

奶牛胚胎一分为四分割移植试验

窦忠英 王新庄 樊敬庄 徐照学 高志敏 国永周

(西北农业大学奶牛胚胎移植试验站, 陕西杨陵·712100)

薛帅岐[✓]

(陕西武功镇畜牧兽医站, 陕西武功·712200)

S823.36

摘要 1990年7月至1991年3月, 以非手术方法采得黑白花奶牛7日龄胚胎。在立体显微镜下, 应用徒手简易胚胎分割法, 一分为四分割6枚胚胎。将所分割的24枚1/4裸胚, 以非手术方法, 分别移植给18头受体牛。其中9头妊娠, 受体移植妊娠率为50%(9/18)、胚胎移植妊娠率为150%(9/6)。得到同胚三犊一组, 同胚二胎一组(其中一头产犊, 一头流产)和单胎四个(其中两头产犊, 两头流产)。

关键词 乳牛, 胚胎移植, 受孕率/胚胎分割 奶牛

中图分类号 S814.6、S823.910.36

1980年, Willadsen 等将绵羊胚胎一分为四分割, 成功地得到了同胚四胎; 1981年, 他们以分割绵羊胚胎的方法, 一分为四5日龄牛胚胎, 得到同胚双胎, 但未获得同胚三胎或四胎⁽¹⁾; 同年, 在另一次实验中, 他们将3日龄8细胞牛胚胎一分为四, 得到同胚三犊一组⁽²⁾。Massip 等于1988年一分为四6枚6.5日龄牛桑椹胚, 将19枚1/4胚移植给8头受体牛, 得到三头犊牛, 其中只有一组同胚双胎⁽³⁾。

本试验从1990年7月至1991年3月进行, 目的在于研究出便于生产应用的简易胚胎一分为四分割法, 并获得同胚多犊。

1 材料与方法

试验母畜及处理 供体牛为西北农业大学奶牛胚胎移植试验站供体奶牛场提供的3~6岁的黑白花奶牛。用FSH+15甲基-PGF_{2a}作超排处理, 发情后进行2~3次人工授精。受体牛的一部分是农户黄牛, 1.5~3岁(1.5岁左右的称为青年牛, 3岁以上产过犊的称为成年牛); 另一部分为农户和本校奶牛胚胎移植试验站黑白花奶牛, 1.5~6岁。用15甲基-PGF_{2a}作同期发情处理, 比供体牛提前半天注射。

采胚 供体牛超排处理发情后第7d(发情时为零d), 用含1%犊牛血清的PBS液作为冲胚液, 采用非手术方法子宫采胚^(4,5)。将检出的胚胎移入含20%犊牛血清的PBS培养液内备用。

胚胎分割 胚胎分割工具用玻管拉针仪(Leitz)拉的微细玻璃针和用止血钳夹住的切

文稿收到日期: 1991-07-25

* 国家“863”高技术研究发展计划项目

割刀片(德国),在立体显微镜下,徒手操作。将选择质量好的 7 日龄胚胎,移入盛有含 20% 犏牛血清的 PBS 液塑料培养皿盖内,在立体显微镜下,先徒手用胚胎切割刀切开透明带一部分,再用直径略小于胚胎的微细玻璃管(直径约 80 μm)吸吹几次,胚胎即可由透明带破口脱出。然后,手持玻璃针由上向下分割裸胚,先一分为二,再将其半胚一分为二,尽量使胚胎一分为四均等。如果是囊胚,特别应注意将内细胞团四均等分。最后,将各 1/4 裸胚分别装入 0.25 mL 的塑料细管内,准备移入受体牛子宫。

胚胎移植 将吸有 1/4 裸胚的塑料细管,装入金属胚胎移植管内(德国或国产仿制品),用非手术方法,移入经同期发情处理、黄体明显的受体牛子宫角尖端。将 1 枚 1/4 胚的,移入有黄体一侧的子宫角;移入 2 枚的,两侧子宫角各移 1 枚。

妊娠检查 移植后 2.5 个月,直肠检查作妊娠诊断。

2 结 果

2.1 1/4 胚移植妊娠率

结果如表 1。4 批共一分为四分割胚胎 6 枚(桑椹胚 3 枚,囊胚 3 枚),将所分割的 24 枚 1/4 裸胚,分别移植给 18 头受体牛(黄牛 8 头,黑白花奶牛 10 头),其中 9 头妊娠,受体移植妊娠率为 50%(9/18),胚胎移植妊娠率为 150%(9/6)。得到同胚三犊一组,同胚双胎一组和单胎四个。同胚三犊妊娠足月,三个受体牛分别于 1991 年 4 月 24 日,4 月 30 日和 5 月 2 日,各产一公犊。4 月 24 日所生公犊发育良好,一切正常;4 月

表 1 奶牛胚胎一分为四分割移植一览表

序号	移植日期	受体牛 品种	受体牛 年龄(岁)	供受体 同期发 情日差	胚胎发 育时期	移植数 (1/4 胚)	胎儿数	分娩日期	仔畜性别
1	90.7.26	黄牛	1.5	-1	桑椹胚	1	1	91.4.24	♂(健壮)
2	90.7.26	奶牛	1.5	-1	桑椹胚	2	1	91.4.30	♀(分娩时死)
3	90.7.26	黄牛	1.5	-1	桑椹胚	1	1	91.5.2	♀(下颌畸形死胎)
4	90.9.18	奶牛	1.5	+1	桑椹胚	2	1	90.12 流产	
5	90.9.18	黄牛	1.5	+1	桑椹胚	2	0		
6	90.9.18	奶牛	1.5	+1	囊胚	2	1	90.12 流产	
7	90.9.18	黄牛	3	-1	囊胚	2	0		
8	90.10.29	奶牛	3.5	0	桑椹胚	1	1	91.7.28	♂(健壮)
9	90.10.29	奶牛	6	0	桑椹胚	2	0		
10	90.10.29	奶牛	6	0	桑椹胚	1	0		
11	91.3.23	奶牛	1.5	-1	早囊胚	1	0		
12	91.3.23	奶牛	1.5	-2	早囊胚	1	0		
13	91.3.23	黄牛	1.5	-1	早囊胚	1	0		
14	91.3.23	黄牛	1.5	-1	早囊胚	1	1	91.12.20	♂(健壮)
15	91.3.23	黄牛	3	-2	早囊胚	1	0		
16	91.3.23	黄牛	1.5	-1	早囊胚	1	0		
17	91.3.23	奶牛	1.5	-1	早囊胚	1	1	91.12.20	♂(健壮)
18	91.3.23	奶牛	1.5	-1	早囊胚	1	1	91.10 流产	
总计						6	9		

注: 1~3 号, 4~7 号, 8~10 号, 11~14 号和 15~18 号各为同一胚胎所分割。

30日所生的在分娩中死亡; 5月2日生的, 下颌畸形为死胎。其他妊娠受体牛, 三头各生一犊, 3头妊娠流产。

2.2 受体牛年龄对妊娠率的影响

由表2可见, 青年牛妊娠率显著高于成年牛。黄牛作受体, 受体妊娠率为37.5%(3/8), 而黑白花奶牛为60%(6/10)(表1)。

表2 受体牛年龄对妊娠率的影响

受体牛	头数	妊娠数(%)	移植胚胎数	胎儿数(%)
青年牛	13	8(61.5)	4.25	8(188.2)
成年牛	5	1(20)	1.75	1(57.1)
总计	18	9(50)	6	9(150)

2.3 胚胎不同发育时期对妊娠率的影响

桑椹胚一分为四分割移植, 受体妊娠率为62.5%(5/8), 胚胎移植妊娠率为166.7%(5/3)。而囊胚, 受体妊娠率为40%(4/10), 胚胎移植妊娠率为133.3%(4/3)。同胚三犊为桑椹胚四分割所得(表3)。

表3 不同发育时期胚胎对妊娠率的影响

每头受体移植1/4胚数	胚胎种类	受体数	妊娠数(%)	移植胚胎数	胎儿数(%)
1	桑椹胚	4	3(75)	1	3(300)
1	囊胚	8	3(37.5)	2	3(150)
2	桑椹胚	4	2(50)	2	2(100)
2	囊胚	2	1(50)	1	1(100)
总计		18	9(50)	6	9(150)

2.4 移植1枚和2枚1/4胚对妊娠率的影响

移植1枚和2枚1/4胚, 受体妊娠率都为50%(6/12, 3/6), 而胚胎移植妊娠率分别为200%(6/3)和100%(3/3)。1枚高于2枚。其中移植1枚1/4桑椹胚者, 受体妊娠率为75%(3/4), 胚胎移植妊娠率高达300(3/1)(表3)。同胚三犊和同胚双胎都来源于移植1枚者。而移植2枚者, 无同胚多胎产生(表1)。

2.5 同期发情程度对妊娠率的影响

供体牛和受体牛在 ± 1 d内发情即可。而以受体牛比供体牛晚发情1d(-1d)的妊娠率高(66.7%)。如晚2d者, 无妊娠(表4)。

表4 同期发情程度对妊娠率的影响

发情日差	受体数	妊娠数	妊娠百分率(%)
-1	9	6	66.7
-2	2	0	0
0	3	1	33.3
+1	4	2	50

3 讨论

1981年Willadsen等在英国剑桥大学首次成功地将奶牛胚胎一分为四, 并且得到同胚双胎和同胚三胎的犊牛^[1,2]。他们是用显微操作仪将5日龄和3日龄胚胎一分为四分割, 将各1/4胚重新装入猪卵的空透明带内, 再用琼脂包埋, 经在中间受体羊输卵管培养几天, 最后移入受体牛。本试验采用徒手简易胚胎分割法, 可代替价格昂贵, 笨重不易搬动运输的显微操作仪, 在立体显微镜下, 手持微细玻璃针或切割刀即可操作。不需要将分割胚重新装入空透明带, 不用琼脂包埋, 不用中间受体, 直接采用非手术方法移植, 操作简便, 快速, 可在生产现场进行, 便于生产应用。

为了克服没有被固定的胚胎滑动, 先手持切割刀上下快速切刺胚胎几次, 直到刺中

为止。由于几次切割,盛胚胎的塑料培养皿局部留有刀痕,变得凹凸不平,胚胎在其上不易滚滑,容易被刀切着。透明带切开后,用直径略小于胚胎的玻璃管来回吸吹几次,裸胚很容易从透明带破口脱出。将裸胚仍移放在有刀痕的平面上,用微细玻璃针容易分割。亦可用切割刀直接连同透明带一起切割整胚或裸胚。作者体会,用玻璃针分割裸胚更易控制,使胚胎等分。

对桑椹胚一分为四移植,受体妊娠率和胚胎移植妊娠率(62.5%, 166.7%)均高于囊胚(40%, 133.3%)。这可能是囊胚内细胞团较小,不易等分的缘故。尤其是先一分为二后,囊胚腔塌陷,内细胞团细胞和滋养层细胞不易分辨,再分割时,不易等分或未能分割,从而使移植妊娠率低于桑椹胚。

青年牛作受体,妊娠率比成年牛高。可能是因为青年牛生殖器官感染机会较少,受其他外界环境影响较少,同期发情集中,有利于妊娠。

参 考 文 献

- 1 Willadsen S M, Lehn-Jensen H, Fehilly C B *et al.* The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of nonsurgically collected cow embryos. *Theriogenology*, 1981; 15(1):23~27
- 2 Willadsen S M, Polge C Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. *Vet Rec* 1981; 108: 211~213
- 3 Massip A, Zwahlen P, Ectors F. Development of bovine quarter embryos transplanted in the fresh state or after vitification. *Annales de médecine vétérinaire*, 1988, 132(6):483~487
- 4 Brem G Mikromanipulation an Rinderembryonen und deren Anwendungsmöglichkeiten in der Tierzucht Stuttgart, 1986; Ferdinand Enke Verlag, B R D.
- 5 赛忠英,樊敬庄,张致民等 奶牛胚胎移植试验报告. 西北农业大学学报, 1987; 15(3):19~24

Experiment of Quarter Embryo Transfer in Dairy Cattle

Dou Zhongying Wang Xinzhuang Fan Jingzhuang
Xu Zhaoxue Gao Zhimin Guo Yongzhou

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

Xue Shuaiqi

(Animal Husbandry and Veterinary Station of Wugong Town, Wugong, Shaanxi 712200)

Abstract From July, 1990 to March, 1991, day-7 embryos were collected non-surgically from Holsteins. Under the common stereo microscope, each of the six embryos were cut into four equal pieces with a micro-needle held by hand. After that, the 24 quartered bare embryos were transferred non-surgically to 18 recipients. Nine of them became pregnant. The pregnancy rate of recipients was 50%(9/18), but the survival rate of embryos in vivo was 150%(9/6). One group of monozygotic triplets, one pair of identical twins (of which one produces calf, and one has an abortion), and four single foetuses (of which two produce calves, and two have the abortions) were produced.

Key word: dairy cattle, embryo transfer, conception rate, / embryo cutting