

和牛超数排卵及胚胎移植效果观察

鲁立刚¹, 王二耀², 施巧婷², 楚秋霞², 朱肖亭², 徐照学^{2*}

(1. 毕节市畜牧兽医科学研究所, 贵州 毕节 551700; 2. 河南省农业科学院畜牧兽医研究所, 郑州 450008)

摘要: [目的] 为了研究和牛超数排卵和胚胎移植的效果, [方法] 试验以和牛作供体, 荷斯坦青年母牛作受体, 采用 PG + FSH 方案对 7 头和牛供体进行超数排卵处理, 用非手术法取胚并进行鲜胚移植。[结果] 结果表明, 采用 PG + FSH 方案头均获得胚胎数为 (11.29 ± 4.86) 枚, 可用胚胎 (5.86 ± 3.27) 枚 (A 级和 B 级); 鲜胚移植 (A 级和 B 级) 妊娠率为 51.22%。[结论] 说明采用该方案对和牛供体进行超数排卵, 并进行鲜胚移植的效果较为理想。

关键词: 和牛; 超数排卵; 胚胎移植

中图分类号: S823

文献标识码: A

文章编号: 1001-9111(2022)04-0006-05

胚胎移植技术自 1890 年创立至今, 经历了 130 余年的发展与完善, 已成为现代畜牧业尤其是高价值低繁殖力畜种繁育中不可或缺的技术手段。牛是单胎大家畜, 其繁殖周期较长, 繁殖力较低, 用超数排卵与胚胎移植 (MOET) 相结合的技术进行扩繁效果好, 且技术成熟。因此牛的胚胎移植技术在实际生产中得到了广泛应用。据国际胚胎移植协会统计, 2018 年世界范围内共利用外源促性腺激素超排供体母牛 76 076 万头, 获得可用胚胎 469 967 万枚, 头均 6.2 枚/次^[1]。

和牛 (Wagyu) 原产于日本, 是世界公认的良好肉牛品种, 肉质特点为肌肉纹理细微, 大理石花纹明显, 口感细嫩、风味独特, 是生产优质高档雪花牛肉的理想品种^[2-3]。据统计, 日本和牛饲养量高达 180 万头, 能满足 1 亿人对雪花牛肉的消费需求。由于日本政府全面禁止和牛遗传物质 (包括活牛、精液和胚胎) 出口, 目前国内饲养的纯种和牛存栏数量极其有限, 且以和牛作为供体进行超数排卵并进行胚胎移植的研究报道较为鲜见。仅见石晓兵等^[4]研究了夏季青年和牛胚胎移植效果分析, 赵善江等^[5]研究了澳洲和牛超数排卵与体内胚胎生产的影响因素。另有毕江华等^[6]、隋鹤鸣等^[7]、赵明礼等^[8]分别从超数排卵次数对和牛体内胚胎生产的

影响, 不同 FSH 剂量对和牛胚胎移植后代超数排卵效果的影响, 以及超排前卵巢上的有腔卵泡数量多少对青年和牛体内胚胎生产效率的影响方面进行了研究。为此, 2019 年 3—6 月, 笔者访学期间有幸参与了导师团队在安徽宿州草原牧业开展的以和牛作供体、荷斯坦奶牛作受体的和牛超数排卵及胚胎移植试验。本试验通过非手术法取胚并进行鲜胚移植, 以观察和牛超数排卵及胚胎移植效果, 以期以后的科研提供借鉴与参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供体牛选择 试验选取安徽宿州草原牧业饲养的健康状况良好、无生殖系统疾病、无传染性疾病, 且发情周期正常、膘情适中的经产和牛 8 头作为供体牛 (试验过程中淘汰 1 头, 实际 7 头可用)。

1.1.2 受体牛选择 试验选取安徽宿州草原牧业饲养的具有完整的繁殖周期、体格发育正常、体况良好、体质健康的青年荷斯坦母牛或经产 (1~2 胎) 荷斯坦母牛 60 头作为受体牛。

1.1.3 试验药品及器械 主要药品: 垂体促卵泡素 (FSH), 加拿大进口, 规格: 400 mg/瓶 (20 mL 稀释); 氯前列烯醇 (PG), 上海市计划生育科学研究所

收稿日期: 2022-03-22 修回日期: 2022-04-26

基金项目: 贵州省高层次 (“千” 层次) 创新型人才培养计划项目 (2015); “西部之光” 访问学者计划项目 (2018)

作者简介: 鲁立刚 (1982—), 男, 硕士, 高级畜牧师, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。

* 通讯作者: 徐照学 (1961—), 男, 博士, 研究员, 主要从事牛繁殖和饲养技术研究。

生产,规格:0.2 mg/支(2 mL);2% 盐酸普鲁卡因,山东方明药业生产,规格:40 mg(2 mL)。MEM, Gibco 公司生产,规格:9.73 g;保存液(Holding),美国 ICP 公司生产,规格:50 mL;促黄体素释放激素(A3),宁波三生生物科技公司生产,规格:25 μ g。主要器械:法国 IMV 卡苏式胚胎移植枪(适用于直径 3 mm 外套,带蓝环)、法国 IMV 直径 3 mm 的输胚枪无菌硬外套、IMV 输胚移植软外套、体视显微镜、B 超妊娠诊断仪、一次性塑料注射器(5 mL、10 mL、20 mL、100 mL)、一次性长臂手套、乳胶手套等。

1.2 方法

1.2.1 供体牛超数排卵处理方案 供体牛超数排卵采用 PG + FSH 方案,即:3 月 10 日对供体牛按 2 支/头剂量肌肉注射 PG,间隔 10 d(3 月 21 日)后再按 2 支/头剂量肌肉注射 PG。再间隔 11 d 后连续 4 d(即 4 月 2、3、4、5 日)按 3 mL、2.5 mL、2 mL、1 mL 每天 2 次(早上 7:00、晚上 19:00)减量肌肉注射 FSH,并在 4 月 4 日晚上和 4 月 5 日早上按照 2 支/头剂量肌肉注射 PG。4 月 6 日晚上进行第 1 次人工授精(记为 0 天),4 月 7 日中午进行第 2 次人工授精(2 次人工授精使用同一头种公牛的精液),并同时按 25 μ g/头的剂量注射促排 3 号。4 月 13 日(配种后第 7 天)冲胚。

1.2.2 受体牛同期发情处理方案 受体牛同期发情采用 PG 法,即:3 月 21 日早上按照 2 支/头的剂量肌肉注射 PG,4 月 4 日、4 月 5 日早上再按 2 支/头的剂量肌肉注射 PG,4 月 6 日观察受体发情情况并做好记录,4 月 13 日通过直肠检查卵巢黄体发育情况择优移植。

1.2.3 胚胎采集方法 供体和牛经超排及人工授精后第 7 天采用二路冲卵管法进行非手术冲胚。步骤如下:

(1)将供体牛保定,用 2% 普鲁卡因(剂量为 4 ~ 6 mL)进行荐尾间隙硬膜外腔麻醉。

(2)用子宫颈粘液去除棒吸除粘液。

(3)将带钢芯的冲卵管插入阴门,达到子宫颈口。用直肠把握法引导冲卵管穿过子宫颈并到达子宫角前端(靠近子宫颈一侧)。

(4)将钢芯缓慢抽出 10 ~ 15 cm,用 20 mL 注射器给冲卵管气囊注入约 10 ~ 15 mL 空气,抽出冲卵管钢芯。

(5)用 100 mL 注射器每次吸取约 60 mL 冲卵液从冲卵管三通处注入子宫角(直到略有注射阻力

为止),然后回收冲卵液。每侧子宫角重复冲卵数次,冲卵液总用量约 500 mL。

(6)将回收液放到集卵杯过滤,在室温下(18 ~ 22 $^{\circ}$ C)静置 5 ~ 10 min 后镜检。

1.2.4 胚胎级别鉴定 根据胚胎的轮廓、细胞发育的均匀性、细胞色泽等形态学标准,胚胎按质量优劣可分为 A、B、C、D 4 个等级^[9-10]。A 级:优良胚胎。胚胎发育阶段与胚龄一致,形态典型,呈球形,卵细胞和分裂球的轮廓清晰、细胞质致密、色泽和分布均匀一致,透明度好,无附着细胞和泡液;B 级:普通胚胎。胚胎发育阶段和胚龄基本一致,与典型胚胎相比稍有变形,但卵细胞和分裂球的轮廓清晰、细胞质较致密、分布均匀、可见一些附着细胞和泡液,变形细胞约占 10% ~ 30%;C 级:不良胚胎。胚胎发育阶段与胚龄不太一致,形态变化明显,卵细胞和分裂球的轮廓稍不清晰或部分不清晰、细胞质不均匀、色泽发暗、结构较松散,游离细胞或泡液较多,变性细胞占 30% ~ 50%;D 级:变性、退化胚胎。轮廓模糊,色调暗,结构松散,碎片细胞和泡液很多,变性细胞约占 50% ~ 80%。

一般而言,A、B、C 级为可用胚胎,但 C 级胚胎移植成功率较低,若以生产为目的则不建议使用,D 级胚胎不宜移植。

1.3 数据统计分析

试验相关数据采用 SAS 统计分析系统(SAS 9.0)^[11]进行分析。不同等级(A、B 级)胚胎移植效果、不同发育阶段(桑椹胚、囊胚)胚胎移植效果用百分率表示,其差异显著性用 χ^2 检验, $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 超数排卵效果

通过对 7 头供体和牛采用 PG + FSH 方案进行超数排卵并 2 次人工授精处理后,第 7 天用非手术法采集胚胎,结果见表 1、表 2。

从表 1、表 2 可以看出:试验采用 PG + FSH 方案对供体和牛进行超数排卵处理,整体效果较为理想,头均胚胎数为(11.29 $\pm$ 4.86)枚,头均可用胚胎数[A 级、B(+/-)级]为(5.86 $\pm$ 3.27)枚。说明在本次和牛超数排卵试验中,药品剂量使用合理。需要说明的是 11002 号供体母牛,冲胚过程中一共获得了 22 枚胚胎,但由于其生殖系统疾病,所获取的胚胎均已退化或死亡,其原因可能是配种过程中造成生殖道感染进而引发炎症所致。

表 1 供体牛超数排卵效果

供体牛号	胚胎数/枚	退化或死亡/枚	可用胚数/枚	胚胎发育阶段					
				桑椹胚	致密桑椹胚	早期囊胚	中期囊胚	扩张囊胚	孵化囊胚
17135	右	2	1	1	1A				
	左	7	5	2	2A				
15016	右	4	1	3	2(B-)		1(B+)		
	左	3	0	3	1(B-)		2(B+)		
15020	右	10	3	7	4A,3B				
	左	3	1	2	1A		1A		
11002	右	16	16	0					
	左	6	6	0					
11006	右	6	2	4	1A,2B		1A		
	左	1	0	1	1B				
15026	右	7	1	6	2A,1B		2A	1A	
	左	2	0	2	2B				
11010	右	5	1	4	2A,2B				
	左	7	1	6	3A,2B		1A		
合计		79	38	41					

注:表中大写字母 A、B 表示胚胎等级。

表 2 供体牛头均获胚数/头均可用胚数

母牛数/头	获胚数/枚	头均获胚数/枚	可用胚数/枚	头均可用胚数/枚
7	79	11.29±4.86	41	5.86±3.27

2.2 胚胎移植效果

将 7 头和牛超数排卵后获得的 41 枚可用胚胎(A、B 级)分别移植给 41 头经过同期发情处理的荷斯坦空怀母牛,40 d 后采用直肠和 B 超检查进行妊娠检查,妊娠效果见表 3。

从表 3 可以看出:本次试验共移植 41 枚胚胎,

妊娠 21 头,妊娠率为 51.22%。其中,按胚胎等级分,则 A 级胚胎移植妊娠率为 54.55%(12/22),B 级胚胎移植妊娠率 47.37%(9/19);按胚胎发育阶段,则桑椹胚移植妊娠率为 46.88%(15/32),囊胚移植妊娠率为 66.67%(6/9)。

表 3 胚胎移植效果

项目	样本数(n)	按胚胎等级		按胚胎发育阶段	
		A 级	B 级	桑椹胚	囊胚
移植胚胎数/枚	41	22	19	32	9
移植妊娠数/头	21	12	9	15	6
妊娠率/%	51.22	54.55	47.37	46.88	66.67

2.3 不同等级、不同发育阶段胚胎移植效果比较

试验采用 χ^2 检验对不同等级(A 级、B 级)、不同发育阶段(桑椹胚、囊胚)胚胎移植妊娠率进行差异显著性检验。结果表明:不同等级胚胎移植妊娠率无显著差异($P=0.8846$);不同发育阶段胚胎移

植妊娠率差异不显著($P=0.5016$)。

3 讨 论

3.1 超数排卵效果

超数排卵是指在母畜发情周期中的适当时期人为地注射外源促性腺激素,从而促使卵巢中卵泡发

育和排卵的数量大大增加的方法。此法在低繁殖力畜种中使用较为广泛。由于牛是单胎大家畜,自然状态下一个发情周期通常只排1枚成熟卵母细胞。因此,为了在一个发情周期内获得更多的卵母细胞,就需要通过注射外源激素促使其排出更多的成熟卵母细胞。

根据之前的报道,李金辉等^[12]用FSH+PG法处理秦川牛获得头均可用胚数4.2枚左右;刘俊平等^[13]用FSH+PG+GnRH法处理奶牛获得头均可用胚数6.2枚左右;乔海生等^[14]用CIDR+GnRH+FSH+PGF法处理供体牛获可用胚数为5.4~8.8枚;和占星等^[15]用FSH+PG法处理在全放牧条件下的婆罗门牛和BMY牛,获得头均可用胚数为3.31枚。另据石晓兵等^[4]选用27头11~13月龄青年和牛作供体,采用CIDR+FSH+PG法进行超数排卵,共获得和牛胚胎274枚(头均10.15枚)、可用胚胎173枚(含C级胚胎),头均可用胚胎6.41枚。

本试验中,采用PG+FSH方法对和牛进行超数排卵,头均获得胚胎数为 (11.29 ± 4.86) 枚,可用胚胎 (5.86 ± 3.27) 枚(只统计A级和B级胚胎)。若剔除11002号供体母牛因后期感染而未能提供可用胚胎因素,本试验实际头均可用胚胎数为 (6.83 ± 2.41) 枚,且本试验所用供体和牛平均年龄在5岁以上,因此,与前述报道相比,本试验超数排卵效果较为理想。

3.2 胚胎移植效果

胚胎移植的效果主要是通过移植妊娠率来衡量。本试验综合妊娠率为51.22%(21/41),略低于石晓兵等^[4]报道的53%。究其原因可能是由于胚胎移植效果受胚胎质量、供受体的同期性、移植操作技术、受体牛营养及饲养管理水平等因素的影响,移植效果具有诸多的不确定性。因此,要想获得较好的胚胎移植效果,供体牛超数排卵、受体牛胚胎移植过程中的每一个环节都必须严格把控^[16-17]。

此外,本试验中共移植A级胚胎22枚,妊娠率54.55%,移植B级胚胎19枚,妊娠率47.37%,但二者的移植妊娠率无显著差异($P=0.8846$)。这与石晓兵等^[4]得出的“一级胚胎移植受胎率(56.10%)显著高于二级胚胎(46.30%)($P<0.05$)”的结论以及西贝正彦等^[18]报道的“品质越好受胎率越高($P<0.05$)”的结论相悖。另外,本试验中共移植桑椹胚32枚,移植妊娠率为46.88%(15/32),移植囊胚9枚,移植妊娠率为66.67%(6/9),二者差异亦不显著($P=0.5016$)。这一结论与隋鹤鸣^[7]、西贝正彦等^[18]的研究结果相一致。

4 结 论

(1)试验采用PG+FSH方案按照总剂量PG 8支/头、FSH 17 mL/头(4 d减量注射),并辅以25 μ g/头促排3号对供体和牛进行超数排卵,效果较为理想。

(2)试验鲜胚移植妊娠率为51.22%,基本达到实际生产水平。不同等级(A级、B级)胚胎、不同发育阶段(桑椹胚、囊胚)胚胎对移植妊娠率均无显著影响。

(3)胚胎移植是一个系统工程,其移植效果受胚胎质量、移植操作熟练程度、受体牛营养及饲养管理水平等诸多因素的影响,只有每一个环节都尽可能做到尽善尽美,才有可能获得较为理想的移植效果。

参考文献:

- [1] VIANAJ. 2018 statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals[J]. Embryo Technology Newsletter, 2019, 37(4): 7-25.
- [2] 侯仕农,王新生,高顺平,等. 纯种和牛与荷斯坦牛杂交后代与荷斯坦公牛生产性能对比分析[J]. 当代畜牧, 2015(26): 81-82.
- [3] GOTOH T, NISHIMURA T, KUCHIDA K, et al. The Japanese Wagyu beef industry: Current situation and future prospects: A review[J]. Asian-Australas J. Anim. Sci., 2018, 31(7): 933-950.
- [4] 石晓兵,董红,卿胜奎,等. 夏季青年和牛胚胎移植效果分析[J]. 草食家畜, 2019, 11(6): 22-32.
- [5] 赵善江,隋鹤鸣,郝海生,等. 澳洲和牛超数排卵与体内胚胎生产的影响因素研究[J]. 畜牧兽医学报, 2021, 52(2): 420-428.
- [6] 毕江华,冯春涛,李素霞,等. 纯种和牛快速扩繁关键技术研究[J]. 中国畜牧兽医, 2017, 44(6): 1784-1789.
- [7] 隋鹤鸣. 优质和牛超数排卵和胚胎移植技术的研究与应用[D]. 长春: 吉林大学, 2018.
- [8] 赵明礼,郝少强,王娜,等. 超排前有腔卵泡数对青年和牛体内胚胎生产效率的影响[J]. 中国畜牧杂志, 2019, 55(3): 63-65.
- [9] 童伟文,田永祥. 牛胚胎移植技术发展概况[J]. 湖北畜牧兽医, 2004(6): 16-17.
- [10] 王念功,马群山,王守岩,等. 奶牛胚胎移植实用技术的研究[J]. 黑龙江动物繁殖, 1998, 6(4): 6-7.
- [11] 鲁绍雄,连林生. SAS统计分析系统在畜牧科学中的应用[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003.
- [12] 李金辉,王新庄,梁家奎,等. 秦川牛超数排卵效果的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2007, 34(2): 136-138.
- [13] 刘俊平,刘凤军,安志兴,等. 牛胚胎移植产业化超数排卵的系统研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2008(2): 12-17.
- [14] 乔海生,铃木达行,AGUNG B. CIDR结合GnRH在牛超数排卵中的应用[J]. 畜牧与兽医, 2005, 37(7): 26-27.
- [15] 和占星,和协超,张继才,等. 全放牧婆罗门牛和BMY牛胚胎回收适期的探讨[J]. 西南农业学报, 2009, 22(2): 467-469.

- [16] 赵霞, 乌仁图亚, 苏雅拉图, 等. 国产药物、激素在羊超数排卵胚胎移植工作中的成功应用[J]. 畜牧兽医杂志, 2021, 40(5): 23-25, 30.
- [17] 赖泽汇, 林红新, 苏银池. 牛羊胚胎工程技术的研究现状及进展[J]. 河南畜牧兽医(综合版), 2021, 42(1): 5.
- [18] 西贝正彦, 程文定, 译. 影响牛胚胎移植受胎率的诸因素[J]. 中国奶牛, 1996(3): 33-36.

Effect Observation on Superovulation and Embryo Transfer of Wagyu

LU Li-gang¹, WANG Er-yao², SHI Qiao-ting², CHU Qiu-xia², ZHU Xiao-ting², XU Zhao-xue^{2*}

(1. Bijie Institute of Animal Husbandry and Veterinary Science, Bijie, Guizhou 551700;

2. Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450008)

Abstract: [Purpose] In order to study the effect observation of superovulation and embryo transfer of Wagyu, [Method] 7 Wagyu as donors were superovulated by PG + FSH scheme and young Holstein cows as recipients. Embryos were obtained by non-surgical method and the fresh embryos were transferred. [Result] The results showed that the average number of embryos obtained by PG + FSH scheme was (11.29 ± 4.86) , (5.86 ± 3.27) embryos were usable (Grade A and B). The pregnancy rate of fresh embryo transfer (Grade A and B) was 51.22%. [Conclusion] It showed that the effect of superovulation for Wagyu and fresh embryo transfer was very good.

Key words: Wagyu; superovulation; embryo transfer

(上接第 5 页)

Construction of the Recombinant Adenovirus of Qinchuan Cattle *PDHB* Gene

ZHANG Yu^{1,2}, WANG Xiao-yu¹, ZHOU Xing², QIU Ju¹, ZAN Lin-sen^{1,3}, LI An-ning^{1,3*}

(1. College of Animal Science and Technology, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100;

2. Longri Breeding Farm of Sichuan Province, Hongyuan, Sichuan 624400;

3. National Beef Cattle Improvement Center in China, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: [Objective] The aim of this study was to construct the recombinant adenovirus vector with Qinchuan cattle *PDHB* gene, in order to provide a basis for studying *PDHB* gene functions in the bovine intramuscular preadipocytes differentiation process. [Method] The *PDHB* gene was cloned with the primers designed according to the *PDHB* mRNA sequence (GenBank Accession No. NM_001035435). After sequencing validation, the *PDHB* gene was cloned into a shuttle vector pAdTrack-CMV. After digested and linearized by *Pme* I, it was transformed into *E. coli* BJ5183 competent cells containing backbone vector pAdEasy-1 to obtain recombinant adenovirus plasmid pAd-*PDHB* by homologous recombination. Further, the recombinant plasmid was digested and linearized by *Pac* I, then transfected into HEK 293A cells for virus packing, amplifying and titer testing by GFP labelling method. The relative mRNA expression of *PDHB* gene was detected by qRT-PCR in the bovine intramuscular preadipocytes which were infected with virus Ad-*PDHB*. [Result] After sequencing validation, the sequence of cattle *PDHB* CDS cloned in this assay was consistent with the counterpart in GenBank. The recombinant adenovirus Ad-*PDHB* was successfully constructed. The virus titer of the Ad-*PDHB* was 1.66×10^9 PFU/mL. [Conclusion] In this study, we constructed the recombinant recombinant adenovirus plasmid pAd-*PDHB* and acquired the high titer recombinant adenovirus Ad-*PDHB*.

Key words: Qinchuan cattle; *PDHB* gene; adenovirus; intramuscular preadipocytes