

羊胚胎移植 实用技术

李延春 主编



金盾出版社

JINDUN CHUBANSHE

羊胚胎移植实用技术

主 编

李延春

副主编

王芝红 马占峰

编著者

庞久龙 王国春 卢少达

马金友 伞洪玖 于国江 温志刚

金 盾 出 版 社

内 容 提 要

本书内容包括胚胎移植概述、羊的生殖生理、羊的生殖激素、胚胎移植准备工作、羊的同期发情技术、供体羊超数排卵技术、羊的人工授精技术、胚胎移植技术、胚胎的体外保存、胚胎移植实验室设计、胚胎移植工作的组织与管理等。内容科学实用,语言通俗简练。可供养羊户、畜牧兽医工作者及农业院校有关师生阅读参考。

图书在版编目(CIP)数据

羊胚胎移植实用技术/李延春主编. —北京:金盾出版社,
2004.12

ISBN 7-5082-3263-1

I. 羊… II. 李… III. 羊-卵子移植 IV. S826.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2004)第 104741 号

金盾出版社出版、总发行

北京太平路 5 号(地铁万寿路站往南)

邮政编码:100036 电话:68214039 66882412

传真:68276683 电挂:0234

彩色印刷:北京精美彩印有限公司

黑白印刷:北京燕南印刷厂

各地新华书店经销

开本:787×1092 1/32 印张:5 彩页:4 字数:107 千字

2004 年 12 月第 1 版第 1 次印刷

印数:1—10000 册 定价:6.00 元

(凡购买金盾出版社的图书,如有缺页、
倒页、脱页者,本社发行部负责调换)

前 言

辽宁省朝阳市种畜场在辽宁省最早引进羊胚胎移植技术,目前推广数量也最多。该项技术从1999年引进,至今已开展5年,累计移植受体羊数量超过1万只,仅2003年就移植了4000余只。随着生产规模的逐年扩大,生产水平也逐渐提高,由1999年不足50%的准胎率,到现在总体准胎率已超过60%,最高的达到86%,就生产而言,已达到国内先进、省内领先的水平。我们在羊胚胎移植技术的应用和发展过程中,有经验也有教训。为了给养羊生产者和胚胎移植初学者提供借鉴,少走弯路,加速良种羊生产,特编写此书。

本书在编写上注重以下两个方面:

一是侧重实用。本书直接从生产出发,跳出胚胎移植技术本身的局限性,将其延伸到相关性较强的羊只饲养管理及生产的组织工作上。通过几年的生产实践,使我们深刻地认识到,胚胎移植的成功不仅仅是同期发情、超数排卵和手术移植。事实证明,单纯抓胚胎移植技术并不会提高整体准胎率,而必须抓好各类羊只在胚胎移植整个阶段的饲养管理。所以,加强对生产者的指导至关重要。向读者介绍如何做好准备期的饲养管理,这是本书的一个重点内容。

二是强调管理。胚胎移植从各类羊只准备期的饲养管理到同期发情和超数排卵技术的应用,从人工授精到手术采胚移植是一项系统工程。完成这项工程,最重要的应该是人员的组织和管理。这就要求领导者必须具备较强的组织和协调能力。对技术人员进行明确的分工、合理的调度、科学的管理,在

此基础上,对技术人员建立责任登记制度并实行效益挂钩的分配原则,调动人员的积极性,加强组织建设、强化组织管理是一项根本措施。

目前,羊胚胎移植工作已开展多年,已经完全从试验阶段转入生产和大面积推广应用阶段。在现有的条件下,我们再满足于 60%左右的准胎率是远远不够的,而应该将现有的准胎率提高到 70%,甚至 80%以上,才能保证羊胚胎移植的高效生产。

编写此书,其目的在于总结经验,找出不足,指导今后工作,促进生产水平的提高。希望本书对今后养羊生产者和胚胎移植工作人员能有一定的借鉴作用,诚若如此,将不虚此墨。显然由于我们的实践经验有限,特别是书籍编写工作缺少经验,谬误的地方在所难免,殷切希望得到专家、学者和同仁们的指教和谅解,不胜感谢!

编著者

2004 年 7 月

目 录

第一章 胚胎移植概述	(1)
第一节 胚胎移植发展概况	(1)
一、胚胎移植的概念	(1)
二、国外胚胎移植概况	(1)
三、我国胚胎移植概况	(3)
第二节 羊胚胎移植的意义	(4)
一、加快优良母羊繁殖速度,迅速扩大良种羊群 ..	(5)
二、缩短世代间隔,加快品种改良	(5)
三、保存品种资源	(6)
四、替代种羊的运输	(6)
五、克服母羊不孕症	(6)
六、产生双羔,提高生产率	(7)
七、为研究其它繁殖新技术提供手段	(7)
第三节 羊胚胎移植的基本原理	(7)
一、胚胎移植的生理学基础	(7)
二、胚胎移植的基本原则	(9)
三、胚胎移植的基本条件	(11)
第四节 羊胚胎移植的主要内容	(11)
一、羊只的选择与饲养管理	(12)
二、同期发情	(12)
三、供体羊的超数排卵	(12)
四、胚胎的回收	(12)
五、胚胎质量鉴定	(12)

六、胚胎的冷冻保存与解冻·····	(13)
七、受体羊的胚胎移植·····	(13)
第二章 羊的生殖生理 ·····	(14)
第一节 公羊的生殖器官及生理功能·····	(14)
一、睾丸·····	(15)
二、附睾·····	(15)
三、输精管·····	(15)
四、副性腺·····	(16)
五、阴茎·····	(16)
第二节 母羊的生殖器官及生理功能·····	(16)
一、卵巢·····	(16)
二、输卵管·····	(17)
三、子宫·····	(17)
四、阴道·····	(17)
第三节 公羊的生殖功能·····	(17)
一、初情期前公羊生殖功能的发育·····	(18)
二、初情期、性成熟和初配年龄·····	(19)
三、性行为·····	(21)
四、交配频率·····	(23)
第四节 母羊卵子的发生、卵泡的发育及排卵·····	(23)
一、卵子的发生·····	(23)
二、卵泡的发育·····	(25)
三、排卵·····	(30)
第五节 母羊的发情·····	(32)
一、初情期·····	(33)
二、性成熟·····	(34)
三、初配适龄·····	(35)

四、发情周期·····	(35)
第六节 受精·····	(37)
一、精子在附睾内成熟·····	(38)
二、精子的运行和获能·····	(38)
三、受精过程的形态变化·····	(39)
四、受精卵的运行及发育·····	(41)
第三章 羊的生殖激素·····	(42)
第四章 胚胎移植准备工作·····	(46)
第一节 种公羊的选择及其饲养管理·····	(46)
一、种公羊的选择·····	(46)
二、种公羊的营养及日粮配制·····	(47)
三、种公羊的饲养管理·····	(48)
四、种公羊的生殖保健·····	(49)
五、注意事项·····	(51)
第二节 供体羊的选择和准备期的饲养管理·····	(51)
一、供体羊的选择·····	(51)
二、供体羊准备期的营养及日粮配制·····	(52)
三、供体羊准备期的饲养管理·····	(53)
第三节 受体羊选择及准备期的饲养管理·····	(54)
一、受体羊的选择·····	(54)
二、受体羊的营养供应和日粮配制·····	(54)
三、受体羊的饲养管理·····	(55)
四、注意事项·····	(55)
第四节 供体羊和受体羊疾病综合防治措施·····	(56)
一、严格检疫·····	(56)
二、环境控制·····	(57)
三、饲料控制·····	(57)

四、免疫接种·····	(57)
五、适时驱虫·····	(58)
六、生殖道疾病的治疗·····	(58)
第五章 羊的同期发情技术 ·····	(60)
第一节 同期发情的概念和意义 ·····	(60)
一、概念·····	(60)
二、意义·····	(60)
第二节 同期发情的原理 ·····	(61)
第三节 常用的同期发情方法 ·····	(63)
一、前列腺素处理法·····	(63)
二、孕激素处理法·····	(64)
三、注意事项·····	(66)
四、影响羊同期发情效果的因素·····	(66)
五、同期发情与胚胎移植·····	(67)
第六章 供体羊超数排卵技术 ·····	(68)
第一节 超数排卵的概念与原理 ·····	(68)
一、概念·····	(68)
二、原理·····	(68)
第二节 超数排卵的方法 ·····	(69)
一、常用激素·····	(69)
二、方法·····	(70)
三、未成年母羊的诱发排卵·····	(72)
第三节 影响供体羊超排效果的主要因素 ·····	(73)
一、超排药品·····	(73)
二、供体羊自身因素·····	(73)
三、季节·····	(74)
四、配种方法·····	(74)

第七章 羊的人工授精技术	(75)
第一节 人工授精工作的重要性	(75)
第二节 种公羊、试情公羊的饲养管理与利用	(76)
一、种公羊的饲养管理与利用	(76)
二、试情公羊的选择及饲养管理	(78)
第三节 精液采集	(78)
一、器械消毒	(79)
二、采精	(82)
三、精液品质检查	(84)
第四节 精液的稀释及处理	(87)
第五节 母羊的发情鉴定及适时输精	(87)
一、发情鉴定	(88)
二、输精	(90)
第六节 注意事项	(90)
第八章 胚胎移植技术	(92)
第一节 供、受体母羊手术方法	(92)
一、术前准备	(92)
二、手术方法	(95)
第二节 供体母羊采胚技术	(98)
一、采胚时间的确定	(98)
二、采集方法	(98)
第三节 胚胎的洗涤与质量鉴定	(101)
一、检胚	(101)
二、洗胚	(102)
三、胚胎质量鉴定	(103)
第四节 受体羊的胚胎移植技术	(106)
一、输卵管移植	(106)

二、子宫角移植	(106)
第五节 影响胚胎移植妊娠率的因素	(108)
一、胚胎因素	(108)
二、受体因素	(110)
三、其它因素	(111)
第六节 供体羊与受体羊的术后护理与饲养	
管理	(112)
一、术后处理	(112)
二、饲养管理	(112)
三、防止术后感染	(113)
四、并发症的处理	(113)
五、受体羊植胚后返情的观察和护理	(114)
第七节 供体羊与受体羊 1 年 2 次重复利用技术	
.....	(115)
第八节 羊胚胎移植的准胎判定	(116)
一、试情法	(116)
二、超声波探测法	(116)
三、激素测定法	(117)
四、免疫学诊断法	(118)
五、直肠-腹壁诊断法	(118)
第九章 胚胎的体外保存	(120)
第一节 非冷冻保存法	(120)
一、活体内保存法	(120)
二、体外 37℃ 保存法	(121)
三、低温保存法	(121)
第二节 冷冻保存法	(121)
一、常规冷冻保存法	(122)

二、玻璃化冷冻保存法	(129)
第十章 胚胎移植实验室设计	(131)
第一节 建筑要求	(131)
一、手术室	(131)
二、检胚室	(132)
三、缓冲间	(132)
四、洗刷室和灭菌室	(132)
五、贮存室	(132)
六、围栏	(132)
第二节 设备、器材及药品	(133)
一、器材与设备	(133)
二、药品	(134)
第三节 准备工作	(135)
一、器具的洗刷	(135)
二、器具、用品的灭菌	(135)
三、培养液的灭菌	(136)
第十一章 胚胎移植工作的组织与管理	(137)
第一节 技术人员的素质要求	(137)
一、思想素质	(137)
二、技术素质	(137)
三、组织能力	(138)
第二节 技术人员的分工	(138)
第三节 技术人员的责任制及管理	(139)
一、责任制	(139)
二、管理	(140)
主要参考文献	(142)

第一章 胚胎移植概述

第一节 胚胎移植发展概况

一、胚胎移植的概念

胚胎移植又称受精卵移植,其基本含义就是将动物的早期胚胎从怀孕母体内取出,移植到另一个同种的、生理状态相同的雌性动物体内,使之继续妊娠发育成为新个体的技术。也称之为人工授胎或借腹怀胎。提供胚胎的母畜称为供体,接受并孕育胚胎的母畜称为受体。胚胎移植实际上是生产胚胎的供体和养育胚胎的受体分工合作共同繁殖后代的过程。

二、国外胚胎移植概况

从1890年Walter Heape在英国首次成功完成家兔的胚胎移植以来,胚胎移植技术经历了100多年的发展历程。随着胚胎移植研究的逐步深入,绵羊(Warwick等,1934)、山羊(Berry等,1949)、猪(Kvansnickii等,1951)、牛(Willett等,1951)、马(Oguri等,1974)等家畜的胚胎移植相继获得成功(表1)。

国际上,动物胚胎移植的发展大体经历了4个阶段,即实验生物学阶段(19世纪90年代至20世纪30年代)、家畜试验阶段(20世纪30年代至70年代)、畜牧生产应用阶段(20世纪70年代至80年代)、胚胎工程研究与开发阶段(20世纪

80年代至今)。

表 1 国外胚胎移植有关技术发展史

作者(年代)	事 例	动 物
Heape(1890)	首次胚胎移植成功	家兔
Beidl 等(1922)	胚胎移植成功	家兔
Nicholas(1933)	胚胎移植成功	大鼠
Warwick (1934) 和 Berry (1949)	胚胎移植成功	绵羊和山羊
Kvansnickii(1951)	胚胎移植成功	猪
Willet 等(1951)	胚胎移植成功	牛
Marden 和 Chang(1952)	首次胚胎洲际运输(保存在 10℃)	家兔
Alberta 家畜移植有限公司 (1971)	首次成立家畜胚胎移植的 商业公司	牛
Whittingham 等(1972)	经长期冷冻,胚胎发育产犊 牛	牛
Oguri 等(1974)	胚胎移植成功	马
	国际胚胎移植学会成立 (1975)	
Stephoe 和 Edwards(1978)	体外受精——胚胎移植,获 得世界上第一例试管婴儿	人

随着胚胎移植研究工作的不断拓展与深入,涉及的内容更为广泛,人们已不仅仅局限于原先的内容和技术,又开始对胚胎进行加工改造,以期进一步提高胚胎的利用价值,因而兴起了胚胎工程的研究与开发,如胚胎冷冻、胚胎分割、胚胎嵌

合、性别鉴定、胚胎干细胞利用等等。体细胞克隆羊(Wilmut, 1997)多莉的诞生,震惊了世界。体细胞克隆的成功,不仅会为人类创造巨大的财富,而且在科学研究上也具有重大的挑战性意义。目前,胚胎工程正向分子水平深入发展。

三、我国胚胎移植概况

我国的胚胎移植技术始于 20 世纪 70 年代初期,起步虽然较晚,但进展很快,几十年来,取得了有目共睹的成绩,缩小了与发达国家的差距(表 2)。

表 2 我国胚胎移植有关技术发展概况

作者(年代)	事 例	家 畜
陈玉琦(1973)	胚胎移植成功	兔
中国科学院遗传研究所(1974)	胚胎移植成功	绵羊
中国科学院遗传研究所(1976)	胚胎低温(10℃)保存产仔	兔
谭丽玲、郭志勤等(1976)	胚胎低温(10℃)保存产羔	绵羊
广东协作组(1978)	手术法胚胎移植成功	奶牛
中国科学院遗传研究所(1979)	-196℃保存胚胎产仔	兔
王建辰等(1980)	胚胎移植成功	奶山羊
王运京、王秀阁等(1980)	非手术法胚胎移植成功	奶牛
中国农业科学院畜牧研究所(1980)	-196℃保存胚胎产羔	绵羊
姚振沅、谭丽玲等(1982)	-196℃保存胚胎产犊	奶牛
马玉斌(1982)	胚胎移植成功	马
王光亚等(1987)	冷冻胚胎产羔	奶山羊
张涌等(1987)	胚胎分割移植成功	奶山羊
谭丽玲、马世援等(1989)	鲜胚分割同卵双生产犊	奶牛

续表 2

作者(年代)	事 例	家 畜
郭志勤等(1989)	冻胚分割同卵双生产犊	奶牛
谭丽玲等(1989)	鲜胚分割四分胚产犊	奶牛
郭志勤等(1992)	鲜胚分割四分胚产羔	绵羊

我国胚胎移植技术发展大体经历了试验研究阶段(20 世纪 70 年代初至 80 年代中期)、发展提高阶段(20 世纪 80 年代中期至 90 年代中期)、推广应用阶段(20 世纪 90 年代中期至今)3 个阶段。

我国胚胎移植技术如今正向胚胎工程和产业化方向发展。随着技术的逐步成熟,特别是奶牛业、肉牛业、肉羊业的兴起,纯种奶牛、肉牛、肉羊紧缺,促进了胚胎移植技术走向市场,达到实际应用水平,在纯种扩繁和家畜育种以及胚胎高技术研究中发挥重要作用。目前我国以生产和经营纯种奶牛、肉牛或胚胎、纯种羊或胚胎的企业和公司有 100 多家,开展胚胎移植技术单位几十家。

第二节 羊胚胎移植的意义

胚胎移植引申到羊的繁殖方面,即对遗传性稳定和生产性能优良的母羊经过超数排卵处理后,将多出自然排卵数倍甚至几十倍的卵子,经受精后取出,分别移植到普通母羊输卵管或子宫内,使之产出优良后代。

一、加快优良母羊繁殖速度， 迅速扩大良种羊群

在自然情况下，母羊性成熟后就会处于发情→配种→妊娠→产羔→哺乳→休情→发情的循环之中，妊娠和哺乳占去了一生中的大部分时间，通过胚胎移植将良种母羊的胚胎移植到其它母羊体内，而不需要在供体内完成胚胎的后期发育，良种母羊减少了妊娠和哺乳的过程，缩短了繁殖周期。更重要的是对羊这种少胎家畜来讲，超数排卵的应用使1只优秀的母羊一次排出许多卵子，使供体繁殖后代的能力增加几倍甚至十几倍。因此，无论从一次配种或一生繁殖来看，都比自然状态下能多产生更多的后代，使母羊繁殖潜力得到充分发挥。例如，辽宁省朝阳市1995年9月引进法国夏洛莱母羊64只，4年累计自然繁育种羊350多只。1999年引进胚胎移植技术以后，2000年繁育200余只，2001年扩繁种羊达400多只，2002年达800多只，2003年达1600多只，2004年将超过3000只，优良种群迅速扩大。

二、缩短世代间隔，加快品种改良

通过超数排卵和胚胎移植技术，供体母羊繁殖后代的能力增强，使其在改良中的意义大为提高。同时，应用胚胎移植技术可以最大限度地减少后裔测定所需要的时间，加大选择强度，可以提高选择准确性，并缩短世代间隔，加快育种改良进程。例如，我国在优质细毛羊（羊毛细度为18.1~21.5微米）新品种选育中，在核心群中每年选择部分优秀公、母羊，采用胚胎移植技术扩繁种羊，截至2000年采用该项技术累计繁育羔羊1330只，占繁殖羔羊总数6476只的20.54%。