

奶牛虽有较强的抗寒能力,但环境温度在8℃—17℃才能发挥最佳生产性能。寒潮和暴雪造成奶牛冷应激,导致奶牛免疫力降低、产奶量下降、繁殖机能减退、消化机能紊乱、乳头冻伤、乳房炎多发,路面结冰、湿滑造成奶牛摔倒,发生骨折、流产等情况;特大暴雪会导致牛舍倒塌,给奶牛养殖业造成较大影响。为将冷应激对奶牛养殖的损失降到最低,保证当前正常奶业生产,建议采取以下技术措施。

寒潮和大雪天气下奶牛养殖应对与预防措施



■暴雪后倒塌的牛舍



■奶牛乳头冻伤

排查安全隐患

对牛舍、待挤区、挤奶厅、饲料仓库、草料库等存在安全隐患的棚顶进行排查,如若发现安全隐患需要及时加固和维修,防止冬季大雪、大风天气压塌和吹翻圈舍顶棚;检查给水系统对暴露在外的给水管道、水龙头,在入冬前要进行防冻包裹处理,对于可以暂停使用的供水管道可以暂时关停。牛舍饮水管道需使用保温棉进行包裹,以防水管被冻裂;饲料贮存、加工区的电器线路应及时进行检修,同时也要注意生活区用火、用电安全,场区内需要配备足够的消防设备,做好场区防火工作,

牛舍防寒保暖

牛舍两端安装大门,防止穿堂风,有条件可设置风斗,在进风侧设置补充热源,提高牛舍内温度。将牛舍迎风面的门窗和墙壁堵严,防止贼风侵袭;及时堵塞牛舍门、窗墙壁的漏风处,在条件允许情况下,将牛舍内温度控制在13℃左右;为了保证牛舍采光,选用透光性好的塑料膜、采光板将窗户密封,窗户的玻璃或采光板应保持干净,有利于采光,泌乳牛舍夜间开启牛舍内照明灯,保证16小时光照时间,有利于奶牛机体内催乳素分泌,

提高奶牛产奶量;为保证牛舍空气质量,在晴朗无风的白天,可以将牛舍的南侧门窗部分打开,做好牛舍的通风,有利于有害气体的排放,在保证牛舍通风换气时也要防止贼风的产生,不要让冷空气直吹牛体,在通风换气时,尽量降低气流的速度;天气晴朗时,可在每日11:00—15:00时,将牛群赶到运动场内进行活动,夜间将圈舍门窗关闭,保证夜间牛只在圈舍内休息,避免牛只夜间在运动场内受寒挨冻,避免冻伤等疾病的发生。

设备设施管理

拖拉机、装载机要及时更换冬季油

料,气温低于-10℃时,机械夜间需放入室内,不具备条件的可使用发动机加热装置或给发动机覆盖棉被。使用牛粪或沙土等在粪渠上层覆盖,保证冬季粪渠畅通。持续低温时,刮粪机夜间启动运转,保证链条及转股轮箱不被冻死。加大粪渠回冲频次,保证粪渠内的污水结冻,避免粪渠结冰。及时清除卧床上的粪便,更换卧床垫料、保证卧床垫料干燥、松软。

含水量较高的粗饲料的管理

对于青贮窖、湿粮玉米窖和露天存放的裹包青贮,加盖棉被等措施,杜绝或减少冻层,饲料取用要做到现取、现喂,以防结冰。做好豆腐渣、啤酒糟、甜菜丝、胡萝卜等多汁饲料的防冻和缓冻工作。

妊娠牛和犊牛的特殊养护

冬季地面湿滑,妊娠期奶牛饲养管理不当易发生流产或死胎。对于新产牛,要建立单独的分娩舍并铺设长的碎稻草,营造安静舒适的产犊环境,出入产房的通道及时清扫积雪或铺设稻草帘子防止牛只滑倒受伤或流产,新产牛尽量使其饮用清洁温水。要保证产房温度,新产母牛稻草厚度超过15厘米,犊牛出生后立即用锯末和干布

将犊牛擦干,快速烘干被毛,避免发生犊牛感冒、肺炎和消化不良性腹泻以及其他并发症;舍外犊牛岛在持续低温来临前应全部移入舍内,犊牛舍应设置取暖设备,必要时可为犊牛制作专门的马甲保温。犊牛喂奶时控制奶温,冬天犊牛的进食奶温比夏天高0.5℃—1℃,温度以39℃—39.5℃为宜;对于断奶犊牛采用小圈低密度群居饲养模式,圈舍四周可用草垛等物品设置挡风墙。

奶厅的特殊管理

保证奶厅供暖,延长奶厅设备冲洗抽空时间,将管道残水抽净,清洗后检查设备易结冰部位,如有残留水则进行人工排水排污。冬季禁止用水冲洗奶牛乳房,保持奶牛乳房干燥,使用高护肤型防冻药浴液,乳房肿胀的新产牛更容易乳头龟裂,需要格外关注。挤奶厅和牛舍距离较远及转运通道温度过低的,可暂时使用乳罩,以防止奶牛乳头冻伤。

饲料质量和牛群营养

低温暴雪发生后,要及时调整日粮营养成分和采食量,以满足奶牛冬季维持需要。饲料中精料供给量增加5%—10%,另外,还要增加矿物元素和维生素

的供给量。寒冷季节奶牛易缺乏维生素A和维生素E,要重视这两种维生素的添加,其喂量可提高1倍,也可以通过补喂胡萝卜和优质豆科牧草的方式来补充维生素等。采用TMR喂饲的牛场,可以将TMR的含水量调整到45%—50%,并要做到少添、勤添,以防冻结,避免奶牛消化系统疾病及流产的发生。

加大难孕低产、体弱患病牛的淘汰比例

低温暴雪期间,牧场养殖成本增加,体弱患病牛治疗恢复期延长,为减少亏损,此阶段加大难孕低产、体弱患病牛的淘汰力度,调整牛群结构保证牧场效益。为避免极寒冬季产犊护理难度大,成活率低的情况发生,牧场应科学制定配种计划,使产犊高峰避开低温暴雪多发的月份。

原料奶运输

冬季道路积雪、结冰,导致饲草料等供应物资及鲜奶运输不畅,加大了人工费用和运输成本。必要时应联系当地农业农村局、乳品企业和奶业协会,积极与道路运输部门联系配合,清理严重雪阻路段,保证物资及原奶的运输。(奶牛产业技术体系网)

牛OPU-IVF技术发展现状和趋势

OPU-IVF技术包括卵母细胞的采集和成熟培养、精子获能、体外受精和胚胎早期培养等过程,本文主要对牛体外胚胎生产过程中的活体采卵、卵母细胞成熟、体外受精和胚胎培养等技术发展现状进行了简要概述,进一步探讨了牛OPU-IVF技术在国内外应用趋势,以及加快推进牛体外胚胎生产技术在国内外研究与应用进程的重要性。

□徐华 车瑞香 朱捷

卵母细胞的采集

卵母细胞的采集分为活体采卵和屠宰场获得两种途径。由于屠宰场供体来源、生产性能、遗传缺陷等情况不明,很难建立完整的后代育种系谱。因此,目前以牛育种为目的的体外胚胎生产,其卵母细胞的来源越来越多地以活体采卵为主要采集手段。

1、活体采卵

活体采卵(OPU)是选择体型外貌、生产性能和遗传基础均优异的母牛作为供体,通过B超仪或内窥镜引导对供体牛卵巢上的2—8毫米卵泡进行穿刺、抽吸,收集卵泡液获得卵母细胞的技术。一般采卵频率为1—2次/周。由于使用B超采卵操作简单,对供母牛造成的应激较小,可以连续进行采卵,且不影响母牛再次发情和妊娠,有利于生产体外胚胎和批量胚胎移植工作的开展,因此,B超活体采卵成为目前应用最广泛的卵母细胞采集技术。

2、影响活体采卵的因素

供体母牛:国外常选择2—6月龄犊牛应用OPU技术采集卵母细胞,但是与成年母牛卵母细胞相比,幼龄牛的卵母细胞发育率较低,随着年龄增长,卵泡数量明显增加,卵的数量和质量也会逐渐提高。在选择OPU供体牛时,可以对预选的犊牛进行基因组检测,根据评估的育种值高低提前优中选优,这样可以加快扩大优秀种质资源群体数量和质量,加大遗传选择强度,提高遗传进展。同时,采用幼龄或青年牛作为卵母细胞的供体,还可以减少对奶牛生产的影响。国内由于体外受精、基因组检测等技术应用较晚,对幼龄牛进行OPU较少,多集中在青年牛或有生产成绩的母牛中。

采卵频率:采卵频率对OPU效果有显著影响。在不进行任何激素的处理条件下卵母细胞供体母牛一般采卵1—2次/周的较多,尤以2次/周(每次间隔2—3天)的效果为佳。每周2次的OPU效果更佳,母牛可以很快恢复其正常的性周期。采卵频率超过2次/周后,高强度的采卵操作会增加母牛应激和卵巢的炎症发生几率,导致采卵效果下降,成本增加,不利于后续的持续生产。

激素处理:每头供体牛每次OPU可获得10—50枚不等数量的卵母细胞。应用促卵泡素(FSH)或孕马血清(PMSG)等激素处理母牛后,可在一定程度上改善采卵效果。研究证明,FSH应用效果更佳。使用FSH和PMSG分别处理乏情奶牛时,注射FSH的卵巢可穿刺卵泡数和采集卵母细胞数均高于注射PMSG的牛只。使用FSH刺激供体牛时,每次OPU采集的卵母细胞经体外受精后都产生了更多可用胚

胎。国际胚胎移植协会(International Embryo Technology Society, IETS)2020年统计数据显示,在OPU之前注射FSH生产体外胚胎的方法主要集中在北美国家,其次是欧洲,通过FSH处理生产的体外胚胎分别占各自地区OPU-IVF胚胎总数的73.1%和35.7%。由此可见,经过FSH处理后的OPU效果和体外胚胎生产效果较为明显。

其他因素:OPU效率受到采卵人员操作熟练度、牛只个体差异、品种差异、发情周期、牛只健康状况、热应激季节、吸卵负压设备等因素影响。不同供体牛的OPU效果存在显著差异,但同一个体在不同时期的OPU效果相似。IETS近年来的数据显示,肉牛品种进行OPU采集卵母细胞平均数量要高于奶牛品种。在供体牛自然发情后第3—4天进行采卵可以获得最多的卵母细胞。供体牛在热应激下,卵巢上的黄体溶解延迟,雌激素水平下降,导致卵泡发育延后,夏季开展OPU的采卵效果明显降低。由于患繁殖疾病或乏情期母牛卵泡数较少,卵巢质地偏硬,不适于进行活体采卵。另外,OPU操作人员技术熟练程度、采卵设备先进性等因素也直接影响到OPU效果,后期可以通过技术培训、采购先进仪器来加以提升。

卵母细胞的成熟

卵母细胞的成熟质量对受精和胚胎发育起决定性作用,而且是决定囊胚率高低的关键因素。由于从卵巢上取出的未成熟卵母细胞分别处于卵泡生长的不同阶段,在适宜培养条件下,有85%—90%的卵母细胞在培养结束时达到M II期。但在许多情况下卵母细胞核成熟时,细胞质并未完全成熟,两者不能完全同步,这可能是导致受精分裂率和囊胚率较低的重要原因。

1、环境条件

气相条件:目前采用的体外成熟培养液大都是以NaHCO₃作为缓冲体系,使用5%的CO₂气相培养较为常见。

温度条件:牛卵母细胞体外成熟最适温度是38℃—39℃。在实际体外成熟培养过程中,需要注意培养箱外部显示屏显示的温度与箱内不同位置的实际温度并不完全一致,应该根据实际测定情况进行温度矫正,同时选择更贴近设定温度的位置(培养箱内正中间位置最佳)放置卵母细胞培养液,以期提高卵母细胞的成熟效果。

2、成熟培养液(IVM)

为提高卵母细胞发育能力,需要人为模拟体内卵泡液生理环境。目前,牛卵母细胞体外成熟培养过程中使用最广泛的是以Hepes或NaHCO₃缓冲的TCM-199培养基,辅以添加卵泡液、血清、激素、生长因子和其他添加物。成熟液渗透压在

280—310mOsm为宜。

卵泡液:卵泡液对提高卵母细胞质成熟质量、增加胚胎发育能力具有促进作用。一般在培养液中添加10%的来自于直径6—8毫米卵泡的卵泡液(BFF, bovine follicular fluid),这样可以获得较高的成熟率和受精率。由于卵泡液的来源受卵泡直径大小、发育阶段和健康状态影响较大,其所含成分并不稳定。因此,该方法目前使用较少。

血清:血清可为颗粒细胞—卵母细胞的复合体(cumulus oocyte complexes, COCs)提供合成蛋白质的氮源,并与卵母细胞周围的卵丘细胞一起防止透明带变硬,有利于精子的穿入,具有促进卵丘细胞扩展和卵母细胞发育成熟的作用。不同血清因为质量、来源、批次差异较大,所含的激素水平不稳定,因此,无血清培养基已成为未来体外胚胎生产体系的主要发展方向。

激素:激素对卵母细胞的体外成熟有促进作用,一般添加10微克毫升的促卵泡素(FSH)和促黄体素(LH)、1微克/毫升的雌二醇(E₂)能够获得较好的培养效果。在代替FSH添加40—50u/ml孕马血清促性腺激素(PMSG)的TCM199+10%血清中培养的卵母细胞也可获得较好的成熟效果。

生长因子:对卵母细胞成熟均有促进作用的细胞生长因子有:表皮生长因子(EGF)、血管内皮层因子(VEGF)、转化生长因子(TGF)α和β、成纤维细胞生长因子(FGF)、胰岛素类生长因子(IGF)I和II等。目前,在成熟培养中应用最为广泛的是EGF(10纳克/毫升),其他生长因子更多地用于科研。

其他添加物:一些抗氧化应激添加物可以缓解成熟过程中氧化应激对细胞蛋白造成的损害,如褪黑素(MLT)、组织蛋白酶B抑制剂如E-64、吡哆醇、维生素C等。近年来,越来越多的研究集中在细胞外囊泡(Extracellular vesicles, EVs)对卵母细胞成熟的影响上。EVs最初被认为是细胞碎片,并未被重视。但现在研究证明,EVs起源于体细胞和卵母细胞,包含蛋白质、mRNA、miRNA和脂质,参与miRNA信号传导、诱导早期胚胎中的转录调节和调节卵丘细胞扩张,有助于改善和提高IVF效率。

3、培养时间

体外成熟的时间过长,会让卵子失去最佳受精时机。成熟时间不够,会导致过早的剥离卵丘细胞,不利于减数分裂的有效进行。体外成熟的卵母细胞可受精的时机一般为4—6小时,这与体内成熟的卵母细胞相比要短得多。其受精时间长短主要取决于成熟卵母细胞的质量,最佳的受精时间一般仅为2—3小时。而卵母细胞的成熟时间是根据群体卵母细胞刚好到达第二次减数分裂中期(MII)时的比率(即成熟率)来确定的。因此,根据情况选择适宜的卵母细胞成熟时间是获得较好受精率的关键。牛卵母细胞体外成熟

的正常时间一般为22—24小时。

体外受精

1、环境条件

气相、温度、湿度等环境条件与卵母细胞成熟条件一致。

2、受精液(IVF)

常用作牛精子获能的基础培养液主要有TALP、BO和Ham'sF10等。培养液的pH值在7.3—7.6之间,渗透压在270—310mOsm(最适宜为295—310mOsm)。在受精液中添加钙离子载体(0.1微摩尔/升)、咖啡因(2—10毫摩尔/升)、肝素钠(10—100微克/毫升)、PHE(青霉素20微摩尔/升+亚牛磺酸10微摩尔/升+肾上腺素1微摩尔/升)、谷胱甘肽(5纳摩尔/升)、牛血清白蛋白等,均可以在不同程度上提高受精效果。一般情况下,利用OPU从供体获得的少量卵母细胞体外成熟后,转移至50—100微升的受精液滴中进行受精;从屠宰场收集卵巢获得的大量卵母细胞体外成熟后,转移至400微升以上的受精液液中进行受精。

3、精液处理

牛精子处理方法有多种,最常使用的是两次离心法,即解冻冻精后,用受精液洗涤两次,每次转速为1000—1500转/分钟,离心5分钟,弃上清液后再用受精液将精子稀释到5×10⁶个毫升用于体外受精,精子最终密度一般为1×10⁶—2×10⁶个毫升。在商业化IVF生产中,实验室人员需要按照客户需求,选择指定公牛冻精进行受精。由于不同公牛繁殖力不同,因此根据公牛情况适当调整精子密度。一般受精时,有效精子与卵母细胞的比例控制在600—5000:1均可获得良好受精效果。在使用性控精液时,有效精子与卵母细胞的比例应该略高一些,至少为600—1200:1或1500—2250:1。在生产中,越来越多地使用性控精液液进行体外受精,生产性控胚胎用于高效扩繁特定牛群。公牛个体差异、精子活力、精子的组织结构是否受损、冷冻保护剂差异、获能能力、解冻方法等因素都可能影响体外受精效果。因此,需要对计划选用的不同品种、不同批次的公牛冻精进行预试验,摸索找到最佳受精条件,提高体外胚胎生产效率和移植受孕效果。

胚胎培养

完成体外受精后,将受精的卵母细胞转移至胚胎培养液中继续培养,直至发育到囊胚阶段(囊胚率在20%—40%)。

1、环境条件

一般在38.5℃、CO₂和O₂浓度均为5%的饱和湿度培养系统下更有利于胚胎发育。

2、胚胎培养基

牛的胚胎培养一般多选用TCM199(加血清)或SOF培养液。培养液pH值为7.1—7.5,渗透压可在较宽范围内,一般为270—300mOsm。化学成分明确的培养液含有4种或更少的基础成分,如无机



■本报记者 封斌摄

盐、氨基酸、维生素和能量类物质。复杂的培养液是含有血清等天然生物活性物质的多样化液体。培养液中的水、无机离子、有机成分、能源物质等都对胚胎体外发育有深刻的影响。水要求至少是三蒸水,最好再加上超滤,以去除有机物质和无机离子,现在多使用专业化生物试剂公司销售的专用水。无机离子主要是Na⁺、Cl⁻、K⁺、Ca²⁺、NaHCO₃、NaH₂PO₄等,有机成分主要是氨基酸、谷氨酰胺、肌醇等,能源物质主要是丙酮酸、乳酸、葡萄糖等(在牛上多用丙酮酸)。

3、胚胎保存

在体外受精过程中,会有20%—40%的受精卵会在受精后第7天发育到囊胚阶段,这时就可以按照体内胚胎移植程序进行移植或者冷冻保存胚胎。一般选择高质量IVF胚胎采用玻璃化冷冻方法保存,这样可以提高未来胚胎移植的怀孕率。

讨论

1、IVF胚胎逐渐成为胚胎移植主要来源

IETS数据显示,2014年之前通过体内胚胎(IVD)技术生产的胚胎是牛胚胎移植的主要来源,之后呈现出逐年下降的趋势。通过IVF技术生产的胚胎自2012年以来逐年上升,并在2016年超过了体内胚胎生产数量。2017年,通过OPU技术获得的牛卵母细胞数量远高于屠宰场采集的数量。2017—2020年全球每年由IVF技术生产的牛胚胎数量累计超过400万枚,2020年IVF胚胎数量超过了113万枚,相比2019年的103万枚增加了12.1%。由此可见,通过IVF技术生产的胚胎在全球范围内已经成为商业化牛胚胎移植的主要来源。接下来,如何进一步提高IVF胚胎生产效率,成为诸多学者和企业重点研发和考虑的问题。

2、“OPU-IVF+性控冻精+全基因组检测技术”成为现代牛繁殖育种工作的新型技术手段

对优秀种质资源开展基因组检测,辅

3、加快牛体外胚胎生产技术的研发与推广,在国内早日实现IVF胚胎商业化

牛OPU-IVF技术不仅可以大大缩短育种时间,降低核心牛群和种牛培育成本,还可选择性地控制生产后代的性别,应用前景非常广阔,市场潜力巨大。当前国外IVF胚胎生产技术成果丰硕获得了普及应用,但在国内,牛OPU-IVF技术还有许多关键环节仍需改进和突破,需要科研工作者和相关科研院校继续深入开展牛卵母细胞成熟机理、胚胎早期培养体系、单精子显微注射(ICSI)、细胞核移植等技术的研究,不断提高囊胚发育比例和质量,拓展IVF技术市场空间,持续提升和扩大生物技术育种的示范带动作用。同时,应结合养殖企业生产需求和经济状况,制定合理的IVF胚胎市场运行机制,积极推进体外胚胎生产和移植工作,进而迅速提高良种牛群扩繁速度,彻底解决优秀种源卡脖子问题。

(徐华 车瑞香单位:河北省廊坊市农业农村局;朱捷单位:河北省廊坊市六骥生物技术开发有限公司)