文章编号: 1003-8701(2006)05-0048-04

引进肉羊胚胎移植技术应用的研究

马惠海^{2,1}, 赵玉民¹, 张嘉保², 杨德新¹, 吕礼良¹, 李鲁蒙³

(1.吉林省农业科学院 吉林 公主岭 136100; 2.吉林大学农学部; 3.吉林中和牧业生物技术有限公司)

摘要: 利用胚胎移植技术对引进优质肉羊品种进行快速繁育, 是加速育种进程与迅速提高我国绵羊肉用品质的捷径。本次非繁殖季节胚胎移植平均每只供体羊冲出可用胚 4.8 枚, 最高为 21 枚, 鲜胚移植妊娠率 86.67%, 总体达国内领先水平。

关键词: 胚胎移植; 肉羊; 应用

中图分类号: S814.8

文献标识码: A

我国是世界养羊第一大国, 绵山羊饲养总数已达 3 亿只。但肉羊业起步较晚, 无肉羊专用品种, 绵羊个体产肉水平低、肉质差。鉴于我国纯种肉羊匮乏的情况, 吉林中和牧业生物技术有限公司于 2004 年 9 月从澳大利亚引入南非肉用美利奴、杜泊等纯种肉羊共计 130 只, 与吉林省农业科学院畜牧分院、中加华枫公司技术合作进行肉羊生物技术开发与推广, 并于 2004~2005 年邀请北美胚胎移植协会 Martin 等专家, 在吉林省长岭县东六号乡进行了纯种肉羊胚胎移植技术的应用研究。

1 材料、器材、药品

1.1 供体羊与受体羊

供体羊选择: 高性能萨福克 (advance performance suffolk, APS) 2 周岁母羊 13 只, 平均体重 140 kg, 是美国在萨福克羊基础上育成的肉羊新品种, 肉用性能更加突出, 百日龄日增重可达 300~350 g; 南非肉用美利奴羊 (South Africa mutton merino) 2 周岁母羊 26 只, 平均体重 141 kg, 该品种是南非于 1978 年在德肉美的基础上选育的, 肉毛兼用, 平均毛细度为 64 支 (22~23 μm), 百日龄日增重达 300~350 g, 主要用于生产羔羊肉; 杜泊 (doper) 2 周岁母羊 26 只, 平均体重 138 kg, 这一品种是非洲著名的肉羊品种, 由波斯黑头羊 (persian) 与无角道赛特 (poll dorset) 杂交选育而成, 皮质优良, 肉用性能好, 羔羊日增重达 300 g。

受体羊选择东北细毛羊及杂种羊母羊共 500 只, 挑选其中体况良好、体重较大、无生殖疾病的经产母羊 113 只进行同期发情处理。

1.2 器材

医用呼吸机、腹腔内窥镜、肠钳、尖头解剖剪、钝头解剖剪、止血钳、集卵器、20 mL 注射器、100 mL 注射器、胚胎移植手术架、气瓶、电动剪毛器、手术刀片、医用缝合线、订书器、实物显微镜、冲胚管、培养皿、消毒卫生纸、医用喷壶 2 个

1.3 药品

冲胚液 (新西兰 icpbio Ltd.)、胚胎保存液 (新西兰 icpbio Ltd.)、增效米先、肝素钠、前列烯醇、冰袋、阿托品、FSH、PMSG、生理盐水、麻醉剂 (ketalean, 加拿大 Bimeda - MTC Animal Health Inc. 生产)、解麻醉剂 (ventipulmin solution, 加拿大 Boehringer Ingelheim Ltd., 其主要成分有克伦特罗等, 具有扩张支

收稿日期: 2006-03-20

基金项目: 科技部农业科技成果转化资金项目“肉羊生产综合技术示范与推广”(04EFN212200067)

作者简介: 马惠海 (1976-), 男, 吉林龙井人, 助研, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

气管等作用)、洗涤液、碘伏、酒精、阴道栓(CIDR)。

2 方法

2.1 供、受体羊管理

手术前 2 个月供、受体羊除放牧之外进行补饲。供体羊日采食量 1.5 kg (干物质),受体羊日采食量 1.1~1.3 kg (干物质)。

营养配方:羊草(干)65%、苜蓿草(干)15%、玉米 10%、豆粕 5%、磷酸钙 0.14%、石灰石粉 0.12%,余者为预混料。

表 1 预混料中各添加量

成分	硫酸钴	碘酸钾	硫酸铜	硫酸亚铁	硫酸锌	硫酸锰	氧化镁	亚硒酸钠	维生素 E	维生素 A
重量	2.5	0.9	9	87	35	40	100	0.075	12	1 700 IU/kg

mg/kg

营养水平:粗蛋白约 8.71%、钙 3.06 g/kg、磷 1.86 g/kg、代谢能约 8.92 MJ/kg、消化能约 10.87 MJ/kg。

2.2 超排与同期发情

供体羊埋植孕酮阴道栓 14 d,于埋栓的第 13 d 进行连续 3 d 6 次 FSH 超排注射,间隔时间 12 h,于第 5 次注射 FSH 的同时撤掉孕酮阴道栓,注射氯前列烯醇 1 mL,第 15~16 d 供体羊发情配种,第 1 次发情配种时注射促排 3 号。于发情后第 6 d 进行手术(前列烯醇与 FSH 均为加拿大生产)。受体羊与供体同期埋栓,撤栓后第 2 d 发情备用。

2.3 冲胚

2.3.1 剪毛

供体羊空腹 24 h,剪毛前肌注阿托品 1 mg,作用是在随之的麻醉后制止腺体分泌,以减少呼吸道分泌,防止分泌物阻塞呼吸道及吸入性肺炎的发生。将羊腹部朝上保定,用电动剪毛器将腹部毛剪净,抬入手术室。

2.3.2 麻醉、消毒

将供体羊保定,静脉注射 ketalean 5~15 mL,7~12 s 后羊全身麻醉倒地,将羊头向后扳与身体背部呈近似直角,把备好的经消毒的气管套管插入气管中,注意不要插入食道中,插好后抽出铜丝将气管套管露在口外部分,用中空的塑料管系在头颈部固定,然后用 20 mL 注射器将气管套管的小气囊充满气,迅速抬上可升降手术架,将四肢在手术架上保定,先喷洗涤液,用消毒卫生纸擦拭,再喷碘伏擦拭,最后喷酒精擦拭,如此重复 2 次,将处理好的羊抬至手术无菌区,将气管套管与呼吸机相连。

2.3.3 手术冲胚

采用子宫法。在乳房前腹中线(两条乳静脉之间)切开皮肤和皮下组织,钝性分离肌肉,最后打开腹膜,创口约 3~4 cm。盖上创巾,使切口暴露于创巾中部。术者将食指和中指由切口伸入腹腔,在与骨盆交界的前后位置触摸子宫角,找到后用二指夹持,牵出创口外。创口要用被生理盐水浸湿的纱布围住,牵出的子宫角不与外皮接触,沿子宫角至该侧输卵管找到卵巢,不可触摸,观察黄体 and 卵泡发育情况,若黄体大且数量多则情况良好,可以冲胚;若黄体退化(regressing),或没发情(no response),则不用冲胚,直接缝合。

准备 4 支 20 mL 冲胚液,在子宫角基部扎孔,将冲卵管插入,用注射器注入 4~8 mL 气体使气囊充满气使之固定,另一端接集卵器。在子宫角的尖端插入套管针,连接吸有 20 mL 温度在 37 °C 的冲胚液,缓缓注入,使冲胚液流以子宫角后回流到集卵器,然后用 20 mL 冲胚液重复冲洗 1 次;另一侧子宫角以同样方法冲洗。集卵器有侧面的滤网,可使细胞等杂质滤出胚胎留下,底部有孔,将多余冲胚液滤出,仅留少量以便检胚。

冲胚后将子宫角伤口作缝合处理,放回腹腔,倒入 500 mL 生理盐水加 2 支肝素钠的溶液(39 °C),然后对腹膜和外皮分别作缝合处理。

2.3.4 术后处理

将供体羊与呼吸机分离,推出手术室,肌注 Ventipulmin 5 mL,用 20 mL 针管将气管套管的小气囊空气抽出,然后慢慢抽出气管套管。肌注强效米先 1 支,使供体羊伏卧在地,过 3~8 min 后供体羊逐渐站立,可人工辅助其站立,站立后可饲喂少量优质牧草。

2.4 检胚

所用的胚胎保存液(embryo holding solution)产自新西兰 icpbio ltd.。镜检冲胚液,在实物显微镜下区分没受精(unfertilized)卵及胚胎。胚胎分 4 级:EB(early Blastocyst,囊胚早期)、HB(hached Blastocyst,囊胚晚期)、M1(Mulberry body 桑葚胚 1 期)、M2(Mulberry body 桑葚胚 2 期)。将同一级的胚胎用吸管检出放入内有 10~15 mL 胚胎保存液的培养皿,在盖上写好级别标记,备用。

2.5 移胚

受体羊剪毛、消毒、麻醉同供体。

2.5.1 腹腔内窥镜检查

在距受体羊乳房基部前腹中线部 2 cm 一侧切开 2 cm 左右的口子,将腹腔内窥镜插入左侧,通过内窥镜观察卵巢表面黄体发育情况,若见到 1~2 个黄体且颜色为黄红色,再对侧切口进行移胚。不能移胚的羊立即将伤口缝合处理。移胚的羊根据卵巢发育情况,决定移入胚胎的级别。

2.5.2 移胚

吸取胚胎方法是:用吸胚管吸入一段培养液,吸一个小气泡,然后吸取胚胎,再吸一个小气泡,最后吸一段培养液。然后进行移胚,左手持内窥镜观察腹腔内部,右手持肠钳将子宫角夹住牵引出腹腔外,在子宫角前 1/3 处用钝针头扎一钝性小孔,将胚胎慢慢注入。移胚后子宫角不必缝合,直接回归腹腔,缝合创口。

2.5.2 术后护理

移胚的受体羊要精心照料,加强营养,避免剧烈运动。

3 结果

3.1 冲胚、移胚情况

经统计,本次非繁殖季节胚胎移植平均每只供体羊冲出可用胚 4.8 枚,最高为 21 枚(南非肉用美利奴),超排的效果存在品种间差异,萨福克羊总体情况较好(平均可用胚获得 6.5 枚/只),南肉美次之(平均可用胚 5.8 枚/只),杜泊较差(平均可用胚 3.2 枚/只);共获得可用胚胎 187 枚,平均每只受体羊移入胚胎约 2 枚。详见表 2。

表 2 2005 年胚胎移植统计

移胚情况	合计数	萨福克(Suffolk)	南肉美(SA.merino)	杜泊(doper)
检查供体羊数(只)	63.0	13.0	26.0	24.0
未受精羊数(只)	20.0	1.0	15.0	4.0
怀孕羊数(只)	4.0	1.0	1.0	2.0
未发情羊数(只)	5.0	1.0	1.0	3.0
供体羊同期发情率(%)	90.5	92.3	96.5	87.5
实用供体羊数(只)	39.0	11.0	10.0	18.0
可用胚胎数(枚)	187.0	72.0	58.0	57.0
平均每只羊获可用胚胎数(枚)	4.8	6.5	5.8	3.2
检查受体羊数(只)	113.0			
受体羊同期发情率(%)	87.7%			
移入受体羊数(只)	99.0	35.0	32.0	32.0

3.2 妊娠率及产羔情况

根据受体羊未返情情况,统计妊娠率为 86.87%。4 月 18 日有一只受体羊因脑包虫而死亡,解剖后子宫内双羔均发育良好。6 月陆续产羔,产羔率 80%左右。

3.3 供体羊恢复情况

供体羊术后恢复良好,未发现有繁殖障碍的情况。

4 讨论与分析

我国的胚胎移植技术日臻成熟,但在供体羊生殖系统操作损伤及妊娠率等方面距产业化应用有微小差距。通过技术交流与应用研究,我们认为胚胎移植技术应重点考虑和提高完善以下几点:

①管理因素。我们的胚胎移植技术往往仅注重技术操作、药物等层面,而未将其当作一个系统来看,包括供受体羊选择、生殖系统检查、供受体羊前期强化饲养和操作的程序化等,不能因一些小环节上出现疏漏,影响整个胚胎移植效果。

②操作的无菌化。从器械消毒到操作的无菌化应严格控制。

③药物的高效及合理使用。本次胚胎移植在药物使用方面较成功:使用的大多为加拿大及新西兰 icpbio 公司生产的药物,药效稳定;对药物的使用较为合理,如供体腹腔术后注入 500 mL 肝素钠与生理盐水的溶液,减少粘连,肌注强效米先 1 支减少感染;供体羊麻醉前注射阿托品,麻醉后注射 Ven-tipulmin 等。

④受体移胚应使用腹腔内窥镜,减小创口长度,减少感染几率。

⑤胚胎分级细致。根据受体卵巢发育情况移植不同级别的胚胎。

⑥手术操作的熟练度。在操作熟练的情况下不仅可以提高整个程序的效率,且由于手术时间缩短及胚胎保存时间缩短可减少对供体及胚胎的损伤。本次胚胎移植每天 4 h 内约进行 13 只供体羊的检查、冲胚,4h 内进行 18~30 只受体羊的检查、移胚,效率较高。

本次胚胎移植属非繁殖季节冲胚,预计可用胚胎平均每只供体羊获得 5 枚以上,但实际结果略低,分析原因如下:

①供体羊中初产羊较多,有的生殖系统发育情况不好。

②品种间差异显著,高性能萨福克(APS)的适应性较好,应激反应小,南非肉用美利奴对麻醉药物反应强烈。

③配种的前期工作未作好,因种公羊多为 2 龄羊,且原来在澳洲处于草原散养,未经调教,因此配种过程中出现漏配,检查供体羊 63 只,其中未受精的羊为 20 只,占 31.7%。

④供体羊营养水平略低。

参考文献:

- [1] 张冀汉,中国养羊业现状及发展对策(上)[J].草食家畜,2003,3(1):1-4.
 [2] 岳文斌,路建新.舍饲养羊新技术[M].北京:中国农业出版社,2002.6.

Studies on Application of Introduced Embryo Transplantation Technology of Mutton Sheep

MA Hui-hai, ZHAO Yu-min, ZHANG Jia-bao, et al.

(Branch of Animal Husbandry, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province,
Gongzhuling, 136100, China)

Abstract: It is a good way to speed up breeding and enhance quality of sheep in our country using embryo transplantation of import mutton sheep. In this experiment in non-reproduction season, 4.8 embryos on average were gotten from every embryo supply sheep and the maximum was 21 embryos. The gestational ratio was 86.67% for fresh embryo transplanting. The study reached national advanced level.

Key words: Embryo transplantation; Mutton sheep; Application