第18卷第2期 西北农业大学学报 Vol.18 No.2
1990年6月 Acta Univ.Agric.Boreali-occidentalis Jun. 1990

奶山羊精子体外获能异体受精试验*

Birth Kids Following Xenogenous Fertilization of Goat Ovulated Oocytes with in Vitro Capacitated Spermatozoa in Rabbit Oviduct

段恩奎 王光亚 马保华 王建辰

(家畜生殖内分泌研究室)

Duan Enkui Wang Guangya Ma Baohua Wang Jianchen

(*Laboratory of Reproductive Endocrinology in Domestic Animals*)

主题词 乳羊/异体受精，精子体外获能，兔产羔

Subject words milk goat/xenogenous fertilization, in vitro capacitation, rabbit, birth

关于哺乳动物体外受精的研究，已经历了120多年，直到80年代才获得了第一例“试管家畜”。近年来，尽管“试管婴儿”平均每天有4例问世，但到1990年4月10日为止，全世界获得的“试管家畜”仅有130例，其中“试管牛”54头，“试管猪”52只，“试管绵羊”23只，“试管山羊”只有1只。

为了克服山羊体外受精的难点，Rao等将山羊输卵管卵母细胞输入事先经子宫输入新鲜羊精的假孕兔输卵管，培养24～36 h，有37.0%完成了异体受精。将这些受精卵移植给9只受体羊后，有1只正常分娩，获得了首例异体受精山羊羔[1]。我们将超排羊输卵管卵母细胞移入事先经阴道输入新鲜羊精的假孕兔输卵管，获得了44.8%的异体受精率[2]。但迄今尚未证实，山羊体外获能的精子与超排卵母细胞在假孕兔输卵管内能否完成受精过程和产出正常后代。本试验旨在研究山羊体外获能的精子与超排的输卵管卵异体受精及受精卵移植后产羔的可能性。

1 材料和方法

1.1 试验动物

10只成年萨能奶山羊和2只种公羊分别从西北农业大学畜牧站和杨陵附近农村购买，均舍饲。实验前1月，对所有羊只进行药浴和驱虫，观察母羊发情表现，记录发情日期。

5只成年大耳白母兔由本研究室自繁自养，年龄1～2.5岁，体重2～4 kg。饲以青

文稿收到日期：1990－05－18

*本课题为高校博士点基金和杨陵农业科技开发基金资助项目。

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

干草、青草和配合饲料，实验前20 d单笼饲养。

1.2 仪器试剂

（1）仪器：WJ-3型CO_2细胞培养箱，上海跃进医疗器械一厂产品；Karl Storz小儿腹腔镜，西德产；OLympus实体显微镜和荧光相差显微镜均为日本产；800型离心沉淀器、高频手术器及常规手术器械均系国内产品，吸卵管和移植管均为自制品。

（2）试剂与激素：牛血清白蛋白(BSA)，结晶研究级，批号87-11-14，Serva进口分装，上海化学试剂站分装厂分装；FSH，批号881020，hCG，批号881023，均由宁波激素制品厂生产；15甲基前列腺素$F2_\alpha$(15甲基$PGF2_\alpha$)批号880602，上海五洲药厂生产。精子洗涤液为修改的Brackett's DM[3]，其中含有0.6mg／mL BSA和47mM $NaHCO_3$（mDM）；精子获能液亦由Braekett's HIS[3]修改而得，即含有0.6mg／mL BSA和47 PGmM $NaHCO_3$(mHIS)。其它常规试剂均为国内产品。

1.3 异体受精方法

（1）山羊超排及异体受体兔准备：从周期15～18 d起，用FSH递减法（100iu，50 iu×3和25iu×2）对供体羊连续处理3 d，首次注射FSH后24 h一次肌注1.2 mg 15甲基$PGF2_{2\alpha}$。站立发情后即静注750iu hCG。与此同时，对发情母兔耳静脉注射100iu hCG。

（2）采卵：对母羊注射hCG后24 h用腹腔镜检查卵巢变化，排卵后立即麻醉，常规剃毛消毒，切开腹壁，用35℃温mDPBS＋10%NCS冲洗输卵管，在30～33℃无菌室检出卵母细胞，立即移入mDM中，置37.5℃ CO_2培养箱中备用。

（3）精子获能：采卵前3～4h用假阴道采集经筛选的优秀种公羊精液。15 min内加入9mL mDM，以1000rpm离心10 min，弃上清液，加入3mL mHIS，在37.5°C，5% CO_2，95%空气，100%相对湿度的CO_2培养箱中培养15 min。再以1000 rpm离心5min，弃去上清液，用1mL mDM重新悬浮。评定精子活力，并以血球计数板计数，用mDM将精子浓度调整为20～30×10^6／mL。在同样条件下培养2.5～3 h，将终浓度调至2×10^6／mL备用。

（4）异体受精及受精卵移植：将5～6枚卵质饱满、形态正常且成熟到M Ⅱ的山羊卵母细胞连同20uL获能精子一起移入假孕兔输卵管中，培养24～60h后处死母兔，用mDM冲洗输卵管，在相差显微镜下检查异体受精情况。将异体受精卵中2～8细胞的早期胚胎移入同期发情的受体羊输卵管，于妊娠21和43 d，分别从颈静脉采血，用ELISA测定血浆孕酮水平，于妊娠70 d用超声多谱勒检查是否妊娠。

2 结果与讨论

2.1 异体受精率

从6只供体母羊输卵管共采到45枚卵母细胞，平均采卵7.5枚，将其中胞质饱满，形态正常，且已成熟到M Ⅱ的卵母细胞35枚，与获能精子一起移入母兔输卵管培养24～60 h，回收到20枚卵子，回收率57.1%，其中13枚已经受精或发生了卵裂，异体受精率为65.0%。

2.2 受精卵移植产羔结果

在13枚异体受精卵中，有9枚发育到2～8细胞阶段，将其分别移给4只同期发情的受

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

体（3，2，3和1枚／羊）。经血浆孕酮和超声波诊断确诊2例妊娠，受体妊娠率为50.0%（2／4），其中1只曾移植3枚2细胞胚胎的母羊已于1990年5月1日产下2只活羔和1只约在产前1周死亡的羔羊。1♂2♀，体重分别为3.65，2.30和2.10kg，体长分别为46，40和45 cm；体高分别为35，30和33 cm（附图）。另一只受体已妊娠140 d以上。

附图 精子体外获能异体受精山羊羔

大羊为异体受精卵移植受体

在系统研究了山羊异体受精的影响因素之后，按总结的有效程序进行了山羊超排卵与体外获能精子异体受精试验，获得了65.0%的异体受精率，该结果明显高于Rao的结果(37.0%)[2]和本试验室以前报道的结果（44.8%）[3]。将受精卵移植给受体羊，获得50%的受体妊娠率，并产出了世界上第二例异体受精山羊后代。这些结果表明，体外获能的山羊精子与超排的卵母细胞在假孕兔输卵管内能够完成异体受精过程，将异体受精卵移给受体羊亦可产出活羔。

参 考 文 献

1 Rao V H, Sarmah B C, Bhattacharyya N K · Xenogenous fetilization of goat ova in the rabbit oviduct.J Rperod. Fert, 1984, 71 : 377 - 379

2 Duan E K, Wang G Y, Ma B H et al., Xenogenous fertilization of goat ovulated oocytes in the rabbit ovduct.Theriogenology, 1990, 33 (1) : 219

3 Brackett B G, Oliphant G.Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro Bol · Reprod.1975, 12 : 260～274

?1994-2014 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net