

奶牛胚胎切割移植试验报告*

窦忠英 樊敬庄

张致民 胡庆义 张晓红

(西北农业大学兽医系)

(陕西省三原县陵前乡奶牛胚胎移植站)

摘 要

以裸胚切割和透明带内切割两种方法,切割31枚奶牛早期胚胎,一分为二。将41枚半胚(其中38枚成对)分别移植给26头受体牛,6头移植怀孕,成功率为23.1%,移植有透明带的半胚和无透明带的裸半胚怀孕成功率都为25%。2半胚在同一透明带内(透明带内切割)的怀孕成功率为40%,而将裸半胚重新装入空透明带内的移植5头(受体全为黑白花奶牛),均未怀孕。桑椹胚分割成半胚移植怀孕成功率为21.1%,而早期囊胚则为28.6%。

关键词 奶牛胚胎;桑椹胚;囊胚;透明带;显微手术;胚胎切割;半胚;裸胚

动物胚胎切割是八十年代发展起来的一种胚胎生物学新技术,它借助于显微外科手术方法,切割早期胚胎,制造同卵孪仔或同卵多仔。迄今为止,该项技术已在小鼠、家兔、绵羊、山羊和牛等动物试用成功⁽¹⁻⁴⁾。牛胚胎切割自70年代末首次成功以来,相继有一些国家试验组研究成功^(2,5-11)。1985年,联邦德国不莱梅·吕凯尔(Nüchel/Bremerhaven)奶牛胚胎移植站切割奶牛胚胎39枚,将其78枚半胚移植,44头受体怀孕成功,成功率为56.4%,其中有15头孪生犊牛⁽¹²⁾。以后一些学者研究使用更方便的切割工具,简化切割程序。如用刮胡切片、眼科手术刀片,或将盖玻片磨制成显微手术刀片,或用合金制成的金属切割刀,也得到了满意的效果。另外,还研究了将切割的半胚不再重新装入准备好的空透明带内,无需再转移到中间受体而直接移植到受体内,也取得成功,这就大大简化了这一工作的程序^(13,14,15)。1981年,Willadsen和Polge将八细胞时期的奶牛胚胎一分为四,移植给受体,有9头怀孕成功,其中6头怀双胎,最后生下8头足月犊牛,其中3头来源于同一胚胎。

我国开展胚胎切割移植的研究工作才刚刚开始。我们从1986年1月到9月将黑白花奶牛早期胚胎切割,一分为二,移植给黑白花奶牛和当地的农家黄牛及杂种牛,以制造同卵孪仔。

本文于1987年2月23日收到。

本文于1986年1月在日本筑波中日农业生物技术学术讨论会上宣读。

三原县白鹿总公司常万全、郑执甲和张庆先等同志在供体牛群的经营管理方面为本试验作了大量工作,特表示感谢。

本试验的一些物品是联邦德国李比锡大学W·Gehring教授、博士所赠,特致谢意。

1 材料和方法

在陕西省三原县白鹿总公司养殖场应用 FSH (宁波市激素制品厂) 和 15 甲基 - PGF_{2α} (上海第五制药厂, 批号 850301), 有时加用 LH (宁波市激素制品厂), 对黑白花奶牛超数排卵 17 头次。在发情后第七天 (开始发情时为 0 天), 用非外科手术方法采卵^[13, 14]。

受体牛中, 黑白花奶牛是白鹿总公司养殖场供体牛群 (已超数排卵 2 次以上); 黄牛和杂种牛为当地农民役牛, 移植后仍在农家喂养。同期发情用 15 甲基 - PGF_{2α} 处理, 与供体牛同时或者晚 12 小时注射。

在实体显微镜下检卵并进行质量评定。将卵分为 A, B, C 三类: A 类为形态完好的桑椹胚或早期囊胚, 作切割移植用; B 类和 C 类为部分变性或完全变性胚胎和未受精卵, 未用于切割移植。

切割用 Leitz 显微操作仪进行。将胚胎移入盛有 20ml 含 20% 犊牛血清的 PBS 液的塑料培养皿内, 放在 Leitz 显微操作仪下用纤细的玻璃针切割。切割采用两种方法:

(1) 裸胚切割: 采用 Ozil^[12] 的切割方法, 先将胚胎固定, 打开透明带, 轻轻吹出细胞团; 然后将裸胚一分为二切割, 并将两个半胚分别装入原透明带和一个提前准备好的空透明带内 (利用牛的变性胚胎或未受精卵的透明带), 准备移植。或者不重新装入透明带, 直接进行裸半胚移植^[7] (见图版 I, 1~3)。

(2) 透明带内切割: 同上法先将胚胎固定, 在对面用纤细的玻璃针刺透部分透明带 (尽量不损伤细胞团), 并由上向下在透明带内将细胞团一分为二切开, 其结果有以下三种情况: ① 细胞团在透明带内被切开, 未从破口移出, 仍在同一透明带内; ② 被切开的一半胚胎留在原透明带内, 而另一半移出为裸半胚; ③ 二半胚同时移出透明带, 为两个裸半胚 (见图 2)。

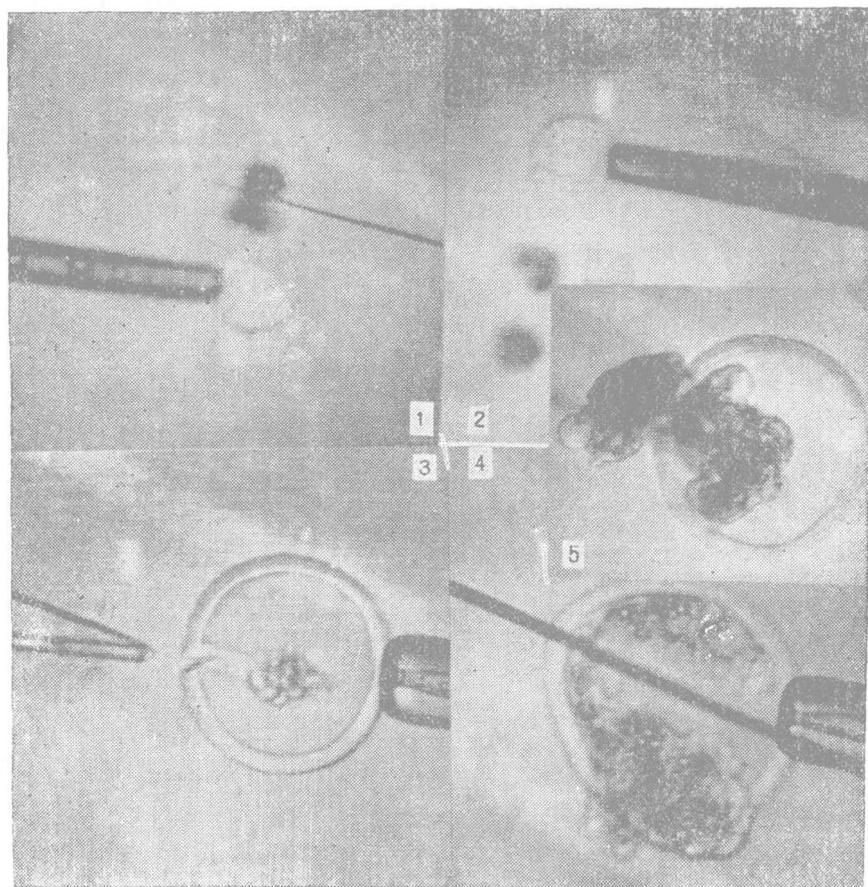
有的将透明带切一破口后, 用玻璃针在透明带外, 由上向下连透明带一起切割胚胎。切割结果亦有以上三种情况 (见图版 I, 5)。

移植分以下两种情况: ① 二半胚在同一透明带内或者单半胚移植, 用非手术方法, 以移卵管通过阴道移入有黄体侧的子宫角前端; ② 如果给一受体移植双半胚, 将其分别移入两侧子宫角前端。移植后 1.5 和 2.5 个月直肠检查, 进行怀孕诊断。

2 结果和讨论

2.1 切割 31 枚桑椹胚和早期囊胚一分为二为 61 枚半胚 (1 枚半胚丢失), 将 41 枚半胚 (其中 38 枚成对) 分别移植给 26 头受体牛 (黄牛和杂种牛 10 头, 黑白花奶牛 16 头)。移植后, 6 头怀孕 (其中黄牛 4 头, 黑白花奶牛 2 头), 成功率为 23.1% (6/26)。移植后其中黄牛怀孕成功率为 40%。1986 年 10 月 29 日到 1987 年 4 月 26 日, 6 头怀孕的受体牛中, 4 头先后各生一黑白花奶牛犊 (三公, 一母), 犊牛健壮, 生长发育良好 (见图 6)。另外两头人为地造成流产 (误用 15 甲基 - PGF_{2α}), 其中一头怀孕 40 天, 一头怀孕 118 天。在移双半胚的 5 头怀孕受体牛中, 未有同卵双仔的犊牛出生。其中在同一透明带内的两半胚有的可能重新融合。根据 Suzuki et al.^[17] 的试验表明, 在 12.5%

的蔗糖溶液中切割胚胎，细胞发生皱缩，容易切割，而且切面细胞受损，尽管两半胚在同一透明带内，也不能再融合，容易得到同卵双仔的犊牛。



图版 I

黄牛作受体，移植后怀孕成功率为40%，而黑白花奶牛只有12.5% (2/16)，显著较低，这和所选用的受体黑白花奶牛不当有关。

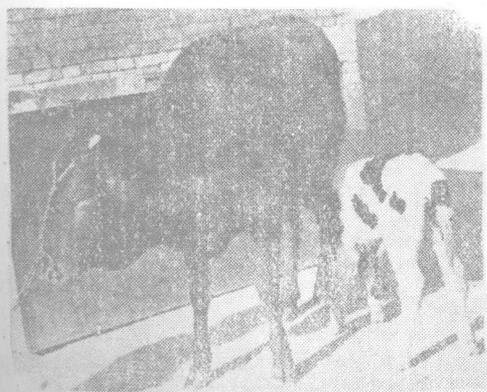


图2 移双半胚的黄牛于
1986年12月21日生一黑白花奶牛公犊

原因往往是准备的受体农家黄牛不足，被迫使用试验牛群的供体牛作受体，这些黑白花奶牛都是已超数排卵2次以上，卵巢未能完全恢复，有的是老龄，而且在选作供体之前又有程度不同的子宫内膜炎，发情周期不太正常，不宜连续作为供体，被迫用作受体，移植后怀孕成功率大大降低。受体黄牛一般选用的是生殖器官健康、发情周期正常的青壮年牛，其怀孕成功率较高。

2.2 给受体牛移植双半胚的15头，怀孕成功率为20% (3/15)，移植单半胚的11头，

奶牛胚胎切割移植统计表*

		桑 椹 胚									囊 胚										
		裸胚切割			透明带内切割						裸胚切割			透明带内切割							
		无透明带		装透明带	无透明带		有透明带		在同一透 明带内		无透明带		装 入 透 明 带	无透明带		有透明带		在同一透 明带内			
胚胎切割数		7		2		3		3		3		2		1		4		4		2	
受体类别		黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛	黄牛	奶牛
移植数	单胚数	2	2		4	1		2													
	双胚数		2			2**	1			1	2	1***	1		1		2**			1	1
怀孕数	单胚数	1 已产	1 流产					1 流产													
	双胚数					1														1 已产	1
怀孕百分数 (%)		50	25			50		50												100	
		1/2	1/4			1/2		1/2												1/1	1/1
		33.3 (2/6)				33.3 (1/3)		50 (1/2)													100 (2/2)
		20 (2/10)			22.2 (2/9)									50 (2/4)							
		21.1 (4/19)									28.6 (2/7)										

注：*裸胚切割的胚胎移植怀孕成功率为15.4% (2/13)，而透明带内切割的为30.8% (4/13)。

黄牛作为受体，用两种方法切割胚胎移植怀孕成功率相同，都为50% (1/2, 3/6)。

**其中1头受体移1半胚有透明带，移另1半胚无透明带。

***移1半胚有透明带，移另1半胚无透明带。

怀孕成功率为27.3% (3/11)，这和未切割胚胎移植单胚和双胚怀孕成功率的差别正好相反。这主要是由于选用了不合适的黑白花奶牛作为受体，移植的双半胚数量较大，成功的百分数较低。如单以黄牛受体统计，移植双半胚和单半胚的怀孕效果则相同，各为40% (2/5, 2/5)。因为试验次数较少，有待于进一步扩大试验。

2.3 给受体牛移植有透明带的半胚和无透明带的裸半胚各12头，怀孕成功率都为25%。而黄牛怀孕成功率均为50% (2/4, 2/4)。由此看来，半胚移植成活与否和透明带的有无关系不大。这就不需要把裸半胚重新装入透明带内，大大简化了操作程序。本试验中，将裸半胚重新装入提前准备好的空透明带内移植给5头黑白花奶牛，全部未怀孕。其原因一是所选黑白花奶牛的怀孕能力差，不宜作为受体；另外，可能与装入透明带的操作过程使胚胎在体外的时间延长，并受到一定损害有关。

2.4 桑椹胚切割移植19头，4头怀孕成功，成功率为21.1%；早期囊胚切割移植怀孕成功率略高，为28.6% (2/7)。单以黄牛受体统计，也是早期囊胚切割移植怀孕成功率〔50% (1/2)〕高于桑椹胚切割移植的怀孕成功率〔37.5% (3/8)〕。

2.5 采用透明带内切割法，半胚移植怀孕成功率为30.8% (4/13)，而裸胚切割法低，只有15.4% (2/13)。单以黄牛受体统计，两种切割法移植成功率分别为42.9% (3/7)和33.3% (1/3)，也能看出前者移植怀孕成功率高于后者。这可能是由于透明带内切割操作方便，用时少，胚胎损伤轻微之故。

胚胎切割技术的应用，不仅可使胚胎移植所用胚胎数目成倍增加，而且可以产生遗传性能相同的后代，这对畜牧业生产和实验研究有着特殊的作用。如研究外界环境和考

件对于家畜生长发育、生产性能等方面的影响,应用遗传性能相同的同卵孪仔或多仔作试验,其所得实验结果就确切得多了^(6, 13),同时,应用胚胎切割技术还可以间接地控制性别(在胚胎性别鉴定和其它控制性别的方法还未建立以前),如将一早期胚胎切割一分为二,先将一半移植,另一半冷冻保存,等到移植受体分娩或者在怀孕期间确定胎儿性别以后,即可根据人们的意愿,将冷冻保存的另一半解冻移植,达到控制动物性别的目的,从而大大提高胚胎移植的价值和实际效果。另外,胚胎切割技术也是通过观察性染色体进行胚胎性别鉴定采样的基本技术,也是胚胎嵌合、细胞核转移、一些无性系繁殖和基因转移等生物工程的基本技术,用途广泛,具有比较重要的意义。尽管该项技术的发展历史只有几年,目前只在少数国家进行,但所取得的结果是令人满意的。

参 考 文 献

- [1] Moustafa, Laila A. U. Hahn, J. : Experimentelle Erzeugung von identischen Mjusezwillingen. Dtsch. tierärztl. Wschr. 1978, 85 : 242 - 244.
- [2] Dankowski, k. et al : Möglichkeiten der zytogenetische Analyse und Geschlechtsbestimmung von Kaninchenmorulae an isolierten Blastomeren. Dtsch. tierärztl. Wschr. 1982, 89 : 248 - 249.
- [3] Willadsen, S. M. : A methode for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. Natur, 1979, 277 : 298 - 300.
- [4] 吉羽宣明, 大竹通男, 盐谷康生 : 由绵羊胚胎二分离移植产生双羔, 家畜繁殖志, 1985, 31卷3号, 126 - 218. (原文为日文)。
- [5] Willadsen, S. M. et al. : The production of monozygot twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. Theriogenology. 1981, 15 : 23 - 29.
- [6] Williams, T. J. et al. : Identical twin bovine pregnancies derived from bisected embryos. Theriogenology 1982, 17 : 114.
- [7] Ozil, J. P. et al. : production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. The veterinary Record, 1982 : 126 - 127.
- [8] Brem, G. et al. : Zur Erzeugung eineiiger Rinderzwillinge durch Embryo-Mikrochirurgie. Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 1983, 96 : 153 - 157.
- [9] Gorlach, A. Hahn, R. u. Schuh, W. : Möglichkeiten der Anwendung der Mikromanipulation an Rinderembryonen unter praxisbedingungen. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1985, 92 : 10 - 11.
- [10] 高仓宏辅等 : 牛二分离裸胚的体外培养及移植后的产仔性。家畜繁殖志, 1985, 31卷3号, 122 - 124. (原文为日文)。
- [11] 佐伯和弘等 : 由牛胚二分离产生双仔, 家畜繁殖志, 1985, 31卷4号, 218 - 223 (原文为日文)
- [12] Roselius, R. : Transferergebnisse mit Rinderembryonen in Nijckel/Bremethaven 1983/1984. Dtsch. Tierärztl. Wschr. 1984, 92 : 11 - 12.

- [13] Hahn, J. et al. : Über die Entwicklung und Beurteilung von Rinder-embryonen, gewonnen aus superovulierten Spendertieren. Dtsch. tierärzt. Wschr. 1983,90 : 420 - 424.
- [14] Hahn, J. : Die unblutige Eigewinnung beim Rind unter Berücksichtigung der Vorbereitung der Spendertiere und der Entwicklung der Eizellen im Eileiter und Gebärmutter. Dtsch. tierärzt. Wschr. 1978,85 : 140 - 145.
- [15] Niemann, H. : Einige aktuelle und zukünftige biotechnische Methode in der Tierproduktion. Dtsch. tierarztl. Wschr. 1984.91 : 280 - 284.
- [16] Ozil, J. P. : Production of identical twins By bisection of blastocysts in the cow. J. Reprod. Fret. 1983, 69 : 463 - 468.
- [17] Suzuki, T. Shimohira, I. : Viability of Frozen - Thawed Bovine Embryos Bisected in Sucrose: A Preliminary Report. An International Journal of Animal Reproduction. 1986, 26(3) : 333 - 339.

A REPORT OF THE PRELIMINARY STUDIES ON EMBRYO CUTTING AND TRANSFERING IN DAIRY COWS

Dou Zhongying Fan Jingzhuang

(Department of Veterinary, the Northwestern Agricultural University)

Zhang Zhimin Hu Qingyi Zhang Xiaohong

(Sanyuan County, Shaanxi Province)

Abstract

Each of thirty-one early developing cow embryos was cut into two parts by using the methods of bare embryo cutting and internal zona pellucid cutting. Forty-one half-embryos (38 half-embryos were paired) were transferred into 26 recipients, of which 6 recipients succeeded in gestation with the success rate of 23.1%. But the success rate of the transfers of both the half-embryos with zona pellucid and the bare half-embryos without it was 25%. When two half-embryos (internal zona pellucid cutting) in the same zona pellucid were transferred, 40% of success rate in gestation was obtained, but the 5 recipients (all Holstein-Friesian) which were transferred with bare half-embryos put into the empty zona pellucid again, failed in gestation. When the morula cut into half-embryos were transferred, the success rate was 21.1% while that of the early developing blastocysts came to 28.6%.

Key Words : cow embryo; morula; blastocyst; zona pellucid; microsurgery; embryo cutting; half-embryo; bare embryo