

# 冷冻保存 2 年的体外受精胚胎移植产犊报道\*

## Birth of Calves after Transfer of in Vitro Produced Embryos Stored at $-196^{\circ}\text{C}$ for Two Years

谭世俭 石德顺 卢克焕  
Tan Shijian Shi deshun Lu kehuan

张重岭 于润富  
Zhang Chongling Yu Runfu

(广西农业大学 南宁市秀灵路 13 号 530005)  
(Guangxi Agricultural University, 13  
Xiuling Road, Nanning, Guangxi, 530005)

(山东省肥城市畜牧局 新城长山街 013 号 271600)  
(Shandong Province Feicheng City Animal  
Husbandry Bureau, 013 Changshan Street, 271600)

**摘要** 140 枚利用完全体外化培养技术生产、经常规方法进行冷冻保存两年后的良种肉牛胚胎,通过非手术法移植到 70 头本地母牛,每头受体牛移入 2 枚胚胎以繁殖纯种后代。结果受体母牛 2 个情期不返情率为 50% (35/70); 120 d 后经直肠检查确诊怀孕率为 27.1% (19/70); 9 头受体母牛足月产下犊牛 10 头,产犊率为 12.9% (9/70), 双胎率为 11.1% (1/9)。受体母牛平均妊娠期为 280.8 天 (266~292); 犊牛初生体重平均为 36.4 kg (20.0~65.0), 生长发育正常。结果说明,体外胚胎经过 2 年的超低温冷冻保存后移植仍可正常产下后代。

**关键词** 牛 体外受精 冷冻囊胚 胚胎移植 妊娠率 产犊率

**Abstract** One hundred and forty frozen-thawed beef embryos produced by in vitro techniques and stored for two years at  $-196^{\circ}\text{C}$  were non-surgically transferred to 70 recipients in pairs. The non-return rate of the recipients two oestrous cycles following transfer was 50.0% (35/70). The pregnancy rate diagnosed by rectal palpation 120 d after transfer was 27.1% (19/70); the calving and twinning rates were 12.9% (9/70), and 11.1% (1/9), respectively. Mean gestation length was 280.8 d (266~292) and weight of the calves 36.4 kg (20.0~65.0). The results indicate that the in vitro produced embryos stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  for two years can develop to the term after transfer.

**Key words** Bovine, in vitro fertilization, frozen blastosyst, embryo transfer, pregnancy rate, calving rate

在动物繁育工作中,胚胎移植是一项有效地提高生产性能的生物技术措施。通过引进优良品种的胚胎移植本地母牛以繁殖纯种后代,是替代进口活畜的好方法。随着牛体外受精技术的研究成功,为工厂化、商业化生产牛胚胎提供了可能,在一定程度上解决了胚胎移植技术在推广应用中存在的胚胎来源不足及成本高等问题。胚胎冷冻保存是提高胚胎利用价值的一项关键技术。一般说来,经过冷冻处理后的胚胎,其活力受到一定程度的降低,从而影响到移植后的受孕及产犊率。据最近卢克焕等人的报道,经过冷冻保存的体外胚胎,移植后早期妊娠率 (50~60 d 检查) 可达到 61.7%<sup>[1]</sup>,达到了新鲜胚胎的水平。但至今为止,关于冷冻体外胚胎数量较大的移植产犊报道仍十

分鲜见。我们于 1993 年 8 月至 9 月间,利用经过 2 年冷冻保存的体外受精胚胎在山东省肥城市进行了胚胎移植,受体母牛已于 1994 年 5 月至 6 月产犊,现将实验结果报道如下。

### 1 材料与方法

#### 1.1 胚胎的生产

试验所用的胚胎均采用完全体外化培养技术生产,方法与 Lu 等先前报道的相似<sup>[2,3]</sup>。简单地说,从屠宰场收集特定品种母牛的卵巢,然后用注射器抽取法从卵巢表面直径为 1~8 mm 的卵泡中采集卵母细胞,经过 20~24 h 的体外成熟培养后,用相同品种公牛的冷冻精液进行体外受精。受精后的早期胚胎在体外条件下继续培养至囊胚阶段。

#### 1.2 胚胎的冷冻保存

胚胎的冷冻保存采用常规方法<sup>[4]</sup>进行。胚胎冷冻

1994-11-14 收稿。

\* 国家 863 计划项目

用液为含 1.5 mol/L 甘油+0.25 mol/L 蔗糖的 PBS。将挑选出来的 1~2 级的 D7 或 D8 早期囊胚和囊胚, 在室温中与冷冻液平衡 20 min 后, 采用两步降温法将胚胎降至 -25℃, 然后直接投入液氮中冷冻保存。本次实验所用的胚胎均为 1991 年 8 月下旬至 9 月上旬间生产及冷冻保存的体外胚胎。

### 1.3 受体牛同期发情处理

受体牛主要为山东鲁西黄牛, 体质健康, 无繁殖疾病, 经产, 拴系舍饲; 少数为奶场黑白花经产奶牛。通过直肠检查, 挑选出有功能黄体的母牛作同期发情处理。采用国产“氯前列烯醇”(PG, 上海计划生育所产, 批号为 910826) 肌肉注射 3~6 mg/头, 12~13 d 后按相同方法再注射一次(当天发情的母牛不处理), 然后观察母牛发情情况。在第二次注射 PG 后的第 8 天进行胚胎移植。胚胎移植前 1 天直肠检查黄体发育情况, 并按黄体大小、质地等指标将其划分为 A、B、C 及 C 级以下 4 个等级, 挑选具有 C 级以上黄体的母牛作为受体牛。

### 1.4 胚胎移植

从液氮中取出装有胚胎的细管, 在空气中停留 10 s 后投入 37℃ 温水中将冷冻胚胎解冻, 然后将细管内的胚胎吹入解冻液中。解冻液为含 10% 发情牛血清, 0.25 mol/L 蔗糖的 PBS。胚胎在解冻液中平衡 10 min 后, 挑选出 1~2 级胚胎装管移植。用输胚胎枪将胚胎移入受体母牛的功能黄体同侧的子宫角大

弯处, 每头受体母牛移入 2 枚胚胎。

## 2 结果与分析

胚胎移植后密切观察受体牛的返情情况, 120 d 后通过直肠进行妊娠检查以确定受体母牛怀孕率。记录怀孕母牛流产、妊娠死亡及最终产犊情况。结果显示, 冻胚移植后受体母牛两个情期不返情率为 50.0% (35/70); 120 d 后经直肠检查确诊怀孕率为 27.1% (19/70); 9 头受体母牛足月产下 10 头犊牛(其中 1 头母牛产双犊), 产犊率为 12.9% (9/70), 双胎率为 11.1% (1/9)。结果见表 1。

表 1 的结果表明, 在 120 天后确诊怀孕的受体母牛到足月产犊之前, 有半数以上 (52.6%, 10/19) 的怀孕受体母牛发生流产或妊娠死亡, 从而严重影响到受体母牛的最终产犊率。另外, 在不同的实验牛场, 受体牛的妊娠率及产犊率差异很大。在孤山牛场移植的受体牛怀孕率 (45.5%, 10/22) 和产犊率 (27.3%, 6/22) 均明显高于其它牛场的结果。

据有关报道, 胚胎移植时受体母牛黄体发育状况如何影响到胚胎移植后的受胎及产犊成功率。受体牛黄体等级越高, 胚胎移植的效果就越好<sup>[5,6]</sup>。在本实验中, 移植 120 d 后直肠检查, 受体牛妊娠率以 C 级黄体组最高 (40.9%, 9/22), 而产犊率则以 A 级黄体组最好 (25.0%, 1/4)。怀孕母牛的流产率 B 级和 C 级黄体组相同 (55.6%, 5/9)。结果见表 2。

表 1 冷冻体外胚胎移植怀孕及产犊结果

Table 1 Pregnancy and calving results after transfer of frozen-thawed embryos produced by in vitro techniques to recipients

受体牛主 Cattle farm	品种 Breed	移植母牛数 No. transfer	确诊怀孕头数 (%) No. pregnancy	产犊母牛数 (%) No. Calving	犊牛数 Calves
孤山牛场 Gushan	黄牛 Cattle	22	10 (45.5)	6 (27.3)	6
拾屯牛场 Shitun	奶牛 Cow	12	3 (25.0)	1 (8.3)	1
过村农户 Guochun	黄牛 Cattle	15	3 (20.0)	1 (6.7)	2
安庄农户 Anzhang	黄牛 Cattle	12	2 (16.7)	0	0
岔河店牛场 Chahedian	黄牛 Cattle	9	1 (11.1)	1 (11.1)	1
合计 Total		70	19 (27.1)	9 (12.9)	10

表 2 受体牛黄体等级与妊娠及产犊的关系

Table 2 Relationship between pregnancy and calving rates and corpus luteum grades in recipients

组别 Group	黄体级别 C. L. grade	移植头数 No. recipient	妊娠数 (%) No. pregnancy	流产、妊娠死亡数 (%) No. abortion & fetal death	产犊数 (%) No. Calving	犊牛数 Calves
1	A	4	1 (25.0)	0	1 (25.0)	1
2	B	44	9 (20.5)	5 (55.6)	4 (9.1)	4
3	C	22	9 (40.9)	5 (55.6)	4 (18.2)	5

本实验用的冷冻胚胎共有 3 个品种,除了有 4 头受体母牛移植两个不同品种的胚胎外(1 个利木辛+1 个夏洛来),其他都移相同品种的 2 枚胚胎。其中利木辛胚胎移植了 31 头受体,直肠检查有 12 头怀孕,妊娠率为 38.7%; 7 头母牛产犊 8 头(有 1 头产双胎),产犊率为 22.6% (7/31),明显高于其他 3 组。结果见表 3。

移植冷冻体外胚胎的受体母牛妊娠期平均为 280.8 天(266~292 天,已加上移植时胎龄 7 天),与自然发情配种母牛妊娠期相仿;胎儿初生体重平均为 36.4 kg (20.0~65.0),个体间相差较大,其中一头受体母牛产下 65 kg 重的母犊,可惜因胎儿过大,发生难产导致胎儿死亡。犊牛外观及生长发育均正常。结果见表 4。

表 3 胚胎品种与受体牛妊娠及产犊的关系

Table 3 Relationship between embryo breed and the rates of pregnancy and calving

胚胎品种 Embryo breed	移植头数 No. recipient	妊娠数(%) No. pregnancy	流产、妊娠死亡数(%) No. abortion/fetal death	产犊数(%) No. calving	犊牛数 Calves
利木辛 Limousin	31	12 (38.7)	5 (41.7)	7 (22.6)	8
西门塔尔 Simmental	28	4 (14.3)	2 (50.0)	2 (7.1)	2
夏洛来 Charolais	7	2 (28.6)	2 (100)	0	0
利+夏 Lim+Char	4	1 (25.0)	1 (100)	0	0

表 4 初生试管牛犊情况

Table 4 Data of the calves

胎儿品种 Calf breed	性别 Sex	胎龄 G. length (d)	初生体重 Weigh (Kg)	毛色 Skin colour	备注 Remark
利木辛 Limousin	公 ♂	281	32.5	红黄 Brown	
利木辛 Limousin	母 ♀	287	45.5	红黄 Brown	
利木辛 Limousin	公 ♂	266	27.0	红黄 Brown	
利木辛 Limousin	公 ♂	285	42.0	淡黄 Light yellow	
利木辛 Limousin	母 ♀	285	20.0	红黄 Brown yellow	
利木辛 Limousin	公 ♂	278	37.5	黑 Black	
利木辛 Limousin	公	277	27.0	黑 Black	双胎 Twin
利木辛 Limousin	公	277	27.0	黑 Black	(产下死亡 Stillborn)
西门塔尔 Simmental	公 ♂	280	47.5	黄白花 Yellow-white	
西门塔尔 Simmental	母 ♀	292	65.0	黄白花 Yellow-white	难产死亡 Dystocia
X±SD		280.8±7.1	36.4±13.9	♂:♀=7:3	

### 3 讨论与结论

先前的试验结果表明,利用常规方法冷冻处于早期囊胚及囊胚阶段的体外胚胎,解冻后 24 h 的存活率可达 84.9% (101/119); 72 h 孵化率为 74.0% (88/119)<sup>[4]</sup>,实验室的试验结果令人满意。但是,只有将冷冻胚胎移植到受体牛内,观察其能否妊娠及正常产犊,才是判定胚胎质量高低的最终标准。据访问观察,本实验受体母牛在胚胎移植后 2 个情期内不返情率为 50.0% (35/70),早期怀孕率较高。但到了 120 天后,经直肠检查妊娠率下降到 27.1% (19/70),而到最终产犊率只有 12.9% (9/70)。与之相比,我室在 1992~1994 年间用同样技术流程生产的新鲜胚胎移植后妊娠率为 50.7% (37/73),与冻胚移植的早期妊娠率相差不大;但产犊率(42.5%, 17/40)则显著地高于冻胚移植。提示体外胚胎经过冷冻保存后其活力和发育能力明显降低,流产和妊娠死亡是冷冻胚胎移植成功率低的主要原因。看来进一步改进胚胎冷冻及解冻技术以提高冻胚的质量是提高体外冻胚移植成功率的关键所在。

初生牛犊的性别比例一般接近于 1:1。本实验中所得到的的性比率雄犊明显高于雌犊,雌、雄犊牛之性比为 1:2.33。据不完全统计,1990~1994 年间,我室在国内采用冷冻体外胚胎移植产下的 68 头试管牛中,雄性犊牛为 52 头,占 76.5%;雌性犊牛为 16 头,占 23.5%;雌、雄犊牛之比为 1:3.25。经

统计学分析, 雄性犊牛所占的比率十分显著地高于雌性犊牛 ( $P < 0.001$ ); 而采用新鲜体外胚胎移植产下的 38 头试管犊牛中, 雌性犊牛为 21 头, 占 55.3%; 雄性犊牛为 17 头, 占 44.7%; 雌、雄犊牛之比为 1.2 : 1, 接近自然性比。结果提示, 雌性体外胚胎的抗冻性可能比雄性胚胎差, 解冻后挑选出的胚胎大都为雄性胚胎或部分雌性胚胎移植后中途流产或妊娠死亡而不能发育到足月分娩阶段, 从而导致雌性牛犊出生比率降低。

一般认为, 除了胚胎的质量外, 移植技术、受体的同期化程度及饲养管理条件是影响胚胎移植能否成功的主要因素。本实验的受体母牛在行胚胎移植时相应处于发情周期的第 5~8 天, 有部分受体牛移植时间与胚龄不同步是造成怀孕率降低的一个重要原因; 另外, 有些农户求犊心切, 胚胎移植后又复配也是造成受体母牛妊娠中止的一个原因。本次实验结果, 孤山牛场获得较高的妊娠率和产犊率, 是与受体母牛是个人承包, 利益挂钩, 护理精心分不开的。说明加强受体母牛的饲养管理可以降低流产率从而提高产犊率。

关于行胚胎移植时受体母牛黄体发育状态对妊娠及产犊率的影响, 有关实验结果报道不一。大都认为受体母牛黄体等级高低与移植妊娠率呈正比关系<sup>[5,6]</sup>, 也有少量报道关系不大<sup>[7]</sup>。从我们的实验结果来看, 受体母牛妊娠率以 C 级黄体组最高 (40.9%); 产犊率则以 A 级黄体组最好 (25.0%); B 级黄体组不论是妊娠率 (20.5%) 还是产犊率 (9.1%) 均最差。结果表明, 冷冻体外胚胎的移植效果似乎与受体母牛黄体等级关系不大。看来, 只要受体母牛生殖器官正

常, 卵巢上有与发情时间相对应的功能黄体就可移植。当然, 由于黄体等级的判定有很大的人为因素, 本次实验动物数量也尚少, 结果还有等待于今后进一步验证。

#### 致谢

本实验所用的体外胚胎系由本室阳年生、黄凤玲、蒋和生和王武陵等同志在国外生产及冷冻; 在胚胎移植过程中得到马世援、张俊功、周传连等同志的大力协助, 特此一并致谢。

#### 参考文献

- 1 卢克焕, 黄凤玲, 阳年生. 牛体外受精胚胎移植后的怀孕率及双胎率. 广西农业大学学报, 1994, 13 (1): 83~87.
- 2 Lu D H, Polge C. A summary of two-years results in large scale in vitro bovine embryo production. In: Proc of 12th International Congress on Animal Reproduction. The Hague, The Netherlands, 1992. 1315~1317.
- 3 谭世俭, 卢克焕. 不同发情周期阶段和不同体积卵泡的卵母细胞对体外受精及其发育的影响. 广西农业大学学报, 1991, 10 (3): 15~18.
- 4 黄凤玲, 卢克焕. 不同发育阶段和质量的牛体外受精胚胎冷冻后的效果. 广西农业大学学报, 1994, 13 (1): 61~65.
- 5 桑润滋, 靳胜新, 郑德富, 等. 黑白花奶牛胚胎移植中国黄牛的配套技术研究. 国外畜牧学—草食家畜, 1992 (增刊), 2~5.
- 6 刘 苏, 梁 亿, 刘若余. 农畜胚胎移植实用化研究. 国外畜牧学—草食家畜, 1992 (增刊), 21~23.
- 7 黄忠牧, 贾福德, 吴铁荣, 等. 奶牛胚胎移植引进技术的消化吸收总结报告 (1985—1990). 国外畜牧学—草食家畜, 1992 (增刊), 13~18.

(责任编辑: 莫鼎新、何启彬)