

奶山羊胚胎冷冻和移植试验*

A PRELIMINARY REPORT OF EMBRYO FREEZING AND TRANSFER IN MILK GOATS

王光亚 马保华 钱菊汾 王建辰 张涌

(兽医系)

Wang Guangya Ma Baohua Qian Jufen Wang Jianchen Zhang Yong
(Department of veterinary science)

关键词: 胚胎冷冻; 移植; 奶山羊

Key words: embryo freezing; embryo transfers; milk goats

家畜胚胎冷冻保存的研究对于优良品种胚胎库的建立及品种推广有重要意义,同时冷冻胚胎便于在生产中应用。哺乳动物胚胎冷冻保存始于实验动物。50年代Ferdow等初次成功地使冷冻家兔受精卵发育成胎儿。Whittingham (1972) 冷冻移植小鼠胚胎成功。同一时期Wilmut也成功地进行了小鼠胚胎冷冻试验,1973年又成功地进行了牛冷冻胚胎的移植。此后在绵羊 (Willadsen et al. 1974)、山羊 (Biltoan et al. 1976) 和马 (Ramamoto, 1982) 等动物的胚胎冷冻移植相继成功。英、美和西德等国已建立奶牛胚胎移植公司,向国外输送冷冻胚胎。目前国内在奶牛、兔和绵羊方面均有成功的报道^[1-3],但在奶山羊还未见报道。本试验旨在解决奶山羊胚胎冷冻和解冻的方法问题,为建立我国优良奶山羊品种西农萨能奶山羊胚胎库创造条件。

1 材料和方法

供试羊为改良奶山羊,4只,购自西北农业大学附近农村;陕北黑山羊2只,购自陕西陇县。冷冻仪为法国微型程序控制生物冷冻仪 (Minicool),自配国产XWT-S小型台式记录仪供自动记录样品冷冻曲线。药品PMSG系长春生物制品研究所产品,批号8317。FSH和LH为宁波激素厂产品,批号860402和860202。15甲基PGF_{2α}为上海第五制药厂产品,批号850302。甘油为重庆东方红试剂厂产。化学纯,批号790914。PBS液系采用国产试剂自配。接牛血清系自制。

对奶山羊用PMSG或FSH配合PG进行超排处理,配种同时注射LH促排。配种后第7日手术,用10%接牛血清PBS液冲洗子宫角回收胚胎。胚胎经冻前处理后,用程序控制生物冷冻仪自动完成冷冻过程。

本文于1987年6月1日收到。

* 本研究是王建辰教授主持的国家自然科学基金项目“家畜胚胎移植的研究”课题的内容之一。刘智喜、程忠贤、原晔、张一玲、谢锡藩等同志在前期参加了部分工作。

冷冻：经鉴定后的胚胎在26℃的室温下，分别在0.3M，0.6M和1.0M甘油20%犊牛血清PBS液中平衡5~10分钟，然后装入含0.2ml 1.0M甘油犊牛血清PBS液的安瓿中，火焰封口，放入冷冻仪冷冻室，将温度传感电极插入对照管，使温度稳定10分钟后，令冷冻仪开始执行程序。冷冻仪即根据指令以1℃/分使样品降至-7℃，在-7℃自动诱发结晶，结晶后再以0.3℃/分降至-36℃，此时迅速从冷冻室取出样品，立即投入液氮中保存。冷冻中样品降温曲线由记录仪自动记录供分析。

解冻：含胚胎的安瓿由液氮中取出后，立即投入35~36℃的温水中，轻轻摇动，1~2分钟后切开安瓿，向安瓿中加入含10%犊牛血清的PBS液0.2ml，平衡5~10分钟，将胚胎检出放入0.3M甘油PBS中平衡5~10分钟，最后移至不含甘油的PBS液中准备移植。

移植：受体羊经腹腔镜检查，证实卵巢上有发育良好的黄体者，于发情后第7日将解冻后的胚胎，手术移植于子宫角内。

2 结 果

共冷冻胚胎三批。第一批于1986年11月5日冷冻奶山羊胚胎6枚（密集桑椹胚1枚，囊胚5枚），冷冻曲线A所示诱发结晶不在最佳状态，11月14日解冻后5枚破碎，一枚形态完整，移植给14号黑羊受体，未孕。经对冷冻程序的子程序修正后，于11月25日进行第二批冷



诱发结晶前后降温曲线图

A—第一批 B—第三批

冻。共冷冻黑山羊胚胎10枚（囊胚1枚，退化胚9枚），12月12日解冻后仅作形态观察及荧光检查，有两枚胚胎发弱荧光，说明这两枚胚胎仍有活力，未进行移植。第三批于11月29日冷冻奶山羊囊胚6枚，冷冻曲线见B。12月3日解冻后有一枚荧光检查阴性，未做移植。其余5枚移给25

号受体奶山羊2枚，未孕。移给22号受体奶山羊3枚，该羊怀孕137天，于1987年4月19日生产羔羊3只，其中公羔2只，母羔1只，全部成活。

3 讨 论

奶山羊胚胎冷冻的研究在国内未见报道，国外可供参考的资料也较少。国外多以DMSO或甘油做防冻保护剂，冷冻程序多未详细报道，少数资料介绍的程序比较复杂，且难以用Minicool的程序语言表达。我们参阅其他家畜的胚胎冷冻程序及冷冻原理，以家兔胚胎为材料，用1.0M甘油做保护剂，在Minicool上进行自编程序及程序语言表达方面的试验。在获得妊娠受体兔后，即用奶山羊胚胎进行试验。试验中我们体会到影响胚胎冷冻质量的关键在于诱发结晶时的状态。在样品容器、保护剂种类、浓度及液体量相对稳定的情况下，由于程序 T_2 ， Δ ， W 和 t 直接控制诱发结晶状态。每一子程序都会影响诱发结晶状态。它们的数据主要靠从试验中获得。如诱发结晶时的冷冻曲线A，在样品结晶时温度发生急剧地升降变化，冷冻的6枚胚胎，解冻后5枚破碎，1枚移植后未孕。于是根据曲线情况，调整了 t 及 Δ 数据，获得曲线B。从曲线B中可以看出，诱发结晶后，样品温度稍有回升，然后平稳下降。冷冻的6枚胚胎解冻后均保持冻前形态，荧光检查1枚阴性，移植5枚有3枚着床发育，且正常分娩。但因数量很少，仍待进一步研究完善。