

性控冻精在肉羊胚胎移植中应用效果的研究

刘长彬¹, 倪建宏¹, 曲明悦², 汪新兰², 罗文毅², 蒲新竹², 张 宾¹

(1. 新疆农垦科学院/新疆生产建设兵团绵羊繁育生物技术重点实验室, 新疆 石河子 832000;

2. 新疆生产建设兵团农十师一八一团兽医站, 新疆 阿勒泰 836001)

摘要:为进一步研究肉羊性控精液在胚胎生产上的应用,以萨福克、无角陶赛特纯种肉用绵羊为供体,本地小尾寒羊杂交后代和湖羊为受体,利用子宫角深部输精及一般人工授精等辅助生殖技术使用性控冻精与普通鲜精对两品种肉羊进行人工授精,统计不同品种肉羊的受胎率和可用胚数,对获得的性控胚胎和普通胚胎进行移植,并对比其移植效果。结果表明:萨福克肉羊和无角陶赛特肉羊超排后黄体数差异不明显($P>0.05$);普通精液输精所获得的胚胎数显著高于性控冻精($P<0.01$);在受胎率上也做了比较,但差异不显著,受胎率43.2%。由于精液在通过流式细胞仪时,对精子顶体造成一定损伤,因此,无论是子宫角输精或阴道子宫颈输精均影响受精率,但性控精液的推广应用确实可以加速家畜遗传育种速度,缩短育种周期。鉴于此,今后对性控精液的研究重点应该放在精液分离过程中对精子的保护,以减少对精子的损伤。

关键词:肉用绵羊;性控精液;超数排卵;腹腔内窥镜技术

中图分类号:S826.9⁺2

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)04-0082-05

动物胚胎工程技术是以胚胎移植(俗称为“借腹怀胎”)为基础,它为性控精液人工授精、鲜胚移植提供了技术手段,通过性控精液生产性控胚胎能够极大地缩短繁育周期,对目前肉羊价格居高不下、繁殖速度慢、种质资源缺乏、快速扩繁和品种改良工作中起到积极的推动作用。1890年英国剑桥大学希普(W. Heape)首次获得安哥拉兔体内胚胎,移植到一只比利时母兔的输卵管内,并产生后代,标志着首次胚胎移植的成功。1934年美国的Warwick等首先成功进行了绵羊的胚胎移植。1973年Wilmut等超低温(液氮)保存胚胎获得成功。荧光活性细胞的分类把性控精液带到商业化应用的边缘^[1]。1999年利用性控冷冻精液进行输精,获得了世界首例犍牛。这些新技术的应用为性控胚胎移植研究打下坚实基础^[2]。1997年Catt等利用分离的精子,用腹腔内窥镜进行输精试验,并产下后代^[3]。2002年Hollinshead等同样对性控精液冻精进行子宫角输精产

下性控羔羊。2004年Morton等采用羔羊超排技术获得的卵母细胞进行体外成熟,利用分离的精子进行体外受精生产出性控后代。目前,关于性控精液的研究报告,多集中在牛^[4-7]上。未见利用肉羊性控精液进行人工授精并产生性控后代的报道。通过流式细胞仪分离出的肉羊性控精液,在肉羊胚胎移植上应用,生产性别控制胚胎,研究其性控精液的受精率、性控胚胎的受胎率及胚胎质量。探讨肉羊性控精液在生产应用中存在的问题,可为以后研究提供借鉴,更好地指导生产实践。总之,性控精液的应用在育种、肉羊产业化生产等方面具有较高的应用前景。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 以无繁殖疾病及传染病的2~5岁健康萨福克和无角陶赛特为供体;以本地小尾寒羊杂交后代及湖羊为受体。

1.1.2 供试器材 拥有自主知识产权的羊专用手术架;腹腔内窥镜一套(OLYMPUS, Japan);实体显微镜(NIKON, Japan);CO₂钢瓶(国产);恒温水浴锅、止血钳、创巾、手术刀、剪刀、持针钳、注射器(1、5和20 mL)、胚胎移植管、一次性皿、Holding液、温度计、布胶带、曲别针、缝合针及线、碘酒及酒精、消毒液、牛皮纸、卫生纸等主要实验器材及耗材。

1.1.3 供试药品 同期发情阴道海绵栓、促卵泡

收稿日期:2011-12-24

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2010BAD05B012);国家“863”计划资助项目(2011AA100307);兵团国际科技合作资助项目(2010YD39);南疆科技专项资助项目(2011BA061)

第一作者简介:刘长彬(1977-),男,河南省虞城县人,硕士,助理研究员,从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail:xlchangbin@163.com。

通讯作者:倪建宏(1969-),男,上海市人,硕士,研究员,从事动物繁殖新技术研究。E-mail:xjshznjh@163.com。

素(FSH,400 mg·瓶⁻¹,新西兰)、孕马血清促性腺激素(PMSG,1 000 IU·瓶⁻¹)、黄体酮、冲卵液(自配)、油剂青霉素、速眠新及苏醒灵(长春农牧大学军事兽医研究所)。

1.2 方法

1.2.1 超数排卵 供体均采用阴道海绵栓诱导同期发情。放栓的任意一天为0天,第13天撤栓,连续3 d每天上、下午间隔12 h肌肉注射FSH。注射总剂量为272 mg,分6次递减注射(48、48、36、36、32和20 mg),在第5针注射FSH同时撤除阴道海绵栓并肌肉注射500 IU PMSG。24 h后开始试情、人工授精等操作。

1.2.2 人工输精 根据供体试情情况,随机分成2组,一组用性控冻精采用子宫角和阴道子宫颈深部输精,每侧子宫角使用一支性控冻精;另外一组使用种公羊的新鲜精液,适当稀释,同样使用阴道子宫颈深部输精和腹腔镜子宫角输精技术,将0.1~0.2 mL精液输入子宫角。

1.2.3 冲胚 在人工授精后的第7天进行手术法取胚。实施手术前供体羊空腹24 h,供体羊手术部位刮毛、清洗、消毒,采用全身麻醉配合局部麻醉,手术部位选在乳房基部向前2~3 cm,腹中线旁2~3 cm切开长5~7 cm切口(以容得下3~4手指的宽度为宜),用中指和食指轻轻夹出子宫角以便暴露子宫体及卵巢,以利于后面的冲胚操作,详细记录左右两侧卵巢上的黄体个数,采用子宫角向子宫体的冲胚方法进行冲胚,每侧子宫角用40~50 mL的最大冲卵液量。

1.2.4 胚胎鉴定 在体视镜下对冲出的胚胎进行分级鉴定,根据胚胎形态的完整性及内细胞团的致密程度分为A、B、C级。胚胎细胞团呈均匀对称的球形,形态典型,单个分裂球的大小、颜色、密度一致,轮廓清晰,胚胎发育阶段与预期的发育阶段一致者为A级;胚胎细胞团的大小和形状以及单个细胞的颜色和密度存在一定的不规则,细胞质较致密,分布均匀,具有完好的、具活性的胚胎细胞团者为B级。胚胎细胞团的大小和形状以及单个细胞有明显变异,分裂球轮廓稍不清晰,或部分不清晰,细胞质不致密,分布不均匀,色调发暗,但仍有部分细胞结构是完好的、有活性的胚胎细胞团者为C级。

1.2.5 胚胎移植 采用微创手术,用移胚针将符合胚胎移植要求的胚胎移植到与胚胎龄同期化的子宫角内,移植后立即向颈部肌肉深部注射黄体酮1 mL。

1.2.6 妊娠检查 于胚胎移植后的45~60 d进行B超检查,统计受胎率。

1.2.7 统计与分析 采用SPSS 14.0进行数据的方差分析,数据相关分析结果表示为平均值±标准差(Mean±S)。

2 结果与分析

2.1 萨福克和无角陶赛特超数排卵的效果

从表1可以看出,萨福克和无角陶赛特肉羊超排处理后,无论在黄体数、获胚数,还是在可用胚数上没有显著差异($P>0.05$)。

表1 萨福克和无角陶赛特肉羊的超数排卵效果

Table 1 Effects of Suffolk and Poll Dorset muttons of using superovulation

品种 Breed	超排数量 Total No. of sheep by superovulation	平均黄体数 Average No. of corpora lutea	回收胚数 No. of recovered embryo	可用胚数 No. of useful embryo
萨福克 Suffolk	220	8.454±7.681a	6.534±5.487a	5.182±1.807a
无角陶赛特 Poll Dorset	168	8.917±9.228a	7.675±9.038a	6.358±5.982a

注:同一列中,相同字母表为差异不显著($P>0.05$),不同字母表为差异显著($P<0.05$)。下同。

Note: Same letter in the same column means not significant difference between treatments ($P>0.05$), different letter in the same column means significant difference between the treatments ($P<0.05$). The same below.

2.2 性控精液与普通精液获胚数比较

从表2可以看出,性控冻精(XY)和普通鲜精通过相同和不同的输精方式,在黄体数上差异不显著($P>0.05$);两种精液采用子宫角输精方式时在受精率、可用胚数存在极大差异($P<0.01$)。两种精液采用子宫颈输精方式时在受精率、可用

胚数存在极大差异($P<0.01$)。性控精液采用子宫角和子宫颈不同输精方式时胚胎受精率、可用胚数差异极显著($P<0.01$)。普通鲜精在采用不同输精方式时,子宫角输精获得了高于子宫颈输精的胚胎受精率和可用胚率,但差异不显著。

表 2 性控精液与普通精液获胚效果

Table 2 Effect of useful embryo of X-sexual controlling refrigerant sperm and ordinary semen

精液类别 Sort of semen	输精方法 Method of semen	黄体数 No. of corpora lutea	受精率/% Rate of fertilization	可用胚数 No. of useful embryo
性控冻精(XY)X-bearing sperm	子宫角 Horn of uterus	9.175±4.415a	30.05±4.653Aa	3.028±2.517Aa
	子宫颈 Cervix	8.324±6.325a	16.50±2.296Bb	1.261±0.264Bb
普通鲜精 Ordinary semen	子宫角 Horn of uterus	9.863±5.123a	75.39±6.357Cc	6.817±3.812Cc
	子宫颈 Cervix	8.926±7.398a	73.492±4.839Cc	6.195±2.634Cc

2.3 性控胚胎与非性控胚胎受胎率的比较

从表 3 可以看出,无论是环境温度、移胚方式和胚胎的级别都在相同的条件下,性控胚胎的受

胎率略低于非性控胚胎的受胎率,但无显著性差异($P>0.05$)。

表 3 性控胚胎与非性控胚胎受胎率的比较

Table3 Comparison of sexing embryo and normal embryo on pregnant rate

胚胎来源 Embryo source	环境温度/℃ Environment temperature	移植方式 Transplant way	胚胎级别 Embryo grade	受胎率/% Fertility rate
性控胚胎 X-bearing embryo	10~15	微创手术	A. B 级	41.4±3.521a
非性控胚胎 Not sexual of embryonic	10~15	微创手术	A. B 级	45.0±2.986a

3 结论与讨论

从研究结果可以看出,肉羊性控胚胎生产目前还存在胚胎受精率低、获得性控胚胎数量较少,是目前从实验室走向推广应用遇到的关键问题。这些影响因素需要做更进一步的研究。但性控精液输精所获得的胚胎质量及性控胚胎的受胎率方面没有显著差异。总之,使用肉羊性控精液的使用能够有效缩短育种间隔,迅速扩大种群。

3.1 萨福克和无角陶赛特的超排效果

由于超数排卵程序对不同品种具有不同的特异性,故超排效果存在一定差异^[8],这和王锋等^[9]、赵振华等^[10]所取得的结果相类似。羊胚胎移植在超数排卵处理时,待处理的供、受体羊,其生殖激素分泌节律是否与外源激素注射同步将对胚胎移植效果有至关重要的影响^[11]。超排效果受处理方法、处理程序、营养、药品选择等方面的因素影响,同样影响到后期的移植受胎率效果^[12-15]。供体经过超数排卵后能否取得较好的处理结果受 FSH 和 LH 能否同时启动本情期内卵泡波有关^[16]。从试验结果可以看出,两品种肉羊通过超数排卵处理后无角陶赛特在获胚胎数和可用胚数上略高于萨福克肉羊,但是没有显著差异。因此,要进一步提高绵羊胚胎移植效率和效益,生殖调控的诸多机理尚需进行深入研究^[17]。

3.2 性控精液与普通冻精在受精率及获可用胚数的比较

早在 20 世纪 60 年代后期流式细胞仪问世,主要是用于癌细胞诊断方面。1976 年, Gledhill 等首次用流式细胞仪测定 X、Y 精子的 DNA。1979 年, Moruzzi 对精子染色体长度进行测定,发现 X 精子和 Y 精子中的 DNA 含量有差异。1987 年, Johnson 等改良了流式细胞仪为分离 X 精子和 Y 精子奠定了基础,并于 1989 年有效地分离出牛精子,且分离精度达到了 80%~90%^[18-19]。该试验对性控精液通过不同的输精方式 7 d 后采集到的胚胎及未受精卵做了比较,发现性控精液冲出的胚胎未受精卵比普通精液高 1~3 倍,利用性控精液获得胚胎质量基本趋于一致,没有差异。在获可用胚上由于未受精卵的比例较高,且明显低于普通精液获得的胚胎数。关于肉羊精子分离方面的研究未见公开发表的文献。该研究还对性控精液和普通精液通过不同的输精方式获得可用胚胎上进行了研究,发现在同种输精方式及不同输精方式上性控冻精无论在卵子受精率和可用胚胎上都极低于普通精液,通过查看相关文献,主要与性控精液在采用荧光染色后,通过流式细胞仪时精子顶体受到一定损伤引起,目前关于精子在通过流式细胞仪时受到的危害程度的报道较少,关于性控精液顶体损伤及相关分子机制理论还有待进一步深入研究。

3.3 性控胚胎与非性控胚胎受胎率的比较

Baril 等研究认为,发育良好的胚胎移植妊娠率高于发育延迟的胚胎,发育同步的胚胎妊娠率居中^[20]。胚胎移植过程中,手术操作者的手法和胚胎移植位置在一定程度上也影响受胎率^[21]。在移植过程中一定要轻捏、轻拉子宫角,手指尽量不要碰到卵巢,一定要保护好卵巢上的黄体,切忌触摸到黄体,否则容易引起黄体退化造成怀孕中途流产。胚胎在体外停留时间 10 h 内在受胎率上没有显著差异^[22-23]。受体羊移植双胚虽然在一定范围内可以提高受胎率^[24-27],但从胚胎的经济价值考虑是不可取的,主要是靠双胚取得的受胎率不抵胚胎的价值。但也有研究者认为不同品种羊的移植受胎率差异显著,对于双胎率低的品种,移植双胚的成羔率显著低于移单胚者。总之,同一品种移植双胚的受胎率比移植单胚的稍高,但差异不显著^[27]。也有研究对卵巢上黄体数目的多少进行了研究,发现黄体数的多少及大小不影响受胎率,而黄体的质量是影响受胎率的关键因素^[28-29]。从这些研究者得出的结论看,胚胎移植是一个复杂的系统工程,每个环节要严格把关,受供体处理、受体选择、供(受)体处理程序和手术操作人员等因素的影响。在肉羊性控胚胎移植上的研究还未见公开报道,综合以前研究者提供的数据和理论,严格遵从胚胎移植相关操作规程。该试验研究是胚胎冲出后在 3 h 内移植到受体羊子宫角,性控胚胎和常规胚胎分别取得了 41.4% 和 45.0% 的受胎率的好成绩。

参考文献:

- [1] 黄金明,游伟,张俊功,等.性控精液在奶牛生产中的应用策略[J].动物医学进展,2006,27(1):100-104.
- [2] 李强,牛志红,刘水涛,等.常规精液与性控精液的超数排卵效果比较[J].中国奶牛,2010(7):37-38.
- [3] Catt S L, Sakka D, Bizzaro D, et al. Hoechst staining and exposure to UV laser during flow cytometric sorting does not affect the frequency of detected endogenous DNA nicks in abnormal and normal spermatozoa[J]. Molecular Human Reproduction, 1997(3):821-825.
- [4] Johnson L A. Sexing mammalian sperm for the production of offspring: The state-of-the-art [J]. Anim. Reprod. Sci., 2000, 61:93-107.
- [5] Johnson L A, Welch G R, Rens W. The Beltsville sperm sexing technology: High-speed sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI[J]. J. Anim. Sci., 1999, 77:213-220.
- [6] Seidel G E J, Schenk J L. Field trial with sexed, frozen bovine semen[R]// Proc 19th Tech. Conf on Artificial Insemination and Reproduction. Columbia, Missouri: Natl Assn of Animal Breeders Columbia, 2002.
- [7] 罗应荣,黄河,李鑫,等.奶牛胚胎性别控制技术的试验研究进展[J].中国畜牧兽医,2005,32:32-35.
- [8] 王敬军,胡大伟,刘国辉,等. FSH 剂量、受体品种及移植胚胎数对崇明白山羊胚胎移植效率的影响[J].上海交通大学学报:农业科学版,2011,29(1):38-42.
- [9] 王锋,代相鹏.激素对波尔山羊超排效果影响的研究[J].畜牧与兽医,2006,38(5):8-10.
- [10] 赵振华,周敏敏,钱红娟,等.山羊超数排卵效果的影响因素分析[J].上海畜牧兽医通讯,2008(1):48-49.
- [11] Keith J B. A history of farm animal embryo transfer and some associated techniques[J]. Animal Reproduction Science, 2003, 79:203-244.
- [12] 朱士恩.动物生殖生理学[M].北京:中国农业出版社,2006.
- [13] Stocco D M. Star protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis [J]. Annu Rep Physiol., 2001, 63:193-213.
- [14] 张嘉保,周虚.动物繁殖学[M].北京:吉林科学技术出版社,1999.
- [15] 石国庆.绵羊繁殖与育种新技术[M].北京:金盾出版社,2010.
- [16] Rubianes E, Teresa D E Castro, Kmaid S, et al. Superovulatory response to FSH treatments after different progesterone primings in ewes[J]. Small Ruminant Research, 1999, 33:156-164.
- [17] 雷赵民,吴建平, Martin Wenkoff. 绵羊胚胎移植生殖内分泌调控及其效果研究[J].草业科学, 2009, 26(6):126-131.
- [18] Johnson L A, Flook J R, Look M V. Flow cytometry of X and Y chromosome-bearing sperm for DNA using an improved preparation method and staining with Hoechst33342[J]. Gamete Research, 1987, 17:203-212.
- [19] Johnson L A, Flook J P, Hawk H W. Sex preselection in rabbits: live births from X and Y sperm separated by DNA and cell sorting[J]. Biology of Reproduction, 1989, 41:199-203.
- [20] Baril F, Khalid M, Haresign W, et al. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET Program[J]. Theriogenology, 2003, 59:1265-1275.
- [21] 代相鹏,张秀华,王锋.波尔山羊胚胎移植影响因素的研究[J].家畜生态学报,2007,28(6):58-63.
- [22] 高志敏,雷安民,窦忠英,等.波尔山羊胚胎移植技术的研究与应用[J].农业生物技术学报,2001,9(2):167-170.
- [23] 李俊杰,桑润滋,金东航,等.影响波尔山羊胚胎移植产羔效果因素研究[C]//窦忠英,陈宏.全国首届动物生物技术学术研讨会论文集.杨凌:西北农林科技大学,2004.
- [24] 苏和.内蒙古克什克腾旗绵羊鲜胚移植技术应用研究[J].内蒙古畜牧科学,1999(3):37-39.
- [25] 朴庆林,王晓阳,金香淑.绵羊冷冻胚胎移植试验报告[J].吉林农业科学,1996(3):86-87.
- [26] Armstrong D T. Factors affecting superovulation success[J]. Embryo Transfer Newsletter, 1991(9):11-17.
- [27] 王光亚,段恩奎.山羊胚胎工程[M].西安:天则出版

- 社,1993.
- [28] 李俊杰,桑润滋,金东航,等.提高波尔山羊胚胎移植妊娠率的研究[J].中国畜牧杂志,2005,41(10):18-20.
- [29] 王玉琴,赵有璋,李发弟,等.提高肉用绵羊胚胎移植成活率的研究[J].中国畜牧杂志,2007,43(9):16-18.

Application Effect of Frozen Sexing Semen on Mutton Sheep Embryos Transformation

LIU Chang-bin¹, NI Jian-hong¹, QU Ming-yue², WANG Xin-lan², LUO Wen-yi², PU Xin-zhu², ZHANG Bin¹

(1. Key Laboratory for Biotechnology of Sheep Breeding of Xinjiang Production and Construction Corps/Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation, Shihhotze, Xinjiang 832000; 2. Nongshishi 181 Groups Veterinary Station of Xinjiang Production and Construction Corps, Altai, Xinjiang 836001)

Abstract: The donors were Suffolk and Poll Dorset, recipients were Small Tail Han Sheep and Hu Sheep. The frozen sexing semen and normal fresh semen were used in insemination of donors. The fertilization rate and available embryos number of these two kinds of semen were compared in order to provide reference for the further application of frozen sexing semen in embryo production. Endoscope insemination and normal artificial insemination of those two kinds of semen were applied in embryo production of two mutton sheep breeds; the fertilization rate and available embryos number of those two mutton sheep breeds were compared, and the transfer effect of sexing embryos and normal embryos were compared as well. The results showed that the number of corpus luteum of those two breeds after superovulation showed no difference ($P>0.05$). The available embryos number from normal fresh semen was several significant higher than that from frozen sexing semen ($P<0.01$). The pregnancy rate for the recipients was 43.2% and showed no difference. However, the frozen sexing semen negatively affected fertilization rate of donors because of the sperm acrosome damage after the sperm processing in flow cytometry, the application of sexing semen could improve breeding process. Therefore, in the future research, the hot topic would be how to protect sperm while applying the X/Y sperm selection.

Key words: mutton sheep; frozen sexing semen; superovulation; laparoscope

(该文作者还有万鹏程和石国庆,单位同第一作者)

致谢:感谢胚胎移植研究室所有成员提供的帮助!

使用包衣种子需注意的事项

种子包衣技术就是把含有农药、微肥、植物生长激素等成分的种衣剂通过机械加工手段,均匀地包在种子表面。包衣种子能综合防治苗期病虫害,补充营养,可促使种子生根发芽,达到苗全、苗壮的目的。在保管和使用包衣种子需要注意 6 个方面:

- 1 包衣种子一般有剧毒,只能做种子用,绝对不能食用或做饲料。包衣种子要存放在干燥、阴凉的通风处,严防小孩和家畜、家禽接触或误食。如有误食致死的畜禽,也应深埋地下,绝对不能食用,就连包衣种子出苗后所间的苗也不能用来喂畜禽,以免中毒。
- 2 播种包衣种子时要穿防护服,戴防护手套,小孩不能参与播种。播种时不得饮食、抽烟、用手擦脸,播种后立即用肥皂水洗净手和脸。
- 3 装包衣种子的包装袋应选用聚丙烯编织袋,最好不用麻袋,以免带毒麻袋纤维飞扬被人畜吸入导致中毒。包装袋用后应烧掉或深埋,严防误装粮食和食品。盛装包衣种子的用具须经彻底洗净后方可使用。洗涮这些用具的水严禁倒在河流、池塘和井池边,可倒在田间或树根周围。
- 4 包衣种子不宜进行浸种催芽。因种衣剂溶于水后可能会对种子的萌发产生抑制作用。
- 5 包衣种子不宜在低洼易涝地和盐碱地使用。包衣种子在高湿的土壤条件下极易发生酸败腐烂;在盐碱地,种衣剂遇碱会分解失效。在 pH 大于 8 的田地不宜使用包衣种子。
- 6 包衣种子忌与敌稗等除草剂同时使用,播种后 30 d 才能使用敌稗。如先用敌稗则需 3 d 后再播种,否则容易发生药害或降低种衣剂的使用效果。