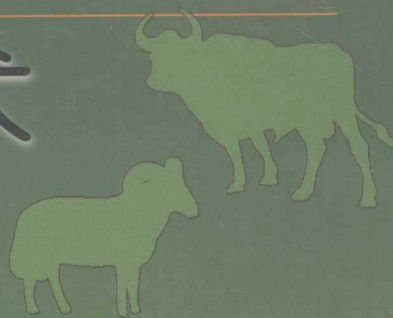


冯建忠 主编

牛羊胚胎移植 实用技术



 中国农业出版社

牛羊胚胎移植实用技术

冯建忠 主编

中 国 农 业 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

牛羊胚胎移植实用技术/冯建忠主编. —北京: 中国农业出版社, 2005.1

ISBN 7-109-09558-4

I. 牛... II. 冯... III. ①牛-卵子移植②羊-卵子移植 IV. ①S823.3②S826.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2005) 第 006141 号

中国农业出版社出版

(北京市朝阳区农展馆北路 2 号)

(邮政编码 100026)

出版人: 傅玉祥

责任编辑 郭永立 刘博浩

中国农业出版社印刷厂印刷 新华书店北京发行所发行

2005 年 4 月第 1 版 2005 年 4 月北京第 1 次印刷

开本: 850mm×1168mm 1/32 印张: 7.25

字数: 178 千字 印数: 1~5 000 册

定价: 12.00 元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

主 编 冯建忠

副主编 刘海军

编 者 冯建忠 刘海军 宋桂敏 张金龙

杨 升 史卫兵 张效生

审 稿 丁伯良

目 录

第一章 胚胎移植技术发展概述	1
一、胚胎移植在家畜品种改良中的意义	1
(一) 扩大优良母畜的数量	1
(二) 缩短世代间隔, 加速育种进程	1
(三) 加快特定品种的扩繁速度	2
二、国外胚胎移植技术发展历史	3
(一) 第一个繁荣时期	3
(二) 第二个繁荣时期	4
三、国内胚胎移植技术发展概况	5
(一) 初级实验研究阶段	6
(二) 小规模推广阶段	6
(三) 商品化应用推广阶段	7
四、家畜胚胎移植技术的应用前景	8
(一) 提高母畜繁殖力	9
(二) 克服母畜不孕症	9
(三) 胚胎的进出口	9
(四) MOET 育种计划	9
第二章 繁殖生理	11
一、牛羊生殖器官的解剖	11
(一) 母畜生殖器官的解剖	11
(二) 公畜生殖器官的解剖	16

二、牛羊的发情周期	21
(一) 发情周期的概念和类型	21
(二) 发情周期阶段的划分	22
(三) 初情期、性成熟和初配年龄	24
(四) 繁殖能力停止期	27
三、影响母畜发情周期的因素	27
(一) 光照	27
(二) 温度	28
(三) 饲料	28
四、生殖激素的变化和发情周期调节的机理	29
(一) 生殖激素的变化	29
(二) 母畜发情周期调节的机理	30
五、牛羊发情周期特点	35
(一) 母牛发情周期特点	36
(二) 母羊发情周期特点	37
第三章 生殖内分泌	38
一、概述	38
(一) 内分泌系统的生理作用	38
(二) 激素生理作用的基本特点	39
(三) 生殖激素的分类	39
二、脑部生殖激素	41
(一) 下丘脑激素	41
(二) 松果腺	48
(三) 垂体促性腺激素	50
三、性腺激素	55
(一) 性腺类固醇激素	55
(二) 性腺多肽类激素	59
四、胎盘促性腺激素	60

(一) 孕马血清促性腺激素	60
(二) 人绒毛膜促性腺激素	62
五、前列腺素	63
(一) 前列腺素的化学结构和种类	63
(二) 前列腺素的生理功能	63
(三) 前列腺素类似物	65
六、信息素	66
(一) 产生与存在部位	66
(二) 信息素和激素的区别	67
(三) 信息素的特点	67
(四) 信息素的生殖生理作用	67
(五) 信息素的作用机理	67
第四章 牛羊同期发情技术	68
一、同期发情的原理与应用	68
(一) 同期发情的原理	68
(二) 同期发情技术的应用	71
二、用于同期发情的激素和使用方法	73
(一) 抑制卵泡发育的激素	73
(二) 溶解黄体的激素	74
(三) 促进卵泡发育、排卵的激素	74
三、牛的同期发情方法	75
(一) 孕激素法	75
(二) 孕激素与雌激素配合法	77
(三) 前列腺素及其类似物 (PG) 法	78
(四) 孕激素与前列腺素 (或其类似物) 配合法	80
(五) 其他方法	81
四、羊的同期发情方法	81
(一) 孕激素法	82

(二) 孕激素加 PMSG 法	85
(三) 前列腺素 (或其类似物) 法	85
(四) 孕激素 + PMSG + PG 法	86
(五) 其他方法	86
五、应用于 MOET 中供体和受体的同步发情	86
(一) 供体牛、受体牛的同步发情程序	86
(二) 供体羊、受体羊的同步发情程序	87
第五章 胚胎移植的技术原理和程序	89
一、胚胎移植的生理学基础	89
(一) 卵泡的发育与卵母细胞的成熟	89
(二) 受精与早期胚胎发育	101
(三) 胚胎移植的技术原理	115
二、胚胎移植的基本原则	116
(一) 胚胎在移植前后所处环境的同一性	116
(二) 胚胎采集的期限	117
(三) 胚胎质量的鉴定与分级	118
(四) 供体、受体的状况	120
(五) 胚胎移植与疾病传播	122
三、胚胎移植的技术程序	125
(一) 供体母畜和受体母畜的选择	126
(二) 超数排卵	127
(三) 供体母畜的配种	127
(四) 胚胎的收集	127
(五) 检胚	128
(六) 胚胎移植	128
(七) 供体和受体的术后观察	129
(八) 记录	129

第六章 牛胚胎移植实用技术	131
一、超数排卵	131
(一) 供体牛的选择及饲养管理	131
(二) 超数排卵的方法及影响因素	132
二、卵子的回收(采胚)	134
(一) 器材与试剂	135
(二) 非手术采卵法	136
(三) 捡卵	138
三、胚胎质量鉴定	140
四、胚胎的移植	140
(一) 受体母牛的选择与管理	140
(二) 移植方法	140
五、妊娠诊断	142
第七章 羊胚胎移植实用技术	145
一、准备工作	145
(一) 胚胎移植操作室的准备	145
(二) 物品准备	146
(三) 人员培训	146
二、超数排卵	147
(一) 供体羊的选择及饲养管理	147
(二) 超数排卵药品	147
(三) 供体母羊的观察	147
三、采卵	150
(一) 主要器械和设备要求	150
(二) 手术前的准备	151
(三) 操作的基本要求	152
(四) 采卵	152

四、检卵	153
(一) 检卵操作要求	153
(二) 回收要点	153
(三) 回收方法和要求	154
五、胚胎的质量鉴定	155
六、胚胎移植	155
(一) 受体的选择及供体羊、受体羊的同期发情	155
(二) 移植	155
七、B超妊娠诊断	156
(一) 妊娠诊断方法	156
(二) 妊娠阳性的依据	158
第八章 胚胎冷冻保存	159
一、胚胎冷冻保存的研究历史	159
二、冷冻生物学基础理论	161
(一) 冷冻对细胞的作用	161
(二) 解冻对细胞的作用	162
(三) 诱发结晶对细胞的保护作用	162
(四) 冷冻保护剂对细胞的保护作用	163
(五) 溶液的玻璃化对细胞的保护作用	164
三、胚胎冷冻方法	164
(一) 平衡冷冻保存	165
(二) 非平衡冷冻保存	166
四、胚胎冷冻程序	168
(一) 保护剂的选择	168
(二) 胚胎的冻前处理	168
(三) 冷冻过程	169
(四) 胚胎解冻	170
五、胚胎冷冻的具体操作	171

(一) 慢速冷却、快速解冻法	171
(二) 玻璃化法	172
六、冻胚活力测定	173
(一) 形态学鉴定	174
(二) 体外培养	174
(三) 荧光染色检查	174
(四) 移植检验	175
(五) 台盼蓝染色	175
七、牛的胚胎冷冻	175
(一) 一步细管法	175
(二) OPS 玻璃化法	176
(三) 超快速冷冻法	176
八、羊的胚胎冷冻	176
(一) 冷冻方法的影响	177
(二) 冷冻保护剂的影响	177
(三) 玻璃化冷冻的胚胎解冻后胚胎处理方式的影响	178
九、玻璃化冷冻保存方法的应用前景	178
第九章 胚胎工程	181
一、胚胎分割	181
(一) 胚胎分割的研究历史	181
(二) 胚胎分割方法	182
二、性别控制	185
(一) 性别控制技术的发展概况	185
(二) 哺乳动物的性别控制技术	186
三、体外受精	189
(一) 体外受精的研究历史	190
(二) 卵母细胞的体外受精程序	192
四、动物克隆技术	197

(一) 动物克隆的研究简史	198
(二) 哺乳动物细胞核移植(克隆)操作方法	200
(三) 克隆哺乳动物的应用前景	203
五、转基因技术	204
(一) 转基因动物的研究历史	205
(二) 转基因动物的制作方法	205
(三) 转基因动物的应用	207
六、胚胎干细胞	209
(一) 胚胎干细胞研究的意义	209
(二) 胚胎干细胞研究的历史	210
(三) 胚胎干细胞建系方法	211
(四) 胚胎干细胞的鉴定	213
参考文献	216

第一章 胚胎移植技术发展概述

一、胚胎移植在家畜品种改良中的意义

胚胎移植也称受精卵移植。它的简单含义就是将一头母畜（供体）的受精卵取出，移植到另一头母畜（受体）体内，使之继续发育至分娩产仔的技术，又称之为人工受胎或借腹怀胎（简称 ET 技术）。此含义引伸到家畜繁殖学领域，即是对遗传基因和生产性能优秀的母畜，经过超数排卵处理后，产生的多出自然排卵数几倍甚至十几倍的受精卵取出，分别移植到其他普通母畜体内，使之继续发育并生产出优良后代的技术。

（一）扩大优良母畜的数量 胚胎移植可使优秀母畜最大限度地发挥品种改良和在育种中的作用。人工授精技术和精液冷冻技术的应用，成百倍、千倍地提高了优秀种公畜在品种改良中的作用；而母畜在品种改良中的作用总是受产仔数和世代间隔的限制，在正常情况下，母畜卵巢内的卵母细胞能排卵的不到 0.1%，排出的卵母细胞中又有许多不能发育成仔畜。卵巢中闭锁卵泡内的卵子不能被利用，这就限制了优秀母畜后代数量的扩大。采用超数排卵技术，就有可能使那些闭锁卵泡内的卵子得以利用。通过超数排卵和授精，可使优秀个体生产大量胚胎，再把这些胚胎移植给受体，就可使稀有血统母畜的后代数量迅速增加，充分发挥优良母畜在育种中的作用。对单胎家畜来说，年采卵一次，通常可使供体年度繁殖率增加 3 倍；年采卵两次，可望获得供体终生繁殖后代的总和。

（二）缩短世代间隔，加速育种进程 在传统育种方法中，

由于公畜和母畜个体后代的数量有限，后裔测定工作非常困难。往往种畜已超过利用年限或已经死亡，才得出后裔表现的结论。对育种工作来说，这时群体中非理想型遗传基因的个体数量可能已占很大比例，给育种工作造成不利影响。采用胚胎移植的方法，可在较短的时间内达到后裔测定所要求的后代个体数量，提早完成后裔测定工作，增加选择强度、缩短世代间隔、加速育种进程。

在家畜育种工作中，应用超数排卵和胚胎移植（MOET）可以加大选择强度。首先，它是从更多的头数中进行选择，可以提高选择的准确性；其次，它是利用更多的亲缘个体群的记录，拥有更多的后备者，可以缩短世代间隔。其中，缩短世代间隔对于加快遗传进展尤为重要。据 Smith（1984）报道，应用 MOET 技术，牛、羊生长性状的遗传进展可比正常繁殖方法分别提高 80% 和 70%，胴体瘦肉率的年遗传进展分别提高 100% 和 80%。如果采用更为合理的方案，并进一步提高胚胎移植成功率，则牛、羊的遗传进展速度有可能比常规方法加快 1 倍，甚至可与猪、鸡这些多产动物的遗传进展速度相媲美。

（三）加快特定品种的扩繁速度 以牛、羊等单胎动物为例，获得某一品种的纯种一般需要经过 5~8 个世代，约 15~20 年。而采用胚胎移植的方法，以纯种母畜为供体，通过超数排卵和人工授精技术，一次获得纯种后代。20 世纪 80 年代初期，美国、澳大利亚、新西兰从欧洲引进大型肉牛品种，以及美国扩大荷斯坦牛数量都采用了胚胎移植技术。日本在发展黑牛和保存日本当地牛品种资源方面也采用了胚胎移植技术。80 年代后期，随着我国牛羊胚胎移植技术水平的提高，一些省市先后在中国荷斯坦牛、西门塔尔牛、安哥拉山羊、优质细毛羊的扩繁上应用 MOET 技术，使这些优良品种的后代数量大大增加，为提高我国牛羊品种改良的整体水平起到了积极的作用。随着胚胎工程技术的日益完善，胚胎公司的不断增多，胚胎移植技术的商业化程

度越来越高。通过胚胎的洲际运输，大量、迅速地引进或扩大某一品种的优秀后代已成为可能，并逐渐被各国广泛应用，除了价格因素外，技术上已不成问题。

在大多数情况下，胚胎移植后代必须卖到 1 000~2 000 美元，才能抵消成本，投资额只有通过增加的肉奶产量来回收。这个价格显然太高，阻碍了这项技术的合理应用。但是，我们应该认识到家畜胚胎移植技术的主要目的是：①从具有很高遗传和生产价值的种畜获得更多的后代，而不是获得商品畜；②从很有价值的，但由于疾病和受伤失去生育能力的母畜获得后代；③生产出口的胚胎；④测试公畜或母畜是否是不合乎需要的隐性性状的携带者；⑤向不含特异性病原体的牛群引入新基因或抢救带病畜群的遗传物质；⑥增加稀有或濒危物种的群体数量。

二、国外胚胎移植技术发展历史

（一）第一个繁荣时期 从第一例胚胎移植动物——家兔问世（英国，Heape，1891）到第一个牛胚胎移植公司成立，胚胎移植技术经历了 80 年的漫长发展过程。期间奶牛非手术移植（Mutter，1964）和奶牛非手术采卵技术的成功，是推动牛胚胎移植技术向产业化转化的重要里程碑。冷冻胚胎技术的研究成功，为这项技术在畜牧业生产中发挥作用奠定了基础。

胚胎移植自 20 世纪 30 年代进入畜牧科学领域以来，首先在绵羊上获得成功。到 40 年代末和 50 年代初，又相继在山羊、猪、牛、马上取得成功。60 年代以后，这一技术受到各国畜牧兽医科学工作者的重视，研究工作得到快速的发展。一些发达国家已出现经营胚胎移植的企业和公司，向国外出售胚胎。

山羊胚胎移植的研究和应用在澳大利亚起步较早，20 世纪 70 年代澳大利亚每年要进口价值 300 万美元的“马海毛”，这就使安哥拉山羊处于一种极端的高价地位，从而为胚胎移植提供了市场条件。澳大利亚的山羊育种家将从 35 只安哥拉山羊回收的

308 枚胚胎，移植给 280 只野山羊受体，其中有 165 只妊娠，共产出羔羊 177 只。1983 年，Armstrong 等对安哥拉山羊的胚胎移植进行了系统研究。1988 年，Bessoudo 等开展了大规模的羊胚胎移植，移植受体 1 500 多只，产羔达 1 300 多只。1989—1990 年处理供体 300 只，移植胚胎数达 4 900 枚，鲜胚移植妊娠率达到 56%，冻胚移植妊娠率为 45%。

可以说，胚胎移植技术作为一个行业，兴起于 20 世纪 70 年代，当时欧洲兼用型品种的牛在北美、澳大利亚和新西兰开始普及，而从欧洲进口种畜因为成本高而且检疫期长，所以降低了进口的数量。为了获得更大的经济效益，使优秀种群和个体尽可能快地扩繁，北美和澳大利亚的育种者加大了对胚胎移植技术研究的资金投入，推动了胚胎移植技术向商品化转化。

在早期，胚胎移植技术服务是由人员集中的机构承担，这类机构由兽医和繁殖生理学专家和他的助手组成，需要外科手术用的全套设备。为了健康和防疫的目的，要使供体群与受体群隔离，需要饲养大群受体牛，因此费用极高。供体牛在胚胎移植过程实施之前，必须运到胚胎移植中心进行长时间检疫。这样，如果以奶牛作为供体，奶产量记录在中心就会受到影响。在非手术采卵、移植技术和冷冻胚胎技术成功之前，冲卵和移植过程都需实施外科手术，常常因为粘连导致供体牛和受体牛繁殖能力下降。胚胎必须在采集后 24~30 小时内移植，如果遇到同期发情的受体牛不足，胚胎就要被弃去或运到另一个有合适受体的中心去。当时平均的移植妊娠率是 50%~60%。育种者必须将犍牛卖到至少平均 3 000 美元/头，才能抵消胚胎移植的成本。这期间，牛胚胎移植业由于技术的改进和成本的下降，经历了一个短期的繁荣。然而，由于种群繁殖力的扩增，导致了 1977 年欧洲兼用型牛在北美和澳大利亚的市场突然瓦解。

(二) 第二个繁荣时期 当胚胎移植经历第二个繁荣期时，这项技术的目的已转向提高种畜群内最有价值的个体的繁殖力。

据国际胚胎移植协会成员报告,1984年约有161 844枚牛胚胎进行了商业化移植。1988年全世界共采集299 009枚胚胎,鲜胚移植140 030枚,冻胚移植118 803枚。目前牛胚胎移植在欧洲、亚洲和澳大利亚、新西兰正稳定地发展,但在南美发展程度较低。在北美这个行业已经达到高峰平台期。由于牛非手术冲卵、移植技术和冷冻胚胎技术的成功开发,从根本上改变了这个行业的运作性质。现在胚胎移植过程能够在牧场实施,牧场主能够提供自己的受体,决定什么时候移植胚胎。胚胎在国际和国内的长途运输已成为现实的种畜运输方法。目前,胚胎移植商业化程度已经很高,在技术娴熟的人员操作下,非手术移植鲜胚妊娠率超过60%,冻胚移植妊娠率平均在50%左右。

20世纪90年代家畜胚胎移植技术被赋予更新更深的内容,成为开发胚胎生物技术的必不可少的技术环节。在世界范围内家畜胚胎移植技术的发展已经或正在从鲜胚移植发展到冻胚移植,从整胚移植到分割胚、嵌合胚、转基因胚、核移植胚及性控胚的移植。牛半胚移植妊娠率已达50%,相当于整胚妊娠率的100%。

下面是牛羊胚胎移植发展简史:

绵羊、山羊	移植成功	1934年 Warwick
奶牛	移植、流产	1949年 Umbaugh
奶牛	移植成功	1951年 Willett
奶牛	非手术移植	1964年 Mutter
奶牛	非手术采卵移植	1968 杉江
牛	胚移公司成立	1971 Alberta Livestock Transplant LTD
牛	冻胚移植	1973 Wilmut & Rowson

三、国内胚胎移植技术发展概况

在我国,胚胎移植技术的研究起步较晚,1973年在绵羊上获得成功,1978年在奶牛上成功。20世纪80年代以后,绵羊、奶牛和奶山羊的冷冻胚胎移植先后成功。90年代以来,绵羊、