

活体采卵技术在荷斯坦奶牛繁殖中的应用

黄启震, 卢文瑾, 王丽娟, 谢彤彤, 付博凡, 袁梦怡, 王相国* (北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

摘要 [目的]为提高优质奶牛的繁殖力,保证低成本的情况下大量生产优质胚胎,对荷斯坦奶牛采用活体采卵的方式采集卵母细胞。[方法]将4头荷斯坦奶牛分为超排组和非超排组2组,超排组对试验牛注射FSH,非超排组对对照牛不采取任何处理。对荷斯坦奶牛进行活体采卵,并对卵母细胞数进行统计。[结果]共采集到12枚卵母细胞,经过受精培养后有8枚受精卵发育良好。[结论]采用优化的活体采卵程序并配合超排技术,能够更好地利用良种奶牛,以达到动物胚胎生产和辅助生殖的目的。

关键词 活体采卵;荷斯坦奶牛;体外受精

中图分类号 S857.2 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)04-0107-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.04.029



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Application of Ovum Pick-up Technology in the Breeding of Holstein Dairy Cows

HUANG Qi-zhen, LU Wen-jin, WANG Li-juan et al (College of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Abstract [Objective] To improve the fecundity of high-quality breed cattle and produce mass of high-quality embryo with low cost, ovum was collected from Holstein dairy cows by using ovum pick-up technology. [Method] Four Holstein dairy cows were divided into two groups: superovulation group(A) and non-superovulation group(B). The dairy cows in group A was injected with FSH, no treatment was made on dairy cows in group B. The ovum was collected from Holstein dairy cows by using B ultrasonic instrument and statistics on the number of collected ovum was made. [Result] 12 oocytes were obtained, and 8 fertilized eggs developed well after fertilization culture. [Conclusion] This experiment adopted an optimized ovum pick-up procedure combined with superovulation technology, which can make better use of improved dairy cows and achieve the production of animal embryo and assisted reproduction.

Key words Ovum pick-up(OPU);Holstein dairy cows;*In vitro* fertilization(IVF)

活体采卵技术(OPU),又称为阴道穿刺采卵(IVR),是1980年后兴起的一种非常实用的实验技术。近年来我国畜牧业、养殖业以及胚胎技术发展迅猛,所以对优质胚胎的需求量日益增加,市场亟需一种可以推广的新型技术来填补优质胚胎的空缺,活体采卵技术应运而生。该技术具有非常显著的优势,能够大幅度提高优质奶牛的遗传力,生产更多的优质胚胎,缩短世代间隔,加快奶牛的育种进程,降低生产成本,尤其是在对未达到生育年龄^[1]、超数排卵效果差、老龄^[2]或妊娠^[3-4]、繁殖障碍^[5]的高产母牛进行采卵表现出巨大优势。与此同时,活体采卵也有很多限制,比如需要更高端的器材设备、采卵操作难度更大,需要技术熟练的实验操作人员来进行操作。这些因素给活体采卵带来了一定的影响,尽管如此,活体采卵技术能够与体外受精、胚胎移植等技术进行配合使用,对奶牛胚胎的生产、发育机理的研究以及辅助生育技术都发挥着非常重要的作用。

活体采卵技术和体外受精、胚胎移植已经成为欧美一些发达国家的重要繁殖技术,并已经应用于商业化生产。OPU结合分离X、Y精子的性别控制技术,可为大规模工厂化生产体外性控胚胎开辟新途径。OPU是一个非常先进、重要的繁殖技术,对于加快优质奶牛的繁殖和培育速度,优化牛群结构,推动畜牧业、养殖业等相关产业的快速发展具有重要作用。种源是畜牧业发展的重中之重。当前我国畜牧生产

中良种覆盖率仅35%左右,约85%是从国外引进的。畜禽种业正面临着国际跨国种业集团种源垄断和产品进入的双重压力。挖掘与利用动物种质资源、揭示繁育机理、创新育种方法、实现高效快繁已成为当前我国畜牧业可持续发展的头等大事。

1 材料与方 法

1.1 供体牛 试验所用的供体奶牛为4头3~5岁体型大小相似、健康的荷斯坦奶牛,将其分为超排组(A组)和非超排组(B组)2组:A组,2头奶牛使用FSH进行处理;B组,2头奶牛不使用FSH处理。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器。活体采卵仪(B超仪、手柄、脚踏开关、采卵针、恒温槽、真空泵、卵泡液收集管)、显微镜、PBS液、平皿、纸巾、长臂手套、消毒乙醇、麻醉剂、耦合剂、纯水等。

1.2.2 试剂。PBS(Gibco)、肝素钠、1%胎犊血清、100 μL/mL青霉素、100 g/mL链霉素(Sigma)。

1.3 采卵前准备 采卵前先将设备打开,并将采卵仪器设备连接好,使采卵针的方向调整到正确的出针位置,真空泵调至6.267 kPa,将收集管置于37.5℃恒温槽中。供体牛站立保定,用4 mL 2%盐酸利多卡因进行硬膜外麻醉,将直肠中粪便全部清除,对外阴部进行清洗和消毒,最后用干净的纸巾检验清洗情况。

1.4 采卵 采用超声波引导穿过阴道采集卵母细胞。用温水湿润探头手柄,以便减少对牛的损害。右手将B超探头伸入到母牛阴道穹隆处,左手通过直肠把握住卵巢并将其与B超探头紧贴,使用B超仪观察卵巢的轮廓和卵泡。同时,移动卵巢使要穿刺的卵泡位于采卵器的出针位置,用把握探头

基金项目 国家重点研究计划项目(2017YFD0502200);北京市奶牛产业创新团队项目(BAIC05-2017)。

作者简介 黄启震(1992—),男,山东滕州人,硕士研究生,研究方向:动物产科及胚胎工程。*通信作者,讲师,博士,从事动物产科及胚胎工程研究。

收稿日期 2018-09-20;修回日期 2018-10-20

的手推动进针管,使针头刺破阴道壁和卵泡壁,将卵母细胞及卵泡液吸入收集管中。

1.5 卵母细胞的体外成熟(IVM) 培养液为 8.63 mL TCM-199+1 mL FBS(Gibco)+20 μ L FSH、10 μ L LH、100 μ L E₂、肝素 25 μ L、10 μ L EGF、100 μ L IGF、10 μ L PS。在培养皿中滴 100 μ L 培养液,将 COCs 加入到培养液中,然后加入石蜡油正好没过培养液,在 38.5 $^{\circ}$ C、95% 空气、5% CO₂ 的培养箱(Thermo Fisher)中成熟 22~24 h。

1.6 卵母细胞的体外受精(IVF) 从液氮中取出精液,在空气中晃动 10 s 直至精液管上的液氮挥发完毕,放入 38.5 $^{\circ}$ C 的温水中解冻约 30 s。用乙醇棉擦拭管壁,然后减掉一端封口后,将其垂直放入含有 2.0 mL 洗精液的离心管口处,再减掉另一端封口,加入 4.0 mL 洗精液,并吹打混匀,放入离心机中 1 800 r/min 离心 3 min。然后,去上清 4.0 mL,加入 4.0 mL 洗精液,1 800 r/min 离心 3 min;去上清 5.8 mL,最后加入 600 μ L 受精液,备用。

将成熟的卵母细胞吸出,放入 Hepes 液吹打使扩散的颗

粒细胞脱落,保留 3~5 层颗粒细胞。再将其用受精液洗 2~3 遍,然后放入 50 μ L 受精滴中。吸取 50 μ L 获能精液加入到受精滴中。在温度 38.5 $^{\circ}$ C、含有 5% CO₂ 的培养箱中培养 16~18 h。

1.7 受精卵的体外培养(IVC) 受精结束后,将受精卵吸入胚胎培养前液中洗 2~3 遍,将其放入 50 μ L 胚胎培养前液中,在温度 38.5 $^{\circ}$ C、含有 5% CO₂ 的培养箱中培养 48 h,然后吸出 25 μ L 胚胎培养前液,加入 25 μ L 胚胎培养后液,受精后第 4 天再半量换胚胎培养后液。

2 结果与分析

2.1 卵母细胞计数与分级 由表 1 可知,试验共获得 12 枚卵母细胞,超排组采集到 10 枚卵母细胞,非超排组采集到 2 枚卵母细胞。超排组卵母细胞数显著大于非超排组。与非超排组相比,超排组的优质卵泡比例显著低于非超排组。这表明通过超数排卵处理虽然显著增加了卵母细胞的数量,但对卵母细胞的质量会产生一定的影响。

表 1 活体采卵所得卵母细胞数统计

Table 1 Number of oocytes obtained from ovum pick-up

组别 Group	供体数 Donor number	卵母细胞分级 Grading of oocytes				卵母细胞总数 Total number of oocytes
		I 级 Grade I	II 级 Grade II	III 级 Grade III	IV 级 Grade IV	
超排组 Superovulation group	2	2	2	2	4	10
非超排组 Non-superovulation group	2	1	1	0	0	2

2.2 受精卵发育状态观察 从图 1 可以看出,将采集到的卵母细胞分别进行卵母细胞体外成熟、体外受精以及体外培养等,最终得到 8 枚发育良好的胚胎,其中死亡的 4 枚胚胎应为 IV 级卵母细胞。虽然活体采卵技术可以降低成本,配合超

排技术可得到数量可观的卵母细胞,但在胚胎存活率方面也有着弊端。总体来看,活体采卵技术在荷斯坦奶牛繁殖中起着不可替代的作用。

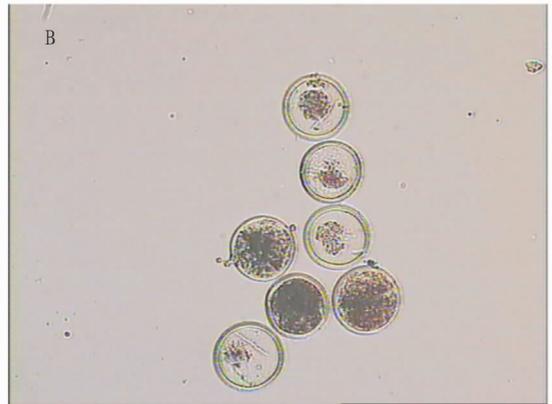


图 1 受精卵发育状态观察

Fig. 1 The development status observation of fertilized eggs

3 讨论

活体采卵技术优点是能够将母畜的系谱进行清楚记录,还可对后备老年奶牛进行卵母细胞的采集,加快畜牧业的发展^[6]。提高优质母畜卵母细胞的利用率,对优良母畜以及珍稀动物的遗传资源有着重要意义。该技术能使超数排卵效果差、老龄高产的奶牛持续提供卵子,并可利用那些有繁殖障碍的牛,使母牛得到充分利用,再结合体外受精和胚胎移

植等技术,可以大大提高优质母畜的繁殖潜力,生产更多的优质胚胎,降低优质胚胎的成本^[7-8],为畜牧业的发展提供更多的技术支持。最重要的是,使用活体采卵技术,无需将供体奶牛屠宰,可以重复使用供体牛,大大节约成本,体现动物福利。Bao 等^[9]研究表明当体内 FSH 的水平升高时,原始卵泡的数量也会相应增加,缩短原始卵泡在卵巢中停留的时间。颗粒细胞产生 FSH 受体与 FSH 有关,当受体数量增加

时卵泡颗粒细胞对 FSH 的应答也越来越明显,从而促使颗粒细胞的持续发育。

该试验结果表明,使用 FSH 激素处理供体牛,可以增加卵巢上的可见卵泡数和卵母细胞数,质量却没有减弱。该试验通过活体采卵技术共采集到 12 枚卵母细胞,其中 8 枚在受精后发育良好。Chaubal 等^[10]使用 FSH 处理,每头平均卵泡数为 (16.0 ± 5.0) ,每次采卵头均获可用胚 (2.1 ± 1.2) 枚。De Roover 等^[11]使用 FSH,每头平均穿刺卵泡数为 (11.9 ± 7.7) 枚,平均获卵母细胞 (5.6 ± 4.1) 枚,优质卵母细胞率为 32%,每头能获得可用胚 (2.0 ± 2.3) 枚。活体采卵可对供体牛进行长期采卵,并能达到良好效果。Merton 等^[12]研究表明对活体采卵牛采用 FSH 处理,频率为每 14 d 1 次,每次可获得 3.3 个可用胚胎。Goodhand 等^[13]、江明生等^[14]研究也表明,经过 FSH 处理的母牛在增加卵泡数的同时,还可以提高卵母细胞的数量。佟桂芝等^[15]研究表明,每周采集 2 次获取的卵母细胞的质量比每周采集 1 次的卵母细胞的质量高,而采卵频率与是否使用激素有关,激素处理后每周可采集 1 次,无激素处理组每周可采集 2 次,可采卵泡总数无显著差异。Reichenbach 等^[16]研究表明用 PMSG 处理并不能提高供体牛的卵泡数量和卵母细胞数。此结果与很多因素有关,不同的激素及其剂量、个体差异、操作人员的熟练程度和季节因素都会对结果产生巨大差异。该试验在采卵过程中,由于操作不当导致一头牛体内出血,这也说明在节约成本提高效率的同时,该试验技术对奶牛的损害也不容忽视。

总而言之,活体采卵技术能从系谱明确的优质高产奶牛中获得卵母细胞;活体采卵技术能使年轻、老龄、妊娠、超数排卵效果不理想的奶牛持续供给卵子,大大加快育种的进程;活体采卵技术能够充分挖掘优质母牛的繁殖潜力,批量生产良种胚胎,降低优质胚胎的生产成本,并能为卵核移植、基因工程、胚胎工程等研究提供必需的材料。OPU 技术在奶牛繁育中有着非常广阔的应用前景,而更加安全有效的活体采卵方式需要进一步研究。

4 结论

使用优化后的活体采卵技术配合超排技术、IVM、IVF 等

技术,能降低成本并更好地利用良种奶牛,以达到动物胚胎生产和辅助生殖的目的。

参考文献

- [1] LOONEY C R, LINDSEY B R, GONSETH C L, et al. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows [J]. *Theriogenology*, 1994, 41(1): 67-72.
- [2] GIBBONS J R, BEAL W E, KRISHER R L, et al. Effects of once-versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development [J]. *Theriogenology*, 1994, 42(3): 405-419.
- [3] FUJITANI Y, NISHIMURA K, KASAI K, et al. Repeated and ultrasound guided transvaginal collection and in vitro development of bovine oocytes [J]. *Anita Sci Technol*, 1995, 66(12): 1023-1030.
- [4] ROSCHLAU K, KUWER A, ROSCHLAU D, et al. Practical use of OPU/IVP in modern cattle breeding [J]. *Arch Tierz*, 2001, 44: 99-101.
- [5] BROGLIATTI G M, ADAMS G P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves [J]. *Theriogenology*, 1996, 45(6): 1163-1176.
- [6] PIETERSE M C, KAPPEN K A, KRUIP TH A M, et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries [J]. *Theriogenology*, 1988, 30(4): 751-762.
- [7] 咎利森. 牛生产学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [8] 刘伟, 杜垒, 唐国盘, 等. 活体采卵技术的研究进展[J]. *中国牛业科学*, 2006, 32(6): 64-66, 79.
- [9] BAO B, GARVERICK H A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: A review [J]. *J Anita Sei*, 1998, 76(7): 1903-1921.
- [10] CHAUBAL S A, MOLINA J A, OHLRICHS C L, et al. Comparison of different transvaginal ovum pick-up protocols to optimise oocyte retrieval and embryo production over a 10-week period in cows [J]. *Theriogenology*, 2005, 65(8): 1631-1648.
- [11] DE ROOVER R, GENICOT G, LEONARD S, et al. Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol [J]. *Anim Reprod Sci*, 2005, 86(1/2): 13-25.
- [12] MERTON J S, DE ROOS A P W, MULLAART E, et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry [J]. *Theriogenology*, 2003, 59(2): 651-674.
- [13] GOODHAND K L, STAINES M E, HUTCHINSON J S M, et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine oocyte donors treated with progestagen, oestradiol and FSH [J]. *Animal reproduction science*, 2000, 63(3/4): 145-158.
- [14] 江明生, 梁兴伟, 卢克焕. 活体采集卵母细胞技术研究进展 [J]. *中国奶牛*, 2004(3): 27-28, 66.
- [15] 佟桂芝, 宋斌, 王洪宝, 等. 活体采卵技术在牛高效快繁中的应用 [J]. *现代畜牧科技*, 2018, 37(1): 17.
- [16] REICHENBACH H D, WIEBKE N H, BESENFELDER U H, et al. Transvaginal laparoscopic guided aspiration of bovine follicular oocytes: Preliminary results [J]. *Theriogenology*, 1993, 39(1): 295.
- [17] 张军旺, 王金林, 王广军. 广东地区稻田养殖小龙虾技术 [J]. *当代水产*, 2018(5): 86-87.
- [18] 唐建清, 宋胜磊, 吕佳, 等. 克氏原螯虾种群生长模型及生态参数的研究 [J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2003, 26(1): 96-100.
- [19] 舒畅, 刘必林, 蒋瑞, 等. 基于眼柄微结构的克氏原螯虾生长分析 [J]. *上海海洋大学学报*, 2018, 27(5): 765-772.
- [20] 史为良. 内陆水域鱼类增殖与养殖学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996.
- [21] 陈彦全, 郭少阳. 标准误差在统计与测量中的使用比较 [J]. *统计与决策*, 2014(20): 75-78.
- [22] 郝拉娣. 于化东. 标准差与标准误 [J]. *编辑学报*, 2005, 17(2): 116-118.
- [23] 盛东峰, 郭翠红. 建鲤苗种体长与体重间相互关系的分析 [J]. *河北渔业*, 2009(7): 6-7, 32.
- [24] 黄诚. 新疆乌伦古湖河鲈 (*Perca fluviatilis* Linnaeus) 种群的生长模型及生态参数的研究 [J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 1993, 29(2): 271-277.

(上接第 106 页)

于 0.25~4.00, 如果是等速生长, 则 $b=3$ 或近似于 $3^{[10]}$ 。该研究中得到的 b 值为 2.561 4, 低于 3, 由此可见克氏原螯虾的生长属于异速生长。这与黄诚^[11]得出的水生动物体长与体重均呈异速生长的观点相一致。

参考文献

- [1] 农业农村部渔业渔政管理局, 全国水产技术推广总站, 中国水产学会. 中国小龙虾产业发展报告(2018) [N]. *中国渔业报*, 2018-06-12(A03).
- [2] 程慧俊. 克氏原螯虾稻田养殖生态学的初步研究 [D]. 武汉: 湖北大学, 2014.
- [3] 韦成昱, 刘西磊, 杜玉兰, 等. 离岸深水抗风浪网箱养殖海鲈体长与体重的关系 [J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(27): 118-119, 121.