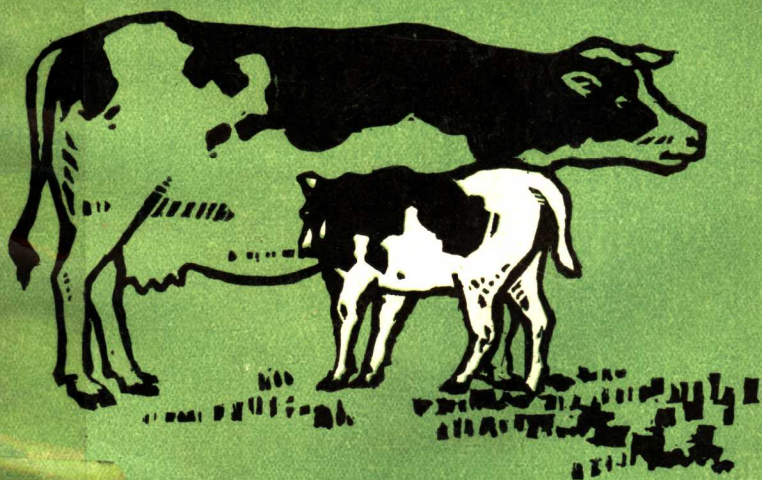


家畜胚胎移植

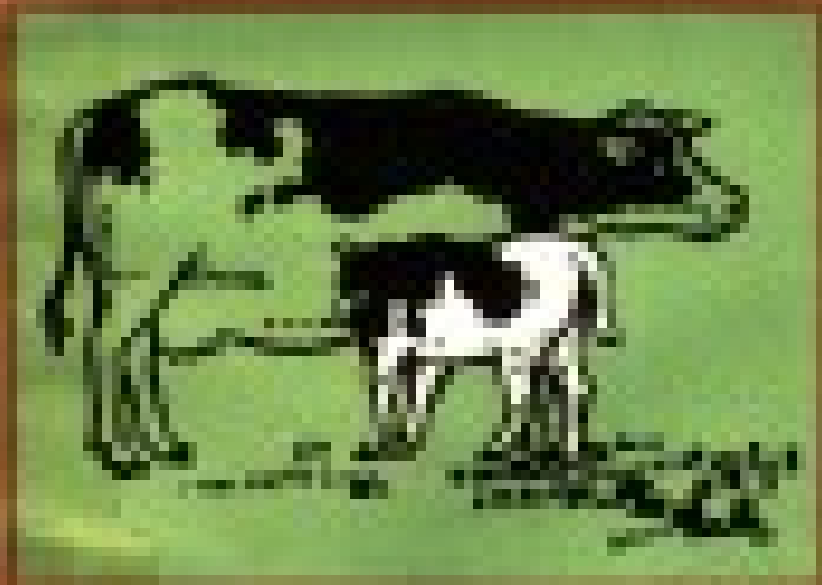
陈秀兰 谭丽玲 荣瑞章 编著



上海科学技术出版社

家畜胚胎移植

王德生 主编 李国辉 副主编 李国辉 编



上海科学技术出版社

家畜胚胎移植

陈秀兰 谭丽玲 荣瑞章 编著

上海科学技术出版社

封面设计 何永平

家畜胚胎移植

陈秀兰 谭丽玲 荣瑞章 编著

上海科学技术出版社出版

(上海瑞金二路450号)

新华书店上海发行所发行 浙江嘉兴印刷厂印刷

开本 787×1092 1/32 印张 6.25 字数 116,000

1983年4月第1版 1983年4月第1次印刷

印数 1—4,400

统一书号: 16119·776 定价: (科四) 0.60元

前 言

胚胎移植技术自 1890 年由英国学者希普首先在家兔受精卵的移植实验中获得成功后，引起许多国家学者的兴趣和重视。他们多次成功的试验，为以后这项技术的研究和应用奠定了基础。至本世纪三十年代后，胚胎移植成为生物科学研究的主要方向之一。随着这项技术的深入研究，与它紧密相关的超数排卵、同期发情和胚胎采集、冷冻保存等技术也相应得到发展，使胚胎移植从六十年代后期起直接应用于畜牧业生产，取得了非常令人兴奋的成就。我国从七十年代开始陆续在牛、羊和兔等家畜方面进行试验，并相继获得成功。大量事实说明胚胎移植已成为一项实际应用于家畜繁殖控制的技术，它对畜牧业生产的影响和作用，可与人工授精技术相提并论。

鉴于胚胎移植在畜牧中的重要作用和广大畜牧工作者的需要，我们根据所进行的试验和结果，并参考国内外的资料，编写了《家畜胚胎移植》这本册子，期望能对这项技术的试验研究和实际应用有所帮助。

本书的绪论、第一章、第三章第三至八节、第四章、第六至七章等由陈秀兰同志编写，第五章由谭丽玲同志编写，第二章和第三章第一节由荣瑞章同志编写。在编写过程中，本书的部分章节曾由王春元同志审阅过，特此致谢。由于我们的水平有限，书中难免有错误之处，谨请读者指正。

编著者 1981 年 11 月

目 录

第一章 绪论	1
第一节 胚胎移植研究简史	3
第二节 胚胎移植研究目的	5
第三节 胚胎移植内容	8
第二章 卵巢的周期性变化和排卵潜力	10
第一节 卵巢的周期性变化	10
第二节 母畜的发情周期	14
第三节 卵巢的排卵潜力	16
第三章 牛的胚胎移植	18
第一节 超数排卵	18
第二节 同期发情	32
第三节 胚胎的采集	37
第四节 卵和胚胎的检测	52
第五节 胚胎移植的方法和结果	64
第六节 诱发母牛双胎	69
第七节 影响胚胎移植妊娠率的诸因素	77
第八节 牛胚胎移植的应用	94
第四章 其他家畜的胚胎移植	98
第一节 羊的胚胎移植	98
第二节 猪的胚胎移植	107
第三节 马的胚胎移植	112
第五章 胚胎保存	115

第一节 胚胎保存及其意义.....	116
第二节 异种(种间)活体内保存.....	118
第三节 体外保存.....	120
第四节 胚胎运输.....	159
第六章 卵细胞的体外受精和培养	166
第一节 体外受精.....	167
第二节 卵细胞的培养和移植.....	171
第七章 与胚胎移植有关的问题	178
附录	189
一、杜氏 (Dulbecco's)磷酸缓冲液(PBS)	189
二、人工合成输卵管液(SOF).....	189
三、Brinster 氏培养液(BMOC-8)	190
四、Whitten 氏培养液.....	190
五、改良的克雷布斯-林格(Krebs-Ringer)重碳酸盐液.....	191
六、体外受精培养液.....	191
七、胚胎移植所需药品和仪器设备.....	192

第一章 绪 论

胚胎移植也称受精卵移植，是指一头母畜(称为“供体”)发情排卵并经过配种后，在一定时间内从其生殖道(输卵管或子宫角)取出卵子或胚胎，然后把它们移植到另外一头与供体同时发情排卵，但未经配种的母畜(称为“受体”)的相应部位(输卵管或子宫角)。这个外来的胚胎能够在受体的子宫着床，并继续生长和发育，最后产下供体的后代。用一句通俗的话来说，就是“借腹怀胎”。

1890年，英国学者 Heape 首先在家兔受精卵的移植实验中获得成功。以后，许多学者在实验动物和家畜进行了多次实验，这些工作为今天这门技术的研究和应用奠定了基础。目前，胚胎移植已成为一项实际应用的家畜繁殖控制技术，它对畜牧业所产生的影响，可以与人工授精已经产生的影响相提并论。

应用胚胎移植技术繁殖家畜，需要有足够数量的胚胎。在通常繁殖情况下，象牛、羊、马等单胎动物，在一次发情时一般只排一个卵，这样少的卵，把它取出来移植给受体，显然是事倍功半而达不到胚胎移植的目的。因此，进行胚胎移植，必须结合超数排卵，使一头供体能够排多个卵子以便于移植。现在超排技术已成为胚胎移植的基础和必须进行的首要步骤。

移植胚胎时，要求供体和受体同期发情，可是超数排卵处理供体后，一次发情获得许多胚胎，而往往又不可能有那么

多与供体同时发情供移植用的受体（除非是有上千头畜群的牧场）。为了获得合适的受体，需要用药物促使受体和供体在同一时间发情或排卵，这就是人工控制同期发情。

超数排卵和同期发情是独立发展起来的繁殖技术，都是胚胎移植中必不可少的两个环节。在胚胎长期冷冻保存能够获得较好结果的情况下，采集到的胚胎不需要立即移植或在没有同期发情的受体时，可以把胚胎冷冻保存起来，供以后使用。从这点来看，同期发情技术并非胚胎移植本身所必须具有的环节。但是在胚胎需要直接移植（鲜胚移植）时，必须要有和供体同期发情的受体。在没有大量畜群供以选择适宜的受体时，如果对受体也进行处理，使它与供体同时发情，这样就可以不必专门寻找受体了。因此同期发情技术的提高和发展，为胚胎移植提供了方便。

目前，人们对胚胎移植技术的研究，已经走出实验室而开始应用于畜牧业生产上。许多国家如英国、加拿大、澳大利亚、美国、西德、新西兰和丹麦等都已建立了经营移植胚胎的商业性机构。过去人们对胚胎的超低温冷冻保存寄予很大的期望，设想能够如精液冷冻保存一样，将胚胎长期冷冻保存，可以随时取用，也便于运输，现在这一设想已经成为现实。另外，家畜卵母细胞包括卵泡卵的体外培养和受精的研究，也取得了一定的进展，可望为胚胎移植提供更为丰富的卵源。

应用胚胎移植技术和显微外科技术，无疑将对家畜繁殖和育种工作产生难以预见的根本性变化，并为哺乳动物遗传学、胚胎学、免疫学和生殖生理学的理论研究提供有力的手段。目前人们正在设想研究一些更为复杂的问题，向生物学、畜牧学和医学更深和更广的方面进行探索。

第一节 胚胎移植研究简史

人们研究胚胎移植的历史并不长,只有 90 多年。英国剑桥大学 Heape 于 1890 年 4 月 27 日首次获得兔受精卵移植的成功。他将 4 细胞期的安哥拉兔的早期胚胎移植到 1 只已交配过的比利时野兔的输卵管内。这只受体兔生了 6 只小兔,其中 4 只是它交配的小兔,另外 2 只是移植进去的安哥拉兔早期胚胎发育而成的小兔,它们具有独特的长细毛、白化等与亲体相同的特征。这个实验第一次证实了受精卵在寄主母体内发育的可能性。

本世纪三十年代以后,胚胎移植成为生物科学研究主要方向之一,人们用实验动物(鼠、兔等)进行了受精卵移植和培养的研究,与此同时也开始进行家畜受精卵移植的研究。几种家畜如绵羊(1934)、山羊(1949)、猪(1951)、牛(1951)和马(1973)都相继获得移植成功。在五十年代,常有羊和猪胚胎移植试验的报道,但未能推广到生产中去,因为用外科手术从供体采集胚胎,并立即又通过外科手术将胚胎移植到受体,这个方法虽然较为容易,但在手术过程中,常会造成如粘连等不良后果,甚至影响供体以后的生殖能力。

六十年代后,随着畜牧业的发展,人们不仅日益清楚地看到胚胎移植在家畜繁殖、育种中的重要意义和作用,而且由于许多科学工作者所进行的大量卓有成效的实验,如超数排卵、同期发情、胚胎采集和移植方法的改进,使这一技术得到发展,开始应用于绵羊的育种和改良工作中去。尤其是 Sugie (1972)设计成功牛卵的非手术采集方法以来,经过不断改进,目前采卵器械已经日臻完善。

1955 年, Averill 曾将绵羊受精卵移植到兔的输卵管内, 并发现可以存活 5 天。1960 年, 他把输卵管里移有绵羊受精卵的兔子, 由英国空运到南非, 途中历时 1~2 昼夜, 到目的地后又把胚胎从兔输卵管中取出, 再次移植到绵羊子宫内(绵羊受精卵在兔输卵管内继续发育), 成功地生下羔羊。以后发现马和牛的胚胎也能够兔输卵管内存活。1970 年, Wrathall 把猪胚置于盛有灭菌组织培养液的小瓶, 由美国空运到加拿大后进行移植, 获得 4 头仔猪。1973 年, Wilmut 把在液氮(-196°C)冷冻保存 6 天的牛胚胎, 经解冻后移植, 得到 1 头公犊。胚胎超低温冷冻保存技术的突破, 是胚胎移植技术的重大成就, 也是该项技术发展中的—次飞跃。现在人们已经可以将哺乳动物的胚胎置于含有冷冻保护剂(二甲基亚砷和甘油)的培养基内, 放进液氮内保存, 随时可以取用或运往他处。胚胎超低温冷冻保存和解冻后移植, 已经在小鼠(1972)、牛(1973)、羊(1974)、兔(1974)和大鼠(1975)相继获得成功。当前, 牛胚胎在液氮保存 9 个月后移植, 已产下 1 头小牛, 小鼠胚胎冷冻保存长达 4 年, 仍能保持生活力。

1975 年 1 月在美国科罗拉多州的丹佛市召开了第一届国际胚胎移植学会的成立大会。会上进行了学术交流活动, 并规定每年召开一次年会。国际胚胎移植学会的成立标志着胚胎移植技术的发展已有美好的前景。

我国家畜胚胎移植的研究首先在家兔(1973)获得成功, 以后羊(1974)、牛(1978)相继获得成功。1976~1977 年, 家兔和绵羊胚胎在低温(10°C)保存 1 天和 5 天后移植, 已经生出仔兔和羔羊。1979 年家兔胚胎在超低温冷冻保存 8.5 天, 经解冻后移植得到后代。1980 年, 绵羊胚胎的超低温冷冻保存后移植, 已生出羔羊。1982 年, 牛的胚胎超低温冷冻保存 374

天后移植也获成功,生下3头犊牛。1982年马胚胎移植成功。

以上所述胚胎的超低温冷冻保存,都是采取缓慢的冷冻和解冻速率。近来的研究证明,降温 and 升温步骤可趋于简化,采取快速的冷冻和解冻速率对胚胎没有损害。现在二步法冷冻鼠胚亦已成功(Kasai, 1980)。我国(1981)也用二步法的冷冻步骤冷冻家兔胚胎,已经生出小兔子了。

目前,我国有许多单位进行绵羊、山羊、湖羊、牛和马的胚胎移植研究。深信这项研究定能取得更大的成就,并逐渐应用于畜牧业生产。

第二节 胚胎移植研究目的

畜牧科学研究的主攻方向之一,就是最大限度地发挥家畜的生产潜力。众所周知,在公畜方面,采用人工授精及冷冻精液,已最大限度地发挥了优良种公畜的利用率。但是良种畜群的增加,不仅决定于公畜,同时也有赖于母畜。从遗传学上看,某一生产性能的优劣取决于公畜和母畜双方。所以优良母畜繁殖潜力的提高,也是畜牧上改良畜群的一个重要方面。胚胎移植技术就是提高优良母畜繁殖潜力的一个有效方法。

家畜胚胎移植的目的在于:

1. 提高优良母畜的繁殖潜力 在家畜繁殖中,一头优良公畜所起的作用比母畜大,因为一头公畜一生的后代比母畜所生产的后代多得多,这就是人们通常所说的“公畜好,好一坡,母畜好,好一窝”。这点除了因母畜一生中产生的生殖细胞远比公畜少以外,还由于母畜一旦妊娠,在妊娠、哺乳期间不发情排卵。这样,妊娠期和哺乳期占去了母畜一生中的绝

大部分时间。因此,1头母牛(或母马)一生只能得到10头左右的后代。但是从母畜繁殖潜力来看,只要采取措施,可以获得比正常繁殖情况下更多的后代。据统计,一头母畜生下来,卵巢内就有好几万的生殖细胞,如母牛卵巢有75,000个生殖细胞。母畜在正常的性周期中,一般有好几个滤泡同时发育,但是最后只有一个滤泡成熟排卵,其他的滤泡闭锁了,这点是非常可惜的。但由于母畜卵巢内有这样多的潜在的生殖细胞,而且都是正常的,人们有可能利用药物促进滤泡的发育,成熟而排卵;如同时人为地解除母畜的妊娠负担,即把胚胎取出来,让其他母畜完成妊娠过程,那末该头母畜又可以开始新的性周期。只要间隔几个发情期不配种,可以重复进行超数排卵处理,这样就可以从该头母畜获得更多的后代。中国科学院遗传研究所和内蒙古三北种羊场(1975)应用超数排卵技术,曾使1头7岁半的黑色三北羔皮羊,一次排18个卵。这些卵受精后移植给白色蒙古羊,结果获得11头三北羔皮羊。黑龙江省畜牧研究所在靠山种畜场(1977)进行的绵羊胚胎移植,得到12头羔羊。加拿大Badd(1977)的一次试验得到17头小牛。

在品种培育改良的过程中,经常需要引进国外的品种来进行杂交。如夏洛来、海福特和西门塔尔等都是优良的肉牛品种,可是价格昂贵,要大量进口这些牛很不合算的。如果应用胚胎移植技术,加速这些品种的繁殖或者进口胚胎,可以大大地减少费用。

2. 从母畜方面促进家畜的改良 对优良种畜或一个新品种育成后,在短期内只依靠少数的母畜进行大量繁殖是不可能的。如果借助于超数排卵和胚胎移植技术,使一头母畜在一次性周期内得到更多的仔畜,可以促进家畜品种改良。

Jandrain(1977)统计, 在一个拥有 4000 头乳牛群的牧场, 其中有 40% 的产奶母牛, 当采用胚胎移植技术进行遗传改良时, 如果每头供体一年供卵 4 个, 则较常规的改良增加 9.7%; 供卵 10 个, 可增加 13.8%; 供卵 16 个, 可增加 16.2%; 供卵 22 个, 则可增加 17.8%。因此在短期内就能使优良家畜的头数大幅度地增加, 大大加速家畜改良的进程。年老的优良母畜, 当它不能维持妊娠到终了或不能再养育幼畜时, 也可以用它作供体, 以获得数批胚胎, 增加后代数量。

3. 缩短世代间隔, 及早进行后裔测定 在畜牧业生产中, 一般要等到母畜性成熟及体成熟后才开始进行配种, 这样在品种或品系繁育中, 需要等待较长的时间。如前所述, 2~3 月龄的小母牛就有 75,000 个卵泡细胞, 如果提早利用这些卵子, 就可以及早了解该母畜的生产性能。试验表明, 用促性腺激素处理幼畜, 可以诱发卵泡发育及排卵, 而且这些卵可以受精, 不过它在性未成熟的幼畜内不能发育, 但把它移植到性成熟的母畜体内, 可以发育成正常胎儿。亦有试验表明, 8~9 月龄的小母羊, 经激素处理后受胎率为 21%, 羔羊发育良好, 母羊生长发育未见异常。因而, 胚胎移植可以成为提早利用幼畜生殖细胞的一种手段, 在育种中缩短世代间隔。当然对母畜是否有远期的效应, 尚需进一步探讨。

如果将同一品种的优良母畜进行重复超数排卵处理和移植, 那么可以获得较多的后代, 从而有可能较快地和较早地从这些大量的后代进行后裔测定, 及早了解其公、母畜的遗传力, 加速品种改良。

4. 使肉牛产双犊 人们对肉类的需求正在不断增长, 各国肉用牛的饲养数量发展很快, 可以预期世界肉牛在畜牧业中的比重将会越来越大。但增加牛肉的供应必须增加肉用牛

头数，而牛通常一胎产一犊，双犊并不多见（据统计双犊约占产犊的1~4%）。实践早已证明，通过改善饲养管理，不可能将双胎率提高到实用意义的水平。一般的方法是只有增加繁殖群的母牛。这样一来，就需要增加饲料基地和饲料用量，成本亦将大大提高。应用胚胎移植的方法，使母牛产双犊，可以在不增加母畜头数的情况下，提高家畜的繁殖率，从而减少了繁殖母牛的饲料用量，增加经济收益，并可以满足人们对肉类的需求。目前试验的双胎率可达50%（30~70%）。

5. 长期保存冷冻胚胎，便于运输和保存遗传资源 近年来，胚胎超低温冷冻保存取得了很大的进展，人们可以不受时间、地点的限制，把所需要的贮存品种胚胎进行移植。今后，国际间的家畜贸易可以不用运输活畜，只要携带冷冻保存的胚胎即可，省去活畜运输的种种困难。胚胎冷冻保存还可以对优良母畜有计划地进行胚胎采集，把胚胎保存起来，建立“胚胎库”，在遗传育种上具有很大的价值。据美国《科学年鉴》（1976）记载，密苏里大学建立了一个新颖的“仔猪库”，把从优良母猪得到的卵子和优良公猪的精子在体外受精后进行冷冻保存。

第三节 胚胎移植内容

胚胎移植技术包括以下几方面的内容：

- (1) 供体的选择，包括遗传价值、生殖机能；
- (2) 供体的超数排卵处理，发情鉴定和配种；
- (3) 胚胎的采集；
- (4) 供体的再利用；
- (5) 卵和胚胎的检查和鉴定；

- (6) 受体的选择, 受体要有正常的生殖机能;
- (7) 受体和供体的同期发情;
- (8) 胚胎的移植;
- (9) 受体的饲养管理及术后护理;
- (10) 受体的妊娠诊断;
- (11) 卵细胞的体外受精、培养和保存。

胚胎移植技术并非是很复杂的过程。新鲜胚胎的直接移植, 即从供体取出胚胎后, 立即或在几小时内移植于受体, 尤其是手术移植, 比较容易获得成功。非手术取卵需要一定的器械和熟练的操作, 但并不十分困难。而其他任何器官的移植都要比胚胎移植困难得多。对移植的胚胎来说, 虽然环境发生了变化, 然而这种变化只是位置上的不同, 而不是生理上的不同, 所以还是容易成功的。

第二章 卵巢的周期性变化和排卵潜力

第一节 卵巢的周期性变化

母畜自性成熟以后，卵巢开始了一系列周期性的变化过程。由卵巢的周期性变化所形成的间隔期在家畜中被称作“发情周期”。这一过程大致可以分成三个部分：卵泡的生长和成熟、排卵和黄体生成及黄体的发育和退化。下面分段叙述。

一、卵泡的生成和成熟

由图 2-1 可以看到，在卵巢的皮质部分包含着大量的初级卵泡。这些初级卵泡的中央是一个初级卵母细胞，周围由单层的上皮细胞包围着。当卵母细胞发育时，围绕它的上皮细胞也开始增殖并形成数层颗粒细胞。这些颗粒细胞增殖时，周围的结缔组织形成卵泡膜。在卵母细胞的生长过程中，卵黄与细胞质的体积都增长了许多倍。但当卵母细胞已达到最大体积时，卵泡却仍继续增大。此现象的出现部分是由于卵泡细胞数量的增加，但更主要的是由于颗粒细胞所分泌的卵泡液在卵泡中形成了一个充满液体的腔而造成的。

卵泡在间情期（发情周期中，除了母畜愿意接受公畜交配的发情期外均称作间情期）内主要是受到垂体促卵泡生成素（FSH）的影响而一直生长着。在黄体期即将结束时，一个或几个中等大小的卵泡比其他相似的卵泡开始更快地生长。这