

奶牛胚胎移植技术要点及应用前景



■本报记者 杨丽霞 摄

□操礼军 汪晖 杜婷婷

牛胚胎移植技术涉及供体和受体动物的选择和管理,以及胚胎的收集和移植。在牛中使用胚胎移植的主要目标是提高有价值的雌性的繁殖率。因此,有价值的雌性的后代数量增加到至少比正常情况下高出5倍的水平。胚胎移植被描述为将从供体动物的生殖道中获得的胚胎或在实验室条件下在体外产生的胚胎移植给一个或多个同步受体。体内胚胎生产的阶段包括供体动物和受体动物的选择,所选供体和受体的发情周期的同步,诱导超排卵和随后的供体授精,收集,胚胎的评估和移植。

胚胎移植技术的发展

历史上第一次哺乳动物胚胎移植的案例发生在1890年,Walter Heape将安哥拉兔胚胎移植到比利时兔输卵管中,并顺利产下了6只幼兔。1934年Warwick等又报道了第一例山羊胚胎移植。后来学者又在牛等动物上进行了相关研究。

现代的胚胎移植技术是在20世纪70年代发展起来的,Wilmot和Rowsond等成功地实现了牛胚胎的低温保存。在过去的30年里,胚胎移植技术的发展经历了3个阶段的变化:第一代是通过超数排卵、非手术恢复和移植从供体获得胚胎。第二代是通过卵子的体外受精获得体外胚胎。第三代是进一步发展了体外受精技术,创新了胚胎微操作技术,涉及体细胞和胚胎干细胞的克隆、着床前遗传学诊断、转基因动物生产等内容。

胚胎移植技术的原理及过程

胚胎移植技术的原理是通过收集基因优良的雌性的胚胎,并将收获的胚胎移植到受体动物体内,从而增加优良雌性动物的子代数量和遗传基因优势。利用胚胎移植技术可以提高奶牛的繁殖率,通过更高的选择强度、更短的世代间隔和更多的雌性后代来传递理想性状。

目前的牛胚胎移植技术通常包括供受体的选择、供体动物的发情同步和超数排卵、供体动物的授精、从供体收集胚胎、转移到受体(新鲜)或冷冻保存、胚胎体外培养、胚胎分割、胚胎

检查和性别鉴定、胚胎移植等步骤。

1、供体选择

胚胎的数量与质量由供体的选择决定,囊胚期前的胚胎发育主要靠母系遗传物质来维持,只有当受精卵运用自己的基因组而不再是母系遗传物质时才能够进入囊胚发育期阶段。胚胎移植的第一步是选择供体牛,选择遗传或表型优良的动物是供体选择的基础,供体奶牛必须具备遗传优势,能够产生大量可用胚胎的特性;具有规律的发情期,每次受孕不超过2次,没有分娩困难,没有可检测到的遗传缺陷;同时供体的营养水平应与体型和产奶量相适应,体况评分良好。此外良好的公牛或者冻精是至关重要的,在后裔测定中应具有优异性状表现,并且营养状况良好。

2、超数排卵

超数排卵是指在一个发情期释放许多卵母细胞的方法。在牛中,有两种普遍接受的超数排卵方法。一种方法是在发情周期的第10天肌肉注射(IM)1次2000—2500IU的孕马血清促性腺激素(eCG),然后在2天或3天后间隔12—24小时注射2次前列腺素。另一种方法是使用促卵泡激素(FSH)。在正常的发情周期中期或接近尾声时,在卵巢上会出现功能性黄体(CL),每天注射2次FSH,连续4天;在胚胎移植计划的第3天注射PG,这将导致CL消退,48—60小时后出现发情或发情;在这时,牛通常会产7—20个或更多的存活卵子。由于卵子数量增加,因此比正常情况下更需要确定存活的精子细胞来授精,所以至少相隔12小时用2支精液,7天后冲洗子宫以收集胚胎。

3、胚胎收集

目前比较普遍的是非手术方法采集牛胚胎,该方法通常要使用双向流动导管,用大量的商品化的冲洗液(500—2000毫升)来冲洗子宫,然后将液体从子宫返回,经不锈钢或尼龙筛将胚胎封入塑料杯中。当胚胎被识别后,要立即被转移到含有新鲜无菌培养基中。通常使用含有青霉素和10%—20%热灭活血清的磷酸盐缓冲液(PBS)作为保存介质。然后通过至少3个不同的装有新鲜无菌培养基的培养皿连续冲洗,每一步都需要新的无菌移液管。最后将它们收集后,

利用立体显微镜评估胚胎形状、颜色、质地和大小等因素,筛选出质量良好的胚胎待转移或冷冻保存。

4、胚胎冻存

胚胎冻存通常采用甘油作为低温保护剂。甘油在冷冻过程中保护了胚胎,但如果在移植前不移除,对胚胎是致命的。一旦胚胎被冷冻,解冻程序需要3—4个步骤的冲洗,以去除甘油,然后再转移。这个过程可能需要15—20分钟。在乙二醇中冷冻胚胎用于解冻后直接移植的方法已被广泛采用,这使得在野外条件下解冻胚胎的移植更加实用。冷冻胚胎的解冻方法与冷冻精液非常相似,应在严格控制时间和温度的条件下处理。

5、同期发情

胚胎移植的妊娠率部分取决于受体与胚胎供者在24小时内发情时间的同步性。通过检测未处理动物的自然发情或通过药物诱导的同步发情后,可以选择受体动物进行胚胎移植计划。因为前列腺素(PGF)诱导的受体发情会在60—72小时发生,而超数排卵的受体发情会在36—48小时发生,受体牛只必须在供体牛只前12—24小时接受治疗,以保证其发情周期趋于一致,特别是鲜胚移植,其差异不得超过12小时。目前牛同期发情主要采用一次PG法、二次PG法与阴道孕酮栓(CIDR)+PG法,不同处理方法效果差异不大,且技术路线十分成熟。

6、胚胎移植

胚胎移植分为手术和非手术两种方法。在大多数情况下,非手术转移是首选方式。目前使用的非手术胚胎移植包括人工授精移液管和胚胎移植移液管的使用。发情同步确认后,移植前,进行第二间隙硬膜外腔麻醉,去除直肠的粪便,消毒外阴部。移植过程是将冻存胚胎在水浴中解冻,然后用蔗糖将胚胎复苏,并重新装入0.25毫升吸管,胚胎间至少间隔2个气泡,然后将吸管装入胚胎移植移液管中。全程必须小心确保吸管与移植枪外套紧密接合,以避免泄漏。胚胎通过移液器穿过子宫颈,被放置在毗邻CL的卵巢的子宫角中,非常类似于人工授精。

胚胎移植技术在奶牛生产中的应用

如今胚胎移植技术已经发展成较

成熟的产业,利用胚胎移植技术可以加强遗传选择、诊断和治疗不孕不育的、控制疾病传播、筛选基因缺陷的牛只、繁殖稀有和濒危物种,以及进行发育生物学等方面的研究。

1、遗传改良

胚胎移植技术现在被用于遗传改良,特别是在奶牛养殖业,今天使用的大多数精液来自通过胚胎移植生产的公牛。超数排卵和胚胎移植技术被用来增加遗传优秀的雌性和优秀的父系后代的数量。并且随着选择强度的增加和世代间隔的缩短,选择为胚胎移植的雌性,可以在群体内获得遗传增益。此外,新的基因组技术越来越多的应用于选择胚胎供体,基因组分析也已成为选择胚胎移植的牛只的必要条件。

2、疾病控制

胚胎移植技术可用于控制基因疾病的大规模传播。首先胚胎移植技术通过有效的筛选供体雌性和雄性牛只,就可以在初步阶段筛选掉一些具有疾病的牛只。并且胚胎可以进行活检和染色体组型分析,进一步对染色体组型异常的个体进行鉴别和淘汰。此外通过检查透明带、胰蛋白酶处理,以及清洗等程序,使体内衍生的胚胎可以去除特定的病原体。因此,一些研究者在疾病暴发时可以利用胚胎移植技术挽救遗传群体,同时也可以作为建立无病畜群的有效替代方法。

3、种畜保护

对于单胎动物而言,要获得纯种的后代,至少需要7—8个世代的繁殖,要经历15—20年的时间。而采用胚胎移植技术以纯种母畜为供体,通过超数排卵和人工授精技术,经过一代就可获得纯种后代,可以大大缩短繁殖时间。因此在保护动物遗传资源、繁衍濒临灭绝的野生动物等方面,胚胎移植技术也发挥了重要的作用。

4、发展生物技术

当前许多生物工程研究必须借助胚胎移植技术的基础来实现,因此也催生了结合胚胎移植等生物技术的相关研究。比如通过胚胎移植技术检测奶牛和公牛中不良隐性性状的携带者;对于某些特征,如并指畸形和侏儒症,缺乏纯合子的、可生育的雌性作为疑似携带者公牛的配偶,通过胚胎移

植技术扩大生产,从而测试公牛是否为携带者。有了超排卵和胚胎移植,1—2个疗程的超排卵将提供足够的胚胎来测试大多数奶牛;此外,接受者可以是双胞胎,在怀孕2个月左右对胎儿进行检查,以诊断出许多这些缺陷。因此,通过胚胎移植,可以快速解决原本难以解决的问题。

胚胎移植电子数据的建立

胚胎移植电子数据的建立对奶牛场开展胚胎移植管理具有重要意义,目前,粗放式管理对奶牛的生产性能、繁殖性能、谱系及后裔信息等记录不全,不利于奶牛胚胎移植数据系统管理,造成奶牛场生产水平低下。而奶牛胚胎移植电子数据的建立可基于受体母牛电子耳标,配备自动阅读器,通过无线网络、智能化技术装备、可视装备、信息编码、电子数据交换等技术对受体母牛的基本信息、移植胚胎来源基本信息及移植过程信息进行系统采集和管理。

对实施胚胎移植的奶牛场奶牛存栏量、品种、受体母牛及胚胎移植相关资料信息通过大数据实现自动获取,用以支持胚胎移植过程管理。通过数据模块对奶牛胚胎移植、奶牛群体档案进行记录和存储,包括基本档案,所有奶牛的血统资料,以及奶牛的繁殖性能测定、体形外貌评分、繁殖遗传力评估结果等方面的资料,这些资料对于奶牛繁殖、生产管理与饲养等方面的工作具有重要的价值。另外,制定出一个与奶牛场自身相适应的繁殖循环标准,在奶牛繁殖过程中,预先提醒繁殖过程中奶牛要发生的繁殖事件,在繁殖过程中出现意外状况,就要重新进行运算和提醒。奶牛繁殖评价先要统计所有奶牛的资料,只有资料完整时,才能做出完整、准确的评价,可根据奶牛场的现有实际情况,还有奶牛场的发展需要,分析牛群特征,然后在奶牛繁殖评价模块中根据繁殖指标,作出全面的繁殖评价结论,确定牛群繁殖现有状况和发展方向,改进奶牛胚胎移植的方法。

胚胎移植技术前景

通过胚胎移植技术可以提高良种公畜的配种效率,充分挖掘优良母畜

的繁殖能力。胚胎移植技术还被应用在肉牛双胎的生产中,提高生产效率。加快优良品种繁育,品种资源保存等优点,使得胚胎移植技术在国内外外的科研和商业生产中得到广泛应用。

胚胎移植技术在家畜育种上可充分发挥优良母畜在品种改良和育种中的作用,尤其是对于牛羊等单胎家畜来说,可以通过超数排卵和胚胎移植技术使得供体繁殖后代增加7—8倍。并从更多的头数中加大选择强度,利用更多的亲缘个体群的记录从而提高选择准确性;可以增加后代的数量,缩短世代间隔。在特定品种扩繁上,对于牛羊等单胎动物,通常获得某一品种的纯种一般需要经过7—8个世代,要15—20年的时间。

而采用胚胎移植的方法,可以选择纯种母畜为供体,通过超数排卵和人工授精技术,一次就可获得纯种后代。20世纪80年代后期,随着我国牛羊胚胎移植技术水平的提高,一些省市先后在中国荷斯坦牛、西门塔尔牛、安哥拉山羊、优质细毛羊的扩繁上应用该项技术,使这些优良品种的后代数量大大增加,为提高我国牛羊品种的整体水平起到了积极的作用。

在保护动物遗传资源、提高家畜生产性能、挽救濒临灭绝的野生动物方面,胚胎移植技术已经越来越发挥出重要的作用。在偶蹄目和灵长目等动物上,国外通过手术方法和经子宫管的非手术方法移植胚胎获得了后代。当前国外已开始建立生殖细胞保存中心,即冷冻动物园。通过体外受精技术、冷冻精液的人工授精技术,将冷冻胚胎移植给亚种等来获得后代的胚胎移植技术,不仅大量保存了珍贵的遗传资源,而且也珍稀动物的繁衍和国际交流创造了新的机遇。

目前我国胚胎移植技术正在快速发展,更多地应用到畜牧生产领域中,同时也促进了其他需要在体外操纵卵母细胞或胚胎的技术的开发,如试管受精、胚胎分割、性别鉴定、基因动物的生产、基因编辑以及核移植克隆等技术。相信随着与之相关的一些研究进一步加深,胚胎移植将发挥出更加广阔的前景。

如何提高犊牛免疫力

人们普遍认为,奶牛出生时免疫缺陷或免疫功能低下,但根据Amelia Woolums兽医的说法,情况并非如此。犊牛出生时就有免疫系统,但它需要帮助才能发挥作用。犊牛接种疫苗有助于保持健康,满足其生长和未来生产的潜力需要。

来自密西西比州立大学的教授在Hoard's Dairyman网络研讨会上说:“犊牛在出生时那一天就有了一个功能齐全的免疫系统。”

“这是一个神奇的系统,能够从各个方面保护犊牛。”Woolums表示,并称赞免疫系统可以抵御各种各样的病原体,清除感染,而不会伤害动物或妊娠牛只未出生的胎儿。“胃肠道、乳腺、呼吸道、体表……所有这些表面都受到我们肉眼看不到的东西的保护,这是相当惊人的。”

然而,有一些因素会影响犊牛免疫系统的运作。母牛的健康和营养以及犊牛的营养构成都起着作用;初乳的质量和数量,以及之后给犊牛吃什么,都会影响犊牛的免疫力,牛舍、饲养密度、清洁度和温度等细节也会影响免疫力。

初乳就是答案

犊牛的免疫系统虽然功能齐全,但功能还不成熟,其反应比成年动物的免疫系统更慢、更弱。我们该如何改善这种情况?

“关于这个问题,初乳是大自然给予的解决方案。”Woolums表示,“我喜欢谈论接种疫苗,但我不认为你可以通过接种疫苗来解决初乳摄入不足的实际问题。”

她指出,多项研究试验表明,犊牛没有摄入足够的初乳,更容易生病,更容易死亡,也更不可能发挥出它们的潜力。因此,“摄入足够的初乳对犊牛的健康至关重要。”

Woolums表示,多年来,该行业一直在强调需要为犊牛提供足够的初乳。但新的研究表明,当犊牛获得优质的初乳时,对健康有重要的益处。由于这项研究,几年前,有关初乳的更新建议发布。

“过去采用犊牛血清总蛋白5.2克/分升作为评价初乳质量的临界值,现在的目标是6.2克/分升(糖度读数为9.4%)作为优秀被动免疫的推荐临界值。”Woolums说,“如果更多的犊牛获

得良好的被动免疫,那么在健康方面就会有重要的收获,疾病治疗也会减少,体重也会增加。”

国家动物健康监测系统(NAHMS)对1623头犊牛进行了抽样调查,结果表明,饲喂初乳后,约40%的犊牛血液抗体浓度处于一般或较差的水平。

Woolums说:“我们知道,被动免疫转移处于优秀的水平比充足更能改善健康。如果目标是达到出色的被动免疫,那么在许多操作上显然还有改进的空间。”

疫苗接种起到防御作用

免疫工具箱中的另一个工具是疫苗接种,犊牛为什么要接种疫苗?

“我们想让动物保持健康,希望能够满足它们生长和生产的潜力需要。”Woolums表示。

她解释了疫苗接种和免疫的区别。“当我们注射疫苗时,会注射一种病毒或细菌,这应该会引起免疫反应,但不会让动物生病,这是疫苗接种。如果动物的免疫系统识别出疫苗中的物质并做出适当反应,动物就会对这种物质产生免疫力,这就是免疫。”

第一剂疫苗启动免疫系统,产生一些抗体,主要是免疫球蛋白M(IgM),增强剂会产生更多的抗体,包括更多的免疫球蛋白G。

“IgM是一种很好的抗体,但IgG能做的更多。”Woolums表示,“注射初次剂量后,再注射加强剂,会得到更强、更好的免疫反应,这是疫苗接种的原则之一。”

在初次注射后1—2个月再次注射,Woolums表示,注射两剂疫苗并不意味着犊牛在第二剂后的第二天就能得到保护。目标是在犊牛疾病暴露前一个月注射第二剂,让其有时间产生免疫反应。

并不一定是有效

为什么接种过疫苗的牛只也会生病呢?Woolums表示,“疫苗失败的原因有很多,这并不总是疫苗的错。”

有时失败是由于疫苗的处理方式。例如,疫苗可能没有在适当的温度下储存,或者可能是使用得不够快。Woolums表示,如果使用消毒剂清洗注射器,消毒剂可能会杀死疫苗。

如果没有足够的时间产生免疫反应,或者在需要时没有给予加强剂,那



■资料图片

么不良的给药时机也是一个问题。

宿主动物的状况也可能是失败的一个原因。如果动物在接种疫苗时已经患病或正在经历营养缺乏,可能会出现这种情况。如果使用的产品对感染动物的病原体无效,接种疫苗也可能不成功。

若在接种了疫苗的牛群中,暴发疾病,Woolums表示,要和你的兽医一起查

明疫苗失败的最可能的原因。同样,在对牛群健康计划进行任何改变之前,包括疫苗接种流程,Woolums建议先和兽医讨论一下。

奶牛在5至8个月龄大时,免疫反应就能达到成年牛的程度。在那之前,我们需要通过初乳、疫苗接种和有效的管理策略来帮助增强它们的免疫系统。(养牛派)