

奶山羊非手术采胚和移胚技术的研究*

张翊华 王强华 窦忠英 王建辰

(西北农业大学动物医学系, 陕西杨陵 712100)

摘 要 将蘸有2%盐酸丁卡因溶液的纱布块填塞在奶山羊子宫颈外口处松弛子宫颈, 用自制的采胚管和移胚管进行非手术采胚和移胚。8只超排羊中有6只采出胚胎, 采胚成功率为75%(6/8), 采胚率为35.8(24/67), 头均采胚 4.00 ± 3.41 枚(1~10)。非手术移植2只受体羊, 有1只怀孕。

关键词 非手术采胚, 非手术移胚, 奶山羊

中图分类号 S814.6, S827.36

采用非手术方法采集和移植羊胚胎, 不仅对供体羊和受体羊均无损伤, 而且能提高良种羊的重复使用次数, 对于促进羊胚胎移植技术走向畜牧生产实际应用有着特别重要的意义和实用价值。目前, 国内外虽已有关于山羊或绵羊非手术采胚和移胚获得成功的报道^[1~9], 但尚处于探索阶段, 没有扩张子宫颈管的可靠方法, 采胚管和移胚管均未定型。本研究采用盐酸丁卡因松弛奶山羊子宫颈, 用自制的采胚管和移胚管非手术采集和移植奶山羊胚胎, 目的在于提高奶山羊非手术采胚的成功率、采胚率及移胚受胎率。

1 材料和方法

1.1 试验动物

选用关中奶山羊母羊10只, 公羊1只, 1~5岁, 从陕西杨陵附近集市买回, 饲养、观察1~2个情期后开始试验。

1.2 药 物

FSH(武汉, 批号930324); 15-甲基 PGF_{2α}(上海, 批号921201); LH(武汉, 批号920124); 盐酸丁卡因(北京, 批号920301); “846”麻醉合剂(长春, 批号921128); 冲胚液(含1%犊牛血清的PBS液, 国产试剂自配); 培养液(含20%犊牛血清的PBS液)。

1.3 器械与消毒

采胚管(由金属外管、树脂内管和玻璃三通管组成, 见图1。外管长25 cm, 外径4 mm, 前端有3对反向侧孔, 外套1个可以滑动的子宫颈塞; 内管长65 cm, 外径2.4 mm, 前端钝圆, 有2个侧孔); 移胚管(长70 cm, 外径1 mm的树脂管); Olympus体视显微镜; 人用子宫颈钳; 人用开腔器; 普通手术器械; 羊保定架和D-2型超声多普勒诊断仪等。树脂管用前开封, 用含抗菌素的冲胚液反复冲洗, 其他器械按常规进行消毒或灭菌处理。

1.4 超排及同期发情处理

对8只供体羊在发情后3~5 d或9~15 d以递减方式肌注FSH, 每天2次, 间隔

收稿日期: 1995-01-10

*国家自然科学基金资助项目。

12 h, 连续 4 d, 总量 300 IU; 在开始注射 FSH 后第 3 d 肌注 15-甲基 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 2 次, 间隔 12 h, 每次 1.2 mg; 发情后交配 2~3 次, 间隔 8~12 h; 第 1 次交配后静注 LH 70 IU. 对 2 只受体羊比供体羊晚 0.5 d 肌注 15-甲基 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 2 次, 间隔 12 h, 每次 1.2 mg.

1.5 非手术采胚

对 8 只供体羊在发情后第 7 d (发情当天为 0 天) 用“846”麻醉合剂 (1 mL/10 kg 体重) 进行全身麻醉, 前低后高仰卧保定, 并进行局部清洗、消毒和隔离. 将浸有 2% 盐酸丁卡因溶液的纱布块放置在子宫颈外口处作用 10~20 min, 松弛子宫颈. 取出纱布块后,

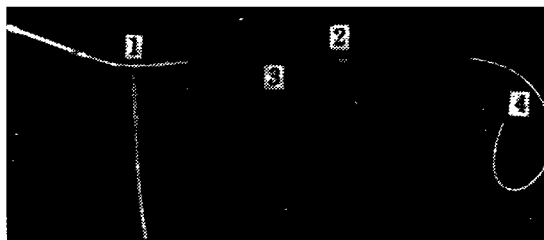


图 1 采胚管

1. 三通管; 2. 子宫颈塞; 3. 金属外管; 4. 树脂内管

将子宫颈钳由开腔器旁侧伸进阴道, 夹住子宫颈外口的突起皱褶或周围组织, 将其牵引至前庭. 然后将带芯外管插入子宫颈外口, 取出开腔器, 左手食指伸进阴道扶住子宫颈, 小指和无名指固定子宫颈钳, 右手继续插管, 遇到皱褶阻挡时可转动方向, 通过子宫颈后阻力消失, 再将管子偏向一侧插进 3~4 cm, 抽出管芯, 插入内管, 当手感阻力大, 放手后管子向外退, 说明管子前端已到达子宫角尖端. 将三通管与采胚管后端接通, 用子宫颈塞堵住子宫颈外口, 并用食指顶住, 将 50 mL 冲胚液由外管注入、内管回收, 或由内管注入、外管回收, 然后注入空气将子宫内余液排出, 回收液立即送实验室进行检胚. 冲对侧角前用直肠指检法确定采胚管在那一侧, 然后拆去三通管, 抽出内管, 将管芯插入外管, 将外管退到子宫体, 再以同样方法插进对侧角进行冲胚. 两侧子宫角均冲洗完毕后, 以常规手术方法打开腹腔, 观察黄体数目, 测量采胚管前端距宫管结合部的距离, 然后缝合腹壁切口.

1.6 非手术移胚

对 2 只受体羊以同样方法插好采胚管 (尖端钻有小孔), 然后按培养液—气泡—胚胎和培养液—气泡—培养液的顺序将胚胎吸到移胚管前端, 将移胚管通过采胚管的内管插到子宫角尖端, 固定住移胚管, 同时将采胚管的内管抽出 2~3 cm, 推动注射器将胚胎注入子宫角内, 然后缓缓抽出移胚管, 在培养液中反复吹洗并镜检, 确定胚胎被移入子宫角后, 再用同样方法给另一侧子宫角移植.

2 结 果

2.1 盐酸丁卡因松弛子宫颈效果

用 2% 的盐酸丁卡因溶液处理后, 10 只试验羊的子宫颈均呈松弛状态, 并能通过外径 4 mm 的采胚管.

2.2 非手术采胚结果

8 只供体羊中有 6 只采出胚胎, 成功率为 75% (6/8), 采胚率为 35.8% (24/67), 头均采胚 4.00 ± 3.41 枚 (1~10), 冲胚液回收率平均为 92%. 未采出胚胎的 2 只羊中有 1 只冲胚顺利, 未检测到胚胎, 另 1 只在一侧子宫角尖端发生穿孔.

2.3 非手术移胚结果

将从29号羊非手术采得的8枚胚胎(4枚囊胚和4枚桑椹胚)非手术移植给同期发情后7d的2只受体羊(22号和25号羊),每侧子宫角各移植2枚(1枚囊胚和1枚桑椹胚)。22号羊在移植后60d时用D-2型超声多普勒诊断仪探查,确定怀孕,86d时有流产征兆,剖检见两侧子宫角各有1只胎羔;25号羊移植后返情,未孕。

2.4 子宫插管深度与体重和体尺的关系

对供体羊,采胚管均能插到距宫管结合部3cm以内的子宫角尖端(附表),受体羊未测量。子宫插管深度与体重之间有正相关的趋势,但差异不显著($r=0.466, P>0.05, n=10$);与体高和体长平均值呈极显著正相关($r=0.789, P<0.01, n=10$)。对子宫插管深度($\hat{y}$)与体高和体长平均值(x)进行直线回归分析,得出关系式: $\hat{y}(\text{cm})=0.48x-0.54$ 。

附表 试验羊子宫插管深度、体重和体尺值

羊号	体重(kg)	(体高+体长)/2(cm)	插管深度(cm)	管一端距*(cm)	羊号	体重(kg)	(体高+体长)/2(cm)	插管深度(cm)	管一端距*(cm)
17	33	67	33	1.5	33	34	71	39	1.0
28	35	76	40	2.0	27	43	74	37	3.0
5	30	63	36	1.0	26	30	73	37	2.0
30	35	73	41	1.0	25	38	73	39	—
29	40	78	41	1.0	22	31	65	33	—

注: * 示采胚管前端距宫管结合部的距离。

3 讨论与结论

3.1 盐酸丁卡因松弛子宫颈的效果

用盐酸丁卡因松弛子宫颈在国内外均属首创,既能取得良好的松弛效果,又避免了用 PGE_2 ^[9]、松弛素^[10]、雌激素和催产素^[11]等激素类药松弛子宫颈引起的副作用;而且盐酸丁卡因具有不影响任何整体性生理功能,对胚胎无毒害作用,供、受体羊均可使用,见效快(5~10 min),药效期短(20~40 min),价格便宜,保存和使用均很方便等优点。因此,作者认为,盐酸丁卡因是目前比较理想的一种山羊子宫颈松弛药。

3.2 非手术采胚和移胚器械

研制羊非手术采胚器械,作者认为有4大难点:①能否通过子宫颈;②能否到达子宫角尖端;③注入的冲胚液能否全部被回收;④如何缩小冲胚区域,减少胚胎丢失。前人大多采用套管针^[1]、塑料输精管^[3]、球头针^[4]等作为采胚器械。本研究设计的采胚管不但冲胚液回流通畅,而且金属外管前端钝圆,表面光滑,便于通过子宫颈;树脂内管带有钢丝管芯,柔韧而有一定硬度,可以插到距宫管结合部3cm以内的子宫角尖端,比前人有很大进步。但由于工艺所限,还不能将冲胚液的回流区域局限在一侧子宫角前端数厘米范围内,这与手术采胚方法相比,胚胎丢失的机会较大,有待于研究改进。

本研究设计的移胚管细而柔软,在插好采胚管后,能通过采胚管的内管顺利到达子宫角尖端,移胚部位准确,比前人采用的静脉导管^[2,7]、长球头注射针头^[1]和子宫输精管^[8](仅能将胚胎移植在子宫体或子宫角基部)有很大进步。

3.3 非手术采胚和移胚结果

本试验由于解决了子宫插管问题,获得了较好的结果。采胚成功率(75%)明显高于

Bondurant 等(20%)^[3]、Barry 等(16%)^[5]和 Nagashima 等(50%)^[6]的试验结果;头均采胚数(4.00±3.41 枚)和采胚率(35.8%)均达到同类研究的先进水平^[6,7]。而且本试验所用动物品质较差,个体较小,若选用品质较好的羊进行试验,效果可能会更好一些。

26 号羊采胚时发生子宫穿孔,主要原因是该羊体质瘦弱,子宫壁很薄,以至于打开腹腔后能清楚地透视到子宫内采胚管上的刻度线。22 号羊移植后 86 d 发生流产,可能与早期子宫感染有关,因此非手术移胚时一定要严格消毒。

本试验结果表明,提高羊非手术采胚的成功率、采胚率及移胚受胎率,在松弛子宫颈问题完全解决的前提下,关键在于采胚和移胚器械的先进程度。若能以精细的工艺在采胚管近前端加上充气泡,而且不影响插管,将冲胚液的回流区域局限在子宫角前端数厘米范围内,就有可能赶上手术方法采胚的效果。

参 考 文 献

- 1 李 杰,周联瑞,乌期满江. 绵羊胚胎非手术移植方法探讨. 新疆农业科学,1981(4):40~42
- 2 Lin An-cheng. Studies on the embryo transfer in goats and pigs. Bulletin of the Nippan Veterinary and Zootechnical College,1981,30:215~216
- 3 Bondurant K H,Skirrow S,Anderson G B. Nonsurgical collection of blastocysts from dairy goats. Theriogenology,1984,22(4):423~432
- 4 Coonrad S A,Coren B R,Mcbride B L. Successful nonsurgical collection of ovine embryos. Theriogenology,1986,25(1):149
- 5 Barry L,Hays D V M. Non-surgical embryo recovery. Dairy Goat Journal,1987,65(1):35
- 6 Nagashima H. Non-surgical collection of embryos in shiba goats. Experimental Animals,1987,36(1):51~56
- 7 Flores-Foxworth G,Mcbride B M,Kraemer D C. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. Theriogenology,1992,37(1):213
- 8 Buckrell B C,Gartley C J,Buschbeck C. Evaluation of a transcervical AI technique for transferring embryos in sheep. Theriogenology,1993,39(1):197
- 9 Barry D M, Van Niekerk C H, Rust J. Cervical embryo collection in sheep after "ripening of the cervix with prostaglandin E₂ and estradiol. Theriogenology,1990,33(1):190
- 10 Akinbami M A,Meredith S,Warren J E. Cervical dilation conception rate,and concentrations of progesterone and estradiol-17β in postpartum ewes treated with porcine relaxin. Theriogenology,1990,34(5):927~940
- 11 Khalifa R M E. 用外源催产素扩张母绵羊子宫颈. 国外畜牧学文摘,1992(3):30

Non-surgical Embryo Collection and Transfer in Dairy Goats

Zhang Yihua Wang Qianghua Dou Zhongying Wang Jianchen

(Department of Veterinary Science, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Services of dairy goats were relaxed by inserting a piece of gauze dipped with Dicaine Hydrochloride solution onto the outer mouths of the cervixes. Embryos of the dairy goats were collected and transferred non-surgically with hand-made embryo collection catheters and embryo transfer catheters. Twenty-four embryos were received from 6 of the 8 superovulated goats with a success rate of 75% (6/8). The collection rate was 35.8% (24/67) and the average per head was 4.00±3.14. One of the 2 goats that had accepted the non-surgical embryo transfer became pregnant.

Key words non-surgical embryo collection, non-surgical embryo transfer, dairy goat