

# 牛胚胎移植、冷冻及一步解冻技术

贺文杰<sup>1</sup>, 徐照学<sup>1</sup>, 辛晓玲<sup>1</sup>, 魏成斌<sup>1</sup>, 张震<sup>1</sup>, 林森<sup>2</sup>, 段迎珍<sup>3</sup>

(1 河南省农业科学院生物技术研究所, 河南 郑州 450002; 2 罗山县畜牧站; 3 河南省畜牧局)

中图分类号: S858.23

文献标识码: B

文章编号: 1004-3268(2004)05-0075-02

## 1 供体牛超数排卵技术

### 1.1 供体牛的选择

供体牛应选择品种优良、生产性能好、遗传性能稳定、谱系清楚、体质健壮、繁殖机能正常、无遗传性和传染性疾病的种牛, 年龄在 15 月龄到 10 岁以内为宜。若供体牛的数量多时, 应对供体牛进行同期化发情处理, 便于集中冲卵。

### 1.2 超数排卵处理

在超排前 3 周给供体牛肌肉注射  $V_A$ 、 $V_D$ 、亚硒酸钠  $V_E$  针剂, 补充维生素和微量元素。

1.2.1 供体牛非手术冲卵所需主要器材、药品 冲卵管、子宫颈扩张棒、子宫颈抽吸黏液棒、集卵漏斗(日本产)。注射器、酒精、碘酊、2%利多卡因。

1.2.2 供体牛冲卵液 MEM(细胞培养液)、pH 值调整液(0.2 mol/L TRIS), 配好的冲卵液需高压灭菌、冷藏保存(4~5℃), pH 值为 7.0~7.2, 渗透压为 270~290 mmol/L。

1.2.3 超数排卵方法 在母牛发情周期的第 9~12 天, 每天肌注 2 次 FSH(早晚各注 1 次), 连

续 4 d, 递减注射; 在第 7、8 次注射 FSH 时, 同时肌肉注射 PG。据试验, FSH 的最佳注射剂量为: 加拿大产 FSH, 每头奶牛用量为 380~400 mg; 日本产 FSH, 每头奶牛用量为 25~30 AU; 中科院动物所产 FSH, 每头奶牛用量为 10 mg。

1.2.4 供体牛发情鉴定 在第 8 次注射 FSH 之后, 对超排供体牛每隔 6 h 观察 1 次发情情况, 每次观察 0.5 h 以上。以母牛站立接受其他牛爬跨作为发情鉴定的标准。

1.2.5 供体牛人工授精 发情后人工授精 2~3 次, 比平时输精剂量加倍。

## 2 非手术冲胚操作技术

### 2.1 保定

将供体牛保定在六柱栏中, 用 2%普鲁卡因(4~8 ml/头)在荐椎与第 1 尾椎结合处或第 1 尾椎与第 2 尾椎结合处, 实行尾椎硬膜外腔麻醉, 直至尾部无知觉。

### 2.2 扩张宫颈

用扩张棒扩张子宫颈, 用宫颈黏液棒抽吸宫颈黏液。然后把带内芯的冲卵管慢慢插入子宫

收稿日期: 2003-11-08

基金项目: 国家农业科技成果转化资金项目(02EFN214101140)

作者简介: 贺文杰(1959-), 男, 河南许昌人, 副研究员, 大专, 主要从事家畜胚胎生物技术研究。

静注或肌注, 如用青霉素 200 万 IU, 链霉素 200~300 万 IU, 注射用水 10~20 ml, 一次肌肉注射, 1 日 2~3 次; 同时应根据病情给予解热镇痛剂类药物, 直至炎症消除为止。对卧地不起的牛, 应切实做好护理, 防止继发感染。

## 6 预防

对该病的防治主要应加强日常饲养管理, 结合我场的预防经验, 笔者认为应作好以下几个方面:

① 畜舍、运动场要清洁干燥, 定期清除污物、冲刷牛舍及牛床, 定期消毒, 加强运动场管理, 及时剔除可能造成奶牛蹄部损伤的砖块、石头、铁丝头、玻璃碎片等异物。② 在多雨湿热季节应定期用 10%  $\text{CuSO}_4$  溶液浸泡牛蹄, 每次约 10 min, 并尽可能地保持畜舍干燥(加强通风等)。③ 定期修整牛蹄, 减少腐蹄病发生的诱因。发现病例及时隔离治疗, 同时应加强护理, 防治交叉感染, 对牛群认真进行观察, 及时发现病牛。

角,当冲卵管到达子宫角大弯处,拔出内芯 5 cm 左右,再把冲卵管往子宫角前端送。当内芯再次到达子宫角大弯处时,再向外拔出内芯 5 ~ 10 cm,直至冲卵管到达子宫角前端为止。给冲卵管气囊充气,连接冲卵管和三通导管。

### 2.3 冲卵液回收

用注射器每次吸取 100 ml 冲卵液,钳住三通导管的输出管,将冲卵液从输入管注入子宫角,每次 20 ~ 50 ml;然后钳住输入管,使回收液从输出管流到集卵杯,每个子宫角用 300 ~ 500 ml 冲卵液。把集卵杯中的回收液在室温下(18 ℃ ~ 22 ℃)静置 15 ~ 20 min,待镜检。

## 3 胚胎的冷冻保存

### 3.1 试验、器材与所需溶液

实体显微镜,胚胎冷冻仪,恒温台,0.25 ml 塑料细管,细管塞,装胚器,0.22 μm 针头式细菌滤器,直径 35 mm 的培养皿。1.5 mol/L 乙二醇冷冻液(含 0.1 mol/L 蔗糖、20%FBS),用 PBS 液配制。保存液为含有 0.4%牛血清白蛋白、0.1 mol/L 蔗糖的 HP—SOF 液。

### 3.2 胚胎冷冻保存操作技术

(1)要求无菌工作室的室内环境清洁、紫外线照射,工作人员着工作衣、帽。保持室内环境温度 20 ℃。(2)将胚胎从冲卵液中吸出,移入培养液(皿)中洗涤 3 ~ 4 遍。培养液经直径为 0.22 μm 滤膜过滤除菌。(3)将洗涤后的胚胎移入冷冻保护液中,并装入细管。(4)装管程序:30 ~ 35 mm 保存液,隔 3 mm 空气;装入 30 mm 冷冻保护液,隔 3 mm 空气层;再装入 30 ~ 50 mm 含有胚胎的乙二醇冷冻保护液,3 mm 空气层,15 ~ 20 mm 保存液,剩余端用细管塞封闭。(5)胚胎移入冷冻保护液及装管过程,控制在 10 ~ 20 min 以内,以降低冷冻保护剂对胚胎的毒性作用。(6)立即将胚胎细管装入-6.5 ℃的程控胚胎冷冻仪胚胎插槽中冷冻。

## 4 受体牛胚胎移植技术

### 4.1 受体牛的选择

受体牛的发情周期应无异常,无繁殖机能疾病;经检疫无传染病,健康、膘情较好。以育成牛

为首选,经产牛分娩在 90 d 以上,产犊性能和哺乳能力良好,无流产史。受体牛移植前需作布氏杆菌病、结核病的检疫。人工授精或胚胎移植 2 次不孕的牛不宜做为受体。

### 4.2 受体牛的饲养管理

受体牛在移植前 6 ~ 8 周开始补饲,日增重保持在 0.30 ~ 0.40 kg。在移植前 6 ~ 8 周,注射 V<sub>AD</sub>、V<sub>E</sub> 针剂,补充微量元素(硒、锌等)。受体牛单独组群饲养,保持环境相对稳定,避免应激反应。

### 4.3 受体牛的同期化发情处理

同期化处理之前对受体牛繁殖系统进行直肠检查,繁殖系统机能正常的牛方可进行同期化发情处理。试验用上海计生所产的 PG,每日肌注 2 次,每次肌注 0.4 mg。受体牛的发情鉴定,以受体牛稳定站立接受其他牛爬跨为发情标准。

### 4.4 受体牛移植操作技术

受体牛在发情后第 7 d 进行移植。移植前对受体牛进行直肠检查,检查黄体是否合格,合格者用于移植。受体牛实行荐尾椎间硬膜外腔麻醉,擦拭外阴部。对照供体牛采胚记录表和合格受体的发情记录,合理搭配受体和胚胎。

从液氮罐取出胚胎细管,立即投入 37 ℃水浴 15 ~ 20 s,用消毒卫生纸擦去水分,去掉封口塞,装入胚胎移植枪进行移植。把装有细管的移植枪(法国产品)套上硬外套,用塑料环卡紧,再套上套膜。将胚胎移植到受体牛有黄体一侧子宫角的前 1/3 ~ 1/2 处(子宫角尖端)。

### 参考文献:

- [1] 贺文杰. 奶牛冷冻胚胎细管内一步解冻法的应用效果[J]. 河南农业科学, 1998(7): 30 ~ 31.
- [2] 徐照学. 河南优质肉牛生产综合配套技术体系试验示范[J]. 河南农业科学, 2002(10): 13 ~ 15.
- [3] 贺文杰. 应用国产激素进行奶牛超数排卵及同期发情处理的试验研究[J]. 畜牧与兽医, 1992(1): 8 ~ 10.
- [4] 郭志勤. 家畜胚胎工程[M]. 中国科学技术出版社, 1998. 12.
- [5] 岳文斌, 杨国意, 任有蛇, 等. 动物繁殖新技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003. 11.