卵母细胞时,卵泡大小也是非常重要的指标。从正常生理角度来说,小卵泡还需要发育,大卵泡趋向老化。许多研究证明,在体外培养体系中,血清是必不可少的因素,它可促进卵母细胞的体外成熟,本试验发现,成熟液中添加较高浓度的血清,3~6 mm 卵泡卵母细胞对其毒副反应效应有较强的耐受能力,而 3 mm 以下组,多表现为胞质黯淡等退化现象,6 mm 则出现胞质色泽过浅等。在牛卵母细胞的体外成熟培养中,添加一定量的 FSH、LH 及雌激素有利于核成熟,极体排出率高且形态正常。

4.3.2 EGF 对卵母细胞成熟的影响

一般来说,卵母细胞体外成熟效果比体内成熟的差,这些主要与胞质成熟有关^[5],为此本试验采用成熟液中添加 EGF,探讨提高卵母细胞成熟的效率。从试验得出,EGF 对牛卵母细胞的成熟,正常受精有显著的提高,而且在胚胎的发育能力上,也要显著的优于对照组。但是在胚胎培养初期,在胚胎培养液中添加 EGF,并未见囊胚发育有显著的变化($P>0.05$,未列出)。因此,EGF 对卵母细胞到囊胚的发育能力主要来源于卵母细胞成熟时期,表明在成熟液中添加 EGF,能够有效的改善卵母细胞的发育潜力。在试验中,成熟液添加 EGF 成熟率显著提高,说明其能促进核成熟,而且当有 EGF 存在时,颗粒细胞的扩张更为充分,进一步促进卵母细胞核成熟。以前报道 EGF 对正常受精无显著作用,本试验却发现,其对正常受精有促进作用。说明对胞质成熟有显著的影响。但是,EGF 是否通过对颗粒细胞,进而促进卵母细胞,还是直接与卵母细胞上受体发生作用,还有待于进一步研究。但是从试验得出,在成熟液中添加 10ng/mL 的 EGF 利于核质成熟。

4.3.3 颗粒细胞层对卵母细胞及胚胎发育的影响

通过实验得知,颗粒细胞在卵母细胞成熟中,起着非常重要的作用,甚至直接会影响到囊胚形成率。裸卵和颗粒细胞层数小于 3 层的卵母细胞,卵母细胞的第一极体排出

率非常低,也就是核成熟率低,而且胞质成熟也差,表现在胞质的色泽,光度及形成胚胎的发育能力等低。本试验中,只有颗粒细胞超过3层的卵母细胞,发育潜力高,体外卵裂率和囊胚率分别达到85.5%和37.8%,显著的高于对照组。而无颗粒细胞的卵母细胞,受精率显著下降,即使能够受精,也不能发育到囊胚。据报道,在卵母细胞成熟前,除去颗粒细胞,对卵母细胞是致命的。认为其重要作用主要表现在:a 保持卵母细胞在减数分裂期,因为颗粒细胞卵母细胞复合体,对减数分裂抑制因子敏感性要比裸卵高,这样就为卵母细胞的胞质成熟提供了时间,而且彼此之间高效的信息交流在整个培养过程中是非常必要(Hashimoto et al.1998);b 参与减数分裂重启,在多种物种的颗粒细胞上发现有LH受体,而在卵母细胞上这受体很少,当LH出现后,首先颗粒细胞反应,产生第二信使,进而促发卵母细胞内钙粒子的震荡,启动减数分裂程序^[6];c 支持胞质成熟,颗粒细胞能为卵母细胞提供一些必需的物质,如半胱氨酸,丙酮酸等,同时也降低氧化作用对卵母细胞的损伤^[7]。此外本实验发现,颗粒细胞直接对受精也有较大的影响(数据未列出),因此在受精时,对颗粒细胞的吹打要轻,至少保留数层,为保证卵子的正常受精提供条件。

4.3.4 Percoll 法与上游法对精子获能和活力的影响

哺乳动物IVF的关键在于获得足量活力好的精子和获能方法^[8]。精子处理以上游法最为常用,但该法活精子回收率相对较低,仅为31%。本试验将0.5 mL细管冷冻精液解冻后在45%和90%的不连续密度梯度Percoll中700 g离心10 min,取得了较好的精子回收效果,离心后抗冻剂、卵黄等全部位于上部,死精子几乎全部位于45%和90%的不连续密度梯度Percoll液之间,而活精子几乎全部位于梯度液底部,精子回收率为57.87%±8.0%,与上游法相比,Percoll法更简便、快速,活精子回收率高且精液洁净^[9]。但是从受精率,卵裂率及囊胚率上来说,虽然Percoll法比上浮法高,但是差异不显著($P>0.05$)。同时多精入卵率也可能提高,精子密度可能是影响多精受精的重要因素之一。但是Parrish等^[10]的实验表明,Percoll法回收的牛精子穿卵率比上游法低,增加精子终浓度可以提高穿卵率,而多精入卵率没有明显增加。本试验发现,上浮法精子活力要优于Percoll法,但是精子数量较少。

4.3.5 咖啡因对精子活力和受精能力的影响

据报道,在受精液中添加咖啡因,能提高牛精子活力和受精能力^[11]。咖啡因是核酸磷酸二酯酶抑制剂,能显著的增加精子呼吸和运动能力^[12]。但是,在本试验中发现,受精液中添加咖啡因,反而影响到精子的活力和正常受精。在无咖啡因组,精子活力维持得很好,而且受精率也高;相反,在添加3 mM咖啡因后,精子的运动和受精能力降低。但是引起降低的原因还未明确。也许是由于咖啡因的过强刺激,导致精子ATP产能不足而造成的。当将咖啡因的浓度降低10倍,精子的活力就有较好的改观,无咖啡因时正

常受精又提高。但是在未添加咖啡因的受精液中，猪精子不能穿过卵子^[13]。Kani 等发现，咖啡因有促进精子顶体反应，和提高精子活力的作用。在小鼠受精中，其有促进作用。但是在牛体外受精中，咖啡因的添加，并未能提高受精，这与 Kenii 的报道一致。

4.3.6 不同蛋白质添加物对体外受精胚胎发育的影响

目前早期胚胎培养液都添加血清或血清白蛋白，血清的成分包含有能量基质、氨基酸、维生素和生长因子等，血清白蛋白也包含有氨基酸和其它一些非氨基酸成分。如在培养液中添加血清和血清白蛋白，则不利于探索早期胚胎发育所需的各种营养成分。为探讨牛早期胚胎体外发育所需的各种特殊物质，使早期胚胎体外发育达到最佳效果，有必要建立化学成分限定的无蛋白培养液系统。根据报道，世界上使用无蛋白质添加的限定的培养液，囊胚发育率很低。在培养液中用聚乙烯醇(PVA)而不用牛血清白蛋白(BSA)作为大分子物质，在仓鼠和牛早期胚胎培养中已做过尝试。发展了一种化学成分限定的猪早期胚胎培养液，即无蛋白的Whittens液+Glycine+Alanine+Hepes+PVA。但是利用这种培养液培养体外生产的早期胚胎的效果不太好，只有16%~21%的猪早期胚胎发育率，且无囊胚形成。研究目的在于建立牛早期胚胎的无蛋白培养液。Iwasaki^[14]等在无蛋白的Whittens液中添加0.276 mmol/L glycine、0.176 mmol/L alanine、15 mmol/L Hepes和1% PVP（聚乙烯吡咯烷酮）来培养体外生产的猪受精卵，结果只有16%~21%的早期胚胎发育率，而无囊胚形成。卢晟盛^[15]利用PVA取代BSA的无蛋白NCSU-23培养液培养猪早期胚胎，多于1/3的早期胚胎发育到了囊胚阶段。虽然牛胚胎能在简单限定培养液中培养^[16]，但是添加蛋白质还是非常必要^[17]。在本试验中，添加PVA的限定培养液中，卵裂率PVA和BSA组要稍高于FBS组，但是差异不显著（ $P>0.05$ ）。也获得了体外受精囊胚，但是效率较其他两组低，特别是扩张囊为0。说明PVA不能单独支持胚胎发育到扩张期。FBS组，囊胚扩张率最高，细胞数上与BSA组无差异，但是其胚胎的形态要差于BSA组。这可能与FBS毒副作用有关。因此，要研究限定培养液，完全可以使用PVA替代BSA或者FBS，但是在发育效率方面还有待于进一步提高。

4.3.7 NEaa 与 Eaa 对胚胎发育的影响

在以前的报道中，人们发现在动物的输卵管中和子宫液中均存在 NEaa 组中大多数的氨基酸，且浓度较高，特别是甘氨酸。在胚胎培养液中，添加甘氨酸、丝氨酸和天冬氨酸可以促进仓鼠胚胎的发育；甘氨酸，丙氨酸可以促进牛胚胎的发育。NEaa 能够显著的提高牛体外受精胚胎的囊胚发育率，特别是添加 2%后，不仅囊胚率达到了 34%，而且胚胎的细胞数也有着显著的提高（ $P<0.05$ ）。说明非必需氨基酸是早期胚胎发育所必需的营养物质。所有这些氨基酸都存在于 NEaa 中。

Eaa 有抑制绵羊早期胚胎发育趋势^[18]，但是本试验也未发现有显著的抑制作用（ $P>0.05$ ），就囊胚细胞数而言，添加 1%的 Eaa 囊胚细胞数要显著的高于对照组

($P < 0.05$), 说明其能够提高胚胎发育质量。1990 年 Bavister 等发现苯丙氨酸、异亮氨酸和酪氨酸抑制仓鼠胚胎发育, 而这些氨基酸都是 Eaa 的组成成份。但是添加 1% 的 Eaa 促进作用大于抑制作用。在胚胎和卵母细胞膜上存在特异的氨基酸载体, 当胚胎分化形成内细胞团和滋养层时, 添加氨基酸可以满足合成蛋白质的需要, 对此时胚胎发育是很有必要的。因此, 通过对比发现, 在培养液中添加 2% NEaa 和 1% Eaa 对牛胚胎发育还是很有必要的。

4.3.8 不同培养液组合对胚胎发育的影响

本试验通过对比发现, 使用两种培养液先后培养, 所得胚胎的囊胚质量, 数量有较为显著的提高, 特别是首先使用 CR1aa+BSA 培养 3 d, 然后再使用 SOFaa+FBS, 获得最高囊胚数和胚胎的细胞数。而且这样的使用血清, 也有效的克服了血清对胚胎发育早期的毒副作用。而在发育后期血清的添加对胚胎的快速生长是非常必要的^[19]。当培养仅用 BSA 时, 得到的 7 d 囊胚数和细胞数较低, 说明血清发育后期的重要性。也有报道血清促进囊胚腔形成和改善胚胎质量^[20]。此结论与我们的实验发现一致。而且在第 3 组中, 所得胚胎的色泽较浅, 卵裂球间隙连接紧密。因为胚胎胞质的色泽与脂质含量有关, 脂质多, 色泽就暗, 其耐冷冻的能力就差, 说明其质量就差。而 CR1aa+SOFaa 培养系统, 能够改善胚胎的发育^[21]。因此, 使用 CR1aa+BSA 培养牛胚胎 3 d, 再使用 SOFaa+5% FBS 培养, 获得胚胎囊胚数量高, 囊胚细胞数也多。

4.3.9 IGF-I 对胚胎发育的作用

体外培养的胚胎细胞凋亡现象非常多, 特别是胚胎的体外发育环境不能满足发育的需要时, 尤为如此^[22]。所以, 在体外培养时, 在培养液中添加一些抗凋亡因子, 对胚胎发育有保护作用。其中, 多用于抗胚胎凋亡的因子包括, EGF, β -fibroblast growth factor (β -FGF), transforming growth factor- α (TGF- α), TGF- β , leukemia inhibitory factor (LIF), interleukin-6 (IL-6)^[23]等。因为在体内, 自分泌和旁分泌的生长因子能特异的改变胚胎的发育进程。当剥夺这些因子时, 就会触发细胞凋亡^[24]。本试验选用添加 IGF-I, 观察是否对胚胎发育有影响。有报道称 IGF-I 对胚胎发育有重要作用。IGF-I 的表达能降低小鼠胚胎的凋亡。Ta-Chin Lin (2003) 通过抗凋亡检测, 也发现 IGF-I 对小鼠胚胎细胞有明显的抗凋亡作用, 而且胚胎细胞数也增加了。本试验也得知, IGF-I 对胚胎的发育有着显著的影响, 特别是囊胚的扩张能力方面, 添加 IGF-I 后, 得到了很大的改善。而未添加组, 胚胎细胞多表现结合不紧密, 色泽也暗, 虽然也有囊胚和扩张囊胚形成, 但数量还是低。添加浓度为 100 ng/mL 比 50 ng/mL 效果较为优化, 但差异不显著。

4.3.10 颗粒细胞共培养体系对胚胎发育的影响

从上述试验结果可以得出, 共培养体系对胚胎发育非常重要, 没有共培养, 虽然也可以获得囊胚, 但是无论从囊胚数量还是扩张能力而言, 都与共培养组相去甚远

($P < 0.05$)。此外山羊颗粒细胞与牛颗粒细胞一样,都能提高囊胚的发育率。Pavasuthipaisit 等(1994)[25]在培养牛体外受精胚胎时,得出上皮细胞共培养能促进发育,而且猪细胞共培养比牛细胞共培养更加有效。这与我们所的结果一致,其它动物细胞能促进胚胎的发育。Feng等(1996)[26]也使用牛输卵管上皮细胞培养人胚胎,获得较好的结果。这充分说明,共培养细胞的分泌一种可溶性物质,来促进胚胎发育,与其物种的特异性无关。

在胚胎培养过程中,氧气浓度对胚胎发育有着重要的影响,降低氧气浓度能够有效的改善胚胎的囊胚发育率[27]。但是共培养体系培养胚胎,降低氧气浓度就没有必要,其优点之一就有降低氧气浓度的作用[28]。

IVM/IVF/IVC 的成功率还受每一步细微操作技术的影响。无论卵丘剥离与否,从 IVM 培养液中取出的卵母细胞都要用精子洗涤液或受精液洗涤 3~4 次。每个清洗过程中的洗净程度,特别是 IVF 后,IVC 前的清洗尤为重要,既要做到防止卵母细胞的裸化,又要做到镜检时看不到精子的头、尾部。受精卵 IVC 2~3 d 后,卵母细胞受卵丘细胞挤压,易附着于培养皿,不利于发育,要用微吸管吸吹以翻动受精卵,并每两天半量更换一次新的培养液。

4.3.11 性控胚胎的体外生产与批量移植

本试验在以上培养条件的基础上,生产部分性控胚胎,为产业化生产胚胎奠定基础。从试验数据来看,性控精液的受精能力轻微降低,但是生产的胚胎发育质量没有影响,而且几个批次间的无差异显著。胚胎移植后,2个月后妊娠检查,受体牛妊娠率保持在 30~45%之间,这结果与国外做的试验一致,05225批次的妊娠率低,仅有29.6%,这与胚胎的移植数量有关,在这批次中,每一受体移植一枚胚胎。但是,体外受精胚胎流产率高,这是国内外遇到的普遍问题,特别是在妊娠后18~30 d内,是流产的高峰时期。此外,大胎综合症也是体外受精胚胎的一大问题,如难产,胎儿畸形,抵抗力低等。但是就目前的移植结果而言,还是符合我们的预料。不得而知的就是出生胎儿的性别是否得到有效的控制,还有待进一步验证。

4.4 小结

1. 卵泡直径与卵母细胞的成熟与发育能力有显著的相关。特别是从3~6 mm卵泡所获得卵子成熟,受精和囊胚率比对照组有显著的增加。
2. 在成熟液中添加 10 ng/mL 的 EGF,利于核质成熟。
3. 卵母细胞成熟过程中,颗粒细胞保持至少 3 层以上,才能为其成熟提供必要条件。而且颗粒细胞能促进精子获能和正常受精。因此在受精时,对颗粒细胞吹打要轻,保留至少数层,为卵子的正常受精,提供条件。
4. Percoll法与上浮法对精子获能和活力的影响不相同,Percoll法快速,活精子数量多,

- 但是多精受精多，而上浮法回收精子数量少，可是精子的总体活力要高于Percoll法。
5. 在牛精子获能液中，添加咖啡因对精子的活力和受精能力无显著的影响，甚至降低了精子的存活时间。
 6. 本试验在无蛋白质培养液（添加PVA）中，获得12.0%的囊胚形成率，但是扩张囊胚形成率为0，而添加BSA和FBS，囊胚率和扩张率显著的提高。
 7. 在培养液中添加 2%NEaa 和 1%Eaa 对牛胚胎发育是很有必要的。
 8. 联合使用培养液能有效的改善胚胎的发育。使用CR1aa+BSA培养牛胚胎3 d，再SOFaa+5%FBS培养，获得胚胎囊胚形成率高，胚胎细胞数也增加。
 9. 添加IGF-I对胚胎的发育有着显著的影响，特别在囊胚的扩张能力方面得到了很大的改善；而未添加组，胚胎细胞多表现结合不紧密，色泽也暗，虽然也有囊胚和扩张囊胚形成，但数量少。
 10. 共培养体系对胚胎的发育有显著的影响。但是使用种间颗粒细胞做共培养层对牛胚胎的发育无显著差异。
 11. 使用性控精液体外受精，要比常规精液受精能力差，受精率轻微的下降。但是受精后，胚胎的发育能力无显著的差异。本试验将体外生产的性控胚胎127枚移植给107头受体牛中，妊娠率达36.5%。

参考文献：

- [1] Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod* 1982;27:147-58.
- [2] Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. *Biol Reprod* 2002;66:38-43.
- [3] Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biol.Reprod.* 2002. 67, 767-775.
- [4] 朱淑文,华修国,艾晓杰,李培昌,吉泽绿.牛不同直径卵泡内卵母细胞体外受精后的卵裂率和染色体异常分析 2002, 7 330-331
- [5] First N.L. and Bames F.L.1989.Development of preimplantation mammalian embryos. *Prog.Clin. Biol.Res.*,294:151-170
- [6] Nagai T.2001.The improvement of in vitro maturation systems for bovine and porcine oocytes. *Theriogenology* 55:1291-1301
- [7] Sofie T, Ann VS, Hans N, et al .Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization *Molecular Reproduction and Development.* 2002, 61: 414-424
- [8] Parrish J.J,Susko-Parrish J.L,Leibfred-Rutledge. M L,et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.*Theriogenology*,1986,25:591 ~ 600
- [9] 陈善军等. Percoll 法处理牛精子对体外受精胚胎发育的影响. *中国兽医学报*,1998,7 : 394-398
- [10] Parrish JJ,Krogenaes A,Susko-Parrish JL. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. *Theriogenology*, 1995, 44:859:869
- [11] Numabe T,Oikawa T,Kikuchi T. Pentoxifylline improves in vitro fertilization and subsequent

- development of bovine oocytes. *Theriogenology* 2001;56:225-233.
- [12] Kenji Momozawa and Yoshinori Fukuda. Caffeine in fertilization medium is not essential for bovine IVF by Fully capacitated spermatozoa. *Journal of reproduction and development*, 2003;49,507-512
- [13] Nagai T, Miura K, Kikuchi K et al. Effects of caffeine on in vitro fertilization of pig follicular oocytes *J reprod dev* 1993; 39:347-32
- [14] Iwasakit, Kimurae, Totsukawak. Studies on a chemically defined medium for in vitro culture of in vitro matured and fertilized porcine oocytes. *Theriogenology*, 1999, 51:709 ~ 720.
- [15] 卢晟盛, 卢克焕. 早期胚胎无蛋白质培养液的建立. *广西农业生物科学* 2003:3
- [16] Matsui, M., Takahashi, Y., Hishinuma, M., Kanagawa, H., 1997. Stimulation of the development of bovine embryos by insulin and insulin-like growth factor-I IGF-I is mediated through the IGF-I receptor. *Theriogenology* 48, 605–616.
- [17] Gandolfi, F., Modina, S., Brevini, T.A.L., et al. Activin bA subunit is expressed in bovine oviduct. *Mol. Reprod. Dev.* 1995.40, 286–291.
- [18] 张家新, 侯健, 史洪才等. 氨基酸对绵羊体外受精胚胎发育的影响. *草食家畜* 2000, 3, 27-30
- [19] Lane M, Gardner DK. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology* 2003;60:407–19.
- [20] Thompson JG, Allen NW, McGowan LT, et al. Effects of delayed supplementation of fetal calf serum to culture medium on bovine embryo development in vitro and the following transfer. *Theriogenology* 1998;49:1239–49.
- [21] Seidel Jr GR, Elsdén RP, Brink Z. Cryopreservation of bovine embryos in media with chemically defined macromolecules. *Theriogenology* 1990;33:322 (abstr.).
- [22] Brison DR and Schultz RM. Apoptosis during mouse blastocyst formation: evidence for a role for survival factors including transforming growth factor alpha. *Biol Reprod* 1997;56:1088-1096.
- [23] Jurisicova A, Latham KE, Casper RF and Varmuza SL. Expression and regulation of genes associated with cell death during murine preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev* 1998, 51:243-253.
- [24] O'Neill C. Role of autocrine mediators in the regulation of embryo viability; lesions from animal models. *J. Assist. Reprod. Genet* 1998, 15:460-465.
- [25] Pavasuthipaisit, K., Lhuangmahamongkol, S., Tocharus, C., et al. Porcine oviductal cell support in vitro bovine embryo development. *Theriogenology*, 1994.41, 1127–1138.
- [26] Feng, H.L., Wen, X.H., Amet, T., Sandlow, J.I., 1996. Development of early human embryos in different culture system. *Theriogenology* 45, 201.
- [27] Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, et al. Effect of oxygen concentration on in vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil* 1990;89:573–8.
- [28] Edwards LJ, Batt PA, Gandolfi F, Gardner DK. Modifications made to culture medium by bovine oviduct epithelial cells: changes to carbohydrates stimulate bovine embryo development. *Mol Reprod Dev* 1997;46:146–54

第五章 应用 PCR 技术鉴定奶牛胚胎性别的研究

目前,性别形成机理的研究已由形态学水平发展到分子水平。性别鉴定的方法也随性别决定理论研究的深入得到同步发展,从个体水平、细胞水平发展到分子水平。性别控制(sex control)就是利用现代生物技术有目的的按照人们的生产要求,控制动物后代的性别比例,在发展奶牛业方面具有重大意义。通过动物性别控制技术的应用,可使某些受性别限制的性状(如母牛泌乳、公鹿生茸)和受性别影响的生产性状在更多的理想性别中按生产需要获得更大的经济效益。因此,人为控制动物后代性别比例不仅能够提高畜牧业生产的经济效益,而且可以排除畜禽群体中的有害基因,防止连锁性遗传疾病,加快优良种畜繁殖,增强育种工作的选择强度,从而获得最大限度的遗传进展。性别控制与胚胎移植、胚胎冷冻等技术的结合应用,可以加速濒危动物和珍稀动物的繁殖和保种;提高优良畜群的增殖速度,促进国际间胚胎和冻精的交流;性别控制也是体外受精、核移植、单精注射及转基因动物的一项配套基础技术,它的应用必将促进其它生物技术的发展。近年来,随着转基因家畜的研究进展,人们也希望能按照家畜性别比例的要求,有选择的进行所需性别的转基因家畜的研究和开发。对早期胚胎的性别鉴定,能够使得人们的愿望得以实现。从长远发展而言,只有应用现代生物技术,特别是奶牛早期性别控制技术,是解决奶牛生产当中存在问题的捷径之一。

目前胚胎性别鉴定方法很多,已经报道的方法有:进行染色体核型分析的细胞遗传学方法^[6,7];H-Y 抗血清识别胚胎表面 H-Y 抗原的免疫学方法^[8~10];利用 Y 染色体片段制作核酸探针的杂交法^[11~15]等。这些方法由于都有准确率不高、费时,或不适于应用到实际生产中等缺点而难以推广。进入 20 世纪 80 年代后, SRY 基因的发现及 PCR 技术的应用,为性别鉴定提供了新的思路。胚胎性别鉴定的实质就是检测 Y 染色体上的 SRY 基因,是 Y 染色体上的一个核心序列为 250bp,编码 80 个氨基酸的单拷贝基因。Herr 等^[16]首先采用 PCR 技术扩增 Y 多重序列鉴定了牛、羊等家畜胚胎性别,其鉴定准确率接近 100%。我国的研究人员采用 PCR 技术鉴定家畜性别,将该技术应用到生产实践中,取得了很大成绩^[16~19]。

用 PCR 鉴定家畜胚胎性别的主要程序为: 获取胚胎:冷冻胚胎、刚从供体牛回收的鲜胚或体外受精培养的胚胎都可以用来鉴定性别; 设计引物:根据 Y 染色体上的性别决定基因或特异性片段设计引物,同时设计一对公母共有基因引物作为内对照,避免假阳性的发生; 用显微操作从胚胎中取出几个细胞热处理后进行 PCR 扩增; 电泳检测。能同时扩增出 Y-染色体上相应片段和公母共有基因片段的胚胎即为雄性胚胎,而只能扩增出共有基因片段的胚胎则为雌性胚胎。

本研究的目的是应用 PCR 技术对牛体内胚胎和体外受体胚胎的性别进行鉴定,以

检测普通精液和性控精液生产胚胎的性别分布比例。在此基础上进一步检测体内胚胎和体外胚胎移植受体母牛后的妊娠率。对奶牛性别控制技术的完善进行探索,特别是为体外生产性别控制胚胎的实际应用奠定基础。

5.1 材料与方法

5.1.1 材料

5.1.1.1 精液和胚胎

普通精液:冷冻精液(0.5 mL)在 39℃ 水浴中解冻后,置于经平衡的 Percoll 液上,400 g 离心 5~40 min 后,弃掉上清液,底部精子团用 5 mL SP-TALP 液稀释,100 g 离心 10 min,洗涤 2 次并调整精子浓度。

性控精液:购自内蒙古赛科星生物科技有限责任公司生产的性控冻精,0.25 mL 塑料细管,每支含 200 万个 X 精子。解冻方法同上。

体内胚胎:分别采用普通精液和性控精液人工授精超数排卵处理后发情的高产奶牛,非手术法采卵。

体外胚胎:牛卵巢采至西安某屠宰场,置卵巢采集液中(20~30℃),3~4 h 内运到实验室。采集卵丘卵母细胞复合体,用洗卵液洗涤 3 次,放入预先平衡的成熟液中,置 38.5℃、5% CO₂、饱和湿度培养 22~24 h,使卵母细胞成熟。用普通精液和性控精液对经过成熟的 COCs 进行体外受精,经体外培养后评估胚胎质量,然后鉴定或移植。

5.1.1.2 主要试剂与设备

DPBS (无钙、镁):实验室自制

Mill-Q 超纯水:实验室自制

卵母细胞成熟液:M199 + 10% FBS + 10 mM Hepes + 丙酮酸钠 + 10 µg/mL FBS + 10 µg/mL LH + 1 µg/mL E₂ (Sigma)

精子获能和受精液:BO 液 + 50 µg/mL Heparin (Sigma)

胚胎培养液:CR1aa+SOFa 两种培养液联合应用(自制)

Taq DNA 聚合酶及 PCR 试剂:TaKaRa 公司

10×TBE 缓冲液:54 g Tris 碱,27.5 g 硼酸,20 mL EDTA(pH8.0),加去离子水至 1000 mL,调 pH 至 8.0。

PE-2400 PCR 仪:PERKIN ELMER

微型离心机:TGL-16B 高速台式离心机,上海安亭科学仪器厂

电泳电源:Multiphor 2197, LKB

水平电泳槽:DYY-31A,北京六一仪器厂

凝胶成像系统:GDS-8000, UVP

电子分析天平：AA-160 型，GERMANY

低温冷冻冰箱：SANYO，Japan

微量移液器：GILSON，France

微量移液器：Eppendorf, German

实验室耗材(Tip 头、离心管等)：上海生物工程公司

其他溶液的配制参照《分子克隆·实验指南》^[2]，《精编分子生物学实验指南》^[1]。

5.1.2 方法

5.1.2.1 体内胚胎的生产和性别鉴定前处理

I 胚胎获取：激素处理供体母牛，进行超数排卵，人工授精，在受精后的第 7 d 非手术冲胚（详见第二章方法）

II 胚胎的收集评定：实体显微镜下检胚，检出的胚胎用 PBS 液冲洗 3 遍，在培养液中评定级别。

III 胚胎的切割：收集的胚胎放置于已点好 PBS 液滴的平皿中，每个液滴中放 1 枚胚胎。用简易切割仪切取大约 10 个左右胚胎细胞作为样品并编号，用 PBS 液洗 3 次，剩下的胚胎部分置于提前编好号码（号码与切割样品的号码一致）的培养液中，置于培养箱中培养，等鉴定结果出来后移植或培养一段时间后进行冷冻保存。

5.1.2.2 体外胚胎的生产和性别鉴定前处理

用普通精液和性控精液分别与体外成熟的卵母细胞进行体外受精(具体操作方法详见第四章的方法部分)，取受精后 7~8 d 发育到桑椹胚至囊胚的胚胎作为样品进行性别鉴定，等鉴定结果出来后移植或培养一段时间后进行冷冻保存。

胚胎取样方法同 6.1.2.1。

5.1.2.3 牛基因组DNA的提取

根据 Blin 和 Stanfford 的方法改进而形成^[2]。

[1] 将冷冻的血样在室温水浴中溶解。

[2] 取 500 μ L 全血转移至 1.5 mL Eppendorf 管中。向管中加 2 倍体积的 PBS 液，混匀，室温下 8000~9000 rpm 离心 15 min。重复步骤，直至沉淀变白。

[3] 弃上清，加 300 μ L 提取液使其悬浮。加 10~20 μ L RNase，混匀，37 $^{\circ}$ C 水浴 1 h。加 10~20 μ L PK，混匀。60~65 $^{\circ}$ C / 37 $^{\circ}$ C 水浴 3 h。加 1 倍体积苯酚，摇动 10~30 min，4 8000~9000 rpm 离心 20 min。转移上清至高压灭菌的 Eppendorf 管中。反复抽提至上清水相清亮透明。

[4] 加等体积酚：氯仿：异戊醇(25:24:1)，摇动，4 8000~9000 rpm 离心 15 min。转移上清，加 1/5 体积 $\text{NH}_4\text{Ac}/\text{NaAc}$ 放置冰上。加 2 倍体积预冷的无水乙醇，晃动，

使 DNA 析出，冰上放置 10 ~ 30 min。

[5] 转移 DNA 团至一新的 Eppendorf 管中，加入 500 μL 70%乙醇洗涤，8000 ~ 9000 rpm 离心 3 ~ 5 min。倒掉乙醇，使痕量液体流出，真空干燥或空气干燥 10 min。加 500 ~ 1000 TE 缓冲液，4 ℃ 过夜，使 DNA 完全溶解，- 80 ℃ 冻存。

[6] 紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和含量：在石英比色皿中加入 15 μL DNA 样品，加水至 3 mL，混匀后分别测定 DNA 样品在 260 nm 和 280 nm 处的紫外光吸收值，并计算 A260/A280 的值，A260/A280 应介于 1.75 ~ 1.80 之间。

[7] 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度。

5.1.2.4 PCR反应进行早期胚胎性别鉴定

5.1.2.4.1 引物的合成

本研究根据牛特异性 DNA 序列和 SRY 基因特异性 DNA 序列设计以下 2 对引物(见表 5-1)。

引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。

表 5-1 本研究所用引物的核苷酸序列
Table 5-1 Nucleotide sequences of the primers used in the research

编 号 (code)		序 列 (sequences)
内源对照特异性引物	B1	5'-TGG AGG CAA AGA ACC CCG CT-3'
	B2	5'-TCG TGA GAA ACC GCA CAC TG-3'
Y 染色体基因组特异引物	S1	5'-CCC TTC CAG CTG CAG TGT CA-3'
	S2	5'-GAT CTG TAA CTG CAA ACC TGG C-3'

5.1.2.4.2 胚胎基因组DNA的准备

将胚胎样品放入 1.0 mL 灭菌的 Eppendorf 管中，加入 20 μL 双蒸水，煮沸 5 min 后稍离心，置于 - 20 ℃ 保存或直接用于 PCR。

5.1.2.4.3 连续复合式PCR

分别用体内和体外生产的牛胚胎作为样品进行 PCR 反应，鉴定胚胎性别，同时以 10 μL PBS 缓冲液作为阴性对照，雄性牛血 DNA 作为阳性对照。PCR 反应体系及条件如下：

PCR 反应体系如下：

10 × 反应缓冲液	5 μL
25 mM MgCl ₂	2.0 μL
10 mM dNTP	1.0 μL
S1	0.5 μL
S2	0.5 μL
B1	0.5 μL
B2	0.5 μL

Taq DNA 聚合酶 0.6 μL

模板 DNA 10 μL

加水至终体积 50 μL，混匀后稍离心

在反应液中先加入 S1、S2 引物，以热启动方式启动扩增，按以下反应在 Perkin 2400 PCR 仪上进行 PCR 反应，95℃ 预变性 2 min 后开始以下循环：

95℃ 变性 30 s

56℃ 退火 30 s

72℃ 延伸 30 s

10 个循环后，再加入 B1、B2 引物继续扩增，

95℃ 预变性 1 min 后进行以下循环：

95℃ 变性 30 s

56℃ 退火 30 s

72℃ 延伸 30 s

22 个循环后，在 72℃ 下继续延伸 7 min。

5.1.2.4.4 扩增产物的检测

反应完毕后，取 10 μL 扩增产物与上样缓冲液按 5:1 充分混匀，2% 含 0.5 mg/mL EB 琼脂糖凝胶电泳，紫外灯下检测扩增结果，并拍照保存。

5.1.2.5 胚胎移植

胚胎取样后保存在培养液中，在性别鉴定结果出来后，移植到同期发情的受体母牛子宫角深部，方法同第二章和第三章方法内容，或培养一段时间后进行冷冻保存。

5.1.3 试验数据的统计学分析

试验组至少重复 3 次以上，试验数据用 χ^2 进行差异显著性分析。

5.2 结果与分析

5.2.1 牛 SRY 基因片段 PCR 琼脂糖凝胶电泳结果

分别取 10 μL 公牛全血和胚胎基因组 DNA 的 PCR 产物在 2%琼脂糖凝胶上电泳，紫外光下观察。在阴性对照呈阴性(图 5-1，4 泳道)，阳性对照呈阳性(图 5-1，3 泳道)的情况下，若出现两条带(A 和 B)，说明该样品的胚胎为雄性(图 5-1，1 泳道)，若只有一条带(A)，则为雌性(图 5-1，2 泳道)，见图 5-1。

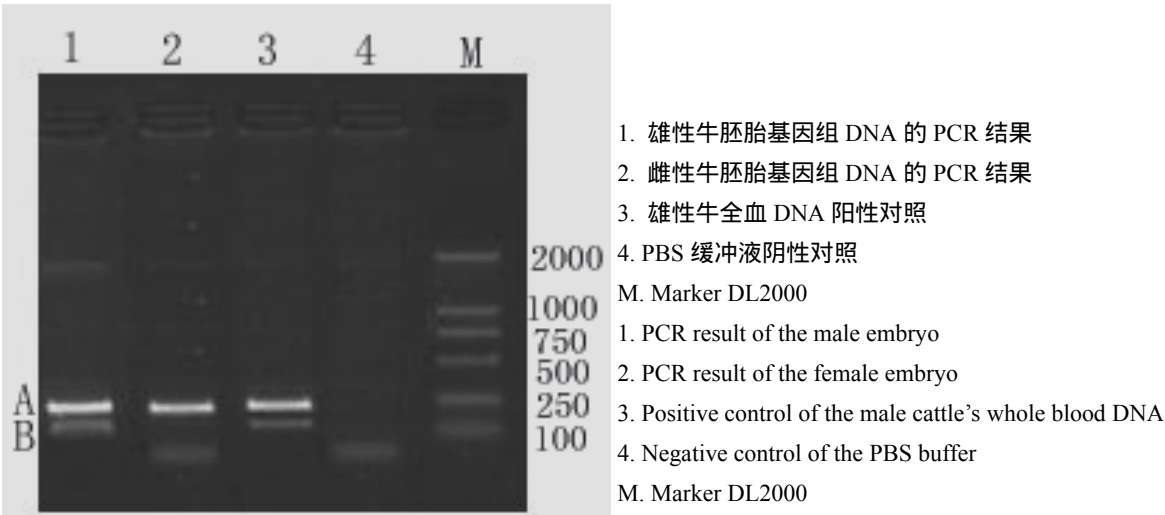


图 5-1 牛胚胎性别琼脂糖凝胶电泳鉴定结果
(A. B1、B2 引物的扩增产物；B. S1、S2 引物的扩增产物)

Fig.5-1 Electrophoresis results of the sex identification for the bovine embryos
(A. Products of the primers B1 and B2; B. Products of the primers S1 and S2)

5.2.2 牛体内胚胎性别鉴定结果

共鉴定了普通精液授精产生的胚胎 998 枚(其中鲜胚鉴定 163 枚,冻胚鉴定 835 枚),性控精液授精产生的胚胎 10 枚，在阴性对照呈阴性，阳性对照呈阳性的情况下，鉴定结果见表 5-2。本研究所鉴定的胚胎中，共移植鉴定的普通精液授精胚胎 486 枚，其中雌性胚胎 481 枚，雄性胚胎 5 枚；移植鉴定的性控精液胚胎 10 枚，其中雌性胚胎 8 枚，雄性胚胎 2 枚。移植 2 个月后检查受体妊娠结果。

表 5-2 牛体内胚胎性别鉴定结果
Table 5-2 Results of the sex identification for the bovine embryos *in vivo*

胚 胎		胚胎数			不能 判定	移 植 胚胎数		受 体 妊娠数		妊娠率 %	犊 牛 出生数	
普通精液授精胚胎	鲜胚 冻胚											
普通精液授精胚胎	鲜胚	163	81	79	3	78	5	32	2	41.03	32	2
授精胚胎	冻胚	835	410	413	12	403	0	152	--	37.72	148	4
性控精液授精胚胎		10	8	2	0	8	2	3	1	40.0%	-	-

注： PCR 电泳结果中 A、B 条带均未出现者为不能判定。
出生犊牛性别与鉴定结果的符合率为 97.85%。

在移植鉴定的普通精液授精胚胎的受体母牛中 移植雌性胚胎的受体牛妊娠 184 头，移植雄性胚胎的妊娠 2 头，总妊娠率为 38.27%。妊娠受体均产出犊牛，犊牛性别与鉴

定结果的符合率达 97.85%。在移植性控精液授精胚胎的受体母牛中，移植雌性胚胎的妊娠 3 头，移植雄性胚胎的妊娠 1 头，妊娠率为 40.0%，产犊结果有待验证。

5.2.3 牛体外胚胎性别鉴定结果

共鉴定了 351 枚胚胎的性别，其中普通精液体外受精产生的胚胎 235 枚，性控精液体外受精产生的胚胎 116 枚，胚胎移植 2 个月后检查妊娠结果，鉴定结果见表 5-3。

表 5-3 牛体外胚胎性别鉴定结果
Table 6-3 Results of the sex identification for the bovine embryos *in vitro*

胚 胎	鉴 定				不能判定	移 植		受 体		妊娠率 %	犊 牛	
	胚胎数					胚胎数		妊娠数			出生数	
普通精液 体外胚胎	235	119	114	2	18	0	5	—	27.78%	4	—	
性控精液 体外胚胎	116	106	9	1	24	0	6	—	25.00%	未知	—	

注： PCR 电泳结果中 A、B 条带均未出现者为不能判定

在移植普通精液体外受精鉴定胚胎的受体母牛中，移植雌性胚胎的 18 头中 5 头妊娠，妊娠率为 27.78%。妊娠受体产出犊牛 4 头，产犊率为 22.22%，犊牛性别与鉴定结果相符，鉴定正确率达 100%。

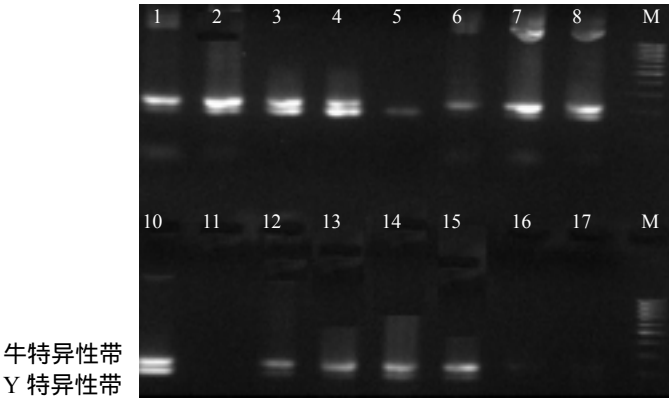


图 5-2 牛体外胚胎性别鉴定琼脂糖凝胶电泳鉴定结果
Fig.5-2 Electrophoresis results of the sex identification for bovine embryos *in vitro*

在移植性控精液体外受精鉴定胚胎的受体母牛中，移植雌性胚胎的 24 头，妊娠数为 6 头，妊娠率为 25.0%，产犊结果有待验证（本试验在 2005 年 3 月初进行移植性控精液体外受精胚胎）。

5.3 讨论

5.3.1 引物设计和PCR反应条件是保证胚胎性别鉴定的基础

本实验采用在 PCR 反应液中先加入 Y 染色体特异性引物(S1、S2)扩增 10 个循环，

再加入内源对照特异性引物(B1、B2)继续扩增22个循环的连续复合PCR方法进行牛早期胚胎性别鉴定。由于模板中Y染色体比常染色体的丰度小,相应的能与雄性特异性引物结合的DNA序列比能与内源对照特异性引物结合的DNA序列少的多,如果在相同的PCR条件下扩增,雄性特异性扩增片段要比内源对照特异性扩增片段少得多,电泳结果中就可能难以观察到雄性特异性扩增条带,从而导致性别鉴定符合率的下降。因此,在PCR反应液中先加入Y-特异性引物优先扩增10个循环,然后再将内源对照特异性引物加入反应体系中继续扩增22个循环,这样,两种特异性片段的扩增数量基本平衡,使牛早期胚胎性别鉴定在2h以内就可以完成,既保证了鉴定的准确率和特异性,又缩短了鉴定所需时间。

本实验是在一个反应样管中,同时进行雄性牛特有的Y染色体特异性DNA序列和雌雄性牛共有的特异性DNA序列的扩增。内源对照特异性引物可以检测反应体系中胚胎DNA样品的存在,防止胚胎丢失时出现假阴性结果。曾溢滔^[3]、黄淑帧^[4]用巢式PCR扩增牛SRY特异性序列,其两次扩增所用引物只有Y特异性引物,若发生样品丢失,即无法避免假阴性结果的出现。Macháty^[20]、Park^[15]采用一对内源对照特异性引物和一对Y特异性引物同时扩增鉴定16~32细胞期胚胎单个卵裂球和8~16细胞期牛胚胎8、4、2、10个胚胎细胞的性别。吕碧文^[5]、Peura^[21]应用一对内源对照特异性引物和两对Y特异性引物对同一样品分别扩增,以求达到更准确的结果,防止微小的缺失和插入,但此技术加重了鉴定操作的工作量,不利于在实践中推广应用。Lopes等^[22]从胚胎取5~15个细胞进行鉴定,比较了只用1对Y-染色体特异性引物和同时用1对Y特异性引物和1对牛常染色体引物的效率和准确率,结果显示,只用1对Y引物的性别鉴定率为89.5%(34/38),2对引物共用的鉴定率为94.1%(48/51),犊牛验证的鉴定准确率分别为79%(15/19)和100%(30/30)。由此可以看出,用2对引物同时扩增是一项很有效的措施,在内源对照特异性条带存在的前提下,如果出现Y特异性带,则说明得到该样品的胚胎为雄性,如没有Y特异性带,则说明胚胎为雌性,而且还避免了只用1对引物时由于胚胎遗失可能造成的错误判断。

5.3.2 性别控制技术在实际应用中存在的问题

目前哺乳动物性别控制的方法多种多样,但最有效的方法是通过分离X、Y精子和鉴定早期胚胎的性别来控制后代的性别^[23~27]。采用流式细胞仪分离X和Y精子以控制胚胎性别的方法也已逐渐应用到实践当中,该方法分离的准确率达90%以上,每小时的分离速度为 $3 \sim 4 \times 10^6$ 个精子,收集后的X或Y精子与卵子受精90%以上胚胎发育雌性或雄性后代。该技术目前存在的主要问题是分离速度太慢。按照目前的分离速度,要获得一个输精剂量的牛精子,需花费近20h。如此长的分离时间直接影响精子的活率,从而导致受胎率下降。

总之,从目前的性别决定理论分析,流式细胞仪分类法和SRY-PCR扩增法是准确

而发展前景广阔的两种性别控制方法。但是,前者由于分离速度太慢而影响其在生产中的应用,目前需要解决的关键问题是提高分离准确率和分离速度,并加强与体外受精和显微授精技术结合提高分离精子的利用率。后者鉴定时间较长(约 3~4 h),延长了胚胎在体外停留的时间,而且取样时会对胚胎造成不可避免的损伤,也从一定程度上影响了胚胎移植的妊娠效率,只有进一步研究简易快速的胚胎切割取样技术、胚胎性别鉴定的 PCR 试剂盒以及取样胚胎的冷冻保存技术,并和当前发展较快的 LAMP 法(鉴定时间较短,约 30~40 min)胚胎性别鉴定技术相结合,先用 LAMP 法对需鉴定的胚胎初步筛选,对 LAMP 法不能确定的结果再应用 PCR 法进一步确证,既缩短了鉴定所需时间,又提高了鉴定正确率。多种方法结合,取长补短,才能使性别控制技术达到推广应用阶段。

5.3.3 性别控制技术在畜牧业中的应用

1989 年,Palmer 等发现了 Y 染色体上的性别决定区(sex determining region of the y chromosome, SRY),该区编码 79 个氨基酸,在不同哺乳动物中有很强的同源性。SRY 序列的发现是哺乳动物性别决定理论的重大突破。尽管 SRY 序列诱导性别分化的具体机理有待深入探讨,但是它对性别控制技术的发展具有重要意义。通过对附植前胚胎进行性别鉴定,然后应用胚胎移植技术,选择所需性别的胚胎进行移植,从而达到控制后代性别的目的,是目前动物性别控制中较为实用的一类方法。PCR 鉴定胚胎性别研究的成功,使胚胎的性别鉴定进入了一个崭新的发展阶段。虽然我国在牛 SRY 基因的分子克隆及鉴定胚胎性别方面已达到国际先进水平,但这种方法存在一定程度的胚胎结构损伤。因为胚胎经过体外操作,会对胚胎造成多方面的影响,从而影响鉴定胚胎移植后存活率。

因此,目前需要进一步提高胚胎取样技术,尽量减少分割过程中对胚胎细胞的损伤,保证半胚的受胎率。同时,尽量提高检测的敏感度,以减少胚胎细胞的采集数和对胚胎结构造成的损伤,提高鉴定后胚胎移植妊娠率。

由于性控精液生产效率低,每支细管又只有少量(约 200 万个)有效精子,故在人工授精时需要进行子宫深部输精,对技术人员的要求较高,加之性控精液的价格较高,为了保证受胎率,每次发情授精次数有可能增加。在现有条件下,大规模推广性控精液进行人工授精还存在一定困难。若将性控精液用于超排母牛人工授精生产体内胚胎,或者用于体外受精生产体外胚胎,再与 OPU 技术相配合,则可以生产出高质量的性控胚胎,也可以充分利用有限的性控精液这一资源。

性别控制也可以通过胚胎克隆技术来实现。但是,胚胎克隆存在着发育率低、移植后受胎率低、出生率低以及出生后死亡率和畸形发育率高等诸多缺点,现在在生产实践中推广应用还受到一定限制。随着胚胎工程技术研究的进一步发展,这些缺点也会逐渐得到克服,使胚胎克隆技术应用于生产实践这一愿望早日实现。

5.4 小结

1. 本研究采用连续复合式 PCR 共鉴定了普通精液授精产生的体内胚胎 998 枚 (其中鲜胚 163 枚, 解冻胚胎 835 枚), 性控精液授精产生的体内胚胎 10 枚; 鉴定了 351 枚体外胚胎的性别, 其中普通精液授精产生的 235 枚, 性控精液授精产生的 116 枚。普通精液体内胚胎性别鉴定后移植受胎率分别为鲜胚 41.03%, 冻胚为 37.72, 性控精液体内胚胎的受胎率为 40%; 普通精液和性控精液体外胚胎性别鉴定后移植的受胎率分别为 27.78% 和 25.00%; 但体外胚胎移植的数量较少。在阴性对照呈阴性, 阳性对照呈阳性的情况下, 体内胚胎性别鉴定已移植出生的犊牛性别鉴定符合率达 97.25%, 性控精液移植胚胎的犊牛性别鉴定符合率待定。
2. 利用性控精液生产已知性别的胚胎, 达到性别控制的目的, 提高了母犊的出生比例。对奶牛性别控制技术的完善进行探索, 为体外生产性别控制胚胎的实际应用奠定基础。

参考文献:

- [1] F. 奥斯伯, R.E. 金斯顿, J.G. 塞德曼等著, 颜子颖, 王海林译. 《精编分子生物学实验指南》. 北京: 科学出版社
- [2] J. 萨姆布鲁克, E.F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯著, 金冬雁, 黎孟枫等译. 《分子克隆实验指南》(第二版). 北京: 科学出版社
- [3] 曾溢滔, 张美兰, 陈美钰等. 应用 PCR 扩增牛 SRY 序列进行奶牛胚胎性别鉴定[J]. 《中国科学》(B 辑), 1993, 23 (4) : 371-376
- [4] 黄淑贞, 陈美钰, 黄英, 等. 试管羊和试管牛胚胎性别的鉴定. 《遗传》, 2000, 22 (2) : 65-68
- [5] 吕碧文, 俞颂东, 金水仙. 牛早期胚胎性别鉴定的 PCR 方法研究. 《武汉大学学报》(自然科学版) 1999, 2: 211-214
- [6] Herr C.M., Matthaei K.L., Steel, K.C. Reed. Rapid Y -chromosome assay sexing of peripheral blood lymphocytes from Bovidae of known phenotypic sex. Theriol, 1990, 33: 240(abst)
- [7] S.S. Wachtel. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. Theriol, 1984, 21: 18-28
- [8] Moreira-Filho C.A., M.D.T. Ramalho, M. Kirszenbaum, et al. Sex selection of Brazilian zebu embryos by indirect immunofluorescence using high titer rat H-Y antisera. Theriol, 2001, 55: 483(abst)
- [9] R.A. Van Vliet, A.M. Verrinder Gibbins, J.S. Walton. Livestock embryo sexing : A review of current methods with emphasis on Y-specific DNA probes. Theriol, 1989, 32: 421-438.
- [10] 杭苏琴, 刘为敏, 牛树理等. H - Y 抗体对小鼠胚胎 H - Y 抗原表达的研究. 《畜牧与兽医》2003, 35(12): 3-4
- [11] Marquant-Le Guienne B, Nibart M, Guyader C, et al. DNA probe sexing of young in vitro fertilized bovine embryos. Theriol, 1992, 37: 253
- [12] Bondioli K.R., Ellis S.B., Pryor J.H., et al. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. Theriol, 1989, 31: 95-104.
- [13] Kawarasaki T., Matsumoto K., Murofushi J., et al. Sexing of porcine embryo by in situ hybridization using chromosome Y- and 1-specific DNA probes. Theriol, 2000, 53: 1501-1509
- [14] Herr K.C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. Theriol, 1991, 35: 45
- [15] Park H., Lee J.H., Choi K.M., et al. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction(PCR) with biopsied single blastomere. Theriol, 2001, 55: 1843-1853.
- [16] 袁野, 丁鐸, 刘娣. PCR 技术在胚胎性别鉴定中的应用. 《黑龙江农业科学》2005, 2: 35-38.
- [17] 王丹, 刘云海, 王志刚等. 非电泳法 PCR 牛早期胚胎性别鉴定研究. 《黑龙江畜牧兽医》2003,

11:9-11

- [18] 陈从英,黄路生,陈静波等. 牛早期胚胎性别鉴定 P C R 反应体系的优化研究.《畜牧兽医学报》2003,34(3),209-212
- [19] 吴阳升,刘明军,郭志勤. 连续多重 PCR 牛胚胎性别鉴定.《新疆农业大学学报》2004, 27(2): 29 ~ 32
- [20] Z.Macháty,A.Páldi,T.Csáki,et al.Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos.J Reprod Fertil,1993,98:467-470
- [21] Peura T., Hyttinen J.M., Turunen, M.J. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction.Theriol,1991,35:547-555
- [22] Lopes R.F.F., Termigononi C.,Rodrigues J.L. Sex determination of bovine embryos using PIT-STOP PCR.Theriol,2001,55:482(abst)
- [23] Buchanan B R, Seidel G E Jr, McHue P M, et al. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa [J]. Theriogenology,2000, 53: 1333-1344.
- [24] Guthrie H D, Johnson L A, Garrett W M, et al. Flow cytometric sperm sorting: effects of varying laser power on embryo development in swine [J]. Mol Reprod Dev, 2002, 61(1): 87-92.
- [25] Lu KH, Cran DG, Seidel GE. In vitro fertilization with flow-cytometrically-sorted bovine sperm [J]. Theriogenology, 1999, 52: 1393-1405.
- [26] Rath D, Long C R, Dobrinsky J R, et al. In vitro production of sexed embryos for gender preselection: High-speed sorting of X-chromosome-bearing sperm to produce pigs after embryo transfer [J]. J Anim sci, 1999,77(12): 3346-3352.
- [27] Stap J, Hoebe R A, Merton J S, et al. Improving the resolution of cryopreserved X- and Y-sperm during DNA flow cytometric analysis with the addition of Percoll to quench the fluorescence of dead sperm [J]. J Anim Sci, 1998,76(7): 1896-1902.

第六章 几种常见影响奶牛繁殖效率疾病的防治研究

在胚胎移植技术的实际应用中，常常会遇到一些导致供体和受体母牛生殖机能紊乱的疾病，使得在对供体进行超排和冲胚时，得到的胚胎数量少或者冲不到胚胎，或者胚胎质量差导致回收的胚胎可利用率降低；有些疾病还会引起受体母牛利用率降低，或者受胎率低^[1,2,3]。这些均可以使胚胎移植的成功率降低而造成大的经济损失，甚至影响到胚胎移植技术的推广和应用。这些疾病主要有卵巢囊肿、持久黄体、卵巢硬肿、卵巢机能减退、早期胚胎流失等。这些疾病还严重地影响了奶牛平时的繁殖力，在一些条件较差、饲养管理水平低的奶牛场和养殖户，很大一部分淘汰母牛都是由于繁殖机能障碍导致不孕症而不得不淘汰^[4,5,6,7,8,9]。高产奶牛的繁殖障碍发生率比普通奶牛更高，严重地影响了生产效益^[10,11,12,13]。有效地控制这些疾病对提高胚胎移植成功率具有重要意义，也可以提高供体母牛和受体母牛的再利用率，而且对奶牛日常人工授精受胎率的提高也具有决定性的作用。

本研究总结了近年来胚胎移植工作和多年兽医临床实践中遇到的几种较常见的影响母牛生殖机能疾病的发病情况、主要治疗措施及治疗效果，尤其是对供体母牛出现的一些生殖机能障碍进行了较深入的探索。

6.1 材料和方法

6.1.1 实验动物

胚胎移植过程中的供体奶牛和受体牛及临床实践中的不孕症母牛。

6.1.2 药品

GnRH：LHRH-A₃，南京市激素制品有限公司，25μg/支

FSH：中国科学院动物研究所，10 mg/支

宁波市激素制品有限公司，100 IU/支

LH：宁波市激素制品有限公司，200 IU/支

hCG：南京动物激素厂，1000 IU/支

PMSG(eCG)：内蒙古生物药品厂，800 IU/支

PG：氯前列烯醇 (Estrumate) 上海计划生育研究所，0.2 mg/2 mL/支

EB：苯甲酸雌二醇，南京动物激素厂，4 mg/2 mL/支

P₄：孕酮（黄体酮）南京动物激素厂，20 mg/2 mL/支

CIDR：EAZI-BREED CIDR (1.9 g Progesterone)，Pfizer Pty. Limited, New Zealand

OT：催产素，南京动物激素厂，20IU/2mL/支

土霉素：赤峰制药厂生产的土霉素碱原粉

露它净：北京兽药厂, 4 mL/支 使用时稀释为 4%

促孕灌注液：盐城兽药厂, 20 mL/支

中草药：各地医药公司各种中草药饮片

6.1.3 实验方法

6.1.3.1 卵巢囊肿的诊断和治疗

6.1.3.1.1 卵巢囊肿及其诊断标准

卵巢囊肿是母牛卵巢上存在的直径超过 25 mm, 存在时间在 10 d 以上的囊性结构。病理性卵巢囊肿可进一步分为卵泡囊肿和黄体囊肿两种类型。二者均可以由于排卵失败而缺乏功能性黄体导致母牛不孕^[1,2,14,15,16,17]。

卵泡囊肿囊壁较薄、内充满液体、囊肿直径 ≥ 25 mm。多数母牛在一侧或两侧卵巢存在 1 个以上的囊肿性结构。有的卵泡囊肿母牛表现出“慕雄狂”症状, 并出现雌激素诱导的身体结构及行为的变化, 如骨盆韧带松弛, 外阴和会阴部肿胀, 尾根抬高, 颈部增厚等。

黄体囊肿的囊壁稍厚、充满液体、囊肿直径 ≥ 25 mm, 分泌正常或超过正常数量的孕酮。多数患黄体囊肿的母牛长期不发情。大多数黄体囊肿可能通过卵泡囊肿部分黄体化形成(Garverick, 1997), 若持续存在较高的孕酮浓度, LH 释放峰和排卵过程即被抑制, 从而引起不孕。

根据近来的研究发现, 卵巢上还可能存在一种直径较大的囊性结构, 即囊性黄体或良性卵泡囊肿, 这些结构不影响正常的生殖功能, 既不改变发情周期, 也不影响妊娠。但这种现象的出现对卵巢囊肿的诊断和治疗变得复杂化。

临床上一般通过直肠检查进行诊断发现直径 ≥ 25 mm 的囊肿, 10 d 后再次检查仍然在同一部位存在, 即可判断为卵巢囊肿。但是, 通过直肠触诊来区分卵泡囊肿和黄体囊肿是很困难的^[1,2,16]。

6.1.3.1.2 卵巢囊肿的治疗方案

现行的激素治疗两种卵巢囊肿的方法基本一致, 其主要方向是使囊肿黄体化, 而后, 重建一个正常的发情周期。

GnRH 治疗：每头奶牛肌肉注射 LHRH-A₃ 100 μ g。

GnRH + PG 治疗：每头奶牛肌肉注射 LHRH-A₃ 100 μ g 后第 9 d, 再注射氯前列烯醇(Estrumate) 0.4~0.6 mg。

中药方剂治疗：应用理气行滞、活血祛瘀、化痰散结消癥的治疗原则。基本方剂组成：当归 30 g、桃仁 20 g、红花 15 g、郁金 20 g、元胡 20 g、鸡血藤 30 g、三棱 20 g、莪术 30 g、丹参 30 g、丹皮 30 g、海藻 20 g、夏枯草 30 g、皂刺 30 g、黄芪 40 g、砂仁

15 g、青皮 20 g、鸡内金 30g、五灵脂 30 g、茯苓 20 g、浙贝 20 g、制半夏 20 g、甘草 15 g，随证加减。粉碎，开水冲调，候温灌服，隔日 1 副，连服 5 副。

GnRH 配合中药治疗：每头奶牛肌肉注射 LHRH-A3 50 μ g 后同时内服中药方剂，方法和剂量同。

6.1.3.2 供体超排冲胚后黄体退化不全形成硬肿的治疗和预防

6.1.3.2.1 黄体退化不全形成硬肿及诊断

本病是在胚胎移植中遇到的一种严重疾病，多发生在超数排卵时 FSH 给药剂量过大，或冲胚后黄体消退不完全甚至没有采取消黄措施，使得卵巢在超排冲胚后不能及早恢复正常，而不能表现出正常的生殖功能。这种疾病的发生很可能是在超排后原来的黄体组织没有及时的消退，存在时间过长，局部结缔组织增生，而发生器质性变化所致。发生本病的母牛，黄体维持时间比正常或超排冲胚后采取消黄措施的母牛要长约 2 个发情周期，大多数长时间不发情，少数表现发情周期延长，或者发情周期不规律，即使发情也难以在授精后怀孕。直肠检查，子宫基本正常，只是卵巢体积要比正常母牛的卵巢增大数倍甚至数十倍，最大的直径超过 15cm，这种卵巢上有多个大小不一的较硬的突起，但这些突起的质度要比功能性黄体硬，经前列腺素注射治疗卵巢体积的缩小和突起的消退程度很低甚至没有效果。

6.1.3.2.2 黄体退化不全形成硬肿治疗方案

本病在国内外文献中还未见相关报道，难以借鉴前人的诊疗经验。从临床症状表现来看，本病和卵巢囊肿同样属于祖国传统医学中的“癥瘕”范畴。所以，对本病的治疗仍采取和卵巢囊肿相似的中药方剂。

应用理气行滞、活血祛瘀、化痰散结消癥的治疗原则。基本方剂组成：当归 30 g、桃仁 30 g、红花 15 g、郁金 20 g、元胡 20 g、鸡血藤 30 g、三棱 30 g、莪术 40 g、丹参 30 g、丹皮 30 g、海藻 20 g、夏枯草 30 g、皂刺 30 g、黄芪 40 g、砂仁 15 g、青皮 20 g、水蛭 20 g、穿山甲 20g、五灵脂 30 g、浙贝 20 g、制半夏 20 g、甘草 15 g，随证加减。粉碎，开水冲调，候温灌服，隔日 1 副，连服 3 副后，间隔 1wk 再服 2~3 副。对硬肿没有完全消退者，20 d 后适当调整方剂再行一个疗程。

6.1.3.3 持久黄体的诊断和防治

6.1.3.3.1 持久黄体及其诊断标准

母牛怀孕黄体在分娩后或周期黄体超过正常黄体时限仍未消退，并且仍然保持分泌孕酮的功能，称为持久黄体（Persistant Corpus Luteum）。由于持久黄体持续的分泌多量孕酮，抑制了卵泡的正常发育，使母牛发情的周期性循环被破坏，表现长期不发情或者发情周期变长。临床上如果母牛长期不发情，直肠检查发现一侧或两侧卵巢有质度较硬的突起，10~14 d 后再次检查卵巢上同一部位原突起仍然没有消退，可以诊断为持久黄

体。

6.1.3.3.2 持久黄体的防治方案

PG 治疗：肌肉注射氯前列烯醇 0.6 mg。

EB 治疗：肌肉注射苯甲酸雌二醇。

PMSG：肌肉注射 PMSG 1600 IU。

促孕灌注液：子宫内注入促孕灌注液 40 mL，3 d 后再注一次。

6.1.3.4 卵巢机能减退的治疗

6.1.3.4.1 卵巢机能减退及其诊断标准

卵巢机能减退是卵巢机能暂时受到扰乱，处于静止状态，或者发情周期不完全，不出现发情现象。根据卵泡发育及发情表现的差异，卵巢机能减退可分为 2 种类型：

卵巢机能不全 母牛出现发情或发情周期延长，发情的外表征候正常或微弱；卵巢中有各种不同的阶段停滞发育的卵泡，有的可能有成熟卵泡，但不排卵，或者排卵延迟。

卵巢静止 是卵巢机能受到扰乱后处于静止状态。母牛不发情，卵巢大小、质地正常，其上既无卵泡，也无黄体。

直肠检查时，卵巢形状和质地无明显变化，也触摸不到卵泡或者黄体，有时可能在一侧卵巢上感觉到有很小的黄体残迹。卵巢体积显著变小，如豌豆大。卵巢仍无变化，即可确诊。

6.1.3.4.2 卵巢机能减退的防治方案

治疗卵巢机能减退，必须在良好的饲养管理条件下进行。

激素疗法

FSH+LH：肌肉注射 FSH 200 IU，出现发情表现后再肌肉注射 LH 200 IU。

PMSG + hCG：一次肌肉注射 PMSG 1600 IU，出现发情后再注射 hCG 5000 IU。

子宫内注入促孕灌注液 每次向子宫内注入促孕灌注液 40 mL，3 d 后重复注射一次。

中药治疗：治疗原则以健脾益气，补益肾元，活血化瘀为主。基本方剂组成：党参 30 g，黄芪 30 g，山药 30 g，当归 25 g，川芎 20 g，益母草 30 g，五灵脂 30 g，熟地 30 g，丹参 30 g，淫羊藿 40 g，仙茅 30 g，肉苁蓉 30 g，枸杞子 30 g，续断 30 g，香附 30 g，牛膝 20 g，女贞子 30 g，青皮 20 g，陈皮 30 g，甘草 20 g，随证加碱。粉碎，开水冲调，候温灌服，隔日 1 服，连服 5 次。

6.1.3.5 慢性子宫内膜炎的诊断和防治

6.1.3.5.1 慢性子宫内膜炎及其诊断标准

慢性子宫内膜炎是子宫粘膜发生的慢性炎症过程，大多数病牛的发情周期基本正

常,少数牛有发情紊乱的表现,但都屡配不孕。无论是在奶牛场还是个体养牛户,其发病率都很高,在淘汰的母牛中,绝大多数是屡配不孕者,而其中 75% 是长期患慢性子宫内膜炎所致,给奶牛业造成巨大的损失。

本病主要是通过全面的了解病史,阴道检查,直肠检查,结合其它一些检查方法进行诊断。

阴道检查的判断标准:子宫颈外口排出化脓性或粘脓性分泌物,或排出的分泌液中有大小不等的黄色或白色絮状物,判断为子宫内有炎性产物生成。

直肠检查的判断标准:一侧或两侧子宫角增粗增长,质度变硬,弹性下降,或子宫角变细变硬者,或子宫角增粗变软者,子宫收缩反应减弱者,可以判断为子宫发生不同程度的病理变化。

6.1.3.5.2 慢性子宫内膜炎的防治方案

慢性子宫内膜炎的治疗方法很多,包括子宫冲洗、子宫内投入抗菌消炎药、激素疗法、中药疗法、激光疗法等,本试验主要采用子宫内注入药物和中药疗法。采用子宫内注入药物治疗时,若子宫内有液体积留,需先用 0.05%~0.1% 的新洁而灭溶液冲洗子宫并将冲洗液及子宫内容物尽量导出。

子宫内注入药物:分别用如下药物注入子宫,较严重病例重复注入 3~5 次。

自配土霉素油剂:土霉素 1.0 g,以丙二醇 20 mL 为溶剂,现配现用或 24 h 内用完。

普鲁卡因青霉素:上海兽药厂生产。子宫内每次投入 400 万单位的普鲁卡因青霉素,以生理盐水或注射用水稀释。

碘甘油:0.2% 的碘甘油 30~40 mL。

露它净:北京兽药厂生产。原液稀释为 4%,子宫内注入 30~40 mL。

促孕灌注液:每次 40 mL。较严重的病例,每隔 3 d 注入一次,连注 3 次。

激素疗法:肌肉注射氯前列烯醇 0.4 mg,10 d 后重复注射一次。

中药疗法:基本方剂:当归 30 g,川芎 20 g,红花 15 g,益母草 30 g,枳壳 40 g,丹参 40 g,丹皮 30 g,桃仁 20 g,公英 40 g,紫花地丁 40 g,天花粉 30 g,淫羊藿 30 g,赤芍 20 g,漏芦 20 g,牛膝 20 g,熟地 25 g,生地 25 g,黄芩 30 g,香附 30,甘草 15 g,随证加减。子宫发生硬化者,加三棱 25 g、莪术 25 g;子宫角增粗松软者,加黄芪 30 g,白术 30 g,青皮 30 g。子宫发生化脓者,加皂刺 30 g、忍冬藤 40 g。上述药物粉碎后内服,隔日 1 服,每个疗程 3~5 服。

6.1.3.6 胚胎死亡的控制

6.1.3.6.1 胚胎死亡及其临床诊断

胚胎死亡分为胚胎早期死亡和胚胎晚期死亡。早期死亡主要发生在受精后 16 d 之

内，晚期死亡主要发生在受精后 16 ~ 42 d。

牛胚胎死亡是一个复杂的难题，对其诊断和发病率的确定还非常困难，而且真正胚胎死亡的发生率是难以确定的。在临床上主要是以配种后超过一个发情周期后返情，而又没有表现出明显的外观症状，直肠检查没有发现子宫和卵巢的明显异常来作出判断。

6.1.3.6.2 胚胎死亡的防治方案

控制胚胎死亡，重在预防。本试验采取了以下 3 种预防方案控制胚胎死亡，并在人工授精后第 60 d 通过直肠触诊进行妊娠诊断，对以下 3 种方案的效果进行了比较。

孕酮补充：发情后第 1、2、3、4 d 每日肌肉注射孕酮 50 ~100 mg。

延迟黄体溶解过程：受体牛胚胎移植后第 8 d 或者在人工授精后 15 d 一次性肌肉注射 hCG 10,000 IU，以使黄体期延长，因而发情周期也延长。

中药方剂：采用补肾健脾，益气补血，活血化瘀的治疗原则。基本方剂为：杜仲 20 g、菟丝子 30 g、党参 30 g、白术 30 g、桑寄生 20 g、续断 30 g、黄芪 30 g、熟地 30g、当归 20 g、川芎 20 g、白芍 20 g、丹参 30g、砂仁 15 g、陈皮 30g、女贞子 20 g、枸杞子 30 g、五味子 30 g、巴戟 20 g、牛膝 20g、香附 30 g、炙甘草 25 g。隔日 1 次，共 3 次，配种或移植的前一个周期内服。

6.2 结果与分析

6.2.1 卵巢囊肿的治疗结果

6.2.1.1 卵巢囊肿的治愈标准

治疗后以卵巢上的大的囊性结构基本消退，恢复正常发情周期为标准。用 GnRH 治疗，一般在 18 ~ 23 d 恢复发情，GnRH 配合 PG 治疗，可以将恢复发情的时间提前到 12 d 左右。单纯用中药内服法，治愈的母牛在 15~25 d 可恢复发情。

6.2.1.2 临床治疗效果

在患牛第一次恢复发情后立即进行人工授精，60 d 通过直肠检查进行妊娠诊断，统计其受胎率。各种治疗方法的效果见表 6-1。

表 6-1 4 种治疗方法对奶牛卵巢囊肿的治疗结果比较
Table 6-1 Results of four treatment methods to ovarian cyst in dairy cows

治疗方法	治疗头数	治愈数	治愈率(%)	治愈后第一情期受胎率(%)
GnRH	53	44	83.0(44/53)	52.3 (23/44)
GnRH+PG	66	57	86.4(57/66)	54.4 (31/57)
中药	42	31	73.8(31/42)	58.1 (18/31)
GnRH+中药	87	76	87.4(76/87)	55.3 (42/76)

由表 7-1 可见，以 GnRH 治疗奶牛卵巢囊肿具有比较显著的效果，中药对奶牛卵巢囊肿的治疗效果不如激素疗法，若将 GnRH 与 PG 或中药合并应用，将会增强其疗效，

GnRH 配合 PG 可以将由治疗开始到恢复发情的时间从 18 ~ 23 d 提前到 12 d , 而 GnRH 与中药合并应用治愈率最高。中药单独治疗, 虽然治愈率不如其它三种方法, 但治愈后第一情期受胎率最高。

6.2.2 黄体退化不全形成硬肿的治疗结果

6.2.2.1 黄体退化不全形成硬肿的治愈标准

治疗后 2 个月之内, 卵巢大小恢复正常, 卵巢上的硬肿基本消失, 恢复发情或卵巢上有正常的卵泡或黄体形成。

6.2.2.2 临床治疗效果

临床上共处理患牛 46 头, 经一个疗程治疗后 20~40 d 治愈 24 头, 经第二疗程治愈 18 头, 总治愈率 91.3%。对治愈的 42 头奶牛中的 30 头进行超排处理。

6.2.2.3 黄体退化不全形成硬肿治愈牛与正常奶牛冲胚效果比较

对上述治愈的 42 头奶牛中的 30 头进行超排处理, 同时处理正常奶牛 25 头作为对照。冲胚结果见表 6-2。

表 6-2 黄体退化不全形成硬肿治愈牛与正常奶牛冲胚效果比较
Table 6-2 Comparison of embryo recovery between normal and cured dairy cows

组别	头数	平均胚胎数	平均可用胚胎数	胚胎可利用率%
治愈牛	30	8.1 ± 6.81^a	5.6 ± 3.34^a	69.1 ^a
正常牛	25	8.7 ± 5.11^a	6.1 ± 2.77^a	70.1 ^a

注: 表中同列数据后字母为显著性标记。字母相同差异不显著, 字母不同差异显著($P < 0.05$), 下表同。

由表 6 - 2 可见, 黄体退化不全形成硬肿的治愈牛进行超排处理后, 所获得的平均胚胎数、平均可用胚胎数和胚胎可利用率稍低于正常奶牛, 和正常奶牛相比差异不显著 ($P > 0.05$)。说明应用理气行滞、活血祛淤、化痰散结消癥的原则治疗黄体退化不全形成硬肿的奶牛疗效显著, 而且可以用于再次超排, 提高供体牛的利用率。

6.2.3 持久黄体的治疗结果

6.2.3.1 持久黄体的治愈标准

用药后直肠触诊卵巢上黄体消退, 并有卵泡发育, 外观有发情表现并可正常排卵者, 即判为基本治愈, 配种后 60 d 左右直肠触诊检查是否怀孕。

6.2.3.2 临床治疗效果

由表 6 - 3 可见, PG、EB、PMSG 和促孕灌注液对治疗奶牛持久黄体均有一定疗效, 但是 EB 和 PMSG 的效果不如 PG 和促孕灌注液的治疗效果, 从治愈牛的受胎情况来看, 促孕灌注液的效果最好。

表 6-3 4 种治疗方法对奶牛持久黄体的治疗结果比较

Table 6-3 Different effects of various treatment methods for persistant corpus luteum of dairy cows

治疗方法	治疗头数	治疗后出现发情时间(d)	治愈数	治愈率(%)	治愈后二次情期受胎率(%)
PG	358	2 ~ 5	319	89.1 ^a (319/358)	75.5 ^a (241/319)
EB	37	1 ~ 2	23	62.2 ^b (23/37)	47.8 ^b (11/23)
PMSG	35	7 ~ 10	23	65.7 ^b (23/35)	56.5 ^b (13/23)
促孕灌注液	78	7 ~ 15	67	85.9 ^a (67/78)	77.6 ^a (52/67)

6.2.4 卵巢机能减退的治疗结果

6.2.4.1 卵巢机能减退的治愈标准

一个情期之内出现发情表现，卵巢上有卵泡发育并且可以成熟排卵。

6.2.4.2 临床治疗效果

表 6-4 4 种治疗方法对奶牛卵巢机能减退的治疗结果比较

Table 6-4 Comparison of treatment effects of 4 methods on afunctional ovaries of dairy cows

治疗方法	治疗头数	治疗后出现发情时间(d)	治愈数	治愈率(%)	治愈后二次情期受胎率(%)
FSH+LH	82	7 ~ 12	62	75.6(62/82)	62.9(39/62)
PMSG + hCG	105	5 ~ 8	67	63.8(67/105)	58.2(39/67)
促孕灌注液	235	7 ~ 20	172	73.2(172/235)	65.7(113/172)
中药治疗	389	7 ~ 20	321	82.5(321/389)	67.3(216/321)

治疗奶牛卵巢机能减退应用的方法不同，治愈率也不同，而且治愈后对其受胎率的影响也不一样。比较应用 FSH+LH、PMSG + hCG、促孕灌注液和中药对治疗奶牛卵巢机能减退的效果，由表 6-4 的结果可以看出，内服中药和子宫内注入促孕灌注液对治疗奶牛卵巢机能减退的效果较应用激素效果要好，但要考虑到激素疗法一次用药，而内服中药疗法一个疗程要服药 5 服，子宫内注入促孕灌注液用药 2 次。

6.2.5 慢性子宫内膜炎的治疗结果

6.2.5.1 慢性子宫内膜炎的治愈标准

发情周期正常，发情时流出的粘液清亮，无混杂物或絮状物，阴道检查粘膜色泽正常，子宫颈外口部无肿胀或病变，直肠检查子宫的大小、质度、收缩力正常，即判为慢性子宫内膜炎临床痊愈。

6.2.5.2 临床治疗效果

表 6-5 6 种治疗方法对奶牛慢性子宫内膜炎的治疗结果比较
Table 6-5 comparison of treatment effects of 6 methods on chronic endometritis of dairy cows

治疗方法	治疗头数	临床治愈数	治愈率(%)	治愈后二次情期受胎率(%)
土霉素	226	193	85.4(193/226)	83.9 (162/193)
普鲁卡因青霉素	137	108	78.8(108/137)	75.0 (81/108)
碘甘油	66	41	62.1(41/66)	70.7 (29/41)
露它净	161	127	78.9(127/161)	79.5 (101/127)
促孕灌注液	315	267	84.8(267/315)	82.0 (219/267)
PG	186	142	76.3(142/186)	78.9 (112/142)
中药治疗	528	419	79.4(419/528)	84.7355/419()

治疗慢性子宫内膜炎的方法有多种,本文只列举了常用的子宫内注药法常用的几种药物和中药内服治疗法。从表 7-5 可以看出,土霉素、促孕灌注液和前列腺素一个疗程治愈效果较好,而治愈后 2 个情期配种受胎率以土霉素组和内服中药组效果更好。

6.2.6 早期胚胎死亡的预防效果

6.2.6.1 对胚胎死亡控制效果的评价

妊娠 60 d 后进行直检,比较处理组和相同条件下未处理组之间的受胎率,以判断各处理组的预防效果。

6.2.6.2 对胚胎死亡控制的效果

表 6-6 不同处理方法对胚胎死亡控制效果比较
Table 6-6 comparison of prevent effects of various methods on bovine embryonic loss

组 别	人工授精奶牛		胚胎移植受体牛	
	处理时间	受胎率(%)	处理时间	受胎率(%)
对照组	-	53.3 (16/30) ^a	-	43.3 (13/30) ^a
P ₄	发情后第 1, 2, 3, 4 d	56.1 (74/132) ^a	发情后第 1, 2, 3, 4 d	49.2 (32/65) ^b
hCG	发情后第 15 d	60.3 (35/58) ^b	移植后第 8 d	53.3 (32/60) ^b
中药	配种的前一个周期	58.3 (21/36) ^b	移植的前一个周期	55.3 (31/56) ^b

由表 6-6 显示,和对照组相比,经 3 种方法处理后,人工授精奶牛和胚胎移植受体牛的受胎率均明显提高,尤其是中药处理组对胚胎死亡的控制效果更显著。

6.3 讨论

繁殖障碍是影响奶牛业繁殖效率和经济效益的主要不利因素,也是影响胚胎移植

供体超排和受体利用的不利因素。随着奶牛产奶量的增加和奶牛场规模的扩大,奶牛卵巢和子宫机能障碍也表现出较大幅度增加的趋势,严重地影响了奶牛的繁殖力,使奶牛业的经济效益下降^[7,8,9,10,11,17,18,47]。胚胎移植过程中,由于供体母牛的生殖机能障碍,使得在超排冲胚时所获得的胚胎数量减少,甚至冲不到胚胎,或者胚胎的质量严重下降,可利用率大大降低^[3,19];而若受体母牛发生生殖机能障碍,则影响同期发情效果,或者即使移植其受胎率也很低,造成胚胎移植效率下降,也因而影响到胚胎移植技术的大规模推广和应用^[3,19]。

卵巢囊肿是引起奶牛不孕症的常见原因之一。激素疗法可以使绝大多数的患病母牛恢复,目前临床上常用的药物为 GnRH 及其类似物、LH、hCG 和 PG^[14,20,22,23]。另外,加强饲养管理,保证供给充足的营养,特别是对缺硒地区给母牛补充含硒饲料,可以减少或预防本病的发生^[21,28]。对产后 2 wk 左右的母牛注射 GnRH 对本病的预防有一定的作用^[2,17,47]。

黄体退化不全形成硬肿是在胚胎移植工作中遇到的一种比较特殊的情况。这主要是由于超排 FSH 剂量过大,而冲胚后又没有及时地采取消黄措施造成的。笔者曾经数次遇到这类病例,有的母牛发生本病后几个月甚至有长达 2 年不能恢复正常生殖机能,卵巢上的硬肿长期不消退,有的表现长期不发情,有的即使发情,人工授精也不能怀孕,个别母牛由于胚胎没有冲尽,发生多胎怀孕,最多的 2 例达到 4 胞胎,于妊娠 7 个月左右早产。对本病的诊断和治疗没有前人的直接经验可遵循,曾经误诊为持久黄体,但是用前列腺素治疗效果不佳。因此借鉴传统中医方法进行治疗。

以祖国传统医学的观点,卵巢囊肿和黄体退化不全均属于“癥瘕”、“肠覃”、“积聚”的范畴^[24,25,26,27,29],认为它们多由于气滞血瘀与水湿互凝所致。病机主要为脏腑功能失调以及气滞血瘀,痰浊凝滞。痰浊内生,痰气郁结,气滞血瘀,痰瘀留滞胞络,闭塞隧道而发为本病。瘀血既是病理产物,又是致病因素^[24,25,27,29]。中医古籍早有类似本病之论述,《灵枢》称之为“肠覃”。“肠覃何如,……寒气乃起,息肉乃生,其始生也,大如鸡卵,稍以益大,至其成,如怀子之状,久者离岁,按之则坚,推之则移,月事以时下,此其候也”(《灵枢·水胀篇》)。根据本病之病因病机,治疗应以理气行滞、活血祛瘀、化痰散结消癥立法。方中当归、桃仁、红花、郁金、元胡、鸡血藤、丹参、丹皮、五灵脂活血化瘀,青皮、浙贝、制半夏、砂仁理气化痰行滞,三棱 30 g、莪术、水蛭 20 g、穿山甲破血消癥,海藻 20 g、夏枯草 30 g、皂刺可增软坚散结、破瘀消癥之效,黄芪 30 g、砂仁、鸡内金健脾益气,甘草和中、调和诸药,共奏消除癥瘕之效。

持久黄体 and 卵巢机能减退均属于卵巢功能失调性不孕症。临床上以激素疗法为主,常用的激素有 FSH、LH、GnRH、PMSG、Es、PGs 等^[1,2,13,17,30,31,32,33]。以中医学和中兽医学的观点,肾主生殖,二者都可以归类为肾虚和气滞血瘀型不孕症,因此治疗以补益肾元、活血化瘀、健脾益气为原则。在方剂中采用补肾兴阳,补血活血,滋阴补肾等方药进行治疗^[35,36,37]。方中熟地、淫羊藿、仙茅、肉苁蓉、枸杞子、女贞子补肾益精,当

归、川芎、益母草、五灵脂补血活血祛瘀，党参、黄芪、山药、青皮、陈皮健脾理气，白芍、香附疏肝解郁，甘草和中、调和诸药。诸药和合，共收补肾益精，调和阴阳之功，促使生殖机能恢复正常。

慢性子宫内膜炎多是由子宫急性感染而来，例如分娩时难产，产道损伤和污染，产后胎衣不下，医源性污染，其它部位发生感染性炎症或者全是感染继发子宫内膜炎，以及其它各种因素造成子宫产后复旧不全，均可导致慢性子宫内膜炎的发生^[1,2,17,47]。

对于慢性子宫内膜炎的治疗，子宫内投药是一种简便而有效的方法。人们尝试应用了多种药物和剂型^[1,17,41,42,43,44,47]。但应用子宫内给药要掌握使药物在子宫中保持较长时间的有效治疗浓度和尽量保证抗菌消炎药物的广谱抗菌性的原则。因为对于慢性子宫内膜炎的治疗主要是要求药物在子宫粘膜局部发挥作用，某些药物剂型可以在子宫很快被吸收进入子宫深层或进入全身血液循环，在子宫粘膜局部停留时间短，对子宫粘膜局部的作用就减弱；对于广谱抗菌药物又不能用刺激性过强的药物，如果应用某些具有强刺激性的药物，虽然有较强的抑菌杀菌效果，但也容易对子宫粘膜造成不同程度的伤害，也是不可取的。笔者的体会是，所用的药物中，以在子宫内吸收缓慢的油剂和混悬剂及一些中药制剂效果更好，如土霉素油剂和促孕灌注液治愈率相对更高。对于一些较严重的病例，还需要几种药物和多种方法配合治疗，例如子宫内注入抗菌消炎药的同时配合中药内服，效果会更显著。

早期胚胎死亡问题已经越来越引起人们的重视，多种因素可以造成本病的发生^[48,49,50,51,52,53,55,56]，即使是在正常牛，在受孕和母体识别期间前后也有高的胚胎死亡率(Mann et al., 1999)^[52]。在这一时期之后的损失较少，但仍然影响受胎率。对牛的早期胚胎死亡研究表明，AI 后肉牛的受精率是 90%，在第 8 d 胚胎存活率为 93%，而在 AI 后第 12 d 胚胎存活率仅为 56%(Diskin and Sreenan, 1980)^[59]。在奶牛，AI 后第 7 d，只有 48%的胚胎被认为是正常的(Weibold, 1988)^[58]。因此，真正的妊娠损失可能发生在 AI 后 2 周之内。胚胎死亡的发生，除了遗传性因素外，还与 AI 时间掌握不当，以及授精前后内分泌异常、泌乳、环境因素和管理因素有关。各种因素可以造成胚胎发育与子宫内环境状况的不同步，而子宫在发情配种或胚胎移植后的组织学变化和卵巢、子宫和胚胎的内分泌机能及相互协调有密切关系，因此控制胚胎死亡的关键是调整授精前后的内分泌状况，使机体处于有利于胚胎发育和附植的状态，减少胚胎的死亡。孕酮对维持怀孕是必需的，妊娠期间孕酮水平低下与胚胎死亡特别是早期胚胎死亡是直接关联的。因此在妊娠早期补充孕酮或增强黄体功能能够减少胚胎的损失。本实验中应用发情或授精后连续注射 P₄ 和在周期黄体退化前增强黄体功能（注射 hCG）来控制早期胚胎死亡，取得了明显的效果，受胎率比对照组显著增高。但是给予孕酮的剂量和注射 hCG 的时机要掌握好。有资料显示，在配种后第 1 d 和第 2 d 即给母牛阴道内放置 CIDR(1.9 g P₄) 并不能提高受胎率，这可能和 CIDR 内孕酮的大量释放引起机体正常的 LH 分泌紊乱有关；而在发情配种后第 11 d、第 12 d 和第 17 d 之后注射 hCG 对受胎率的影响也很低^[60]，

第 15 d 是母牛妊娠识别的一个生理性“窗口”。

奶牛生殖机能障碍的发生大多数是由于不良的饲养管理水平及产前产后各种疾病造成的,因此要加强饲养管理,特别是要做好围产期母牛的管理,才能有效地降低这类疾病的发病率。对家畜特别是奶牛生殖机能障碍的治疗方法有很多种,主要包括激素疗法、抗生素疗法、物理疗法(如特定电磁波疗法、激光疗法、红外线疗法、针灸疗法等),以及传统医学疗法等^[1,2,17,61]。而物理疗法由于受设备条件和兽医临床实践的特殊性的限制,其大规模推广应用目前还受到一定困难,激素疗法和抗生素疗法在当今也遇到一些问题,如激素的剂量和给药时间难以掌握,激素和抗生素的残留对乳制品的质量的影响和对人类健康的危害已经提到议事日程上来。目前在国内外的大型乳品企业已经要求无抗奶和无激素残留奶,而药物残留对我国的一些肉制品出口企业曾经造成了巨大的经济损失,因而国家在制药行业已强行停止某些抗生素原料药的生产。从这些可以看出,在畜牧业生产和兽医临床实践中,迫切需要开发出疗效显著而又对人和动物没有危害的治疗方法。在国外已经有人用酶制剂替代抗生素治疗奶牛乳腺炎和子宫内膜炎,而且取得了很大的成功^[45]。我国的传统医学和传统兽医学积累了几千年的经验,在这方面具有独到的优势。内服中药虽然疗效显著,但是由于其用药剂量过大,组方复杂,使用不便等缺点,在临床实践中的应用受到一定限制。南京农业大学的宋大鲁教授在上世纪八十年代研究成功的促孕灌注液,不但对动物卵巢机能减退有显著效果,而且对持久黄体、慢性子宫内膜炎也有非常好的治疗效果^[37,38,39,40]。近年我国也开发出其它一些用于家畜疾病治疗的纯中药提取制剂,如中国农科院中兽医研究所研制的“清宫液”^[46],胡秀芳等研制成功的“清宫消炎混悬剂”^[35,36],李树明研制成功的“宫炎宁”等^[61]。传统的中医药学与现代科学技术的有机结合,必将使祖国这一伟大瑰宝绽放出异彩。

6.4 小结

1. 卵巢囊肿的诊断以卵巢上存在时间超过 10 d,直径 25 mm 的囊泡性结构,且发情周期和发情表现异常为诊断标准。激素治疗以 GnRH 和 hCG 为主,中医以理气行滞,活血祛瘀,化痰散结消癥为治疗原则。本研究中激素疗法中 GnRH 一次治疗的治愈率为 83%, GnRH + PG 治愈率为 86.4%, 中药内服一个疗程治愈率为 73.8%, GnRH + 中药内服治愈率为 87.4%; 各治疗组治愈后第一情期受胎率分别为 52.3%, 54.4%, 58.1% 和 55.3%。
2. 黄体退化不全形成硬肿是奶牛胚胎移植中供体母牛出现的特殊情况。借鉴中国传统医学观点,将之归为“癥瘕”、“积聚”、“肠覃”范畴,采用理气行滞,活血祛瘀,化痰散结消癥的治疗原则,经 2 个疗程治疗,总治愈率 91.3%。治愈母牛再次用于超排,所获胚胎数量及可利用率与正常母牛没有显著差异。
3. 在本研究中对持久黄体的治疗方法中,以促孕灌注液和激素疗法中 PG 注射效果最好,治愈率分别为 85.9% 和 89.1%,治愈后 2 个情期受胎率分别为 77.6% 和 75.5%。

4. 本研究中卵巢机能减退 4 个治疗组 FSH + LH 组、PMSG + hCG 组、促孕灌注液组和中药内服组的治愈率分别为 75.6%、63.8%、73.8%和 82.5% ; 治愈后 2 个情期受胎率分别为 62.9%、58.2%、65.7%和 67.3%。
5. 本研究中治疗慢性子宫内膜炎的几种子宫内注药方法中, 以土霉素油剂和促孕灌注液效果较好, 治愈率分别为 85.4%和 84.8%,治愈后 2 个情期受胎率 83.9%和 82.0 ; PG 注射治愈率为 76.3%,治愈后 2 个情期受胎率为 78.9% ; 中药内服组治愈率为 79.4%, 治愈后 2 个情期受胎率 84.7%。
6. 对胚胎死亡控制的效果。对照组、P₄ 补充组、hCG 组和内服中药组人工授精后的受胎率分别为 53.3%、56.1%、62.1%和 58.3% ; 胚胎移植后受胎率分别为 43.3%、49.2%、53.3%和 55.3%。与对照组相比, 经处理后, 受胎率均有不同程度的提高。

参考文献 :

- [1] 陈北亨主编. 兽医产科学. 北京, 农业出版社(第二版), 1988.3
- [2] 王建辰主编. 家畜生殖内分泌学. 北京, 农业出版社(第一版), 1993.10
- [3] 和协超, 季维智. 影响牛胚胎移植妊娠率的因素分析[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 18(4): 11 ~ 14
- [4] 乌志萍, 晋鹏 合译. 高产奶牛繁殖障碍的原因与对策[J]. 中国奶牛, 1995, 4: 54 ~ 57
- [5] 于德涌. 奶牛繁殖障碍的防治[J]. 中国奶牛, 1995, (5): 34 ~ 35
- [6] 刘崇立, 门凤春. 高产奶牛的繁殖障碍及对策[J]. 中国奶牛, 2002(4), 52 ~ 53
- [7] 刘琼霞, 李秀山, 陈铁桥等. 奶牛繁殖障碍综合征研究进展[J]. 吉林畜牧兽医, 2004(2): 13 ~ 16
- [8] 程郁昕, 江汪洋, 许春香等. 奶牛场成母牛淘汰的原因及分析[J]. 黄牛杂志, 2004, (1): 57 ~ 60
- [9] 刘青, 冯东来. 浅谈奶牛繁殖障碍的发生和防治[J]. 中国奶牛, 1998, (2): 31 ~ 33
- [10] Wiltbank MC. Improving reproductive efficiency in high producing dairy cows. 20th World Buiatrics Congress. pp571-583, 1998
- [11] Fourichon C, Seegers H, Malher X. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta analysis[J]. Theriogenology 53, 1729-59, 2000
- [12] Disorders Previous to Conception on Pregnancy Attrition in Dairy-Cows[J]. Theriogenology 46, 643~648, 1996
- [13] S. McDougall, C.W.R. Compton, D.W. Hanlon, P.J. Davidsonb, D.J. Sullivan, A.H. Gore, F.M. Anniss. Reproductive performance in anestrus dairy cows following treatment with two protocols and two doses of progesterone[J]. Theriogenology 63 (2005) 1529-1548
- [14] H. ALLEN GARVERICK .1997. Ovarian Follicular Cysts in Dairy Cows[J]. 1997, J Dairy Sci 80 (5):995-1004
- [15] William J. Silvia1, Angela S. McGinnis, T. Ben Hatler. A comparison of adrenal gland function in lactating dairy cows with or without ovarian follicular cysts. Reproductive Biology[J]. 2005, Vol. 5(1): 19~29
- [16] Archibald LF, Thatcher WW, 1992. Ovarian follicular dynamics and management of ovarian cysts. In: Large Dairy Herd Management. Van Horn HH, Wilcox CJ, eds. Am Dairy Sci Assoc, Champaign, IL.
- [17] 郑星道著. 奶牛产科学. 长春, 吉林大学出版社, 1990.5
- [18] M. C. Lucy ,2001. ADSA Foundation Scholar Award .Reproductive Loss in High Producing Dairy Cattle: Where Will It End? [J]. J. Dairy Sci. 84:1277-1293

- [19] Liu HC, Jones GS, Jones HW et al. Mechanisms and factors of early pregnancy wastage in in-vitro fertilization embryo transfer patients[J]. *Fertil Steril*, 1998;50:95 ~ 101
- [20] Bartlett PC, Niswanger PK, Kaneene JB, et al, 1986. Cystic follicular disease in Michigan Holstein-Friesian cattle: incidence, descriptive epidemiology, and economic impact[J]. *Prev Vet Med* 4:15.
- [21] Harrison JH, Hancock DD, Conrad HR, 1984. Vitamin E and selenium for reproduction of the dairy cow[J]. *J Dairy Sci* 67:123-132.
- [22] Pursley JR, Kosorok MR, Wiltbank MC, 1997. Reproductive management of lactating dairy cows using synchronization of ovulation[J]. *J Dairy Sci* 80:301-306.
- [23] Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC, 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF_{2α} and GnRH[J]. *Theriogenology* 44:915-923.
- [24] 廖越. 中医治疗卵巢囊肿综述[J]. *福建中医学院报*, 2005, vol.15(1):62 ~ 64
- [25] 胡静月. 肖承琮教授论治卵巢囊肿的经验[J]. *北京中医药大学学报(中医临床版)*, 2004, vol.11(1), 33~35
- [26] 陈荣, 江琴. 卵巢囊肿中医药治疗概况[J]. *中国中医药信息杂志*, 1997, vol.4(11):13 ~ 15
- [27] 沈维力, 曲相权, 王安生. 中西医结合治愈奶牛卵巢囊肿病案[J]. *中兽医学杂志*, 2001(1):31
- [28] 高纯一, 祁永锋. 奶牛卵巢囊肿的研究进展与治疗[J]. *河北畜牧兽医* 2002, Vol.18,3 p30
- [29] 何爱波, 卓亚佩. 消囊汤与散囊丸治疗卵巢囊肿临床疗效观察[J]. *四川中医*, 1995(10):36
- [30] 魏学良, 王新华, 张斌等. 用激素治疗奶牛屡配不孕症[J]. *中国奶牛* 1995(2):34
- [31] 赵建营, 贺军. 应用促排 3 号治疗奶牛不孕症[J]. *中国兽医杂志*, 1995, (4):36 ~ 37
- [32] 于宗义. 用激素治疗奶牛卵巢机能障碍性不孕症[J]. *中国兽医科技*, 1995(2):35 ~ 36
- [33] Lewis GS, Caldwell DW, Rexroad CE Jr, Dowlen HH, Oren JR (1990). Effects of gonadotropin-releasing hormone and human chorionic gonadotropin on pregnancy rate in dairy cattle[J]. *J Dairy Sci*, 73:66.
- [34] Eduvie LO, Seguin BE (1982). Corpus luteum function and pregnancy rate in lactating dairy cows given human chorionic gonadotropin at mid diestrus[J]. *Theriogenology*, 1982, 17 :41~ 45.
- [35] 蒋兆春, 苏德辉, 奚晋弗等. 奶牛繁殖障碍中草药防治技术与作用机理[J]. *中兽医学杂志* 1999(2):23 ~ 27
- [36] 蒋兆春, 苏德辉, 胡秀芳. 中草药防治奶牛不孕症及其作用机理[J]. *江苏农业学报*, 1995, (2):36 ~ 39
- [37] 宋大鲁, 宋金斌, 胡元亮等. 中药促孕灌注液的研制和应用[J]. *南京农业大学学报*, 1987, (3):115 ~ 119
- [38] 宋大鲁, 胡元亮, 周立稳等. 中药促孕灌注液治疗家畜不孕症的机理研究[J]. *南京农业大学学报*, 1993, 16(增刊):142 ~ 148
- [39] 尹保民, 赵玉奎, 金庭辉. 应用促孕灌注液治疗奶牛不孕症的体会[J]. *中国畜牧杂志*, 1999, (1):47
- [40] 胡元亮, 徐魁梧, 宋大鲁等. 新型中药促孕灌注液治疗奶牛子宫内膜炎及促孕效果验证[J]. *畜牧与兽医*, 1999, (3):6~8
- [41] 韩振英. 奶牛慢性子宫内膜炎的诊疗[J]. *河北农业大学学报*, 1994, vol.17(11):238~240
- [42] 李长安. 奶牛慢性子宫内膜炎的综合治疗[J]. *中兽医医药杂志*, 1996, (5): 25 ~ 26
- [43] 张桥, 彭本英, 金巍. 奶牛慢性子宫内膜炎的治疗试验[J]. *湖北农学院学报*, 2003, (5): 331~333
- [44] 陈永忠. 乳牛子宫内膜炎非抗生素药物的治疗[J]. *中国兽医科技* 2002, vol.32(6): 41~41
- [45] Marc Drillich, Damaris Raab, Miriam Wittke et al. Treatment of chronic endometritis in dairy cows with an intrauterine application of enzymes: A field trial[J]. *Theriogenology*, 2005, 63 :1811~1823
- [46] 张来英, 陈登天, 田志军. “清宫液”治疗奶牛不孕症对比试验[J]. *草食家畜*, 1998, (3):46 ~ 47
- [47] (美) 威廉·C·雷布汉著. 赵德明, 沈建忠主译. 奶牛疾病学. 北京, 中国农业出版社(第一

版).1999.8

- [48] 蒋金湖. 早期胚胎死亡的重要原因 子宫环境与胚胎发育不同步[J]. 畜牧与兽医, 1995,vol.27(6): 275 ~ 277
- [49] 李裕强,张涌. 母体免疫因素与早期胚胎死亡[J]. 动物医学进展, 1998,vol.19(3):6~9.
- [50] 雷安民,安立龙,奚忠英.环境因素与牛早期胚胎死亡[J]. 家畜生态,1998,vol.19(2):40 ~ 42
- [51] 杜立银, 孙树民, 姜鹏等. 影响奶牛胚胎死亡的病因探析[J]. 动物保健, 2004,(1), 7 ~ 9
- [52] Mann, G. E., Lamming G. E., Robinson R. S. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy[J]. J. Reprod. Fertil, 1999,Suppl. 54:317~328
- [53] Wiebold, JL. Embryonic mortality and the uterine environment in first-service lactating dairy cows[J]. J Reprod Fertil. 1988 Nov;84(2):393-9.
- [54] Westwood C. T, Leant I. J, and Garvin. J. K. Factors Influencing Fertility of Holstein Dairy Cows: A Multivariate Description[J]. Journal of Dairy Science, 2002, 85(12): 3225~3237
- [55] Hansen P. J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective[J]. J. Anim. Sci. 2002,80(E. Suppl. 2):E33~E44
- [56] Mitchell W. Smith and Jeffrey S. Stevenson.. Fate of the Dominant Follicle, Embryonal Survival, and Pregnancy Rates in Dairy Cattle Treated with Prostaglandin $F_{2\alpha}$ and Progestins in the Absence or Presence of a Functional Corpus Luteum[J]. J. Anim. Sci. 1995. 73:3743~3751
- [57] Thurmond MC, Picanso JP, Jameson CM. Considerations for use of descriptive epidemiology to investigate fetal loss in dairy cows[J]. J Am Vet Med Assoc 1990,197 : 1305 ~ 1312,
- [58] Sartori R, Sartor-Bergfelt R, Mertens S. A, et al. Fertilization and Early Embryonic Development in Heifers and Lactating Cows in Summer and Lactating and Dry Cows in Winter[J]. J. Dairy Sci.2002, 85:2803~2812
- [59] Diskin MG, Sreenan JM. Fertilization and embryonic mortality rates in beef heifers after artificial insemination[J]. J Reprod Fertil 1980; 59: 463~468.
- [60] Eduvie LO, Seguin BE (1982) Corpus luteum function and pregnancy rate in lactating dairy cows given human chorionic gonadotropin at mid diestus[J]. Theriogenology 17 :41 5.
- [61] 李树明,曾富强,王均等.“宫炎宁”治疗奶牛子宫内膜炎试验[J]. 西南农业大学学报(社会科学版), 1995(3):33 ~ 36

结 论

- 1 应用 CIDR + FSH 递减法超排成功率和平均回收可用胚胎数分别为 89.50%和 6.12 枚；应用 PG + FSH 递减法超排成功率和平均回收可用胚胎数分别为 90.02%和 5.98 枚；利用发情周期 9~11 d 的自然发情奶牛直接 FSH 递减法超排的成功率和平均回收可用胚胎数分别为 98.54%和 7.56 枚，效果最好。供体奶牛超排处理中采用性控精液人工授精，平均可用胚胎为 4.70 枚。15 月龄以上的青年奶牛进行超排处理较适宜，连续重复超排次数应控制在 3 次以内，超排处理间隔最短时间应该选择 46~60 d。经产母牛 1~3 胎次，且产后间隔时间在 80~90 d 超排效果较好。
- 2 对初选受体牛采用二次 PG 法、CIDR+PG 法和一次 PG 法进行同期发情处理，同期发情率分别为 75.60%、77.39%和 72.15%；营养水平偏好的青年受体牛利用率高；鲜胚和冻胚移植后的妊娠率分别为 55%~57%和 46%~47%；以 EG 作为冷冻介质冷冻保存胚胎并于 35 解冻后可以直接移植。以中医中药调理未孕受体牛后进行同期发情处理，受体利用率和受胎率提高；产后 20~25 d 的经产受体牛应用 GnRH 联合 PG 调节处理，受体利用率和自然恢复组相近，产犊和同期发情间隔时间缩短。
- 3 直径为 3~6 mm 的卵泡所获得的至少 3 层以上颗粒细胞包裹的卵母细胞体外成熟率、受精率和囊胚率较高；在培养液中添加 10 ng/mL 的 EGF 有利于细胞成熟；在获能液中添加咖啡因对精子的活力和受精能力无显著的影响；培养液中添加 BSA、FBS、IGF-I、2%NEaa 和 1%Eaa 能显著提高牛胚胎体外发育和胚胎质量；使用 CR1aa+BSA 联合 SOFaa+5%FBS 以及细胞共培养体系培养 IVF 胚胎，能够提高胚胎的发育潜力；使用性控精液进行体外受精，受精率略下降。
- 4 采用连续复合式 PCR 技术鉴定了普通精液和性控精液授精产生的体内胚胎，胚胎性别鉴定后移植受胎率分别为鲜胚 41.03%和 40.00%，普通精液生产的冻胚鉴定后移植的受胎率为 37.72%；普通精液和性控精液体外胚胎性别鉴定后移植的受胎率分别为 27.78%和 25.00%；体内胚胎性别鉴定符合率达 97.25%。
- 5 针对几种常见的引起奶牛繁殖障碍的疾病的治疗和预防，取得如下结果：卵巢囊肿应用 GnRH、GnRH + PG、中药内服和 GnRH + 中药内服一次治愈率分别为 83%、86.4%、73.8%和 87.4%，各治疗组治愈后第一情期受胎率分别为 52.3%、54.4%、58.1%和 55.3%；黄体退化不全形成卵巢硬肿经 2 个疗程内服中药治疗后总治愈率为 91.3%；对持久黄体的治疗以促孕灌注液和激素 PG 注射效果最好，治愈率分别为 85.9%和 89.1%，治愈后 2 个情期受胎率分别为 77.6%和 75.5%；卵巢机能减退 4 个治疗组 FSH + LH 组、PMSG + hCG 组、促孕灌注液组和中药内服组的治愈率分别为 75.6%、63.8%、73.8%和 82.5%；治愈后 2 个情期受胎率分别为 62.9%、58.2%、65.7%和 67.3%；治疗慢性子宫内膜炎以土霉素油剂和促孕灌注液效果较好，治愈

率分别为 85.4%和 84.8%。 针对早期胚胎死亡采取 3 种控制措施, 对照组、P₄ 补充组、hCG 组和内服中药组人工授精后的受胎率分别为 53.3%、56.1%、62.1%和 58.3%; 胚胎移植后受胎率分别为 43.3%、49.2%、53.3%和 55.3%。治疗组的受胎率均有不同程度的提高。

本试验研究的创新点：

本试验在将胚胎工程技术应用于提高良种奶牛的繁育效率方面，进行了系统研究及较大规模的生产应用。

- (1). 在MOET技术体系中，对影响超排效果的各种因素进行了较全面的分析，优化了规模化生产胚胎的超排方案，取得了稳定的超排效果。特别是利用自然发情第9~11 d的母牛直接注射FSH，获得超排成功率98.54%，平均可利用率胚胎数7.56枚的良好效果，可以加快良种奶牛核心群的遗传进展。
- (2). 对受体牛同期发情的研究中，首次提出应用中草药对未能移植的和移植后未孕的受体牛进行调理后，利用率显著提高；怀孕并分娩的受体牛在产后20~25 d应用GnRH联合PG处理，可以使产犊到同期发情处理间隔缩短。
- (3). 在胚胎IVP技术研究中，从卵母细胞体外成熟、体外受精及胚胎体外培养三方面进行试验，首次报道使用国内性控精液体外生产胚胎并进行了移植，为完善胚胎体外生产体系和牛胚胎体外生产产业化奠定了基础。
- (4). 在奶牛性别控制研究方面，应用国产性控精液进行了一定规模的体内和体外胚胎的生产，而且每头次超排配种产生的性控胚胎达到4.7枚；应用PCR技术对体内和体外胚胎进行了较大规模的性别鉴定，并将性别鉴定的胚胎进行了移植，出生犊牛性别和鉴定结果符合率达到97%以上。
- (5). 对影响奶牛繁育效率的几种繁殖障碍疾病进行诊治和分析，比较不同疗法对几种疾病的治疗效果；对供体奶牛超排后黄体退化不全形成的硬肿，首次用中医疗法进行治疗，并获得良好的治疗效果；对降低奶牛胚胎死亡这一难题，进行了较有意义的探索，通过补充孕酮、注射hCG和内服中药，使人工授精和胚胎移植的受胎率均有不同程度的提高。

需进一步深入研究的方向

将胚胎工程技术应用于提高奶牛繁育效率，还存在许多尚待深入研究的课题。为了获得更多优质胚胎，针对奶牛个体差异需进一步优化超排程序。在胚胎IVP技术中，如果将IVF技术与性控精液和活体采卵技术结合应用，会大大提高体外生产胚胎的质量和效率。性别鉴定中需要优化PCR程序和胚胎取样技术，改进及开发新的鉴定方法，如以浊度为基础的LAMP法和标记探针的FISH法。要建立良种奶牛快繁体系，不仅仅是繁育技术上的问题，管理方面也特别重要，只有同时加强饲养管理和疾病防治管理，才能使繁育效率真正得到提高。

附录

Acrosome reaction: 顶体反应
Activation: (卵)激活
AETA: American Embryo Transfer Association 美国胚胎移植协会
AETE: European Embryo Transfer Association 欧洲胚胎移植协会
AI: artificial insemination, 人工授精
BCS: body condition score, 体况评分
 β -FGF: β -fibroblast growth factor
BST: bovine somatotropin, Posilac, 牛生长激素
CaM: calmodulin, 钙调素
Capacitation: 获能
CETA: Canadian Embryo Transfer Association 加拿大胚胎移植协会
CIDR: controlled internal drug release device, 可调控内部药物(孕酮)释放装置
COC: cumulus oocytes complex, 卵丘卵母细胞复合体
CSF: cytostatic factor, 细胞静止因子
Dephosphorylation: 去磷酸化作用
DF: dominant follicle, 优势卵泡
DIP: degradable intake protein, 可降解蛋白
DNA: deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸
DPBS: Dulbecco's phosphate buffer solution, 无钙镁磷酸缓冲液
E₁ estrone
E₂ estradiol
EB: estradiol benzoate, 苯甲酸雌二醇
eCG: equine chorionic gonadotrophin, 马绒毛膜促性腺激素(即孕马血清促性腺激素)
ECM: extracellular Matrix, 细胞外基质
EGF: epidermal growth factor, 上皮生长因子
ES cell: embryonic stem cell, 胚胎干细胞
ET: embryo transfer, 胚胎移植
F-body: F 小体
FCS: fetal calf serum, newborn calf serum, 胎牛血清
Fertilization: 受精
FITC: fluorescein isothiocyanate, 异硫氰酸荧光素
Fixed-time AI: 定时人工输精
Flow cytometer sorter: 流式细胞分类器
Follicular waves: 卵泡发育波
frozen embryo bank: 冷冻胚胎库
FSH: follicle stimulating hormone, 促卵泡素
Functionally dominant follicle: 功能性优势卵泡
GAGs: glycosaminoglycans, 氨基多糖
GalTase: galactosyltransferase, 半乳糖基转移酶
GH: growth hormone, 生长激素
GnRH gonadotropin releasing hormone, 促性腺激素释放激素
GVBD: germinal vesicle breakdown, 生发泡破裂
H33342: Hoechst BisBenzimide 33342, 荧光染料Hoechst33342
hCG: human chorionic gonadotrophin, 人绒毛膜促性腺激素, 绒促性素
hMG: human menopausal gonadotrophin, 人绝经期促性腺激素
H-Y antigen: male specific minor histocompatibility-y antigen, 雄性特异性弱组织相容性抗原
ICE: interleukin-1b converting enzyme, 白细胞介素-1b转化酶
ICM: inner cell mass, 内细胞团
ICSI: introcytoplasmic sperm injection, 胞质内精子(显微)注射

IETS International Embryo Transfer Society, 国际胚胎移植协会
IGF-1R: IGF-1 receptor, 胰岛素样生长因子-1受体
IGF-II: insulin like growth factor-2, 胰岛素样生长因子-2
IGFBP-1: insulin like growth factor-1 binding protein, 胰岛素样生长因子-1 结合蛋白
IGF-I insulin like growth factor-1, 胰岛素样生长因子-I
IL-6: interleukin-6, 白细胞介素-6
INH: Inhibin, 抑制素
IP₃: inosito triphosphate, 三磷酸肌醇
IRS-1: insulin receptor substrate-1, 胰岛素受体基质-1
IVC: *in vitro* culture (of embryos), 胚胎体外培养
IVF: *in vitro* fertilization, 体外受精
IVM: *in vitro* maturation (of oocytes), 卵母细胞体外成熟
IVP: *in vitro* production (of embryos), 胚胎体外生产
Kayomeres: 染色体泡
LIF: leukemia inhibitory factor, 白血病抑制因子
LOS: large offspring syndrome, 大胎综合症
MAP: mitogen-activated protein, 促细胞分裂激动蛋白
MOET multiple ovulation and embryo transfer, 超数排卵和胚胎移植
MPF: maturation Promoting Factor, 成熟促进因子
Nonsurgical Methods (of embryo recovery): 非手术法冲胚
Nuclear transfer or nuclear transplantation: 细胞核移植
Nymphomania: 慕雄狂
OMI: oocyte Maturation Inhibiting Factor, 卵母细胞成熟抑制因子
Oocyte recovery from live cows: 牛活体采卵
OPU: ovum pick-up, 活体采卵
Ovsynch: ovulation (排卵) 和 synchronization (同期化) 的复合词. 同期化排卵
P₄: progesterone, 孕酮
PAF: platelet activating factor, 血小板激活因子
Pb: polar body, 极体
PBS: phosphate buffed solution, 磷酸缓冲液
Phosphorylation: 磷酸化作用
PI: propidium Iodide, 碘化丙啶
PI3-kinase: phosphatidylinositol 3-kinase
PKC: protein kinase C, 蛋白激酶 C
PLC: phospholipase C, 磷酸脂酶 C
PMSG: pregnant mare serum gonadotrophin, 孕马血清促性腺激素
PRID: Progesterone Releasing Intravaginal Device, 孕酮释放阴道置入装置
PRL: prolactin 催乳素
Recognition of egg and sperm: 精卵识别
Sephrose-6MB: 琼脂糖-6MB
Sex control: 性别控制
SRY: sex determining region of the Y chromosome, Y 染色体性别决定区
Superovulation, Multiovulation: 超数排卵
swim down: (精子)潜游法
swim up: (精子)上游法
TGF- α : transforming growth factor- α , 转化生长因子- α
TGF- β : transforming growth factor- β , 转化生长因子- β
Timed AI: 适时人工输精
Transgenic Animal Pharming: 转基因动物制药
Zearalenone: 玉米赤霉烯酮

致 谢

本论文是在导师张涌教授的悉心指导下完成。3年来导师渊博的学识、敏锐的洞察力和判断力、一丝不苟的工作作风和平易近人的高尚品格使我受益终生。导师严谨的科学态度、开拓进取的精神、必胜的信念是我终生学习的榜样。师母高羽飞老师在生活学习上给予的无微不至的关怀和照顾使我终生难忘。

在试验设计和实施过程中，得到导师张涌教授认真的指导和帮助。西北农林科技大学王建辰教授、窦忠英教授、张英汉教授、王建华教授、张彦明教授、咎林森教授等在论文的研究开题和审阅时提出的宝贵建议和意见，西南农业大学动科院李跃民教授为我提供了宝贵的资料，在此表示衷心感谢。特别感谢马保华副教授、袁斌高级畜牧师、庞全海教授、杨增歧教授、张立研究员、庄淑珍副教授、刘华博士等在论文完成过程中和生活上大力帮助。

在整个试验研究中，得到了本实验室权富生副教授、安志兴博士、徐永平博士、郑月茂博士、赵晓娥博士等的极大帮助，在此表示由衷感谢。同时在论文实施和撰写中得到柏学进、曹鸿国、赛务加甫、李向臣、张志平、赵雪、阿拉达尔、王勇胜、刘凤军等博士生的帮助，另外得到山灵、张勃伟、吴月红、贺宽军、丛迎峰等硕士生的热心协助，感谢生物工程研究所全体师兄姐妹的大力帮助。

感谢西北农林科技大学动物科技学院的领导与老师、学校的领导与老师在我在读期间给予的关心和帮助。在试验内容完成过程中得到杨陵科元生物工程有限公司全体员工的大力协助，以及陕西省各市区县畜牧业部门的领导和科技人员的帮助，在此致以诚挚的谢意。

在我就读期间，内蒙古农业大学的校领导和动科院的领导与同事对我的研究工作给予极大关心，并为我的事业发展上创造了良好条件，特此致以躬谢。特别感谢临床兽医教研组祁生旺、李云章等教授对我工作的支持和帮助。

特别感谢我的爱人张心灵教授和女儿刘令圭在我学习和生活中给予的全力支持和无私奉献。感谢我的父母岳父母及所有亲人对我的学业理解、鼓励和支持！

再次向所有关心和支持我学习和工作的老师、同学、同事、朋友表示由衷地感谢！

刘俊平
二零零五年五月

个人简历

刘俊平，男，汉族，1963年生，内蒙古五原县人，现在内蒙古农业大学从事教学工作，中国畜牧兽医学会兽医产科学分会会员。1988年毕业于内蒙古农牧学院兽医系，获硕士学位，并于同年留校任教，先后主讲过“兽医产科学”、“兽医外科学”、“中兽医产科学”、“兽医学”等课程。于2001~2002年到西北农林科技大学生物工程研究所进修一年，2002年9月~2005年7月于西北农林科技大学攻读临床兽医学专业博士学位，主要研究方向为动物胚胎工程。



在攻读博士学位期间，作为主要完成人参加的科研课题有：农业部农业科技成果转化项目（高产良种荷斯坦奶牛良种奶牛胚胎和冷冻精液生产），国家计委高技术产业化示范工程项目（肉牛胚胎工程产业化），科技部重大攻关项目，国家奶业重大科技专项（奶牛良种快速繁育关键技术研究 2002BA518A01-2），陕西省攻关项目（动物胚胎工程产业化开发 2003K01-G3-02）。参加农业部“万枚高产奶牛胚胎移植富民工程”项目，并被聘为陕西省执行该项目的专家组成员。另外参加的课题还有“863”高技术项目（家畜体细胞克隆技术体系的建立和应用 2001AA13081），“973”重大基础研究项目（体细胞克隆胚胎核活动规律研究），国家自然科学基金重点项目（体细胞克隆大熊猫的研究）等。

在读期间主要发表的论文：

1. 刘俊平,张志平,安志兴,张涌.奶牛体外胚胎批量生产的研究.中国农学通报,2005,21(8)(已录用)
2. 刘俊平,曹鸿国,安志兴,张涌. LIF与心肌条件液在小鼠ES细胞分离中的差异比较. 中国农学通报, 21(3):30~33,154
3. 刘俊平,曹鸿国,郑月茂等.大鼠心肌条件培养基在昆明白小鼠胚胎干细胞分离培养中的效果. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(2):1~5
4. 刘俊平,曹鸿国,安志兴等.大鼠心肌细胞体外培养特性研究. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(1):9~12
5. 刘俊平,张秀,安志兴,徐永平,张涌. 牛早期胚胎体外发育条件的研究. 黄牛杂志,2004,30(12):29~31
6. 刘俊平,安志兴,张涌. 紫外线照射时间对孤雌激活和体外受精胚胎发育的影响. 动物医学进展,2004,25(2):109~110
7. 安志兴,刘俊平,王超等. 青年荷斯坦奶牛初次超数排卵试验.中国兽医学报,2003,23(3):303~304
8. 祁生旺,刘俊平,麻生福. 奶牛产后真胃变位治疗方法比较. 中国兽医杂志,2002,38(10):20~21
9. 张立,刘俊平,曹鸿国. 季节对放牧条件下安格斯和海福特超数排卵的影响. 中国农学通报,21(5):38~40
10. 曹鸿国,刘俊平,张涌. 小鼠卵母细胞的孤雌激活与ES细胞样集落分离. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2005,33(3):1~5