

# 杜泊羊体外胚胎生产效率的影响因素

陈大勇<sup>1</sup> 汪立芹<sup>2</sup> 范利宏<sup>1</sup> 仇春娟<sup>1</sup> 李俊龙<sup>1</sup> 黄俊成<sup>2</sup>

1. 内蒙古赛诺草原羊业有限公司, 呼和浩特 010000;

2. 农业部草食家畜繁育生物技术重点开放实验室, 乌鲁木齐 830000

**摘要** 为了将绵羊体外胚胎发育技术应用于生产, 采用活体采卵—体外受精的方法, 对准备淘汰的杜泊羊进行外源激素处理, 并对可能影响体外胚胎发育及移植后受胎效率如 FSH 剂量、公羊个体、获取卵母细胞方式等因素进行研究, 结果发现: (1) 每只供体注射 FSH 240 IU 或 420 IU 剂量对获得卵母细胞数、胚胎数及体外受精卵裂率没有明显影响 ( $P > 0.05$ ); (2) 不同公羊个体对卵母细胞体外受精效率有显著影响, 但胚胎移植后受胎率没有明显影响 ( $P > 0.05$ ); (3) 活体采卵与屠宰场采卵方式相比, 对卵母细胞的回收没有影响 (12.24 vs 13.84,  $P > 0.05$ ), 但活体采集卵母细胞受精后的平均胚胎数显著低于后者 (7.50 vs 11.17,  $P < 0.05$ ), 卵裂率极显著低于屠宰场采卵方式 (60.92% vs 81.75%,  $P < 0.01$ ); (4) 上述几组试验对受胎率都没有影响 ( $P > 0.05$ )。由此可见, 供体使用 240 IU 的 FSH, 选择受精效率好的公羊, 能显著提高杜泊羊体外胚胎生产效率; 离体采集卵母细胞体外发育效率高于活体采卵。

**关键词** 杜泊羊; 体外胚胎生产; 卵母细胞; 卵裂率; 受胎率

**中图分类号** S 826.9; Q 813.7 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)05-0063-05

超数排卵及胚胎移植技术 (multiple ovulation and embryo transfer, MOET) 为世界各地绵羊品种的改良作出了巨大的贡献<sup>[1-2]</sup>。经多次超排处理的供体母羊, 虽仍处于壮年时期, 身体各项机能都处于最好阶段, 但由于卵巢、子宫、输卵管之间相互粘连, 导致无法再进行超排处理, 甚至无法自然繁殖, 造成了极大的浪费。体外胚胎生产 (*in vitro* embryo production, IVEP) 技术, 指对母体进行激素处理, 通过活体或屠宰场采集卵母细胞, 在体外条件下对卵母细胞进行成熟培养—体外受精—体外培养, 获得可移植的胚胎, 并将胚胎移植至合适受体, 获得后代的过程, 也即人们常说的试管婴儿。虽然已有大量人<sup>[3]</sup>、奶牛<sup>[4]</sup>、水牛<sup>[5-6]</sup>、山羊<sup>[7]</sup>、绵羊<sup>[7-8]</sup>、猪<sup>[9]</sup>等“试管婴儿”的诞生, 但在我国, 由于绵羊品种不纯, 无法从屠宰场获得可用于体外胚胎生产的纯种绵羊卵巢, 而绵羊活体采卵技术, 通常通过手术方式采集卵母细胞, 由于在抽吸卵泡时出血较多, 容易导致卵巢粘连, 从而影响了该技术在绵羊生产中的应用。本研究即以此为切入点, 将 IVEP 技术应用于因粘连

无法再用的超排供体母羊, 以最大限度地发挥优良种畜的繁殖性能。

## 1 材料与方法

### 1.1 供、受体羊的选择和处理

供体羊为经多次超排处理后, 因输卵管、子宫角、腹膜等相互粘连而无法再使用的纯种杜泊母羊。每次试验精液采自体格健壮、已用于配种的杜泊种公羊。供体母羊处理与超数排卵方案略有不同, 受体同期发情方法相同。将海绵栓放置于供体母羊阴道内, 设为第 0 天, 在放栓第 10 天时供体肌肉注射促卵泡激素 (FSH), 共注射 6 针, 每次注射间隔 12 h, 剂量逐渐递减, 注射第 5 针时禁饮禁食。

受体羊放栓日期与供体羊相同, 在第 12 天即供体手术前 12 h 撤栓, 同时肌肉注射孕马血清 (PMSG) 330 IU, 不需要试情, 撤栓后第 4 天开始移植, 手术前 24 h 禁饮禁食。

采精公羊每天喂胡萝卜 100 g, 鸡蛋 1 个, 精料 250 g, 适量地运动。

收稿日期: 2015-11-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (U1203381, U1403184); 国家转基因重大专项 (2014ZX08008-003); 内蒙古自治区科技创新引导项目; 自治区公益性科研院所基本科研业务经费; 自治区科技人才培养项目

陈大勇, 兽医师. 研究方向: 绵羊繁殖技术. E-mail: chendayong81@126.com

通信作者: 汪立芹, 副研究员. 研究方向: 动物繁殖与胚胎生物技术. E-mail: wlq6304@126.com

## 1.2 卵母细胞的采集

注射最后一针 FSH 间隔 12 h 后,将供体羊于保定架上保定,通过手术方式将绵羊卵巢暴露于体外,用装有抽卵液的 10 mL 注射器抽吸卵泡,将吸取的卵泡液置于离心管中沉淀 5 min,在体视镜下捡出卵母细胞;若子宫与腹膜粘连严重而无法将卵巢暴露出体外的供体,送至屠宰场屠宰,摘取卵巢,放入装有 35 °C 生理盐水的保温杯内运回实验室,相同方法回收卵母细胞。

## 1.3 卵母细胞的体外成熟

回收的卵母细胞经抽卵液洗涤 3 次后,用体外成熟液洗涤 3 次,按 50 枚/孔的密度放入装有 500  $\mu$ L 成熟液的 4 孔板内,在 38.6 °C 的含有 5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度的二氧化碳培养箱内培养 22~24 h。成熟液的主要成分为:TCM199 -HCO<sub>3</sub> + 10% 胎牛血清(GIBCO) + 0.05 IU/mL 促卵泡素(FSH) + 0.05 IU/mL 促黄体素(LH) + 1  $\mu$ g/mL 雌二醇 + 24.2 mg/L 丙酮酸钠 + 100 IU/mL 双抗。

## 1.4 卵母细胞的体外受精

用 0.1% 的透明质酸酶对成熟后的卵母细胞进行处理,除去部分卵丘细胞,并用体外受精液洗涤 3 次后置于装有 500  $\mu$ L 受精液的 4 孔板内。采集公羊精液,选取活力在 0.7 以上的公羊用于试验,提前 2 h 将装有 2 mL 受精液的圆底试管置于二氧化碳培养箱内平衡,用移液器吸取 200  $\mu$ L 精液置于圆底试管底部,待精子上游 30 min 后,取上层约 1 mL,经 1 500 r/min 转速离心 4 min,弃去上清,加入 1 mL 受精液,轻轻混匀精子,再次离心,留约 100  $\mu$ L 精子混悬液,计算精子密度,按  $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$

个/mL 的密度加入 4 孔板内,与卵母细胞共同孵育 18 h。受精液的成分为:SOF + 20% 发情羊血清 + 6 IU/mL 肝素钠 + 100 IU/mL 庆大霉素。

## 1.5 胚胎移植

将与精子共孵育过的卵母细胞用培养液洗涤 3 遍,洗去粘附于透明带上的全部卵丘细胞和精子,将其置于装有培养液的 4 孔板内培养 30 h,统计卵裂率,弃去未卵裂的卵母细胞。用移植液洗涤 1 次胚胎,移植至同期发情的受体输卵管内,每只受体移植 2 枚 2~8 细胞期胚胎。

## 1.6 数据统计

所有数据使用 SPSS 13.0 统计软件的 *t* 检验方法,以平均数  $\pm$  标准误表示。

# 2 结果与分析

## 2.1 供体激素处理方案对卵母细胞体外受精效率的影响

将每批供体分成 2 组,一组 FSH 总剂量为 240 IU,一组 FSH 剂量为 420 IU,用活体采卵的方式获取卵母细胞。结果表明,2 种处理方案平均获得卵母细胞数没有差异(11.86 vs 12.75,  $P > 0.05$ ),体外受精后的卵裂率也没有差异(57.66% vs 59.93%,  $P > 0.05$ ),移植受胎率差异不显著(59.56% vs 61.39%,  $P > 0.05$ )。

## 2.2 公羊精液对胚胎体外生产效率的影响

每组试验供体采用活体采卵方式获取卵母细胞,每次采集 2~3 只公羊精液,分组受精,重复 3 次,受精和受胎效率如表 2 所示:公羊 3651 和 858 体外受精卵裂率(78.17%、77.11%)显著高于 6736

表 1 FSH 剂量对活体采卵卵母细胞体外受精效率和胚胎移植受胎率的影响

Table 1 Effect of FSH dose on oocytes *in vitro* fertilization efficiency and pregnancy rate

FSH/ IU	母羊只数 Ewes No.	卵母细胞数 Oocytes No.	卵裂胚数 Embryos No.	卵裂率/% Cleavage rate	移植受体数 Receptors No.	怀孕数 Pregnant ewes No.	受胎率/% Conception rate
240	91	11.86 $\pm$ 0.95(1 074/91)	7.38 $\pm$ 0.94(663/91)	57.66 $\pm$ 3.14	306	181	59.56 $\pm$ 2.41
420	57	12.75 $\pm$ 1.49(709/57)	7.66 $\pm$ 1.03(506/38)	59.93 $\pm$ 3.68	182	112	61.39 $\pm$ 2.48

表 2 公羊个体对卵母细胞体外受精和受胎效果的影响

Table 2 Effect of the ram on oocytes *in vitro* fertilization and pregnancy

公羊号 Rams No.	卵母细胞数 Oocytes No.	卵裂胚数 Embryos No.	卵裂率/% Cleavage rate	受胎率/% Conception rate
6736	338	198	52.90 $\pm$ 5.68a	51.93 $\pm$ 7.51(52/98)
6726	278	165	55.71 $\pm$ 3.65a	65.56 $\pm$ 8.68(55/85)
121037	667	463	68.74 $\pm$ 5.04ab	45.41 $\pm$ 8.87(71/162)
3651	702	533	78.17 $\pm$ 4.36b	61.45 $\pm$ 4.07(134/210)
858	1 352	1 004	77.11 $\pm$ 5.35b	60.27 $\pm$ 2.91(256/418)

注:同列标注不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。Note: Values in the same column with different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

和 6726 号公羊 (52.9%、55.71%), 最大差距达 25%; 每只受体移植 2 枚胚胎的受胎率没有差异, 但最大差距也达 20%。

### 2.3 获卵方式对卵母细胞体外受精效率的影响

离体采集和活体采集卵母细胞回收率间没有差

异, 分别为 13.84 枚/只和 12.24 枚/只; 而离体采集卵母细胞体外受精后的卵裂率极显著高于活体采集方式 (81.75% vs 60.92%,  $P < 0.01$ ), 每只供体获得的胚胎数差异显著 (11.17 vs 7.5,  $P < 0.05$ ); 但胚胎移植后的受胎率没有差异 (62.54% vs 60.39%,  $P > 0.05$ )。

表 3 获卵方式对卵母细胞体外受精效率的影响

Table 3 Effect of oocyte access method on the efficiency of *in vitro* fertilization

采集方式 Oocyte access method	母羊数 Ewes No.	卵母细胞数 Oocytes No.	卵裂胚数 Embryos No.	卵裂率/% Cleavage rate	移植受体数 Receptors No.	怀孕数 Pregnant ewes No.	受胎率/% Conception rate
活体 OPU	148	12.24 ± 0.78 (1 783/148)	7.50 ± 0.64 (1 096/148) <sub>a</sub>	60.92 ± 2.06A	365	219	60.39 ± 2.37
离体 <i>In vitro</i>	106	13.84 ± 2.77 (1 554/106)	11.17 ± 1.97 (1 267/106) <sub>b</sub>	81.75 ± 3.40B	349	226	62.54 ± 4.15

注: 同列标注不同大写字母表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。Note: Values in the same column with different uppercase letters are significantly different ( $P < 0.01$ ) and those with different lowercase letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).

## 3 讨论

活体采卵技术 (ovum pick-up, OPU) 的出现为 IVEP 技术提供了更为广泛的应用前景。由于超声波引导法简单、可重复性好、采卵效率高, 对于大动物采卵是最好的选择, 目前 OPU-IVEP 商业化的生产主要是用在牛上<sup>[10-11]</sup>。小型动物可采用较为复杂的内窥镜或剖腹术的方法来收集卵母细胞。

绵羊胚胎移植技术是依靠手术方式回收胚胎的, 因此, 供体经过 3~5 次手术, 通常都会发生粘连或输卵管堵塞, 此时的供体羊体况良好, 卵巢功能正常, 粘连不会影响卵母细胞的生长发育, 只是影响输卵管伞对卵母细胞的收纳、卵母细胞的受精及胚胎的发育和回收。因此, 将粘连拟淘汰的母羊作为供体, 应用 OPU 和 IVEP 技术, 能最大限度地挖掘供体母羊的价值。

卵泡刺激素 (FSH) 是由动物脑垂体前叶嗜碱性细胞合成与分泌的一种糖蛋白类促性腺激素, 在下丘脑—垂体—性腺生殖轴中起重要的作用, 可以促进卵巢卵泡的生长、卵泡颗粒细胞的增生以及雌激素的合成与分泌<sup>[12]</sup>。激素处理方案是关系超排效果的关键因素之一<sup>[13-15]</sup>, 目前绵羊常用的超排方案有 CIDR + FSH + PG/PMSG<sup>[16]</sup>、ECG + FSH<sup>[17]</sup> 等。超数排卵技术是为了获得尽可能多的可用胚胎, FSH 剂量太大, 容易出现不排卵的大卵泡, 而 IVEP 技术不需要排卵, 只要得到发育起来的卵泡即可, 因此激素方案与超排方案相比较为简单, 仅用

FSH 一种激素即可。本研究在比较 FSH 总剂量为 240 IU 或 420 IU 对 OPU 回收卵母细胞数、体外受精后可移植胚胎数、卵裂率及胚胎移植受胎率的影响时发现, 加大 FSH 剂量并不能增加卵母细胞的数量以及 IVEP 效率, 每只供体使用 240 IU 国产 FSH, 即能获得卵母细胞 11.86 枚, 远高于单独注射 PMSG 的 1.6 枚<sup>[18]</sup>, 并且每只供体的卵母细胞体外受精后可得到早期胚胎 7.38 枚, 移植受胎率达 59.56%, 与常规胚胎移植受胎率结果相近<sup>[19]</sup>。

精子是影响体外受精效率的主要因素之一。精子质量与公羊遗传性、营养条件、健康状况等息息相关。前期在进行牛、绵羊卵母细胞体外受精试验时发现, 不同个体公牛冷冻精液对受精效果有显著影响, 尤其是影响了体外胚胎的后期发育能力<sup>[20]</sup>, 公羊个体冷冻精液对体外受精效果也有显著影响<sup>[21]</sup>, 本试验研究了公羊个体对绵羊活体采集卵母细胞体外受精效率的影响, 结果发现, 个别公羊个体体外受精后的卵裂率显著低于其他公羊, 与前期研究结果相似。本研究选择的是饲养条件一致、健康状况良好、精子活力 0.7 以上、人工授精后母羊怀孕率正常的公羊, 但其对卵母细胞体外受精效果仍有影响, 究其原因, 可能与受精过程中精子、卵子以及相互间发生一系列反应有关, 确切原因有待进一步研究。

在王芬露等<sup>[10]</sup>看来, 活体采集牛卵母细胞发育能力要高于屠宰场采集卵母细胞。而刘长彬<sup>[22]</sup>对比了屠宰场采集离体卵巢获取的卵母细胞和活体采集卵母细胞体外受精效率, 发现卵母细胞来源对

IVF 的影响不显著。Souza-Fabjan 等<sup>[23]</sup>详细研究了山羊不同来源卵母细胞对体外成熟率、体外受精卵裂率、囊胚率及囊胚孵化率的影响,得出屠宰场采集卵母细胞成熟率和受精卵都显著好于活体采集的卵母细胞,证实了活体采集卵母细胞比离体采集卵母细胞需要更长体外成熟培养时间的结论。本试验通过对绵羊不同来源卵母细胞体外发育能力研究得出,离体采集卵母细胞体外受精后获得的胚胎数和卵裂率皆显著高于活体采集卵母细胞,但 2 种条件下早期胚胎移植后受胎率没有差异,与 Souza-Fabjan 等<sup>[23]</sup>的研究结果相似。因此,虽然在现有的绵羊卵母细胞体外成熟、体外受精、体外培养条件下,离体采集卵母细胞的体外胚胎生产技术已达到应用水平,但仍需进一步研究活体采集卵母细胞体外培养系统。

### 参 考 文 献

- [1] BOUQUET A, SØRENSEN A C, JUGA J. Genomic selection strategies to optimize the use of multiple ovulation and embryo transfer schemes in dairy cattle breeding programs[J]. *Live-stock science*, 2015, 174: 18-25.
- [2] VIEIRA L M, RODRIGUES C A, MENDANHA M F, et al. Donor category and seasonal climate associated with embryo production and survival in multiple ovulation and embryo transfer programs in Holstein cattle [J]. *Theriogenology*, 2014, 82(2): 204-212.
- [3] STEPTOE P C, EDWARDS R G. Birth after the reimplantation of a human embryo[J]. *Lancet*, 1978, 2(8085): 366.
- [4] PINTO T L, LOPES B C, FERREIRA M B, et al. 245 effects of *gyr*(*bos taurus indicus*) donor mitochondrial DNA and ovum pickup order on *in vitro* embryo production[J]. *Reproduction fertility & development*, 2015, 27(1): 212.
- [5] QIN G S, CHEN M T, YANG B Z, et al. Ovum pick-up - *in vitro* embryo production - embryo transfer technology in the application of water buffalo production[J]. *Journal of animal and plant sciences*, 2012, 22(3): 312-314.
- [6] AQUINO F, ATABAY E, OCAMPO M, et al. *In vitro* embryo production and transfer of bubaline embryos using oocytes derived from transvaginal ultrasound-guide follicular aspiration (TUFA) [J]. *Buffalo bulletin*, 2013, 32(2): 545-548.
- [7] PARAMIO M T, IZQUIERDO D. Current status of *in vitro* embryo production in sheep and goats[J]. *Reproduction in domestic animals*, 2014, 49(4): 37-48.
- [8] SOUZA-FABJAN J M G, PANNEAU B, DUFFARD N, et al. *In vitro* production of small ruminant embryos: late improvements and further research[J]. *Theriogenology*, 2014, 81(9): 1149-1162.
- [9] GRUPEN C G. The evolution of porcine embryo *in vitro* production[J]. *Theriogenology*, 2014, 81(1): 24-37.
- [10] 王芬露, 王世表. 通过活体采卵 (OPU) 的方法来进行牛体外胚胎生产的研究[J]. *现代畜牧兽医*, 2005(2): 44-46.
- [11] CEBRIAN-SERRANO A, SILVESTRE M A, RUIZ S, et al. Effect of sex-sorted sperm on development and quality of *in vitro*-produced bovine embryos derived from ovum pick up oocytes[J]. *Animal science papers and reports*, 2013, 31(2): 111-122.
- [12] 华荣茂, 曾斌. FSH 研究进展[J]. *江西科技师范大学学报*, 2014(6): 7-12.
- [13] TOOSI B M, TRIBULO A, LESSARD C, et al. Superovulation and embryo transfer in wood bison (*Bison bison athabasca*) [J]. *Theriogenology*, 2013, 80(5): 542-451.
- [14] RUTIGLIANO H M, ADAMS B M, JABLONKA-SHARIFF A, et al. Effect of time and dose of recombinant follicle stimulating hormone agonist on the superovulatory response of sheep[J]. *Theriogenology*, 2014, 82(3): 455-460.
- [15] RATTO M H, SILVA M E, HUANCA W, et al. Induction of superovulation in south american camelids[J]. *Animal reproduction science*, 2013, 136(3): 164-169.
- [16] 张帆, 李晓丽, 王俊, 等. 杜泊绵羊超数排卵及胚胎移植影响因素分析[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2014, 22(3): 40-44.
- [17] FORCADA F, AIT AMER-MEZIANE M, ABECIA J A, et al. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep[J]. *Theriogenology*, 2011, 75(4): 769-776.
- [18] WIECZOREK J, KOSENYUK Y, CEGLA M, et al. A new concept in laparoscopic ovum pick-up (opu) in sheep-efficiency of method and morphology of recovered oocytes[J]. *Ann Anim Sci*, 2010, 10(1): 39-48.
- [19] SATTERFIELD M C, SPENCER T E. Asynchronous embryo transfer in sheep; lack of survival in progestinized recipient ewes[J]. *Journal of animal science*, 2011, 2(1): 8-19.
- [20] 汪立芹, 杨梅, 陈童, 等. 不同因素对牛体外受精效果的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(1): 38-40.
- [21] 汪立芹, 赵云程, 陈童, 等. 不同因素对绵羊卵母细胞体外受精效果的影响[J]. *中国畜牧兽医*, 2010, 37(8): 84-87.
- [22] 刘长彬. 奶牛活体采卵及体外受精的研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
- [23] SOUZA-FABJAN J M G, LOCATELLI Y, DUFFARD N, et al. *In vitro* embryo production in goats; slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media[J]. *Theriogenology*, 2014, 81(8): 1021-1031.



## Factors affecting efficiency of *in vitro* embryo production in Dorper sheep

CHEN Dayong<sup>1</sup> WANG Liqin<sup>2</sup> FAN Lihong<sup>1</sup>  
QIU Chunjuan<sup>1</sup> LI Junlong<sup>1</sup> HUANG Juncheng<sup>2</sup>

1.Inner Mongolia SINO Sheep Breeding Co. Ltd, Hohhot 010000, China;  
2.Key Laboratory of Grass Livestock Reproduction & Breed Biotechnology,  
Ministry of Agriculture, Urumqi 830000, China

**Abstract** In order to apply the technology of *in vitro* lamb embryo development to production, we studied the possible effects of factors such as dose of FSH, individual rams, oocyte obtain methods on *in vitro* embryo development and the conception efficiency after transplantation. The results showed that injection dose of FSH 240 IU or 420 IU per donor had no effect on the number of obtained oocytes, the number of embryos, and *in vitro* fertilization and cleavage rate ( $P > 0.05$ ). Ram had significant effects on *in vitro* oocyte fertilization efficiency ( $P < 0.05$ ), but did not affect the pregnancy rate of embryo transplantation ( $P > 0.05$ ). When compare oocyte harvesting method of ovum pick up (OPU) with slaughterhouse, there was no effect on the recovery of oocyte (12.24 vs. 13.84,  $P > 0.05$ ). However, the average number of embryos obtained by OPU was significantly lower than that obtained by slaughterhouse (7.50 vs 11.17,  $P < 0.05$ ), and the cleavage rate was extremely significantly lower than the latter (60.92% vs 81.75%,  $P < 0.01$ ). All of the above tests had no effect on the pregnancy rate ( $P > 0.05$ ). Using 240 IU donor FSH and selecting the fertilization efficiency ram, can significantly improve the *in vitro* embryo production. The *in vitro* developmental ability of the oocyte harvested by the slaughterhouse was higher than that by OPU.

**Keywords** dorper sheep; *in vitro* embryo production; oocytes; cleavage rate; conception rate

(责任编辑:边书京)