

胚胎工程技术及其在畜牧业中的应用^{*}

李 勇, 窦忠英, 杨炜峰

(西北农林科技大学 陕西省干细胞工程技术研究中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 胚胎工程技术研究的目的, 是对哺乳动物的胚胎在体外进行人为控制操作, 让其继续发育, 进而获得优良或珍稀动物个体, 并应用这类技术进行基础研究和应用开发性研究。文章主要叙述了胚胎移植、胚胎冷冻保存、胚胎分割、体外受精、性别鉴定及控制、转基因动物、细胞核移植、胚胎干细胞和胚胎嵌合等胚胎工程技术及其在畜牧业中的应用前景。

[关键词] 胚胎工程; 胚胎移植; 体外受精; 胚胎干细胞

[中图分类号] S852.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)02-0104-09

胚胎工程技术是胚胎移植技术发展一定程度而出现的名词, 是由发育工程演变而来的^[1]。胚胎工程技术根据其发展现状包括以下 9 类: (1) 胚胎移植技术; (2) 胚胎冷冻保存技术; (3) 胚胎分割技术; (4) 试管动物技术(体外受精技术); (5) 性别控制技术, 即 XY 精子分离和胚胎性别鉴定技术; (6) 转基因动物技术; (7) 动物克隆技术(细胞核移植技术); (8) 胚胎干细胞技术; (9) 胚胎嵌合技术。目前, 前 5 种技术已在生产实践中得到不同程度的应用, 但应用较多的是前 2 种技术, 其他几种技术由于设备投入成本较大, 成功率较低, 尚处于实验室向生产转化阶段。近 30 年来, 随着生物技术的发展, 胚胎工程技术也日新月异, 在促进畜牧业发展及其相关领域研究中取得了令人瞩目的成就。下面将分别介绍各种胚胎工程技术在畜牧业生产发展中的应用历程。

1 胚胎工程在畜牧业中的应用

1.1 胚胎移植技术

胚胎移植技术是继人工授精之后发展起来的繁殖高新技术, 目前已成为扩大优秀家畜遗传资源的主要手段, 有的称作 MOET 技术(超数排卵与胚胎移植技术)。作为家畜育种的重要手段之一, 自 20 世纪 50 年代初第一头胚胎移植牛在美国诞生以来, 胚胎移植技术飞速发展。据不完全统计^[1], 全世界目前年产胚胎移植牛超过 35 万头, 美国、法国等发达国家每年参加后裔测定的青年公牛的 80% 来自胚胎

移植所产的后代。20 世纪 80 年代后期, 我国在生产中开始应用牛、羊胚胎移植技术, 近几年该技术在全国得到迅速发展。本实验室 1990 年奶牛新鲜胚移植妊娠率达 62.2%, 批内达 76%。在 6 省区规模化生产中, 绵羊和山羊的移植妊娠率在 60% 左右, 批内达 76.8%。根据国际胚胎协会的统计^[2], 20 多年来, 进行胚胎移植的动物数量和种类每年都在增加, 胚胎移植已经成为畜牧业中最活跃的产业。

将 MOET 技术应用于羊的育种, 即将多种胚胎工程技术组装为配套技术体系, 利用当地羊为受体, 借腹怀胎, 可加快良种羊的繁殖。具体措施是利用阴道栓实现同期发情, 阴道栓和激素药物同时应用超数排卵, 采用人医二通式导尿管采胚, 然后进行移植, 获得后代。有些地区成功地运用“政府+ 科技人员+ 企业+ 农户”的新体制, 使布尔山羊胚胎移植产业化, 已取得了显著的社会和经济效益。在胚胎移植技术中, 较难控制的一个环节就是超排, 因为影响超排的因素很多。人们对影响超排反应的研究最初集中在影响卵巢反应的因素方面: (1) 促性腺激素的种类、批号和用量; (2) 给药方式和持续时间; (3) 超排起始日期; (4) 超排时是否使用其他激素等。近来的研究主要是: (1) 简化超排步骤(减少注射次数以减少应激); (2) 减少超排差异, 改善超排反应; (3) 提高可用胚率。目前, 认为造成超排差异的主要原因是动物个体差异和所处的环境不同, 包括营养状况、繁殖史、年龄、季节、超排处理时卵巢所处的状态以及重

* [收稿日期] 2003-05-29

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30070374)

[作者简介] 李 勇(1977-), 男, 陕西长安人, 在读硕士, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

[通讯作者] 窦忠英(1939-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士生导师, 主要从事哺乳动物胚胎工程研究。

复超排等^[3,4]。羊卵泡的发育研究是提高超排反应的基础,但目前还没有实用、有效的手段来人为控制卵泡募集的数量和所处的状态(生长或退化)。目前所有对超排的研究都是通过设立对照来选择最佳的超排方案,但存在的不可预见性与个体差异尚无法消除。

近些年来超排结果逐步稳定,说明超排处理这一环节已经被基本控制,但消除个体差异还没有十分有效的方法。由于生物个体的反应差异不能仅从调整激素这一方面消除,因此提供合理的营养日粮、最佳的饲养管理环境、良好的健康状况和最大程度减少应激,是成功繁殖体系的先决条件。

1.2 胚胎冷冻保存技术

20世纪70年代,W Hittingham 等^[5]连续报道小鼠胚胎在-196℃和-269℃冷冻保存获得成功,引起科学界的广泛重视。随后相继应用这种方法在牛^[6]、兔^[7]、绵羊^[8]、大鼠^[9]、山羊^[10]和马^[11]等多种动物上获得成功。胚胎冷冻技术经历了由繁到简的过程,主要围绕程序简化、缩短冷冻时间、选择低温保护剂及冷冻方法、解冻方法等方面进行研究,所选方法和程序的目的都是尽可能减少胚胎在冷冻时的物理损伤。

冷冻方法有慢速冷冻法、快速冷冻法、一步冷冻法、玻璃化冷冻法和超快速冷冻法等。目前,山羊胚胎的冷冻主要采用常规慢速冷冻法、快速冷冻法和玻璃化冷冻法。在用快速冷冻法冷冻时,Tsunoda等^[12]为了提高冷冻后胚胎的存活率,用1.0%~1.2%的琼脂糖包埋胚胎得到了较好的效果,半胚移植产羔率达47%,全胚移植产羔率达80%。在脱除保护剂时加入一定浓度的蔗糖(0.25 mol/L)可使胚胎发育率提高(囊胚达67%,桑椹胚达41%)。丁家桐等^[13]采用两步冷冻法在研究山羊胚胎冻存中得到的妊娠率和产羔率分别为61.5%和40.0%,在液氮中保存3~4.5年的山羊桑椹胚、囊胚,解冻后发育率为38.6%和47.6%。Rall等^[14]首次发明了玻璃化冷冻法,Mahmoudzadeh等^[15]采用EFS玻璃化冷冻液通过两步平衡法进行牛胚胎冷冻保存,其胚胎存活率为69%;Deval^[16]采用两步法冷冻牛胚胎,解冻培养后胚胎发育率为65.7%。在国内,本实验室窦忠英等^[17]将奶牛胚胎直接投入液氮冷冻保存182 d后解冻,可用胚率为87.5%,移植妊娠率为42.9%;另外,窦忠英等^[18]用自制简易胚胎冷冻器冷冻奶牛胚胎,解冻后可用胚率为84.2%,移植妊娠率为31.5%。桑润滋等^[19]采用自

制的EFS40对牛胚胎进行了玻璃化冻存研究,其解冻移植后受体的妊娠率为55.6%,产犊率为54.5%。

黄凤玲等^[20]采用玻璃化冷冻法研究冷冻条件对牛体外受精卵发育率的影响时发现,用乙二醇作防冻剂,投入温度为-40℃液氮中效果较好,而阳年生等^[21]的研究结果表明,乙二醇的浓度和投入液氮的温度对胚胎的分化率没有显著的影响。但李荣凤等^[22]认为,不同的培养液对胚胎的抗冻能力有影响,如M-199培养液的效果优于改良输卵管液(SOF)培养液,氨基酸能明显提高胚胎的抗冻能力。体外受精后第7和第8天获得的囊胚期胚胎经冷冻解冻后在体外条件下可以获得较高的成活率^[23]。室温条件下,采用二步法添加防冻剂并于20℃条件下解冻的玻璃化冷冻保存方法可以获得较高的体外受精胚胎存活率^[24]。在冷冻液中分别添加15%的胎牛血清(FCS)、15%的阉公牛血清(SS)和0.4%的牛血清白蛋白(BSA),冷冻解冻后胚胎的孵化率较高(81.5%,76%和73%)^[25]。

随着玻璃化溶液和玻璃化方法的改进,玻璃化法将是山羊胚胎冷冻保存最有前途的方法。近年来对玻璃化胚胎冷冻的研究,趋于向冷冻保护剂中添加各种物质,如糖类、抗冻蛋白(AFPs)、植物抗冻因子、透明质酸、盐等,以提高冷冻效果。

胚胎冷冻保存是胚胎移植技术进入商业化阶段的关键,它可以使胚胎移植不受时间、地域限制,简化引种过程,防止疾病传播,还为建立优良动物的胚胎库提供了条件。家畜胚胎库的建立,可实现简便廉价的远距离胚胎运输,促进国际间的良种交换。

1.3 胚胎分割技术

胚胎分割是哺乳动物胚胎工程的重要组成部分。胚胎分割就是将一枚胚胎用显微手术分割为二,甚至分割为四或八,以获得同胚双生或同胚多生后代。哺乳动物胚胎分割技术开始于Nicholas对大鼠2-细胞卵裂球的分离和培养^[26],Tarkowski等^[27]研究了小鼠1/4,2/4,3/4卵裂球的发展规律,得到了世界上首例半胚来源的活体动物。20世纪70年代以来,随着胚胎培养及移植技术的发展和提高,哺乳动物胚胎分割技术取得了突破性进展^[28]。通过胚胎分割,目前已在山羊和绵羊上获得同胚二分割胚后代,绵羊的同胚三羔、同胚四羔。在国内也获得了山羊、绵羊同胚双生后代。本实验室窦忠英等^[29]以黄牛作受体,奶牛胚胎二分割移植妊娠率为50%;樊敬庄等^[30]用简易徒手分割法获得同胚双犊,1990年

奶牛胚胎二分割移植妊娠率为 46%, 得到国内首例胚胎四分割同胚三犊, 四分胚移植妊娠率为 50%。目前胚胎分割的研究方向也正向着简单化和实用化发展。

胚胎分割技术经过近 20 年的发展, 在理论和技术方法上都已完善, 尤其是在牛羊的胚胎分割技术、增加胚胎移植中的有效胚胎数、提高妊娠率、增加克隆后代的数目等方面, 与细胞核移植技术相比, 有更高的成功率。目前在一般情况下, 牛、羊细胞核移植产生后代的成功率在 10% 以下, 而胚胎分割的半胚产仔率一般接近 50%。胚胎分割技术可以与其他胚胎生物技术相结合, 为胚胎转基因技术、性别鉴定技术提供活胚检查的方法, 为胚胎嵌合、胚胎干细胞技术提供卵裂球分离的方法和手段。胚胎分割还可以获得遗传上同质的后代, 为家畜育种研究提供有价值的材料。由此可见, 进一步提高胚胎分割技术的生产效率、完善技术和培养系统, 可以使这门技术继续发挥作用, 为畜牧业生产服务。

1.4 体外受精技术

体外受精技术(*in vitro fertilization*, IVF)是指通过人为操作使精子和卵子在体外环境中完成受精过程的技术。对哺乳类动物体外受精的研究已经有 110 多年的历史。20 世纪 60 年代以后, IVF 的研究迅速发展, 特别是对精子获能技术和细胞培养方法的许多重要改进, 使 IVF 由对实验动物的研究跨入了对家畜的研究领域。将 IVF 的卵子移植给受体动物, 已在山羊、绵羊等多种动物获得了试管后代。1982 年, 美国 Brackett 等获得了第一胎试管犊牛^[31]; 1989 年, 我国首例试管牛在内蒙古大学诞生^[32]; 1990 年, 利用冷冻体外受精胚胎技术在中国农科院获得三只试管牛^[33]。英国剑桥 ABC 公司(Animal Biotechnology Co. Ltd)目前年生产体外受精胚胎 10 万~16 万枚^[34]。日本 1988 年生产试管牛 160 头, 1989 年开始将体外受精技术应用于日本本地黑牛生产^[35]。至 1995 年, 日本有 102 个单位使用体外受精技术, 共移植 4 262 头牛, 产犊 1 216 头, 囊胚率达 30% 左右^[36]。1989 年以来, 我国旭日干、范必勤、朱裕鼎、卢克焕、秦鹏春、石德顺等在牛的体外受精技术方面的研究已接近或达到世界先进水平^[37]。目前, 国外报道的 IVF 囊胚发育率为 30%~46.3%^[38, 39], 国内为 32.6% 左右^[22, 40]。

体外受精作为一种新的繁殖技术, 能够提供大量的胚胎来源, 可以满足胚胎工程研究以及生产性胚胎移植的需要。体外受精技术的进一步发展和完

善, 为实现动物胚胎的工厂化生产提供了可能; 对充分发挥良种母畜的繁殖潜力, 加快家畜品种改良和优良品种遗传资源的开发与利用, 加速畜牧业的发展具有重要的科学意义和实用价值。

1.5 动物性别控制

动物性别控制(Sex Control)是指通过人为的干预或操作, 使母畜按人们的愿望繁殖所需性别后代的技术。早在 1902 年, Bhattacharya B C 等^[41]在研究蝗虫精细胞时, 首先提出了性别决定的染色体理论。20 世纪 50 年代末, 人们证明了鼠和人的雄性性别是由 Y 染色体决定的^[41]。1990 年, 英国学者 Sinclair 等^[42]发现哺乳动物(包括人类)Y 染色体短臂上靠近长臂染色体区的 35 kb 区域存在性别决定区(SRY, 睾丸决定因子基因)。1991 年, Koopman 等^[43]进行了小鼠性反转试验, 证明了 SRY 为哺乳动物的性别决定基因。

家畜的性别是在受精时决定的, 故如何将动物精液中 X 和 Y 精子分离是解决家畜性别控制的关键问题。半个世纪以来, 关于分离精子的方法已有很多报道, 如沉降法、密度梯度离心法、电泳法、白蛋白沉淀法、免疫法、凝胶过滤法、层析分离法等。这些方法都是以 X 和 Y 精子之间的物理差异为依据, 如密度、重量、形态、大小、活力和表面电荷等。尽管这些方法有许多似乎成功的报道, 但却缺乏科学根据、可靠性、重复性和效率性。卢克焕^[44]认为目前最科学和最可靠的分离精子方法是, 根据 X 和 Y 精子的 DNA 含量(性染色体)存在差异的原理, 利用改良的流式细胞仪测定分离 X 和 Y 精子。

早期胚胎性别鉴定的方法主要有: (1)细胞学方法, 即从胚胎取出部分细胞直接进行染色体分析或阻断培养在细胞分裂中期进行染色体分析, 对胚胎进行性别鉴定, 虽准确率可达 100%, 但采集对胚胎有伤害; (2)免疫学方法, 其常用的检测胚胎 H-Y 抗原的方法是间接免疫荧光法, 虽不伤害胚胎且有较高的鉴别准确率, 但人为因素较大; (3)分子生物学方法, 其实质就是检测 Y 染色体上的 SRY 基因抗原的有无, 有则判为雄性, 无则判为雌性。

近几年, 人们对性别控制的实用性研究尚在不断的探索中, 对生物性别实现有效控制和使胚胎性别鉴定达到实用化水平还有一定差距。所以, 今后应该在对性别决定进行更深入研究的基础上, 着重那些快速、准确、经济的胚胎性别鉴定方法。

1.6 转基因动物技术

转基因动物技术(Transgenic animals)就是用

实验室方法, 将人们需要的目的基因导入受体动物基因组, 使外源基因与动物本身的基因整合在一起, 并随细胞的分裂而增殖, 在动物体内得到表达, 并能稳定地遗传给后代动物。它的研究建立在经典遗传学、分子遗传学、结构遗传学和DNA重组技术的基础之上。Gordon等^[45]首次报道用DNA显微注射法获得了转基因小鼠。Palmiter等^[46]把大鼠的生长激素基因导入小鼠受精卵内, 获得了“超级”小鼠; Hammer等^[47]获得了转基因兔、绵羊、猪; Church等^[48]获得了首例转基因牛。到目前为止, 人们已成功获得了转基因鼠、鸡、山羊、猪、绵羊、牛、蛙以及多种转基因鱼^[49~51]。转基因动物可通过DNA显微注射、载体(如反转录病毒载体、精子)、细胞培养、胚胎的细胞注射等方法获得, 但成功率不高, 需进一步研究提高转基因的效率。转基因可以在乳腺系统MAR(基质结合区)表达, 通过DNA印迹分析(即Southern印迹分析)检测其外源基因的表达。

转基因技术应用于动物生产上, 不但可以通过控制激素和生长因子、改变结构蛋白、产生新的代谢途径等方法提高动物的生长速度及选择的效率, 增加改良的机会, 加快改良性状的进程, 解脱有性繁殖的束缚, 而且还可以提高动物的抗病力, 如Horisberger^[52]将抗流感基因Mx转入牛, 王敏华等^[53]将猪瘟病毒核酸酶基因转给兔, 获得的转基因动物抗病力明显提高。

1.7 细胞核移植技术

细胞核移植技术(Nuclear transfer)即动物克隆技术(Animal cloning)。因供体核的种类不同又可分为胚胎细胞、胚胎干细胞、胎儿体细胞和体细胞核移植技术。其方法是将供核细胞或细胞核注入去核成熟的卵母细胞内, 经电或化学方法使核质融合、激活细胞分裂形成胚胎, 经移植受体妊娠产仔从而达到扩繁同基因型哺乳动物的目的。理论上该技术是胚胎分割的进一步发展。

1.7.1 胚胎细胞核移植技术 即将供体胚胎解离成单个卵裂球后注入去核的成熟卵母细胞内融合, 产生大量遗传同质克隆胚胎的技术。胚胎细胞核移植最早是由Brings等^[54]于1952年在两栖类动物蛙上完成的。此后人们对鱼类和两栖类动物进行了深入研究。哺乳动物核移植在20世纪70年代以后才有了较大的发展。人们相继在小鼠^[55]、绵羊^[56]、山羊^[57]、牛^[58]、兔^[59]、猪^[60]等动物上获得成功。本实验室唐铁山1994年得到胚胎细胞核移植兔7只, 窦忠英1995年得到国内首例胚胎细胞核移植猪6

头^[61]。

1.7.2 胚胎干细胞核移植 哺乳动物PGCs的核移植最早是在小鼠上进行的。1992年, Tsunoda等^[62]用小鼠雄性生殖细胞核移植得到了囊胚。随后, 研究者在绵羊^[63]、牛^[64]、猪^[65]、兔^[66]上成功地进行了胚胎干细胞核移植试验。

1.7.3 胎儿体细胞核移植 随着细胞核移植技术的深入研究, 人们利用哺乳动物胎儿成纤维细胞核移植, 相继在绵羊^[67]、牛^[68]、山羊^[69]、兔^[70]和猪^[71]上获得成功。

1.7.4 体细胞核移植技术 自从Wilmut等^[72]的成体乳腺上皮细胞克隆绵羊Dolly诞生以来, 证明了高度分化的体细胞在卵母细胞质中具有去分化、重获全能性的能力, 从而否定了只有早期受精卵的卵裂球具有发育全能性的学说。卵母细胞的克隆鼠^[73]、克隆牛^[74]、耳皮肤细胞的克隆牛^[75]、体细胞克隆山羊^[76]、体细胞克隆牛^[77]等体细胞克隆动物也相继诞生。

利用克隆技术生产具有极高经济价值的转基因动物或迅速扩大稀有动物种群数量具有重大的经济效益, 但是目前存在体细胞克隆动物产仔率低、胎仔过大、流产、死胎、畸胎、后天发育不良等问题, 需要投入更大的精力去研究。

1.8 胚胎干细胞技术

胚胎干细胞(Embryo Stem Cells)是由早期胚胎内细胞团(ICM)或原生殖细胞(Primordial Germ Cells, PGCs)分离出来的多潜能细胞, 它与胚胎细胞有相似的形态特征和分化潜能。随着ES细胞与胚胎工程和基因工程结合, 必将为畜牧业生产带来巨大革命。ES细胞研究, 首先源于畸胎瘤干细胞(Terata-carcinoma Stem Cell), 即EC细胞(Embryonal carcinoma cells), 但是EC细胞种系嵌合率很低, 而且由于其肿瘤源性, 生成的嵌合体成年又出现肿瘤, 且建成的EC细胞系有异常核型。随后, 胚胎干细胞的研究取得了很大的进展(见表1^[78])。另外, Sims等^[79]用ES细胞核移植得到4头犊牛, Cibelli等^[80]利用转基因技术得到了生殖系嵌合牛; 1996年, Campbell等^[81]将绵羊ES细胞系经核移植得到4只羔羊。我国尚克刚等^[82]、丛笑倩^[83]也分别建立了小鼠的ES细胞系, 并得到了嵌合体小鼠; 1995年, 赖良学^[84]建立了兔的ES细胞系并得到了一只皮毛嵌合体。目前, 中国科学院上海细胞生物所和中国农科院畜牧所等单位, 亦已开始猪的ES和EG细胞的研究, 并取得了一定进展。

表 1 胚胎干细胞研究概况进展

Table 1 Embryo stem cell research general situation progress

哺乳动物 ES 细胞系 Mammalian	建系年代 The year of establishment	作者 Author
小鼠 Mouse	1981; 1989; 1990; 1991; 1995	Evans 等; 尚克刚; 丛笑倩; 陈立人; 钱永胜
仓鼠 Hamster	1988; 1990	Deotschman 等; Diedrahita 等
猪 Swine	1990; 1991; 1994; 1995; 1996	Notarjanni, Diedrahita, Strojok, Anderson; 陈立人; Wheeler; 钱永胜; 徐军, 冯秀亮
水貂 Emine*	1992	Sukoyan
牛 Bovine*	1992; 1993; 1994	Satio; Stice; Strelchenko
兔 Rabbit*	1993; 1994; 1995	Graves; Noemann; 赖学良
绵羊 Ovine*	1994; 1996	Tsuchiya; Meinecke Tilmann
山羊 Goat*	1994; 1996	Bongso; Meinecke Tilmann
人 Human*	1994	Bongso

注: 有“*”者为类 ES 细胞系。

Note: “*” stands for ES cell-like line

用 PGCs 建立干细胞系的研究近年也有较大进展(见表 2^[78, 85])。这些成果表明, PGCs 建系得到的 EG 细胞与 ES 细胞一样是多能干细胞。并且每只实验动物一次可提供 5 000~ 6 500 个 PGCs(鼠)或 15 000 多个 PGCs(猪), 虽然可能会因 PGCs 细胞具有迁移特性而导致贴壁率较低, 但其材料来源还是比较丰富的, 这就为胚胎干细胞系建立提供了一个新思路, 也为体外胚胎培养难或 ES 细胞分离难的动物提供了一个新途径。ES 细胞的生物学特性, 决定了其在生物学领域不可估量的应用价值。ES 细胞

可用于分子遗传学和发育生物学的研究, 为研究生殖细胞发育分化和成熟的调节机制以及生殖肿瘤的产生提供了丰富的材料; ES/PGCs 细胞具有全能性、定向整合及较高的嵌合能力, 是转基因的高效载体, 并使外源基因整合表达的筛选工作由个体水平上升到细胞水平, 便于实施“基因敲除”, 进行家畜改良。随着核移植技术和嵌合体制作技术的日趋完善, 高效增殖而得到大量 ES 细胞必将成为克隆动物材料获得的重要途径。因此, ES/PGCs 细胞建系, 有着重要的应用价值和广阔的开发利用前景。

表 2 由 PGCs 建立干细胞系进展

Table 2 Building stem cell line from PGCs progress

年代 Year	作者 Author	研究成果 Results
1973	Jean	描述小鼠 PGCs 形态结构 Morphological and structural description of mouse PGCs
1977	Brinster	研究 PGCs 的能量代谢, 发现其与刚排出的卵之间相似 Finding of the similarity of energy metabolism of PGCs to newly ovulated ova
1982	Felici	用 EDTA/percoll 法分离到小鼠 PGCs Mouse PGCs isolated with EDTA/percoll method
1990	Leichthammer	分离到牛、猪、兔的 PGCs Isolated PGCs from cattle, pig and rabbit
1992; 1994	Rensnick; De Felici, Donovan	确定了小鼠 PGCs 干细胞系的 3 种生长因子 Identification of 3 growth factors affecting mouse PGCs stem cells
	Yasuhisa Matsui	用小鼠 PGCs 建立了干细胞系并得到了嵌合体 Establishment of stem cell line with mouse PGCs and chimera
1994	Stewart	利用 PGCs 建立了干细胞系得到了生殖系嵌合小鼠 Establishment of stem cell line with mouse PGCs and reproductive chimera mouse
1994	Robert 等; 李松	用 PGCs 建立了牛的干细胞系; 得到牛类 EG 细胞 Establishment of bovine stem cell line with PGCs and EG-like cell
1994	Mitani	建立了大鼠的 PGCs 干细胞系 Establishment of PGCs stem cell in rat
1997; 1998	Shim; Piedrahita	用猪的 PGCs 建立了多能干细胞系并得到了嵌合体猪 Establishment of pluripotent stem cell line with porcine PGCs and chimera pig
1997	常万存等	用胎儿 PGCs 分离克隆出 EG 细胞 Isolation of EG cell from fetal PGCs

1.9 动物胚胎嵌合技术

动物胚胎嵌合技术即通过显微操作, 使 2 枚或 2 枚以上受精卵(胚胎)的全部或部分胚胎细胞嵌合在一起, 人工复合胚胎, 以获得嵌合体动物的技术。

哺乳动物嵌合体的研究工作, 最早是由

Tarkowshi 等^[86] 分别用 8-细胞卵裂球聚合法制作了首批嵌合体小鼠。随后 Garuner 等^[87] 用囊胚的内细胞团(Inner Cell Mass, ICM)注入到另一胚胎中, 也获得了来自 2 个品系的嵌合小鼠。此后, 人们先后获得了大鼠、兔和羊的嵌合体。20 世纪 80 年代后, 进行了牛和猪的嵌合体研究, 并且开展了绵羊和山

羊、马和斑马、小鼠和大鼠等种间和属间嵌合体的研究^[88]。然而, 尽管Hoppe^[89]1977年进行了成功的研究, 但目前有人认为孤雌生殖基因组不能支持哺乳动物胚胎发育至分娩, 纯合二倍体母本或父本的原核也不能发育至分娩; 铃木达行^[90]研究的结果表明, 通过聚合来自孤雄生殖和体外受精的半胚或全胚, 能生产嵌合囊胚。将胚胎移入受体内, 将能生产来自孤雄生殖细胞的活犊牛。

正常情况下, 不同品种聚合嵌合体的细胞能共存, 在所有组织中可互作。因此, 嵌合技术将作为基因保存的一种工具。采用这项技术, 有可能在以下几个方面取得突破: (1) 生产濒临灭绝的动物或某些数量极少的外来品种牛的嵌合体; (2) 生产嵌合肉牛(因为通过聚合无性别的体外受精胚胎生产嵌合牛的性比率总是以雄性占有主导地位); (3) 使用PCR扩增雄性特异DNA来鉴别性别, 生产聚合胚胎进而生产嵌合奶用母牛; (4) 将几个优秀的不同品种聚合起来产生具有几个优秀品种优势的新品种(终端品种); (5) 将更高发育阶段的卵裂球(来自孤雄生殖胚胎, 贡献给内细胞团)与低级阶段的卵裂球(来自体外受精胚胎, 产生滋养外胚层)聚合起来, 生产高度纯化的纯合优秀母牛。

对早期嵌合体的研究用以阐明动物发育的生物学问题, 近十几年来, 随着胚胎工程的发展, 已成为研究胚胎发育和遗传变异最理想的实验材料。在转基因动物生产及家畜繁育等方面, 嵌合体也具有潜在的优越性。与ES细胞培养和基因操作技术相结合将使嵌合体的应用前景更加广阔, 然而在家畜方面进行嵌合体实用研究还有一段较长的路程。

2 胚胎工程技术与我国畜牧业的发展前景

据统计^[91], 近2年来国内山羊、绵羊的胚胎移植数每年在3万枚以上, 使国内种羊数目迅速扩大,

为杂交改良打下了基础。有人预计今后5年内, 纯种公羊数量将趋于饱和, 养羊业将以种用为主逐步过渡到以生产商品肉羊为主, 满足人们对优质羊肉的需要^[92]。现在全国年产犊牛约5000万头, 按照农业部科技司推荐的方法计算, 平均每头胚胎移植牛后代比土种牛每年增加经济效益3.5万元。以每年胚胎移植牛1%计算, 年总经济效益将高达175亿元, 市场潜力巨大。

20世纪80年代, 胚胎移植技术已经逐步由实验室走向生产应用。在发达国家, 许多兽医院已将胚胎移植作为常规业务, 并且与之相关的配套器械和药品也应运而生; 体外受精技术和性别鉴定技术已经应用于生产实践; 转基因技术已经在制药领域显示了美好前景。现在我国刚进入WTO不久, 国内畜牧业面临与国外同行竞争的巨大压力, 胚胎工程技术特别是胚胎移植技术产业化的推广已刻不容缓。与发达国家相比, 我国畜牧业生产效率低、资源浪费大、产品卫生和质量差、生产规模小, 以至于无法适应国际、国内市场需求。近几年内, 我国的牛、猪等农产品进口关税将大幅下调, 竞争形势将更加严峻。所以利用已成熟的胚胎工程技术来改良土种牛、羊, 是一条快速繁育改良、提高牛羊生产效率、增强国际竞争力的有效途径。

牛、羊是草食家畜, 能将牧草和秸秆等各种粗饲料转化为人们所需要的肉、奶、皮、毛等。我国牛、羊养殖业的发展已跨入世界大国先进行列。胚胎工程技术作为扩繁(增加种畜数量)、育种(提高种畜质量)、保种、引种(促进优良种畜交流)的有效手段, 必将为中国牛羊的品种提升做出贡献, 同时牛羊养殖业的发展也必将为胚胎工程技术的发展提供舞台。

[参考文献]

- [1] 陈北亨, 王辰辰. 胚胎移植技术. 兽医产科学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 325-337.
- [2] 杨炜峰, 高志敏, 窦忠英. 胚胎移植技术的现状与展望[J]. 乳业科学与技术, 2002, (1): 29-33.
- [3] 王希朝. MOET技术在布尔山羊杂交核心群育种中的应用[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2000: 3-44.
- [4] Thatcher W W, Moreira F, Santos J E P. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production[J]. Theriogenology, 2001, 55: 75-89.
- [5] Whittingham D G. Survival of mouse embryos frozen to -196 and -269 [J]. Science, 1972, 178: 441.
- [6] Leibo S P, Loskutov N M. Cryobiology of *in vitro* derived bovine embryos[J]. Theriogenology, 1973, 39(1): 81-84.

- [7] Parks J E, Ruffing N A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes[J]. Theriogenology, 1992, 37(1): 59- 73
- [8] Fidler S, Giudive L, Lamb E. Cryopreservation of embryo and ova[J]. Fert Steril, 1988, 49: 793- 764
- [9] Whittingham D G. Survival of rat embryos after freezing and thawing[J]. Reprod Fertil, 1975, 43(3): 575- 578
- [10] Willadsen S M, Polge C, Rowson L E, et al Deep freezing of sheep embryos[J]. Reprod Fertil, 1976, 46(1): 151- 154
- [11] Yamamoto Y, Oguri N, Tsutsumi Y, et al Experiments in the freezing and storage of equine embryos[J]. Reprod Fertil Suppl, 1982, 32: 399- 403
- [12] Tsunoda Y, Vincent C, Garnier V, et al Transfer of frozen-thawed embryos in sheep[J]. Vet Rec, 1987, 120(4): 83- 85
- [13] 丁家桐, 李碧春, 李拥军, 等. 用玻璃化冷冻保存山羊胚胎的研究[J]. 江苏农学院学报, 1997, 18(1): 17- 19
- [14] Rall W F, Fathy G M. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at - 196 °C by vitrification[J]. Nature, 1985, 313: 573- 575
- [15] Mahmoudzadeh A R, A Van Soom, Bols P, et al Optimization of a simple vitrification procedure for bovine embryos produced *in vitro*: effect of developmental stage, two-step addition of cryoprotectant and sucrose dilution on embryonic survival[J]. Reprod Fertil, 1995, 103(1): 33- 39
- [16] Deval A. Vitrification of bovine embryos produce *in vitro* survival hatching and pregnancy rates[J]. Theriogenology, 1996, 45(1): 178
- [17] 窦忠英, 王新庄, 樊敬庄, 等. 奶牛胚胎直接投入液氮冷冻保存试验[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(增刊 2): 65- 68
- [18] 窦忠英, 王新庄, 樊敬庄, 等. 自制简易胚胎冷冻器冷冻保存试验[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(增刊 2): 69- 72
- [19] 桑润滋, 朱士恩, 吴德国, 等. 玻璃化冷冻牛胚胎的分割移植实验初报[J]. 农业生物技术学报, 2000, 8(2): 128
- [20] 黄凤玲, 石德顺, 卢克焕. 几种冷冻条件对牛体外受精卵发育率的影响[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(2): 337- 338
- [21] 阳年生, 黄凤玲, 卢克焕. 牛体外受精胚胎一步脱防冻剂冷冻方法的研究[J]. 中国畜牧杂志, 1996, 32(2): 9- 11
- [22] 李荣凤, 于彦珠, 旭日干, 等. 牛体外受精胚胎成分明确培养系统的建立[J]. 内蒙古大学学报, 2002, 33(5): 563- 566
- [23] 阳年生, 卢克焕. 体外受精后不同时间收集的牛胚胎的冷冻效果[J]. 中国兽医学报, 1995, 15(3): 281- 286
- [24] 廖洪武, 李荣凤, 旭日干. 平衡方法和冷冻温度对牛体外受精胚胎玻璃化冷冻保存效果的研究[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 1995, 26(1): 85- 89
- [25] 黄凤玲, 阳年生, 石德顺, 等. 不同血清对常温和冷冻保存牛体外受精胚胎的影响[J]. 广西农业生物科学, 2002, 21(1): 8- 11
- [26] Nicholas D S, Ulberg L C. Early embryo development in the mammal. I. Effects of experimental alterations during first cell division in the mouse zygote[J]. Anim Sci, 1942, 33(1): 86- 95
- [27] Tarkowski P, Leary P, Gresser I. Interferon and cell division. VI. Inhibitory effect of interferon on the multiplication of mouse embryo and mouse kidney cells in primary cultures[J]. Experimental Biology and Medicine, 1959, 138(3): 1044- 1050
- [28] 孟庆刚, 兰恭赞, 朱士恩, 等. 哺乳动物胚胎分割技术研究进展[J]. 动物科学与动物医学, 2001, 19(5): 7- 9
- [29] 窦忠英, 樊敬庄, 张志民, 等. 奶牛胚胎切割实验报道[J]. 西北农业大学学报, 1987, 15(3): 19- 24
- [30] 樊敬庄, 窦忠英, 王新庄, 等. 现场分割奶牛胚胎产生同胚双犊的研究[J]. 西北农业大学学报, 1993, 21(增刊 2): 49- 51
- [31] Brackett B G, Younis A I, Fayer-Hosken R A. Enhanced viability after *in vitro* fertilization of bovine oocytes matured *in vitro* with high concentrations of luteinizing hormone[J]. Fertil Steril, 1982, 52(2): 319- 324
- [32] 黄志坚, 黄依明. 牛体外受精技术研究进展[J]. 福建畜牧兽医, 2002, 24(1): 56- 58
- [33] 吴清明. 哺乳动物体细胞克隆技术研究进展[J]. 河南畜牧兽医, 2001, 22(12): 8- 9
- [34] Endo K, Kobayashi K, Mizuno J. Commercial application of *in vitro* produced bovine embryos[M]. International symposium of biotechnology on animal reproduction, 1992: 32
- [35] 郭志勤. 家畜胚胎工程[M]. 北京: 中国科技出版社, 1998
- [36] 和占星, 文际坤, 赵开典. 日本胚胎工程的现状与趋势[J]. 黄牛杂志, 1999, 25(3): 72- 73
- [37] 王光亚, 段恩奎. 山羊胚胎工程[M]. 陕西杨凌: 天则出版社, 1993
- [38] Numabe T, Okawa T, Kikuchi T. Dextroxyfylline improves *in vitro* fertilization and subsequent development of bovine oocytes[J]. Theriogenology, 2001, 56: 225- 233
- [39] Mizushima S, Fukui Y. Fertilizability and developmental capacity of bovine oocytes in a cultured individually chemically defined maturation medium[J]. Theriogenology, 2001, 55: 1431- 1445
- [40] 高建民, 朱裕鼎, 刘云海. 牛体外受精胚胎无血清培养的研究[J]. 中国农业科学, 1998, 31(3): 452- 454
- [41] Bhattacharya B C, Clung M C. Sex control in mammals[J]. Tierzucht Zuechtungsbiol, 1958, 72: 250- 254
- [42] Sinclair A H, Palmer M S, Berta P, et al Comparison of human 2FX and 2FX transcripts[J]. PNAS, 1990, 87: 1681- 1685
- [43] Koopman T, Sagai T, Hanzawa N, et al Genetic control of sex-dependent meiotic recombination in the major histocompatibility complex of the mouse[J]. EMBO, 1991, 10: 681- 686
- [44] 卢克焕. 哺乳动物性别控制研究进展[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(4): 411- 414

- [45] Gordon W H, Srinivasan P R, Stokoe N, et al Parameters governing the transfer of the genes for thymidine kinase and dihydrofolate reductase into mouse cells using metaphase chromosomes or DNA [J]. Somatic Cell Genet, 1980, 6(3): 333- 347.
- [46] Palm iter R D, Omitz D M, Hammer R E, et al Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice[J]. Nature, 1985, 313(6003): 600- 602
- [47] Hammer R E, Pursel V G, Rexroad C E, et al Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection[J]. Nature, 1985, 315(6021): 680- 683
- [48] Church F, Camper S, Goodwin E, et al Structure and regulated expression of bovine prolactin and bovine growth hormone genes[J]. Adv Exp Med Biol, 1986, 205: 281- 299
- [49] 王鲜忠, 孙新明 转基因动物研究进展[J]. 动物医学进展, 1999, 20(3): 24- 26
- [50] 杨 凌, 杨殿有 转基因动物研究进展[J]. 畜牧与兽医, 1998, 30(4): 181- 183
- [51] 陈永福 应用体细胞克隆技术生产转基因动物的前景[J]. 草食家畜, 2001, (增刊): 1- 3
- [52] Horisberger M A. The action of recombinant bovine interferons on influenza virus replication correlates with the induction of two Mx-related proteins in bovine cells[J]. Virology, 1988, 162(1): 181- 186
- [53] 王敏华, 王 斌, 江金益, 等 转移抗猪瘟病毒核酸酶基因转免的研究[J]. 畜牧兽医学报, 1996, 27(4): 319- 325
- [54] Brings F, King B M. Beta-catenin localization during Xenopus embryogenesis: accumulation at tissue and somite boundaries[J]. Development, 1994, 120: 3667- 3679
- [55] Modlinski J A. Transfer of embryonic nuclei to fertilized mouse eggs and development of tetraploid blastocysts[J]. Nature, 1978, 273(5662): 466- 467.
- [56] Willadsen S M. Nuclear transplantation in sheep embryos[J]. Nature, 1986, 320(6057): 63- 65
- [57] 张 涌 山羊卵核移植的研究[J]. 中国农业科学, 1991, 24(5): 1- 6
- [58] Prather R S, Barnes F L, Sims M M, et al Nuclear transplantation in the bovine embryo: assessment of donor nuclei and recipient oocyte[J]. Biol Reprod, 1987, 37: 859- 866
- [59] Stice S L, Robl J M. Nuclear reprogramming in nuclear transplant rabbit embryos[J]. Biol Reprod, 1988, 39: 657- 664
- [60] Jolliff W J, Prather R S. Parthenogenic development of *in vitro*-matured, *in vivo*-cultured porcine oocytes beyond blastocyst[J]. Biol Reprod, 1997, 56: 544- 548
- [61] 唐铁山 兔胚胎细胞核移植研究[D]. 陕西杨凌: 西北农业大学, 1994
- [62] Tsunda H V, Burkhart J G. Comparison of mutation frequencies obtained using transgenes and specific-locus mutation systems in male mouse germ cells[J]. Mutat Res, 1992, 279(2): 149- 151
- [63] Smith G W, Moor R M, Smith M F. Identification of a 30,000 M(r) polypeptide secreted by cultured ovine granulosa cells and luteal tissue as a tissue inhibitor of metalloproteinases[J]. Biol Reprod, 1993, 48: 125- 132
- [64] Sims M, First N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells[J]. PNAS, 1994, 91: 6143- 6147.
- [65] Cheong H T, Ikeda K, Martinez Diaz M A, et al Development of reconstituted pig embryos by nuclear transfer of cultured cumulus cells[J]. Reprod Fertil Dev, 2000, 12(2): 15- 20
- [66] Du F, Giles J R, Foote R H, et al Nuclear transfer of putative rabbit embryonic stem cells leads to normal blastocyst development[J]. Reprod Fertil, 1995, 104(2): 219- 223
- [67] Angelika E S, Alexander J K, William A R, et al Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts[J]. Science, 1997, 278: 2130- 2133
- [68] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(7): 642- 646
- [69] Baguisi A, Behboodi E, Melican D T, et al Production of goats by somatic cell nuclear transfer[J]. Nat Biotechnol, 1999, 17(5): 456- 461
- [70] Galat V V, Lagutina I S, Mezina M N, et al The effect of serum starvation on the efficacy of the nuclear reprogramming of rabbit embryonic fibroblasts[J]. Ontogenez, 1999, 30(6): 411- 416
- [71] Tao T, Machaty Z, Boquest A C, et al Development of pig embryos reconstructed by microinjection of cultured fetal fibroblast cells into *in vitro* matured oocytes[J]. Anim Reprod Sci, 1999, 56(2): 133- 141
- [72] Wilmut I, Schnieke A E, McWhir J, et al Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells[J]. Nature, 1997, 385(6619): 810- 813
- [73] Wakayama T, Perry A C F, Zuccotti M, et al Full-development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei[J]. Nature, 1998, 394: 369- 374

- [74] Yoko Kato, Tetsuya Tani, Yusuke Sotomaru, et al Eight calves cloned from somatic cells of a single adult[J]. Science, 1998, 282: 2095- 2098
- [75] Zakhartchenko V, Alberio R, Stojkovic M, et al Adult cloning in cattle: Potential of nuclei from a permanent cell line and from primary cultures[J]. Mol Reprod Dev, 1999, 54: 264- 272
- [76] 李裕强, 张 涌. 动物克隆的理论与实践[J]. 西北农业大学学报, 2000, 28(2): 89- 90
- [77] 董雅娟, 柏学进, 李建栋, 等. 牛体细胞核移植技术[J]. 中国兽医学报, 2002, 22(4): 347- 350
- [78] 董 晓, 冯书堂, 郑 行. 胚胎干细胞研究进展[J]. 国外畜牧科技, 2000, 27(4): 24- 26
- [79] Sim s M, First N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells[J]. PNA S, 1994, 91: 6143- 6147
- [80] Cibelli J B, Stice S L, Golueke P J, et al Transgenic bovine chimeric offspring produced from somatic cell-derived stem-like cells[J]. Nat Biotechnol, 1998, 16(7): 642- 646
- [81] Campbell K H, McWhir J, Ritchie W A, et al Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line[J]. Nature, 1996, 380(6569): 64 - 66
- [82] 尚克刚, 李子玉, 吴鹤龄. 建立小鼠多能干细胞系的几个主要影响因素[J]. 遗传学报, 1992, 19(6): 491- 496
- [83] 丛笑倩. 小鼠原生殖细胞建立过程及分化特性的研究[J]. 试验生物学报, 1999, 32(3): 251
- [84] 赖良学. 家兔类胚胎干细胞的分离和克隆[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 1995
- [85] 郝晓静, 杜立信, 孙允东, 等. 畜禽胚胎干细胞的研究进展[J]. 当代畜牧, 2002, (3): 46- 49
- [86] Tarkowski C, Kastenbaum M A, McIntz C. Factors affecting mortality from secondary disease in mouse radiation chimeras[J]. Natl Cancer Inst, 1965, 35(1): 227- 234
- [87] Garuner E M, Fraser A, Herbst E W, et al Parthenogenetic stem cells in postnatal mouse chimeras[J]. Development, 1967, 116: 95- 102
- [88] 樊俊华, 魏庆信, 华文君, 等. 猪 ICM 注入囊胚获得嵌合胚的研究[J]. 实验研究, 1997, (2): 7- 10
- [89] Hoppe J. Invite culture store and transfer of goat embryo[J]. Austr J Biol Sci, 1977, 29(1): 125- 129
- [90] 铃木达行. 生产牛嵌合体的研究[J]. 郭志勤译. 草食家畜, 1998, 98(1): 1- 5
- [91] 张 波. 面对 WTO 养羊业怎么办? [EB/OL]. www. China-sheep. com. 权威评论, 2002-05-29
- [92] 文国艺. 河南养羊业的发展方向[EB/OL]. www. China-sheep. com. 综合信息, 2002-10-17

Embryo engineering technology and their application in animal production

L I Y ong, DOU Zhong-y ing, YANG Wei-feng

(Shaanxi Center of Stem Cell Engineering and Technology, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Aiming at the acquirement of improved or rare animals, and the basic research and applied development, the research on embryo engineering and technology intend to realize to the *in vitro* manual control of mammalian embryos and their further development. The paper reviewed the embryo engineering and technology, including embryo-transfer, embryo freezing/preservation, embryo division, *in vitro* fertilization, sex identification and control, gene-transferred animal, nuclear transfer, embryonic stem cell and embryo chimera, and their application prospect in animal farming.

Key words: embryo engineering; embryo transfer; *in vitro* fertilization; embryo stem cell