

奶山羊胚胎移植试验报告

王建辰 渊锡藩 窦忠英 刘智喜 张一玲
程忠贤 钱菊汾 张 岳 段恩奎 贾爱春

(西北农学院畜牧兽医系)

胚胎移植自从本世纪30年代进入畜牧科学领域以来,首先在绵羊上获得成功,到40年代末和50年代初又相继在山羊(Warwick和Berry, 1949)、猪、牛、马上取得成功,60年代以后,随着畜牧业科学技术发展,这一技术受到畜牧兽医工作者的重视,研究工作取得了较快的进展。目前,英、美、加、澳、丹麦等国已经出现了经营胚胎移植的企业单位,有的国家已开始向国外出售胚胎。

我国胚胎移植的研究,从1973年开始,1974年在绵羊上获得成功,1978年在奶牛上相继成功。1978年10月召开了全国牛胚胎移植第一次会议,随后这项技术迅速在国内发展起来。但到目前为止,国内尚未见到关于奶山羊胚胎移植成功的正式报导。在国外,目前的研究主要集中在牛上,山羊方面的报导也很少。我国的奶山羊在畜牧业中占有一定比重,尤其是我院饲养的萨能奶山羊,经过30多年的纯种选育,不仅在体尺外貌、繁殖性能和泌乳性能方面均显有特色,而且遗传性能强,杂交改良效果显著,深受群众欢迎。为了尽快扩大畜群,迅速繁殖推广这一良种,我们根据“西农萨能奶山羊的纯种选育和杂交改良”课题计划,从1979年11月—1980年3月进行了奶山羊胚胎移植试验,已初步获得成功,于80年4月24日和5月24日分别产出母羔一头,发育良好,兹将试验情况小结如下。

一、材料和方 法

1. 试验羊:选购32头2—6岁萨能改良奶山羊,共分5批。其中用作供体者22头次,用作受体者33头次。

2. 试验药物

1)超排药物

①促卵泡素(FSH) } 均由武汉生物药品制造厂生产,
②促黄体素(LH) } 批号790302

③13去氢- ω -乙基-PGF₂ (以下简称PG):上海第九制药厂合成,批号780601。

• 本文由窦忠英、王建辰执笔。

2)冲卵液 杜氏磷酸盐缓冲液(PBS),为Whitten氏1971年改良配方。

3. 超排处理

①供体羊的选择:选择发情后5天以外的羊只。

②处理方法:每天肌注FSH两次,每次50iu,连续注射3天。第二天加注PG两次,每次2毫克。发情后及时配种,每天早晚各配一次,共配3—5次。发情后立即或8—12小时内静注或肌注LH75—150iu。未出现发情症状者,亦于开始用药后第五天肌注或静注LH(表1)。

表1 超排处理方法

时	间	处	理	用	量	用	法
第一天	上午	F S H		50iu		肌	注
	下午	F S H		50iu		肌	注
第二天	上午	F S H		50iu		肌	注
		P G		2毫克		肌	注
	下午	F S H		50iu		肌	注
		P G		2毫克		肌	注
第三天	上午	F S H		50iu		肌	注
	下午	F S H		50iu		肌	注
第四天	上午	试	情				
	下午	试	情				
第五天	上午	试	情	第1、2批为75iu		静注或肌注	
	下午	L H	试	第3、4、5批为150iu			

4. 同期发情处理

在供体羊处理的当天,同时给受体羊上、下午各肌注PG2毫克。但第一批受体羊提前半天注射PG;第五批在肌注PG后的第二天上午又肌注FSH50iu。

5. 采卵

开始发情后2—4天,采用手术方法进行输卵管和子宫角采卵。供体羊作侧仰卧保定,在一侧乳头的上方与乳房基部相垂直的部位作6—8厘米的切口。

输卵管采卵:先由输卵管的喇叭口插入一细橡皮管或塑料导管,用粗丝线结扎固定,然后用注射器吸入冲卵液5—10毫升,由子宫角尖端向官管接合处刺入针头,缓慢推入冲卵液,用平皿或小烧杯收集之。推入冲卵液时,术者手指应将子宫角端捏紧,以免冲卵液倒流入子宫角内。

子宫角采卵:输卵管冲洗完毕,再进行同侧子宫角冲洗。术者通过原子宫角尖端针孔,向子宫角内推入冲卵液15—25毫升,并将官管接合处捏紧,以防冲卵液倒流入输卵

管内。同时,助手在子宫角基部插一针头,收集冲卵液,或者用注射器缓慢吸出。助手同样须将子宫角基部捏紧,防止冲卵液流入子宫体。针头不应插得过深或过浅,以免刺入子宫壁内,而影响冲卵液的排出。亦可从子宫角基部注入冲卵液,由子宫角尖端进行收集。

6. 检卵:收集到的冲卵液,立即在10倍解剖镜下进行检卵。确认是卵时,将其吸出,移放在64—128倍显微镜下,鉴定是否受精,以及分裂球的颜色、大小、多少和有无异常,并选定移植用卵。检卵室的温度应维持在20—25℃之间。

7. 输卵:选择与供体同期发情在24小时以内的受体(作同期发情处理或自然发情者),将要移植的卵吸入尖端弯形吸管或者小注射器内,由供体羊输卵管采得的卵,从输卵管喇叭口或子宫角尖端输入输卵管内,由子宫角采得的卵从子宫角尖端或基部用小注射器输入子宫角内,最后将移卵吸管或注射器再用冲卵液冲洗,镜检其冲洗液,以确定是否将卵输入。

输卵后,将子宫放回原位,闭合腹壁。手术过程的消毒、麻醉、切开,缝合等要求均与一般外科手术相同。

二、结 果

1. 超排效果 经处理的22头次供体羊中,有20头次出现发情症状,占90.9%。并且对16头羊作了黄体数和卵泡计数,平均每头黄体数14.9个(4—36个)。一个卵巢上最多达26个。卵泡平均数每头9.3个(1—18个)。第一、二批排卵率均为64.8%,而第3、4、5批排卵率则分别为57.3%、60.3%和50%。总平均排卵率为60.1%。由开始用药到开始出现发情症状时间平均为3天(2.5—3.5天)。

表 2 超排处理效果统计

批号	时 间 (年、月、日)	头 数	出 现 症 状 发 情 头 数	开 始 发 情 时 间 (平均天数)	L H 用 量 (i u)	每 黄 体 平 均 数	每 卵 泡 平 均 数	排 卵 率 (%)
1	79.11.21	6	4	3.13	75	11.7	6.3	64.8
2	79.12.4	4	4	2.75	75	15.3	8.3	64.8
3	79.12.21	5	5	3	50	14.7	10.3	57.3
4	80.1.9	3	3	2.5	150	23.5	15.5	60.3
5	80.3.10	4	4	3.5	150	11.5	11.5	50.0
共 计		22	20	3		14.9	9.3	60.1

[注] FSH用量各批一律为300iu, PG一律为4毫克。

2. 采卵效果 19头供体羊以手术采卵,其中13头采到卵,采卵成功率为68.4%。共采卵98个,其中正常分裂卵40个,占40.9%;单细胞卵50个,占51%;退化卵8个,占8.1%。平均每头羊采卵5.2个。

表3 采卵效果统计

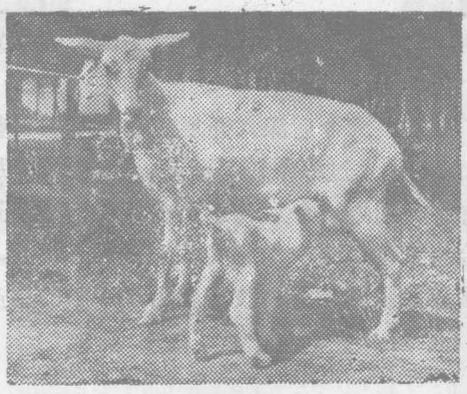
批 号	头 数	采 卵 数											
		子 宫 角						输 卵 管					
		左			右			左			右		
		正 常	单 细 胞	退 化	正 常	单 细 胞	退 化	正 常	单 细 胞	退 化	正 常	单 细 胞	退 化
1	6	3		1	2	1		1	1		5	2	3
2	3		5			8			7			6	
3	3		1			1		6	3	2	7	1	2
4	3		5			5		4	2		8	2	
5	4							4					
共 计	19	3	11	1	2	15		15	13	2	20	11	5
		15			17			30			36		
		32(32.6%)						66(67.4%)					

从子宫角内采卵32个(正常分裂卵15.6%,单细胞卵81.3%,退化卵3.1%),占总采卵数的32.6%;从输卵管内采卵66个(正常分裂卵53%,单细胞卵36.4%,退化卵.6%),占采卵数的67.4%(表3)。19头供体羊的黄体数共23100个,采卵98个,采卵成功率为42.6%。

3. 同期发情 单纯应用PG对33头次受体羊进行处理,27头(81.8%)于注射PG后平均2.2天(2—3.5天)出现发情症状。第5批于注射PG后24小时再肌注FSH 50iu,在注射PG后平均4.2天出现发情症状(表4)。

表4 同期发情效果统计表

批 号	处 理 方 法	处理头数	发情数	用药后开始出现发情时间 (平均天数)
1	PG	15	13	2.46
2	PG	6	4	2
3	PG	5	4	2.13
4	PG	7	6	1.75
小 计		33	27	2.2
5	用PG后24小时肌注FSH50iu	7	6	4.2
共 计		40	33	2.5



18号受体羊及其1980年4月24日所生的母羔

4. 移植效果：对20头受体羊进行手术移卵后，经42天未返情者7头。按此计算，受胎率应为35%。但第5批移卵时已是非繁殖季节（3月），虽然在3头中有2头未返情并不能认为是受胎根据。故实际上应按17头中5头未返情计算受胎率，即为29.4%。但结果只有两头羊分娩：18号及16号受体羊分别于4月24日及5月24日各产母羔一头（见照片）。其余3头估计发生隐性流产。

三、讨论与小结

1. 超排处理问题

根据对16头超排羊卵巢的观察，每头平均有14.9个红体和9.3个卵泡，有一个卵巢最多有26个红体。由此看来，超排处理的作用效果较好，但所采卵的质量较差。正常分裂发育的受精卵仅占40.9%，大部分是退化卵或单细胞卵。这可能有二个原因：

① 试验进行的时间过晚；错过了羊配种时机，随着时间的后移，卵的质量和受精能力降低。例如第一批羊的正常受精卵为50%，而以后各批正常受精卵的百分率都降低。

② 超排处理所用FSH的量过大，超排过多，未成熟的卵较多，致使不受精的比例加大。因此，以后可将FSH的用量适当减少，再作观察。

超排处理的排卵率平均为60.1%，尚有相当一部卵并未排出，这可能因试验进行时间较晚，排卵容易发生延迟；从各批排卵率也可看出这个问题。第一、二批排卵率都为64.8%，而以后各批均降低，第5批仅为50%。另外，LH的用量在第一、二批为75iu，而第三、四、五批为150iu，以后各批排卵率的降低也可能与LH用量过大有关。

2. 手术采卵问题

手术时，腹壁的切口应正对乳头，并与乳房基部外侧相垂直，这样容易将两侧子宫角和卵巢拉出腹腔。如果切口与乳房平行，则拉出对侧子宫角和卵巢比较困难。

冲卵时，冲卵液用量不可过大，推入冲卵液要用力均匀，避免压力猛增，而使输卵管壁或子宫壁受到损伤，甚至破裂（见到一例子宫破裂）。

从输卵管采卵时，由于冲洗液用量少，采卵率比子宫采卵率为高。操作应轻缓，避免造成输卵管伞或输卵管损伤。

用同一供体羊进行第2—3次手术时，发现大部分生殖器官发生粘连。分析原因，可能由于：① 超排过多；② 在红体、卵泡计数过程中，常常造成红体破裂出血；③ 操作不够迅速轻微；④ 给腹腔未注入生理盐水或樟脑油。

3. 对用PG进行同期发情处理的评价

从表5观察，不论是繁殖季节内进行试验（前4批），或非繁殖季节内进行试验

(第5批), 均有80%以上的处理羊表现同期发情。这证明PG对诱发奶山羊同期发情的效果相当可靠。

4. 本试验在奶山羊的胚胎移植上取得了成功, 为今后深入开展工作积累了一些经验。但是, 由于山羊比绵羊性娇, 比较敏感, 在手术过程中较易骚动, 不象绵羊那么容易操作。同时因系初步进行试验, 还存在有不少问题, 今后, 还须在繁殖季节内进一步进行研究, 以确定超排及同期发情用药的恰当剂量, 减少术后供体生殖器官粘连, 提高移植成功率, 并探索非手术采卵、移卵方法, 为将胚胎移植技术应用于山羊的生产实际开阔道路。

* * * *

(上接92页)

参 考 文 献

1. Jenkiks 等: Journal of bone and Joint surgery, 1977, 59(B)(1), 53~57。
2. Goodship 等: vet, Rec, 1978, 120(4)322。
3. Vaughan 等: Vet, Rec, 1978, 102(13)287~288。
4. Littlewood: Vet, Rec, 1979, 105(8)223~224。
5. Goodship 等: Vet, Rec, 1980, 106(8)217~221。
6. 赵渠森编译: 高模量、高强度碳纤维, 燃料化学工业出版社出版, 1973。