

山羊辅助生殖技术^{*}

崔 明¹, 刘 娣², 周佳勃^{2,3}

(1. 鹤岗绿森林业有限公司松鹤林场, 鹤岗 154100; 2. 黑龙江省农科院畜牧中心, 哈尔滨 150086; 3. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

摘要: 辅助生殖技术(ART)在山羊的繁育中具有重要作用。因为操作简单和成本低, 同期发情和人工输精是使用最广泛的辅助生殖技术。由于结果具有不可预见性, 超数排卵和胚胎移植(MOET)使用的并不十分广泛。使用经内窥镜从有价值的母畜采集的卵母细胞有助于提高MOET的结果并扩大其应用范围。胞质内精子注射(ICSI)技术能够利用精子作为载体生产转基因动物, 以及使用无运动能力的冻干精子。转基因和克隆技术可以显著影响今后的山羊繁育, 但是需要提高技术的效率。

关键词: 同期发情和排卵; 人工输精; 超数排卵 胚胎移植; 体细胞核移植技术; 辅助生殖技术

中图分类号: S 827.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2006)05-104-04

Assisted Reproduction Technologies in Goat

CUI Ming¹, LIU Di², ZHOU Jia bo^{2,3}

(1. Hegang Lusen Forestry Corporation Limited Songhe Forestry Center, Hegang 154100; 2. Animal Husbandry Research Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract: Assisted reproduction technologies (ART) plays a crucial role in goat breed. For simplicity and excellent cost, estrous synchronization and artificial insemination (AI) are the most commonly ART used worldwide. As its unpredictability, multiple ovulation and embryo transfer (MOET) have not used widely. In vitro embryo production using oocytes collected by laparoscopy from valuable donors has the potential to improve the results obtained from MOET and expand its applications. ICSI technique can be used to extend the sperm vector for transgenic goat production and to use freeze-dried sperm for which spermatozoa motility is not required. Transgenesis and cloning technologies are expected to have an important impact on the future genetic improvement of goat, but the technical efficiencies should be improved.

Keywords: SEO; AI; MOET; SCNT; ART

中国山羊养殖居世界第一。但若与养羊业发达国家相比, 特别是在品种良种化、产品品质等方面, 差距仍然很大。应用辅助生殖技术(ART)能够加速山羊遗传改良的进程。山羊的人工输精(AI)和胚胎移植(ET)提高了选择的强度, 性未成熟山羊的

体外胚胎技术(JIVET)可以缩短世代间隔加速育种进程。与正常育种进程相比应用ART技术可出生更多生产性能高的动物的后代。特别对于山羊和绵羊等季节性发情动物, 如果与同步发情和排卵等ART技术相结合, 可以使山羊在非繁殖季节出生后

* 收稿日期: 2006-05-16

基金项目: 黑龙江省农科院博士后科研基金资助

第一作者简介: 崔明(1972-), 男, 黑龙江延寿人, 学士, 从事畜牧学研究。Tel: 88181706; Email: chowjb@163.com。

通讯作者: 周佳勃, 黑龙江省农科院在站博士后, 主要从事配子与胚胎工程研究。Email: chowjb@163.com; Tel: 0541-55190846。

代和产奶。

1 同期发情和排卵

同期发情和排卵(SEO)是所有ART技术的关键技术,而且会直接影响到整体效率。因为山羊是季节性生殖动物,所以SEO的主要作用是在非繁殖季节进行AI,或者超数排卵、胚胎移植(MOET)和腹腔镜活体采卵(LOPU)。

山羊的同期发情的一般方法是采用阴道栓或者皮下埋植孕酮处理10 d接着在撤阴道栓后48 h注射前列腺素。人工输精的同期化处理需要在孕酮处理后48 h同时注射250~500 IU的马绒毛膜促性腺激素(eCG),例如在撤栓后的注射eCG促进卵泡的发育和同期排卵,以保证在固定时间进行人工输精和胚胎移植。但是eCG的注射剂量需要根据山羊品种、季节、体重、年龄、所需后代的数量来调整。

众所周知,短时间重复使用eCG处理会导致山羊繁殖力下降。这是由于前次处理产生了抗eCG抗体^[1]。抗体导致了发情周期LH峰和排卵时间的推迟,因此重复使用eCG处理需要调整输精时间否则会导致受精率下降。使用孕酮阴道栓长时间处理(18~21 d)往往会出现受精率下降,这可能是由于长期孕酮处理不利于精液运输。孕酮处理超过5 d会导致卵巢上较大主卵泡出现和生长,导致AI后的受精率下降。Rubianes等(2003)提出在山羊使用短期孕酮处理方法,孕酮处理5 d后撤栓后注射200~300 IU的eCG。使用短期刺激方法和eCG,撤栓后54 h输鲜精的妊娠率可以达到68%^[2]。有报道称在发情时注射GnRH,可以精确控制排卵时间^[3]。这有助于在固定时间输精或采集卵母细胞和特定阶段的胚胎。

2 人工输精

人工输精是使用最广泛的ART技术。它在全球范围内的改良作用显著^[4]。AI也是一种相对简单和廉价的遗传改良方法。使用冷冻精液有利于国际间交流遗传物质,在繁殖和非繁殖季节都使用精液,并且延长了有价值公畜的繁殖寿命。AI和发情同步化是生产管理的关键技术,可以在特定时间交配、分娩、生产肉或乳以适应市场和其它需要。

输精方法上常常受精液保存方法影响。为了到达良好的受精效果往往是精子损伤程度越大越需要将精子放置到离受精部位近的位置。新鲜精液可以选择使用阴道输精法,而子宫颈输精法适合冷藏和冷冻精液。为了使冷冻精液获得较高的妊娠率(>

70%),最好采取子宫内输精,但是需要有技术支持。

使用性别鉴定精液的人工输精是提高动物繁殖力的有效方法,尤其是在奶山羊。目前性别鉴定精液已经被成功的用于包括牛^[5]、马^[6]、猪^[7]、绵羊^[8]、麋鹿、海豚等多种动物^[9]。对山羊进行精子性别鉴定的报道很少,目前在山羊仅有Parrilla等人的(2004)实验性的报道,证明使用流式细胞精子分选仪可以将精子分为X和Y精子两群,而且山羊精子的分选效率要优于其它家畜精子(X、Y精子之间DNA含量差异大),预计不久就会被大量应用^[10]。

3 超数排卵和胚胎移植(MOET)

超数排卵和胚胎移植(MOET)的目的是使母畜比自然繁殖出生更多的后代。这种方法在理论上是可行的,但是因为成本、技术和效率问题,使MOET不能大面积的用于动物育种和改良^[11]。许多研究者都认为ART的最大障碍是MOET,有可能完全失败。主要原因是这种技术结果的不确定性和母羊对超排反应的不同,高排卵低受精率和早期黄体退化^[11]。这些不可预测的结果加上高额的费用和手术法采集和移植胚胎,阻碍了MOET大规模用于山羊的改良。

成功的山羊超数排卵和胚胎移植平均每个供体可以得到6~8枚可移植胚胎^[11]。但是这要受到品种、年龄和营养状态等许多因素的限制。通常每个供体的可移植胚胎的数量从0%~30%,这其中还有25%~50%的供体因受精失败和早期黄体退化。超排反应差异被认为受促性腺激素处理之前卵巢出现卵泡数量的影响^[12]。这是标准超卵程序所不能控制的。

受精率较低可能是在同步发情时精子运输不良以及输精和排卵的同步性较差造成的。这些问题可以通过使用子宫内输精来解决(腹腔镜输精)。还可以在检测到发情时注射GnRH同步化排卵和人工输精来解决。早期黄体退化可以影响到30%的供体。如果使用腹腔镜在手术前检测超数排卵的反应,发现早期黄体退化就不需手术,因为早期黄体退化可能与回收较多的未受精卵或者降解的卵母细胞有关。导致早期黄体退化的原因还不十分清楚,但是一般与营养状态,在超排中使用eCG^[13]和应激有关^[14]。

4 腹腔镜采集卵母细胞用于体外生产胚胎

腹腔镜采集卵母细胞(LOPU)与体外生产胚胎

技术结合能够提高有价值后代的数量, 该技术与手术法收集胚胎相比损伤很小, 而且在每个母畜的生殖周期中都可以重复几次, 它的可预见性要高于超数排卵。

使用来自腹腔镜采集的未成熟卵母细胞体外生产胚胎能够弥补 MOET 技术的不足^[11, 13]。首先这种技术能够反复进行, 外伤损伤小。其次它可以避免超排引起的不良反应, 例如排卵率低, 早期黄体退化和受精率低的问题。可靠性和可重复性也比较好。但是个体对促性腺激素的超排反应差异依然存在。通常 LOPU 技术的结果是每个供体可以收集 > 5 个卵母细胞^[14]。此外, 该技术还可以使性未成熟动物得到后代。例如, LOPU 提供的优质卵母细胞还可用于生产原核胚(DNA 注射生产转基因原代动物)或者用作核移植的受体胞质。

LOPU - IVP 技术在扩大生产性能优秀的性未成熟山羊应用具有很大的商业价值, 性成熟动物体外胚胎技术通常被称为 JIVET。这种技术可以缩短世代间隔, 而性未成熟动物对促性腺激素的反应良好。Baldassarre 等(2004)研究发现 3 月龄以上的性未成熟山羊的卵泡反应最强。而且能够获得的体外生产的可移植胚胎并发育到期^[14]。

应用这种技术可以在超过百日龄的羔羊获得正常后代。这可以较大的缩短世代间隔。因此, JIVET 可以有效的应用 LOPU - IVP 技术缩短世代间隔来加速优秀动物的改良进程。

5 胞质内精子注射

胞质内精子注射(ICSI)作为人类一种辅助生殖手段被引入。该技术在动物的主要应用是用于遗传上重要的雄性动物的配子来保护野生动物和家畜。而且, 这种技术能够利用精子作为载体生产转基因动物, 以及使用冻干精子保持精子活力。因为, 最初是在仓鼠使用 ICSI 技术, 接着先后在小鼠、牛、家兔、绵羊、人类、马、猫、猪和山羊出生了 ICSI 后代。这表明这项技术日趋成熟。Keskinetepe(1997)在非繁殖季节用冷冻 - 解冻的山羊精子进行 ICSI, 结果受精卵可以发育到囊胚, 可见, 通过 ICSI 可使季节性发情产仔的动物在非发情季节也能产仔^[16]。周佳勃等(2004)使用附睾精子和染色证明死亡精子 ICSI 后也获得囊胚。扩大了受精精子的来源^[17]。

结合精子载体转基因技术, 将目的基因与精子在一起孵育, 筛选出携带目的基因的精子, 然后注射到卵胞质中, 进而获得与传统转基因方法类似的转基因动物, 这样有可能提高山羊转基因的效率, 从而

为转基因动物的研究开辟简单易行的技术路线。

6 转基因和克隆

转基因和体细胞核移植技术(SCNT)在促进改良中起重要作用, 使动物改良过程更高效和廉价^[18]。众所周知在转基因动物的乳中生产有价值的重组蛋白。转基因山羊的生产也有报道^[19]。因为其产奶量可以接受, 投资和维持费比奶牛低, 山羊被认为是有效的生产重组蛋白的工具。目前, 该技术在山羊的主要是用于生产转基因动物的原代动物的生产, 这些转基因动物可以生产出含有有价值的药物和蛋白的乳^[15, 19]。

传统生产转基因原代山羊的方法是将构建的 DNA 注射到体内原核胚的原核中。这种方法是可靠的, 但是因随机整合效率很低, 转基因的结果不稳定(通常只有不到 10% 的后代产生)并且表达量低(0 ~ 10 g 重组蛋白/L 奶中)。Baldassarre 等(2004)报道了使用 LOPU 源的卵母细胞得到的体外原核胚通过原核注射法生产转基因山羊。这种方法提高了供体的利用率, 能够得到更多的卵母细胞和胚胎, 可以控制受精时间和后续 DNA 注射, 这对于成功整合很关键^[14]。

随着动物克隆技术的进步, 可以用于提高转基因山羊生产效率^[20]。通过脂质体转染整合构建的 DNA 到靶细胞中, 然后筛选正确整合的细胞作为供体细胞。虽然核移植重构胚的生产效率低于原核注射法(由于妊娠率低和胚胎死亡率较高), 但是所有的出生动物都是转基因动物, 经过诱导泌乳都能够产生乳蛋白^[18, 19]。

应用转基因体细胞核移植技术可以显著提高一些经济性状, 例如增加乳、肉和毛产量。虽然在山羊还没有相关报道, 但是显而易见, 这种技术要得到广泛的应用, 需要提高山羊转基因技术和克隆技术的效率。

7 展望

由于简单、相对成本低和有效, 同期发情和人工输精仍将是应用最广泛的山羊改良的辅助生殖技术。MOET 将主要用于动物进口和山羊品种改良。LOPU - IVP 对扩增优秀动物的基因十分有效。结合 JVIET 和 LOPU 技术用于进口冷冻胚胎繁育山羊新的品系和品种潜力十分巨大。ICSI 与克隆技术结合, 转基因技术将成为改良山羊生产性能最显著和有前途的方法。

参考文献:

- [1] Drion PV, Furtoss V, Baril G, et al. Four year of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with parameters of reproduction [J]. *Reprod. Nutr Dev.* 2001, 41:401-412.
- [2] Rubianes E, Menchaca A, Carbajal B. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats [J]. *Anim Reprod Sci.* 2003, 78: 271-287.
- [3] Pierson JT, Baldassarre H, Keefer CL, et al. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goats [J]. *Theriogenology*, 2003, 60: 397-406.
- [4] Leboeuf B., Restall B., Salomon S. Production and storage of goat semen for artificial insemination [J]. *Anim Reprod Sci.*, 2000, 62: 113-141.
- [5] Seidel Jr GE, Schenk JL, Herickhoff LA, et al. Insemination of heifers with sexed sperm [J]. *Theriogenology*, 1999, 52: 1407-1420.
- [6] Buchanan BR, Seidel Jr GE, McCue PM, et al. Insemination of mares with low numbers of either unsexed or sexed spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 2000, 53: 1333-1344.
- [7] Rath D, Ruiz S, Sieg B. Birth of female piglets following in uterine insemination of a sow using flow cytometrically sexed boar semen [J]. *Vet Rec.*, 2003, 29: 400-401.
- [8] Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC, et al. Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa [J]. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2002, 14: 503-508.
- [9] Garner DL, Seidel Jr GE. Past, present and future perspectives on sexing sperm [J]. *Can J Anim Sci.*, 2003, 83(3): 375-384.
- [10] Parrilla I, Vazquez JM, Roca J, et al. Flow cytometry identification of X- and Y-chromosome-bearing goat spermatozoa [J]. *Reprod Domest Anim.* 2004, 39(1): 58-60.
- [11] Cognie Y, Baril G, Poulin N, et al. Current status of embryo technologies in sheep and goat [J]. *Theriogenology*, 2003, 59: 171-188.
- [12] Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Castellanos V, et al. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes [J]. *Reprod Nutr Dev.*, 2003, 43: 17-28.
- [13] Pintado B, Gutierrez-Adan A, Perez Llano B. Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSC/anti-PMSC or combined FSH/PMSC administration [J]. *Theriogenology*, 1998, 50: 357-364.
- [14] Baldassarre H, Karatzas CN. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats [J]. *Anim Reprod Sci.*, 2004, 82: 83: 255-266.
- [15] Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies [J]. *Theriogenology*, 2002, 57: 275-284.
- [16] Keskinetepe L, Morton PC, Smith SE, et al. Caprine blastocyst formation following intracytoplasmic sperm injection and defined culture [J]. *Zygote* 1997, 5(3): 261-265.
- [17] 周佳勃, 吴延光, 韩东, 等. 精子和卵母细胞质量控制对山羊卵胞质内精子注射(ICS)受精的影响 [J]. *实验生物学报*, 2004, 37(5): 367-374.
- [18] Wheeler MB, Walters EM, Clark SG. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future [J]. *Anim. Reprod. Sci.*, 2003, 79: 265-289.
- [19] Baldassarre H., Wang B, Pierson JT, et al. Early propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production [J]. *Cloning Stem Cells* 2004, 6: 23-27.
- [20] Keefer CL, Baldassarre H, Keyston R, et al. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and non-transfected fetal fibroblasts and in vitro-matured oocytes [J]. *Biol. Reprod.*, 2001, 64: 849-856.

欢迎订阅 2007 年《中国草地学报》



《中国草地学报》(原《中国草地》)是由中国农业科学院草原研究所主办的国家级草学学术期刊,它秉承原《中国草地》的办刊宗旨,立足全中国,面向全世界,积极宣传和报道中国草学研究领域的最新理论与重要成果,介绍新进展与发展动态,内容以草学基础理论研究和应用理论研究为主,兼纳高新技术研究和直接产生生态效益、经济效益的开发性研究,主要包括草原学、牧草学、草地学和草坪学等学科领域内有关草地与牧草资源、草地经营管理与改良利用、牧草遗传育种与引种栽培、牧草生理生化、草地建设与生态保护、草地生产与饲料加工调制、草坪绿地、草业经济与可持续发展战略等。栏目主要有“研究报告”、“专题报告”、“综述与专论”、“研究简报”。读者对象为从事草业科研、教学、生产和管理的专家、学者、院校师生、领导及业内中高级科技人员,也适合农学、畜牧学、林学、环境科学等相关领域的科技人员阅读与参考。

本刊为中国草学界影响最大的专业期刊之一,现为中国科技核心期刊、中国科学引文数据库来源期刊和第四届全国农业优秀期刊,并被《中国生物学文献数据库》和《中国生物学文摘》等多种数据库及二次文献收录,2004 年影响因子达 0.8 以上。双月刊, A4 开本, 120 页, 国内外公开发行, 每期定价 15.00 元, 全年共 90.00 元。国内统一刊号 CN15-1344/S, 国内邮发代号 16-32, 全国各地邮局均可订阅, 错过订期可直接向本刊编辑部补订。地址: 呼和浩特市乌兰察布东街 120 号; 邮编: 010010; 电话: 0471-4926880。

