

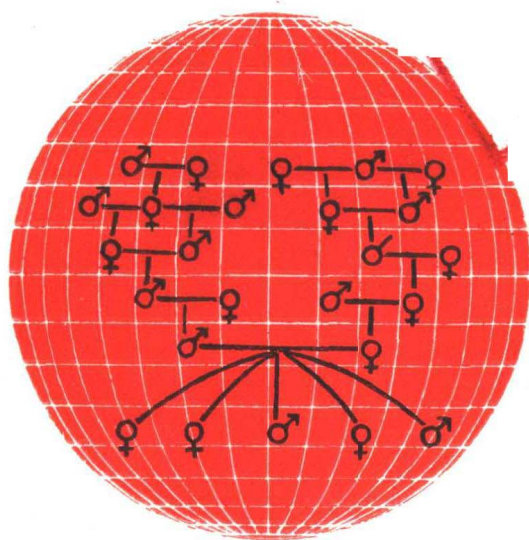
粮农组织
动物生产和保健
文集

76

用现代生物技术异地冷冻

保存濒危牛的基因

中国农业科技
出版社
北京1992



联合国
粮食及农业组织



用现代生物技术异地冷冻 保存濒危牛的基因

作者: G. Brem, B. Brenig,
M. Müller, K. Springmann

(联邦德国, 慕尼黑大学, 动物分子学育种系)

粮农组织
动物生产和保健
文集

76

中国农业科技
出版社
北京1992



联合国
粮食及农业组织

京书0701

(京)新登字061号

本书原版为联合国粮农组织动物生产和保健文集(76)《用现代生物技术异地冷冻保存濒危牛的基因》(FAO Ex Situ cryoconservation of genomes and genes of endangered cattle breeds by means of modern biotechnological methods M-22 ISBN 92-5-102785-4)

CPP/91/16

版权所有。未经版权所有者事前许可,不得以电子、机械、照相复制等任何方法或其他程序全部或部分翻印本书,或将其存入检索体系,或发送他人。申请这种许可应写信给联合国粮农组织出版司司长(意大利罗马Via delle Terme di Caracalla, 00100)并说明希望翻印的目的和份数。

中国农业科学院科技文献信息中心
根据其同联合国粮农组织的协议出版

用现代生物技术异地冷冻保存濒危牛的基因

译校者:周鼎年 缪卓然

责任编辑:王宝珍

中国农业科技出版社出版(100081 北京海淀区白石桥路30号)

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

中国农业科学院科技文献信息中心印刷厂印刷

开本787×1092毫米 1/16 印张:5.25印张 字数:127千字

1992年7月第一版 1992年7月第一次印刷

印数:1—3000册 定价:4.15元

ISBN 7-80026-327-4/Q·6

279, 188

目 录

1 引言	(1)
1.1 品种的概念和品种濒危的标准	(1)
1.1.1 品种的概念	(1)
1.1.2 品种濒危的标准	(1)
1.2 保护濒危品种的理由	(2)
1.3 确定基因储备的基本方法	(4)
2 基因组	(6)
2.1 保存	(6)
2.1.1 胚胎(超数排卵、受精卵的采集及冷冻保存)	(6)
2.1.2 胚胎的操作	(13)
2.1.3 细胞和核	(16)
2.1.4 精液	(17)
2.1.4.1 精液的冷冻保存	(17)
2.1.4.2 深度冷冻精液的长期贮存	(19)
2.1.5 卵母细胞	(20)
2.1.5.1 排出的卵母细胞的收集	(20)
2.1.5.2 从卵巢收集卵母细胞	(20)
2.1.5.3 体外受精	(20)
2.1.5.4 深度冷冻和解冻后卵母细胞的体外受精	(20)
2.2 复原	(21)
2.2.1 解冻胚胎的移植	(21)
2.2.2 用卵裂球和保存的细胞生产嵌合体	(23)
2.2.3 核移植	(25)
3 基因	(28)
3.1 保存	(28)
3.1.1 分离的染色体	(28)
3.1.2 基因组DNA文库和/或cDNA文库的建立	(29)
3.1.2.1 高分子量基因组DNA的分离和部分水解	(36)
3.1.2.2 重组DNA的体外包装和转染	(36)
3.1.3 基因分离	(39)
3.1.4 核苷酸序列	(40)
3.2 复原	(40)
3.2.1 用保存的材料构建遗传文库	(40)
3.2.2 转基因牛的生产	(41)
3.2.2.1 直接显微注射DNA	(41)

3.2.2.2 用逆转录病毒载体移植基因·····	(43)
3.2.2.3 用转染的多能细胞形成嵌合体而生产转基因牛·····	(43)
3.2.3 转基因动物的检查·····	(44)
3.2.4 转基因牛的繁育·····	(48)
4 遗传问题·····	(51)
4.1 小群体生存的可能性·····	(51)
4.2 遗传变异性的降低·····	(51)
4.3 质量性状·····	(54)
4.3.1 在胚胎和精液文库中保存单基因·····	(54)
4.3.2 在基因组文库中保存单基因·····	(55)
4.4 数量性状·····	(56)
5 胚胎库的实际应用·····	(57)
5.1 固定的胚胎移植站·····	(57)
5.2 流动的胚胎移植小组·····	(57)
5.3 供体母牛·····	(58)
5.4 建立胚胎库所需要的费用·····	(61)
6 讨论和结果·····	(63)
6.1 濒危的牛品种·····	(63)
6.2 牛品种的保存价值·····	(63)
6.3 选择最适宜的保种技术·····	(64)
6.4 实际工作·····	(64)
7 摘要·····	(66)
8 参考文献·····	(67)

1. 引 言

近几十年间,随着农业和繁育计划的发展,牛的育种群发生了重大变化。与集约化繁育活动相结合建立了良种牛登记协会,使某些牛的品种因生产性能的逐步提高,其繁殖的地区范围明显扩大。由于生物技术的最新进展,促进了诸如精液的冷冻保存和冷冻胚胎的出口,这些牛的品种也占据了整个世界。结果,当地品种的数量不断减少,生产性能高的品种数量日益扩大,两者几乎相当。可以预料,全世界25000万头牛在今后1000年中将主要由20个不同的品种组成。现存的500个牛品种大部分会面临完全灭绝或被其他品种杂交的真正威胁。

对于有些牛品种不能得到预期发展,反而面临灭绝的问题,可以采取两种态度。一种是听任事态的发展,其理由是经济上不成功的品种不值得关心,因为人们无需那些已丢失其原有特性而不再有保存价值的品种。另一种是承认这些品种在繁殖和遗传方面有重要作用,并用合适的方法保存它们,通过建立小规模群体或种质基因的冷冻保存来实现。

本专著有几个目的。它简要介绍了保存品种的几个有利理由,并回顾了现代生物学技术,用这些技术可以为这些品种的后代保存基因组或个别基因,同时还讨论了有关复原家畜基因的可能性,以及遗传结果,也研讨了包括实用性和潜在成本方面的可行性问题。

1.1 品种的概念和品种濒危的标准

至少在小亚细亚和近东,人类驯养家牛约有8500年的历史。我们预计牛是在几个不同地方分别开始驯养的。这一点在育种者看来是值得注意的,因为在不同地方驯养,所以不同群体基因库的收集也是不相同的。由于只有很小一部分野生群体变为驯养群,因此早期驯化的牛就其基因库而论已经不同于它们的野生型伙伴。随后的繁育引起了一些在野生型群体中未曾出现过的新组合,最终,在原先存在于野生型群体中的特殊范围内形成了早期品种(Röhrs, 1980)。

1.1.1 品种的概念

在一个物种内,各品种之间的区别在于它们在具有生产性能和生产潜力的形态学特征和生理学特征上存在明显差异。应该注意,从物种分类为不同品种是不包括在动物学命名法中的。

品种是同一物种中的一群动物,它们有相同的起源,同有某些体型和生理特征及商品价值。鉴于它们的生物学行为,这样的品种不是永久不变的统一体。但是,这一术语有不同的解释方法,例如:

——品种的含义是,能进行良种登记、有严格的繁育计划和不断接受生产性能鉴别。

——品种是群体的组成部分。

KräuBlich(1981)把牛的品种定义为按照特定的配种计划或选择特定的特性经长时间培育出的遗传个体。可任意给不同品种取名。某一特定群体中的单个基因经常会导致形成一个有遗传特点的群体,从而得到一个独特的品种名称。这些品种的亚群称作变种或品系。

1.1.2 品种濒危的标准

如果可用于进一步繁育的动物数量低于某个最低限,这个品种就可认为处于濒危状态。

饲养在不同地点的个别动物如果不能参与繁殖过程，它们就不能保证这个品种能持续下去。

德国育种研究协会动物育种遗传统计技术委员会就动物繁育中基因贮存的世代发表过声明（Züchtungskunde, 1978）。按照这一声明，如果用于繁育的公牛数低于10头，可以说这一品种已受到威胁。

为保持一个品种的遗传变异性，并能使其生存下去，不仅要有具有繁殖能力的动物数量，而且要有公母性别的一定比例。决定因素是所谓的有效群体规模（Ne），可用下面公式计算：

$$Ne = [4 \times Nm \times Nf] / [Nm + Nf] \quad (1)$$

Nm表示公畜数，Nf表示能得到的母畜数。

能用有效群体规模（Ne）计算近交增量（△F），每一世代为：

$$\Delta F = 1/2Ne \quad (2)$$

非随机选配能稍微减少近交效应，即选择尽可能与受配动物无血缘关系的动物。

为能成功地选择数量性状，如体尺、体重等，需要一个超过100头动物的有效群体规模。如果无需选择因而也不考虑育种进展，那么有效群体规模Ne = 50就足够了。由此而出现百分之一的近交增加是允许的。表1资料表明保持相等的公母畜数量，尽管在实践中往往不可能作到，但仍然是最适当的。在正常情况下，公畜数常少于母畜数，然而20头公畜和50头母畜是足够的。

如进一步把母畜数增加到80头，不会显著提高有效群体规模。

表1 繁育参数：动物数、有效群体规模、近交增量

公畜(头)	母畜(头)	合计(头)	有效群体规模	一代后近交增量(%)*
50	50	100	100	0.5
20	80	100	64	0.78
10	90	100	36	1.39
1	99	100	3.96	12.63
20	50	70	57.1	0.88
10	50	60	33.3	1.50
1	50	51	3.92	12.75

• 随机繁育

1.2 保护濒危品种的理由

驯养动物遗传资源减少问题至少在1974年于马德里召开的第一届世界应用遗传学代表大会以后已经讨论过。已经发表过许多声明，提出了保存濒危品种的理由。只有两种出版物被引用来解释这个问题。

德国育种研究会委员会（Züchtungskunde, 1979）提出的保存濒危品种的理由如下：

（1）濒危品种或繁育群可以包含迄今尚未被认识的或忽视的遗传性状。考虑到环境变化、市场需求变更，或与其它群体的杂交繁育计划，这些性状也许要优于目前拥有的群体中现存的和/或占支配地位的性状。虽然单个基因的出现可以产生优势，但它随着特定品种的消失必然会丢失。优势也可以由几个基因的互作而产生。贮存这种特定的遗传结构是很费

时间的，如果需要，可以从占支配地位的群体中专门选择这些基因。

(2) 如果占支配地位的群体中有效的和可利用的遗传变异减少，濒危品种可以像遗传库一样作为后备群占有重要的地位。

在占支配地位的育种群体内进行集约化选择的特征表现为个体动物间的可利用遗传差异趋向减少。长期下去，这将对进一步的遗传改良和农畜对环境变化的适应性产生限制性效应。在不同的育种群寻求同一目标的平行育种计划会把风险加大到一定程度。如果需要，可以在后期阶段把单独培育的群体重新组合，以储存遗传变种。

(3) 家畜品种是文化遗产

一些家畜品种往往与农业发展中的特殊历史和技术阶段相关。在这方面，这样的品种无疑是值得保存的，其受重视的程度应像各地留下的建筑遗址和博物馆中收集的技术工具一样。一些家畜品种传统上就在某些地区居于支配地位。因此，它们的作用不仅在于形成地方特色，而且也使这些地区具备了娱乐价值。

FAO的家畜遗传资源保存和管理培训手册中(Bod, Buvanendran, Hodges, 1984)就保存遗传资源列举了下面几条理由：

(1) 人们不可能预测人类将来对畜产品的需求或因价格结构变更带来的生产体系的改变。因此，可以想象将来动物的专门特征与现有动物特征会有明显不同。这是特别重要的，如抗病力或适应性等因素。

(2) 驯化的农畜群体及它们的形态学和生产特征是有创造力的人类干预所产生的。因此，这样的群体有资格像建筑遗址那样受到保护。

(3) 可以想象个别纯种群其本身是没有经济价值的，但是，如果用在育种计划中它们会很有经济价值的。

(4) 在粗放的环境条件下，比如游牧环境条件，饲养已获得适应性的低生产性能品种往往花费最小。在这种条件下，这些品种甚至会拥有比其它外来品种更多的优越性。外来品种需要更为集约化的管理和更为独特的饲料，因为它们的生产性能较高。

(5) 多数情况下，本地品种与特定地区的历史和特点密切相关。它们是独特的，因此值得保护。

(6) 本地品种还表现了动物育种的历史发展，因此有教育价值。

(7) 本地品种对于现有牛群的遗传和生理学特征方面的比较研究很有价值。

(8) 在某些地区，当地品种很吸引人，因此对旅游者有重要作用。

保护濒危品种的一系列理由必须被延伸来考虑另一些重要问题，即动物育种方面的新进展，特别是为生产转基因动物和克隆动物而设计的试验。如果这些新技术在将来能获得成功，并更大规模地应用，那么可以预料，遗传改变也将被引入现存的品种。因此，在基因转移计划中，将不排除特殊的外来品种可以作为重要的起始群体。

通过新的育种技术减少现有品种的种类和对它们的保存之间的因果关系很复杂，可能是可逆的。一方面，现代技术，如人工授精、胚胎移植或胚胎操作越来越多地专门用于高生产性能品种。另一方面，正是应用了这些技术，才有可能建立可以保存整个基因组或个体基因的资源库，从而保护那些面临灭绝的品种。

1.3 确定基因储备的基本方法

保存特殊品种的遗传信息有几种方法，其效率、可行性和成本各不相同（Brem, Graf 和KräuBlich, 1982）。可作如下选择。

（1）在家畜动物园内保留较小的群体。通过私人的积极性和设立奖金来赞助保留这些动物的意图。

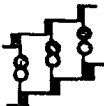
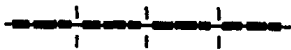
遗传信息	用于制备和收集的技术	
	核酸	生物化学
	密码子	生物化学
	外显子	生物化学，遗传工程
	基因簇	生物化学（将来），遗传工程
	染色体	遗传工程，冷冻保存，显微操作
	核型—基因组	显微操作
	精液（单倍体）	冷冻保存，人工授精
	卵子（单倍体）	体外受精
	原核（单倍体）	显微操作
	核	克隆，显微操作
	胚胎	冷冻保存，胚胎移植
	细胞	克隆，基因文库
	成畜	小群体，动物园

图1 以不同水平保存遗传资源的技术

——公母畜放在一个或几个畜群中。不储存冷冻精液或胚胎。

——育种群只含母畜。通过人工授精全部用冷冻精液进行配种。这种方法需要冷冻保存精液和足够的贮量。

(2) 在不保存活畜的情况下贮存冷冻精液。从畜群中取适宜的母畜经人工授精复原独特品种的遗传潜力，接着在随后的几个世代中进行遗传级进杂交来增加起始品种的基因频率。

(3) 在不保留活畜的情况下，储存冷冻胚胎和精液。如果需要，将胚胎移植到寄养动物来复原原有品种。

上述技术已用来建立牛品种的遗传储备。除保存活畜或储存冷冻胚胎和精液外，也有分离、保存和移植核或染色体的想法。这些方法也可以保护遗传资源。

现代分子生物学技术的发展还提供了其它方法。必须指出，这些技术通常在后一阶段不能使基因组以全部复苏的形式得以保存，但是，能以所谓基因文库的形式保存个体基因或大批无文件证明的和未知的基因。

图1概括了遗传信息的不同组分及保存它们所需要的技术。下一章将集中讨论用于储存和复原遗传资源的技术，并着眼于技术、遗传和经济诸方面及其可行性。

2. 基因组

2.1 保存

2.1.1 胚胎（超数排卵、受精卵采集、冷冻保存）

最近几年，在牛育种中胚胎移植已经发展成为一种重要的生物技术手段。除了作为增加后裔数量来扩大遗传上有价值的母畜数量的一种方法外，这种技术也用来保存基因组。随着非手术技术的发展，大大简化了采集和移植牛胚胎的技术。但是，每个供体动物对超数排卵反应产生的明显差异仍会妨碍胚胎移植计划。这很重要，因为能否得到大量可进一步发育的牛胚胎是进一步取得成就的先决条件。

在出生时，母畜卵巢中含数千个卵母细胞。只有很少几个真正被用来繁殖。对于牛，通过超数排卵能同时采集大量的卵子，超数排卵是用促性腺物质处理诱导的。这些激素过分刺激卵巢，从而诱导多排卵。

最广泛使用的能诱导牛超数排卵的促性腺激素是孕马血清促性腺激素(PMSG)和猪促卵泡素(pFSH)，后者从猪的垂体中得到。使用的另一种激素是人绝经促性腺激素(HMG)。因为PMSG的生物半衰期很长，一次注射处理就够了，而FSH的生物半衰期只有五个小时，不得不施用四到五天，每天两次，剂量逐步缩小，以刺激充分排卵。

自Casida等(1943)用从牛和羊得到的垂体提取物处理发情周期第16至18天的牛而获得首次成功的尝试以后，已经认识到超数排卵处理存在一些不令人满意的反应。他们注意到大约30%的受试动物未出现卵泡发育增强。

Schilling和Holm(1963)在黄体期开始和结束时各注射一次PMSG以诱导超数排卵。这种处理方法也不能明显减少个体的变异性。

一些作者首先用孕酮或雌激素对动物进行预处理，随后施用PMSG或FSH。Rowson(1951)提出用PMSG在卵泡期而不是在黄体期刺激动物时，排卵率较低。

溶黄体物质如前列腺素和其类似物解除了控制终止排卵的机制。自从用PMSG和PGF_{2a}结合处理发情周期第5天至第16天之间的动物，使超排取得成功后，诱导发情的问题已经解决。Elsden等(1974)、Rasbech(1974)、Sreenan和Beehan(1974)、Mickelsen(1974)和Moore(1975)阐述过他们的首次成功处理。他们都是通过肌肉或子宫内施用前列腺素或它的类似物之一。在注射PMSG后24小时施用一次，或注射PMSG后24小时和48小时各施用一次。

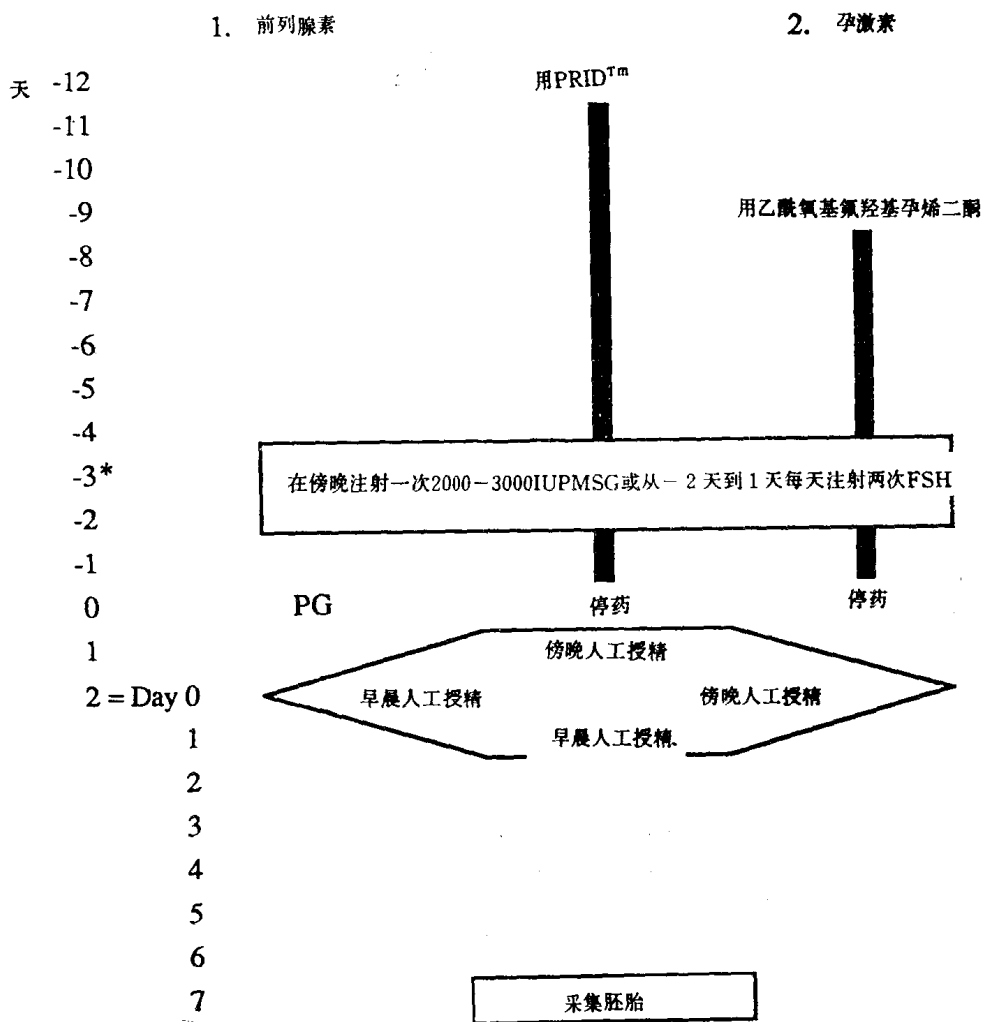
除溶黄体药物外，孕激素也适用于与PMSG(图2和图3)协同地结合处理，孕激素能在发情周期的任何阶段使用以诱导排卵。由于反弹效应，中止激素处理后，动物会在短期内发情。可应用的适宜方式是阴道栓PRID™或耳埋NORGESTOMET™。这些埋藏型制剂在使用时要比以前用的口服型孕激素制剂容易控制得多。

尽管PMSG和FSH对卵巢的刺激作用相同，但在美国和欧洲主要施用pFSH。

胚胎通过输卵管完成迁移后(发情周期的第五天)，可在第七天用非手术技术从子宫获取。

通常是在抽出子宫颈粘液后把一根导管通过输精管插入子宫取得胚胎。用一个小气球把导管的头部固定在一个子宫角的分叉点上(图4)。然后把冲卵液(Dulbecco磷酸缓冲液)注入子宫,使胚胎悬浮,然后排出冲卵液,从中收集胚胎。下面介绍几种收集胚胎的导管技术:

- (1) 使用带有金属排液孔的双通导管(Lampeter等, 1977a, b);
- (2) 使用带有橡胶排液孔的双通导管(Baumgärtner等, 1977);
- (3) 使用三通橡胶导管(Brand等, 1978);
- (4) 使用三通金属导管(Sugie, 1965)。



*发情周期的第9—15天

图2 超数排卵时间表

可以用不同方法处理冲卵液以采集胚胎:

- (1) 利用自然重力注入冲卵液: 用适宜的导管系统将一升液体注入子宫。冲洗结束后, 还靠重力立即用三通管将液体排出(流过法)。采用二通管时一般需要有一个T形阀。注入

一定量的液体后，子宫内容物被虹吸管吸出（封闭系统法）。

（2）用注射器注入冲卵液：注入一定量的液体，通常为50—80毫升，再立即把液体抽出。这种技术常与二通管配合使用。

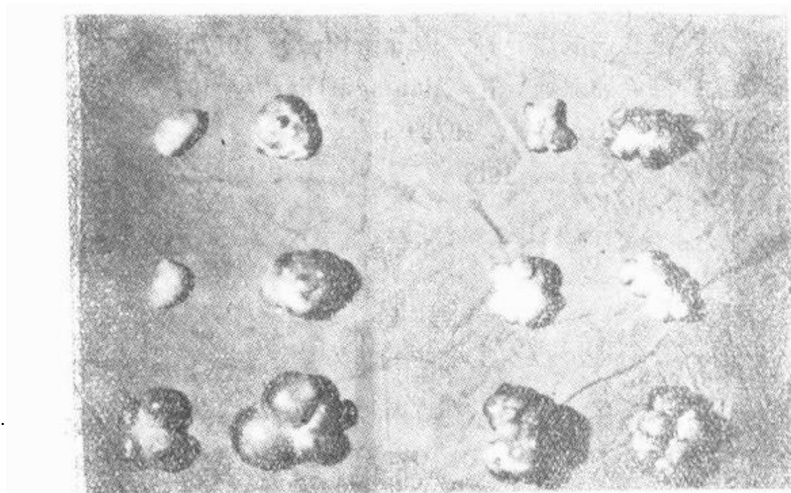


图3 六头超数排卵母牛的卵巢，左边的未经PMSG抗血清处理，右边的经PMSG抗血清处理

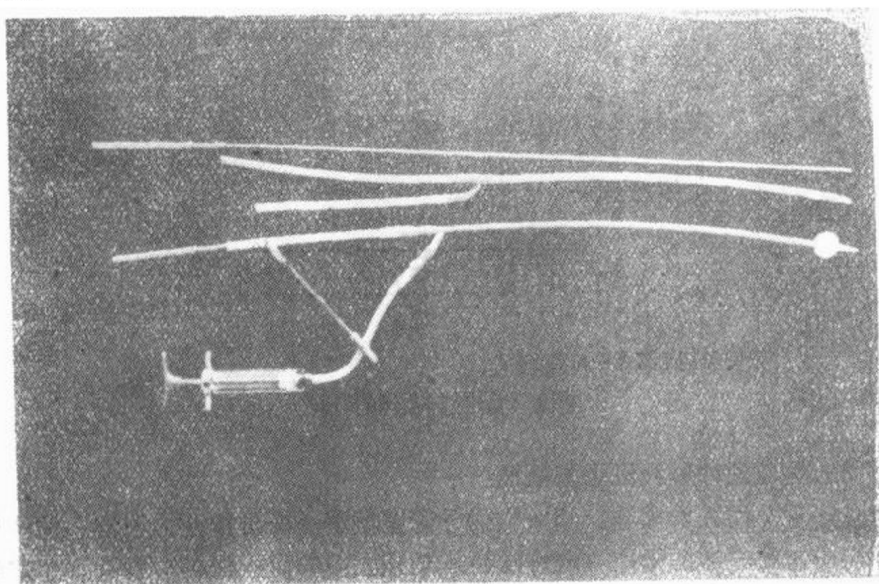
另介绍几种回收冲卵液的处理方法：

（1）根据液体量，将回收液放入一个或几个量筒内，静置约20分钟，使胚胎沉到底部。用过滤系统小心地倒出或吸出上层清液（图5）。后一种技术能节省许多时间。

（2）将回收液倒入锥形烧杯，这种方法也是根据胚胎比回收液密度大的原理。因此，要倒出上层清液，在烧杯的尖底部收集胚胎。

（3）将从子宫回收的冲卵液进行过滤。过滤系统可以与冲卵系统的出口联合。或者用适当的过滤系统从子宫排出的液体中分离出胚胎。

a)



b)

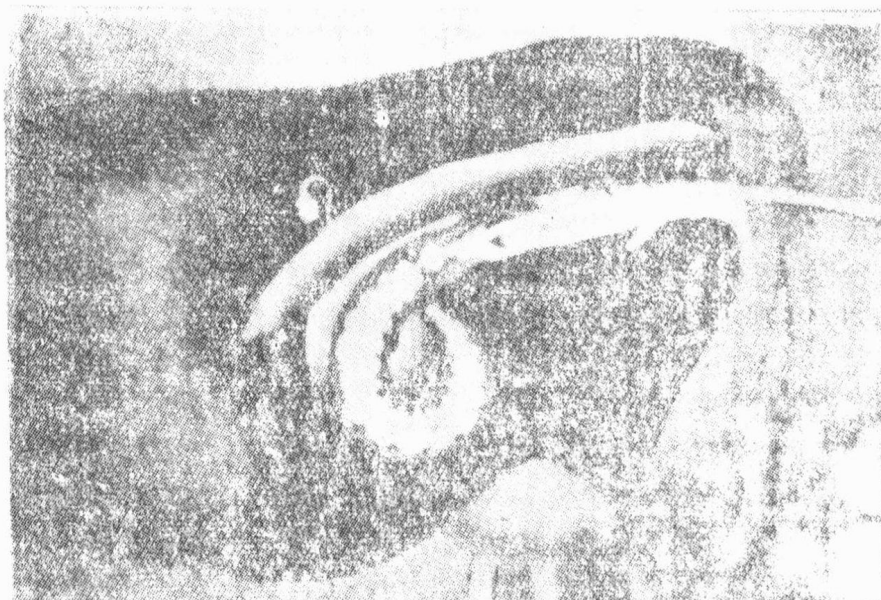


图4 无创伤收集胚胎所需的工具 (a) 和处理图 (b)

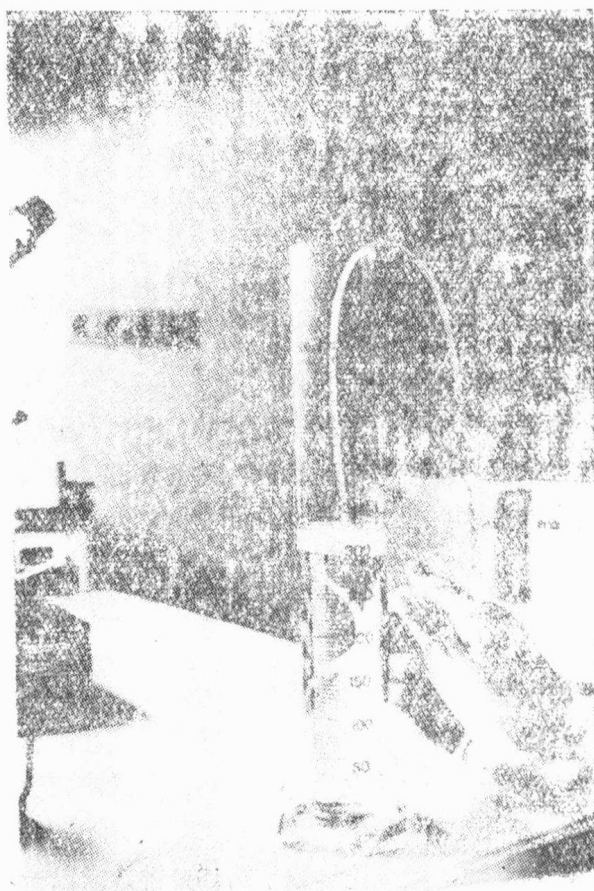


图5 吸出回收的冲卵液，减少液量，然后收集胚胎

然后将浓缩的冲卵液（见1、2条）倒入一个或几个大的培养皿中进一步用显微镜检查。通常在大的培养皿中用冲卵液涮洗滤器。用一台简单的体视镜或光学显微镜在放大12—50倍下选取胚胎，并放入含培养液的器皿中。培养液中常补充20%的胎儿或新生犊血清。有人证明，每毫升培养液中加三毫克牛血清白蛋白是有效的，特别是对于冷冻保存的胚胎。

胚胎的直径通常为0.16毫米。它们仍被透明带包围，在采卵当天（6—8天）已达到桑椹胚或胚囊阶段。将胚胎贮存于胚胎库前，极重要的是按质分级，以保证复原效果，并移入合适的受体动物。图6作了总结，胚胎分级时通常要考虑发育状况（与预期的生理状况是否一致）和形态学（细胞质的致密度）。如果所用的胚胎为“好”或“极好”会得到最佳效果。

依下面指标将胚胎分级：

极好：这些胚胎符合预期的发育阶段。它们是半透明的，略带黄色。卵裂球大小一致。牢牢地互相粘附着，看不到特殊的或完全分离的细胞。透明带不呈凹状，为圆型，无任何颗粒物质。胚胎不在培养液中飘浮。培养几个小时后可见到进一步发育。

好：胚胎基本符合预期的发育阶段。卵裂球大小一致，最多有一个已分离。透明带呈圆型，没有任何颗粒物质。几小时后可见到进一步发育。

中等：外观与预期的发育阶段相差24小时。卵裂球呈黄色带暗斑。组织紧密，有几个分离的卵裂球。大小略有差异。透明带不完全呈球形。保温几小时后辨不出进一步发育。

差：胚胎与预期的发育阶段不符，通常延迟2—3天。着色深，外观不透明。卵裂球联结松散，大小不均。几个卵裂球呈分离状。透明带变形，有颗粒物质复盖。在培养的24小时内辨不出进一步发育。

变质：卵裂球大小差别很大。组织结合松散，有个别的裂解细胞。着色深或黑。透明带严重变形。

死亡：卵裂球彻底裂解，着黑色。

在纯水冷冻期间，溶剂变成生物学惰性体，即冰晶，因此，有必要加抗冻化合物，防止胚胎在冷冻和解冻时受损。

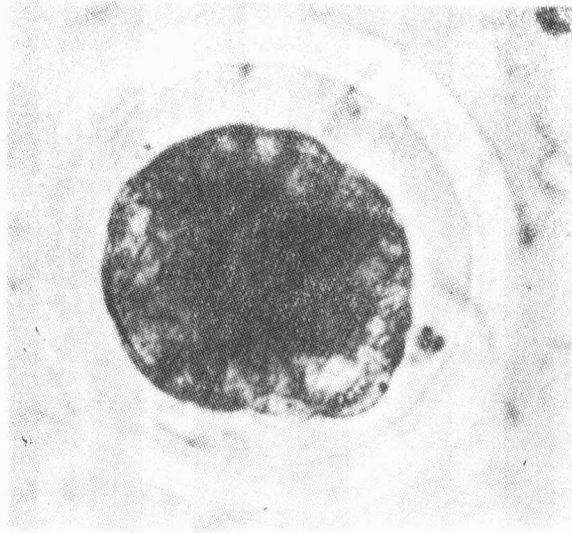
原则上有两类不同的化合物可用于这一目的：

（1）防冻剂必须能穿透细胞膜保护细胞。适宜的化合物如甘油、二甲基亚砷（DMSO）和低分子量酒精。许多这类物质对细胞有毒。因此，选择理想的化合物是极重要的。尽管已经确认DMSO为小鼠胚胎的防冻剂，但甘油用于牛胚胎则最好，它损坏最小。通常的有效工作浓度为1—4 M。

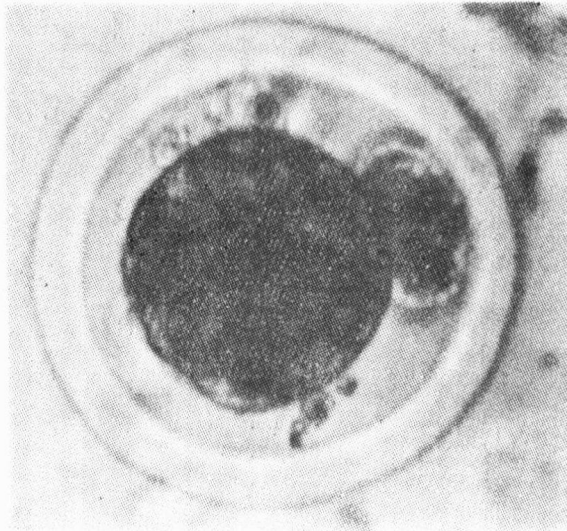
（2）聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖、葡萄糖和其它糖不必透过细胞膜的防冻剂。通常低浓度（0.01—0.2M）就有效。

防冻剂以不同的方式起作用。首先，它能降低培养液的冰点，使形成结晶时对细胞产生的机械损坏降至最低限。其次，它们也以一种仍未弄清的方式使细胞膜强度增高。关于冷冻和解冻牛胚胎的许多技术已有介绍。大多数用甘油作防冻剂，所用浓度不同，但最常见的是10%的甘油。

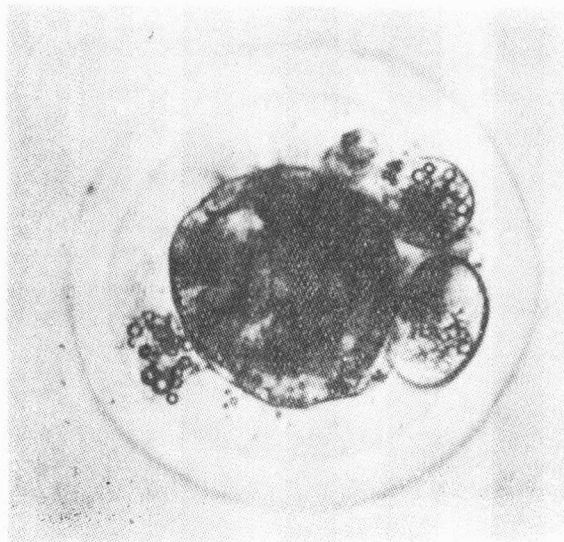
可以用几种浓度梯度添加甘油，至少让细胞平衡10分钟，或以一步法添加。然后把单个胚胎或成组胚胎贮存在塑料细管中，将其从环境温度冷却至-7℃。这时，远离细胞的某个



a) 极好

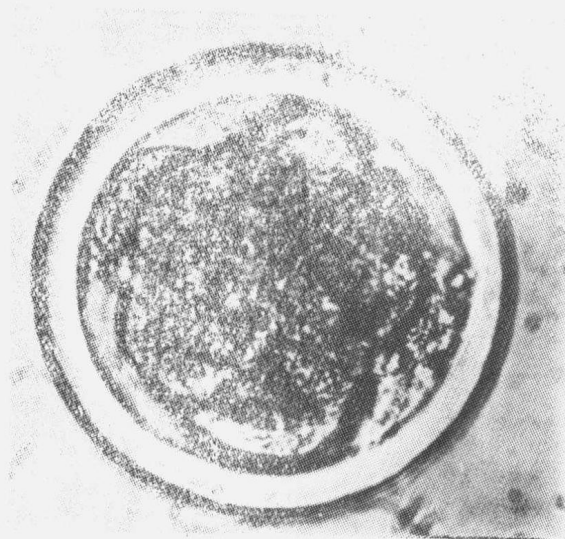


b) 好

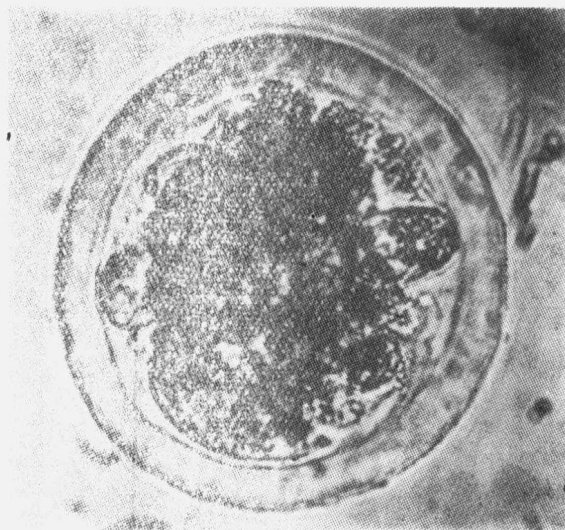


c) 中等

d) 差



e) 变质 (不满意)



f) 死亡

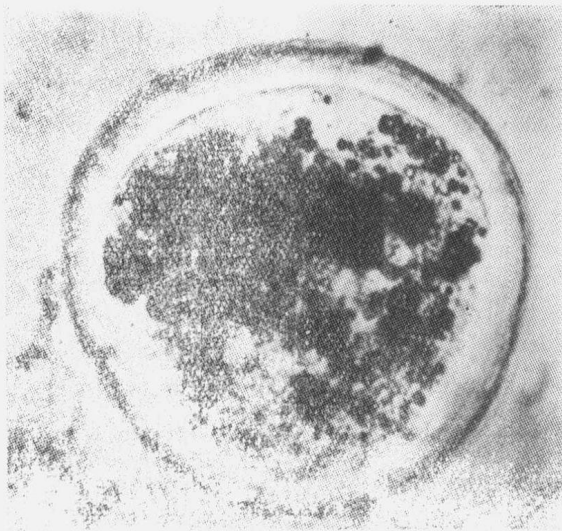


图6 第6天牛胚胎的质量