

河南省牛胚胎移植技术研究与应用进展

魏成斌, 施巧婷, 徐照学*

(河南省农业科学院 畜牧兽医研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 从牛的超数排卵技术、胚胎冷冻技术、胚胎工厂化生产技术、应用胚胎生物技术建立良种肉牛繁育体系等方面综述了河南省牛胚胎移植技术的研究与应用进展。

关键词: 河南省; 牛; 胚胎移植; 超数排卵; 活体采卵; MOET 育种技术

中图分类号: S813.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2009)09-0200-03

利用胚胎移植技术可以克服自然条件下动物繁殖周期和繁殖效率的限制, 可使动物繁殖后代的速度是自然状态下的十几倍甚至几十倍, 从而快速增加良种动物的数量。因此, 世界上许多畜牧业发达的国家都利用胚胎移植技术快速扩繁良种牛。自 20 世纪 70 年代以来, 我国已有 20 个省市开展了牛胚胎移植及相关生物技术研究, 80 年代初开始进行大规模的奶牛胚胎移植技术试验研究。虽然起步较晚, 但发展迅速, 尤其是近几年, 胚胎移植技术更加成熟并已在一定范围内推广应用。

河南省在牛胚胎移植方面的研究较其他省份早, 且对此研究较多, 多年来已获得省部级多项科技进步成果奖。无论是基础研究水平、配套技术水平、硬件设施, 还是人才资源都达到全国先进水平。特别是“九五”以来, 通过国家“九五”重点科技攻关项目“应用胚胎生物技术建立良种肉牛繁育体系和生产体系”、国家农业科技跨越计划项目“河南优质肉牛生产综合配套技术体系试验示范”、国家农业科技成果转化资金项目“高产奶牛胚胎工厂化生产技术体系研究与示范”、国家农业科技跨越计划项目“应用胚胎生物技术快速扩繁良种奶牛及规模化健康养殖试验示范”、河南省杰出人才创新基金项目“高产奶牛胚胎工厂化生产技术体系研究”、国家农业科技成果转化资金项目“优质奶牛性控胚胎生产及健康养殖技术示范”、“十一五”国家科技支撑计划重点项目“优质肉牛新品种选育与产业化开发”、国家“863”重点项目“牛分子细胞工程育种技术创新与优势性状新品系

培育”等项目的实施, 使该项技术得到了较快的发展, 已进入推广应用阶段, 并筹建了良种牛胚胎生物工程产业化项目, 开展牛胚胎移植的商业化运作。

1 超数排卵技术

1.1 同期发情技术研究

1978—1980 年, 河南省农科院畜牧兽医研究所对黄牛同期发情进行了研究, 摸索出了用药量和用药后母牛发情规律, 停药后大部分黄牛集中在 2~4 d 发情, 同期发情率大于 75.0%, 情期受胎率大于 62.5%。同期发情技术研究为牛胚胎移植技术应用打下了良好的基础。

1.2 应用国产激素对奶牛进行超数排卵的研究

河南省农科院畜牧兽医研究所于 1978 年开始进行家畜胚胎移植及相关生物技术研究, 1984 年开始进行大规模的奶牛胚胎移植技术试验研究。

1986—1989 年, 河南省农科院畜牧兽医研究所同河南省畜牧局改良站等单位完成了省招标项目“河南省牛胚胎移植技术的研究”, 应用国产激素和器械对奶牛进行超数排卵, 采用胚胎移植技术使黄牛繁殖奶牛。共超排供体牛 185 头, 成功 159 头, 成功率为 81.95%; 共获卵 1201 枚, 头均 (7.55 ± 6.37) 枚, 其中可用胚胎 880 枚, 头均 (5.68 ± 4.96) 枚。同期发情处理受体牛 236 头, 发情 139 头, 发情率 58.90%; 鲜胚移植受体牛 178 头, 受胎 78 头, 受胎率 43.82%, 其中移植受体黄牛 145 头, 受胎 61 头, 受胎率 42.07%, 移植受体奶牛 33 头, 受胎 17

收稿日期: 2009-06-10

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划重点项目(2008BADB2B0303-03); 国家农业科技成果转化资金项目(2008D00020211); 现代农业产业技术体系专项资金

作者简介: 魏成斌(1969-), 男, 河南遂平人, 副研究员, 本科, 主要从事家畜遗传育种、繁殖技术研究。

通讯作者: 徐照学(1961-), 男, 陕西华县人, 研究员, 博士, 主要从事家畜繁殖技术研究。

头, 受胎率 51.52%; 冷冻胚胎移植受体牛 61 头, 受胎 23 头, 受胎率 37.70%^[1]。该研究确立了应用国产激素垂体促卵泡素(FSH)和前列腺素 PGF2 α 诱发牛超数排卵和发情同期化处理的最佳程序和剂量, 并总结出了采卵方法、胚胎鉴定、胚胎冷冻保存和发情同期化处理的最佳程序和剂量, 并总结相应环节的技术规程, 该研究成果具有国内先进水平, 为胚胎移植技术在河南省的应用和发展奠定了基础。

1.3 重复超排技术研究

为探讨多次重复超排的效果, 河南省农科院生物技术研究所自 2002 年 10 月至 2004 年 10 月, 对同一批蓝白花肉牛供体牛进行 8 次重复超排, 累计生产可用胚胎 349 枚, 平均每头次 5.5 枚。每批获可用胚胎数无逐渐下降趋势, 说明多次重复超排是可行的^[2]。自 2003 年 12 月至 2005 年 4 月, 对 9 头中国荷斯坦奶牛供体牛进行 6 次重复超排, 采胚 47 头次, 累计生产可用胚胎 292 枚, 平均每头次冲胚获可用胚 6.2 枚。每批获可用胚胎数并未随超排次数的增加而呈现逐渐下降趋势, 说明中国荷斯坦牛以 3 个月的间隔多次重复超排是可行的^[3]。

2 胚胎冷冻保存技术

2.1 牛胚胎玻璃化冷冻保存及一步解冻技术研究

1991—1992 年, 河南省农科院畜牧兽医研究所进行了“牛胚胎玻璃化冷冻保存及一步解冻技术研究”并初获成功。该研究采用丙三醇和丙二醇与分子量最小、渗透性强而且化学毒性较低的乙二醇混合液为细胞内液做抗冻保护剂; 采用丙三醇和丙二醇作细胞外液的抗冻保护剂; 以 0.5 mol/L 蔗糖液为解冻液, 对体内胚胎作玻璃化冷冻和解冻试验, 其解冻的完好率为 58.7%, 经过培养, 有 55.6% 的胚胎继续发育, 移植妊娠率为 53.3%, 虽然解冻完好率较低, 但为胚胎玻璃化冷冻保存降低化学毒性, 提高胚胎活性开辟了新方法^[4]。该研究将胚胎直接投入液氮进行冷冻保存, 是一种新的快速冷冻方法, 结合一步解冻方法, 这样既不需要复杂昂贵的冷冻设备, 也便于操作, 对牛胚胎移植技术在养牛生产中的应用具有实际意义。

2.2 牛体外受精胚冷冻保存的研究

河南省农科院畜牧兽医研究所于 1993—1995 年进行了牛体外受精胚冷冻保存的研究, 对牛卵泡母细胞体外受精(IVF)168h 的致密桑椹胚、囊胚用常规快速冷冻法、预冷和不预冷的超快速冷冻法进行了冷冻保存试验。结果表明, IVF 囊胚采用含

10%甘油的常规快速冷冻法、含 2.1 mol/L 甘油和 0.25 mol/L 蔗糖预冷 5 min 的一步冷冻法及含 25%甘油和 25%乙二醇预冷 5 min 的玻璃化冷冻法等 3 种方法进行冷冻保存, 解冻后的继续发育率均无显著差异, 可用快速、简便、预冷的一步冷冻法或玻璃化冷冻法替代常规快速冷冻法^[5]。

3 胚胎工厂化生产技术

3.1 体外受精技术研究

1995—1996 年, 河南省农科院畜牧兽医研究所进行了牛卵泡母细胞体外受精的研究, 在国内首次用含 10 ng/mL 肝素的 percoll 分层液法处理精子, 显著提高了囊胚发育率。首次发现重组牛生长激素(rbGH, 10 ng/mL)对牛卵泡母细胞体外受精后的囊胚发育有显著促进使用, 研究了 BFF(牛卵泡液)rbGH 对牛卵泡母细胞体外受精后发育的影响, 在颗粒细胞单层和输卵管上皮细胞单层共同培养系统中, 加入适量的 rbGH, 可以代替昂贵的 IGF-1(胰岛素样生长因子)和 EGF(表皮生长因子)^[6], 这对于商业性大批量生产牛 IVF 胚胎具有较大的实际意义。

3.2 活体采卵技术研究

河南省农科院畜牧兽医研究所 1998 年开始进行牛活体采卵技术研究, 在超声波扫描仪的指导下, 用双孔型采卵针对牛连续实施活体采卵, 每周 1 次, 每次头均采集 6.1 枚, 所得卵子应用体外成熟、体外受精、体外培养技术, 生产体外胚胎^[7]。

3.3 建立体外胚胎工厂化生产技术体系

2002—2004 年, 河南省农科院生物技术研究所通过国家农业科技成果转化资金项目“高产奶牛胚胎工厂化生产技术体系研究与示范”, 应用 HS-2000 型超声波辅助采卵系统(活体采卵仪)和 LAMP 法胚胎性别鉴定仪进行胚胎工厂化生产。初步建立了牛活体采卵—体外受精的体外胚胎工厂化生产程序。项目实施期间, 共进行高产奶牛活体采卵 557 头次, 采集卵母细胞 3954 枚, 卵母细胞采集率 51.2%, 头均采集卵母细胞(7.1 \pm 4.3)枚。2 年共进行高产奶牛超数排卵 170 头次, 获高产奶牛体内胚胎 1284 枚, 头均获可用胚胎(7.55 \pm 5.36)枚。

2003—2005 年, 河南省农科院生物技术研究所承担的国家农业科技跨越计划项目“应用胚胎生物技术快速扩繁良种奶牛及规模化健康养殖试验示范”, 通过超数排卵—人工授精(体内胚胎生产)和活体采卵—体外受精(体外胚胎生产)2 个技术路线生

产良种奶牛胚胎,以河南省数量众多的黄牛为受体,快速扩大良种奶牛的群体。共进行了 350 头次的超数排卵,冲胚 324 头次,超排总有效率达到 92.6%,得到 2536 枚胚胎,其中可用胚胎 2233 枚,平均每头次获可用胚胎 6.9 枚。共实施高产奶牛活体采卵 327 头次,采集卵母细胞 2321 枚,卵母细胞采集率 51.2%,头均采集卵母细胞 (7.1 ± 4.3) 枚。在国内率先建立了良种奶牛活体采卵、体外受精技术操作程序,在技术上取得重大突破与创新,并使该项技术达到实用化阶段。该项技术创新,提高了河南省奶牛胚胎生物技术的研究水平和手段,有力促进了河南省奶牛业的发展。通过对提高受体母牛胚胎移植受胎率的研究,总结出了提高受体牛胚胎移植受胎率的主要技术措施和关键技术要点,总结了供体牛的准备、供体牛同期发情处理、供体牛的超排和配种以及胚胎回收、胚胎质量评定、胚胎冷冻等牛胚胎生产的各个环节中应采取的全程质量控制措施^[8]。

4 应用胚胎生物技术建立良种肉牛繁育体系

4.1 应用胚胎生物技术建立良种肉牛繁育体系和生产体系

河南省农科院生物技术研究所在承担的国家“九五”重点科技攻关项目“应用胚胎生物技术建立良种肉牛繁育体系和生产体系”,结合我国及河南省实际,重点开展了以技术创新为主的试验研究与推广应用。该专题的重大技术突破为:①在国内率先研制成功了不含血清、解冻时不需分步脱除冷冻保护剂的牛胚胎冷冻保护液,建立了牛胚胎快速冷冻、一步解冻移植技术操作程序,为牛胚胎移植技术的推广应用奠定了技术基础。②建立了应用 PCR 技术鉴定牛早期胚胎性别的技术,该技术使牛胚胎从取样到出结果,控制在 3 h 内,准确率在 95% 以上。通过对提高受体母牛胚胎移植受胎率的研究,总结出了提高受体牛胚胎移植受胎率的主要技术措施和关键技术要点。项目实施 5 年中,共移植胚胎 350 枚,得到蓝白花肉牛胚胎移植后代 52 头,配套系良种肉牛胚胎移植后代 131 头,选育良种公牛 30 头,生产冻精 25 万份,在河南省肉牛基地县进行了杂交改良试验,获改良后代 10 万多头。

4.2 应用胚胎生物技术快速扩繁良种肉牛

河南省农科院生物技术研究所在承担的首批国家农业科技跨越计划项目“河南优质肉牛生产综合配套技术体系试验示范”,针对我国肉牛饲养业良种率低、饲料转化率低、牛肉档次不高的现状,以胚胎生

物技术为核心技术,快速扩繁良种肉牛,在河南省农科院试验牛场、南阳黄牛繁育场和河南省纯种肉牛繁育中心等试验场,开展了德国黄牛、皮埃蒙特牛和比利时兰牛的超数排卵、胚胎冷冻保存、胚胎分割等试验研究和胚胎生产与移植工作,共超排德国黄牛 61 头次、皮埃蒙特牛 19 头次和比利时兰牛 22 头次,分别获得可用胚胎 366 枚、117 枚和 120 枚,头均获可用胚胎 5.9 枚,达到国际先进水平(5~6 枚);共移植胚胎 455 枚,获纯种犊牛 236 头,其中德国黄牛 128 头;皮埃蒙特牛 56 头,比利时兰牛 52 头,冷冻库存纯种肉牛胚胎 148 枚。

4.3 良种肉牛 MOET 育种技术研究

MOET 育种技术是超数排卵和胚胎移植技术与核心育种技术相结合的一项系统工程,在提高育种进展和育种效益方面应用于单胎动物具有很大潜力。通过超数排卵与胚胎移植,使母畜的繁殖率提高几十倍。在肉牛育种方法上,国内首次将数量遗传学理论、育种方法和胚胎生物技术结合在一起,形成了一个定量性的 MOET 育种体系的育种规划系统。通过良种肉牛核心群生产性能测定和选种方法的研究,建立了良种肉牛 MOET 核心群育种方案实施体系^[9]。利用 MOET 育种技术可快速选育出良种肉牛,从而解决我国现已引进的良种肉牛品种的培育问题。

参考文献:

- [1] 田金如,李继军,邓瑞广.牛胚胎移植试验研究[J].河南农业大学学报,1995,29(1):82-87.
- [2] 魏成斌,徐照学,贺文杰.比利时蓝白花肉牛重复超排试验[J].中国牛业科学,2006,32(1):30-31.
- [3] 魏成斌,贺文杰,辛晓玲,等.中国荷斯坦牛重复超排试验[J].中国奶牛,2006(11):24-25.
- [4] 田金如,邓瑞广,李继军,等.牛胚胎直接投入液氮快速冷冻技术的研究[J].河南农业科学,1995(5):31-32.
- [5] 徐照学,兰亚莉,安森亚,等.牛体外受精胚胎冷冻保存的研究[J].中国兽医学报,1997,17(4):402-405.
- [6] 徐照学,钱菊汾,兰亚莉,等.BFF rhGH 对牛卵泡卵母细胞体外受精后发育的影响[J].中国兽医学报,1996,16(6):621-626.
- [7] 徐照学,兰亚莉,西康裕,等.高产奶牛连续活体采卵及卵母细胞体外受精[J].中国兽医学报,1999,19(4):272-273.
- [8] 徐照学,魏成斌,辛晓玲,等.牛胚胎生产的全程质量控制[J].黄牛杂志,2004,30(2):14-16.
- [9] 徐照学,贺文杰,辛晓玲,等.良种肉牛 MOET 育种技术研究[J].中国农学通报,2003,19(5):4-6.