

生物技术在养羊业科学研究中的应用

刘守仁

(新疆农垦科学院, 新疆 石河子 832000)

[摘要] 介绍了冷冻精液、胚胎移植、胚胎冷冻、胚胎分割、体外受精、核移植克隆、基因导入等技术。这些技术的应用使养羊业育种和生产水平大为提高, 产生了显著的经济效益。同时, 为养羊业科研和生产开辟了新的途径。

[关键词] 生物技术; 养羊业

20世纪50年代初期, 全国仅有绵羊 $2\,662 \times 10^4$ 只, 山羊 $1\,613 \times 10^4$ 只, 年产绵羊毛 3.35×10^4 t。1998年, 全国绵山羊总数为 $23\,586.9 \times 10^4$ 只。其中绵羊 $11\,815.2 \times 10^4$ 只, 山羊 $1\,3771.7 \times 10^4$ 只。年产绵羊毛 28.7×10^4 t (低于1996年的 29.8×10^4 t 的生产水平), 产肉 125×10^4 t。山羊产绒 $9\,742$ t, 产肉 94.4×10^4 t。生物技术在养羊业生产中的应用, 主要表现在以下几个方面:

1 冷冻精液技术 (frozen semen)

冷冻精液是一种保存种质资源和充分利用优良公畜的有效途径。1949年以来羊新鲜精液的人工输精在我国各大型羊场广泛应用, 有力促进了我国养羊事业的迅速发展。1972年中国首次引入澳大利亚美利奴细毛羊, 随之开始绵羊冷冻精液保存及输精技术研究。但由于羊特殊的生殖结构和冻精活力所限, 羊冻精受胎率仍低于正常水平。据新疆农垦科学院畜牧兽医所繁殖研究室1990年报道, 绵羊冷冻精液输精情期受胎率 55.54% ($178/321$)。为提高优秀种羊冷冻精液的情期受胎率, 近年出现了利用腹腔内窥镜, 进行羊子宫角深部输精技术。石国庆等(1996)用解冻后活力仅0.2的绵羊冷冻精液, 借助腹腔内窥镜子宫角深部输精, 情期受胎率 72.73% ($32/44$)^[1]。

2 胚胎移植 (embryo transfer, ET)

胚胎移植是指将一头良种母畜经超数排卵处

理, 配种后的早期胚胎取出移植到另一头同种、相同生理状态的受体母畜内, 使胚胎继续发育成为新个体的过程。

哺乳动物胚胎移植技术的研究已有一百多年的历史。Lopyrin等(1950年和1951年)报道的绵羊胚胎移植结果, 使得绵羊的胚胎移植变为现实。Averill(1958年)报道绵羊胚胎移植的存活率为 80% ($24/30$)。此时, 外科手术已成为绵羊胚胎移植技术操作的基本方法。我国绵羊胚胎移植成功于1974年, 起步较晚。

目前国内外绵、山羊胚胎移植技术已较成熟, 由于大多数绵、山羊个体价值较低, 胚胎移植成本高而影响了胚胎移植技术的广泛应用。但在新品种引进, 加速遗传进展, 扩大母羊数量, 增加繁殖季节的生产效应、品种资源保存、进行各项生物学研究及生物工程等方面仍发挥不可估量的作用。

目前, 超数排卵 (superovulation) 仍是能够获得大量绵、山羊胚胎的方法之一。羊超数排卵处理主要常用激素有FSH(促卵泡素)和PMSG(孕马血清促性腺激素)。每只绵羊超数排卵激素常用剂量FSH $2.50 \sim 4.17$ mol/s, PMSG $16.67 \sim 21.67$ mol/s^[2]。超排处理时, 在绵羊情期第12~13 d肌注超排激素。使用PMSG注射1次即可, 且价格廉, 易于推广, 但其半衰期长, 副作用较大, 作用的变异范围也较大, 每只母羊平均排3~10枚卵。使用FSH需要按每日1次或2次递减肌注3~4 d, 半衰期短, 作用可靠, 平均排卵8~15

枚,回收卵数显著高于PMSG,但需要连续注射3~6次,且费用较高。因此超排技术仍须进一步改进。可将PMSG和FSH两者结合起来应用,寻求一种费用合理、效果稳定的超排程序。另外研究FSH激素缓释控释制剂,延长FSH半衰期,减少注射次数。据曾培坚等(1996)报道应用15%聚乙烯吡咯烷酮(PVP)加FSH一次肌肉注射老龄母羊(15只),获得 8.58 ± 3.59 枚/只的排卵数^[3]。

胚胎采集(embryo collection)和胚胎移植(embryo transfer),由于羊个体小,生殖道不利于手工操作,用腹腔内窥镜进行羊的胚胎移植,方法较简便,且可降低手术法中出现的粘连问题。

内蒙古家畜改良站在1991~1996年,对9个品种408只供体羊超数排卵处理,获可用胚4002枚,头均 9.81 ± 4.64 枚,移植受体3129只,历年鲜胚移植妊娠率平均74.02%^[4]。吉林农科院、新疆畜牧科学院和新疆农垦科学院等单位承担的国家“九五”项目——优质细毛羊的选育提高,利用胚胎移植技术扩繁优质细毛羊核心群取得较好效果^[5]。实施胚胎移植可使优良核心群体繁殖后代增加3~5倍,优良个体繁殖后代增加7~10倍^[4]。

3 胚胎冷冻保存(embryo freezing preservation)

自1949年Polge冷冻哺乳动物精子获得成功,发现甘油在精子冷冻过程中能起到保护作用。这标志着近代低温生物学的开端。1972年Whittingham(英)首先成功地冷冻保存了小鼠胚胎。1973年Wilmut和Rousso对慢速冷冻保存牛胚胎采用快速解冻获得成功。随后相继在羊、兔、马、人、猴等冷冻胚胎保存成功。

目前所用的冷冻方法较多,归纳起来可分为慢速冷冻法(Freezing)和玻璃化快速冷冻法(Vitrification)。慢速冷冻法常用RPE冷冻仪,胚胎经不同浓度甘油溶液处理,分二步或三步渗透脱水后,按一定要求装管。然后按编制的降温程序处理细管,诱发植冰(Ice seeding),最后放入液氮(-196℃)中保存。石国庆等^[6](1998)应用慢速冷冻法冷冻胚胎306枚,解冻后移植妊娠率34.64%。玻璃化快速冷冻法由Rell和Fahy(1985)提出,是用高浓度渗透性保护剂组成的玻

璃化溶液处理胚胎,使胚胎脱水到一定程度后,引起胚胎内源性胞质大分子如蛋白质及已渗入胞内的保护剂浓缩,不使用降温冷冻仪,将胚胎从常温或4℃直接投入液氮实现快速降温,以便细胞内外的成分同时玻璃化而不形成冰晶,从而达到保护胚胎的作用。常用防冻剂有二甲亚砜(DMSO)、丙二醇、聚乙二醇、蔗糖、海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)等^[7]。Szell A Z等(1994)用玻璃化冷冻绵羊胚胎的怀孕率为52%。

胚胎冷冻保存是使胚胎移植技术真正走向商业化生产的关键因素。使胚胎移植能在任何时间、地点进行,还可以利用这项技术建立品种资源基因库;而且可以进行快速、廉价的国内外胚胎运输,简化了引种过程,使家畜的资源在世界范围内的转移更加方便。

4 胚胎分割(embryo splitting)

20世纪80年代以来,哺乳动物的胚胎分割技术发展很快。1980年Willadsen等建立了一套毛细管分离法。1984年Gatica简化了操作方法,用玻璃针分割绵羊胚胎,将半胚分别移入备用透明带中直接移植取得成功。我国家畜胚胎分割以及与胚胎分割有关的研究工作,自80年代晚期以来进展很快。已在小鼠、家兔、绵羊、山羊、牛等动物实验成功。1987年蒋世娥等徒手分割绵羊鲜胚成功;1989年张涌等分割山羊冻胚产羔成功。1990年郭志勤等分割绵羊鲜胚四分胚同卵双生。

据报道移植半胚的妊娠率不亚于全胚^[8]。如Leibo等(1981)移植半胚和全胚的妊娠率分别为52.4%和56.5%;Lambeth等(1983)62.5%和58.3%,Takeda等(1986)60%和70%。因此在移植数量上半胚比全胚增加了一倍。通过胚胎分割提高胚胎的利用率,获得人工同卵双生具有很大的优越性和实际意义。是扩大胚胎的利用率的有效途径。虽然胚胎分割技术本身开始进入实用化阶段,但在分割胚的长期保存、胚胎数的恢复机理以及胚胎分割技术的延伸方面,还有很多值得研究的问题。这些问题的解决可望使胚胎分割技术发挥更大的效益。

5 体外受精(in vitro fertilization, IVF)

体外受精是指通过人为操作使精子和卵子在体

外环境中完成受精过程。IVF 技术包括卵母细胞体外培养 (In Vitro Maturation, IVM)、精子体外获能 (In Vitro Capacitation)、体外受精、早期胚胎体外培养 (In Vitro Culture) 和移植等一系列步骤。

哺乳类体外受精的研究已经有 120 多年的历史。20 世纪 50 年代初期, 张民觉和 Austin (1951) 发现了哺乳动物精子的获能现象后, 开创了哺乳类 IVF 研究的新纪元。1959 年, 他又把体外受精的兔卵裂卵移植给受体母兔, 获得世界上第一个体外受精的哺乳动物——试管小兔, 从而拉开了人工制作“试管动物”的帷幕。60 年代以后, IVF 的研究迅速发展, 迄今为止, 将 IVF 的卵子移植给受体动物, 已在家兔、小鼠、大鼠、人、牛、猪、狒狒、绵羊、山羊和老虎等 10 多种动物获得成功。我国试管羊之父旭日干等 (1989) 用绵羊体外受精的胚胎进行移植, 在世界上首次成功地获得试管绵羊, 产羔率为 18.0% (11/61)^[9]。

表 1 我国试管动物、人的首创记录

Table 1 The first record of test tube human and animal in China

物种	首创者	单位	年份	卵母细胞来源
小鼠	陈秀兰等	中国科学院遗传所	1986	卵巢卵母细胞
人	张丽珠等	北京医科大	1988	卵巢卵母细胞
兔	徐君等	西北农业大学	1989	输卵管卵母细胞
绵羊	旭日干等	内蒙古大学	1989	卵巢卵母细胞
牛	旭日干等	内蒙古大学	1989	卵巢卵母细胞
山羊	钱菊汾等	西北农业大学	1990	输卵管卵母细胞
猪	范必勤等	江苏省农业科学院	1990	卵巢卵母细胞

注: 引自《生物工程在农业上的应用》第 375 页

在过去的 10 年中, 体外受精进展很快, 目前国内外已可以利用该技术在实验室内生产牛、羊胚胎, 为商业化胚胎移植提供胚源。另外在家畜育种方面可作为一种缩短育种周期的有力手段, 具有重要的科学价值和实际意义。张锁链、旭日干等^[10]从 2~3 个月龄的绒山羊母羔体内采集卵母细胞, 进行体外受精。将 49 枚 F1 代羔羊 2~8 细胞期胚移植给 31 只受体母羊, 产羔 12 只 (F2 代); 将 4 枚 F2 代羔羊 2~4 细胞期胚移植给 15 只受体母羊, 产 F3 代羔羊 2 只。通过幼龄母羔卵母细胞体外受精技术, 使通常在杂交育种过程中培育一代所需的 2 年以上的繁殖周期可以缩短为 7~8 个月。

6 核移植克隆 (nuclear transfer and cloned embryos)

哺乳动物核移植是将哺乳动物早期胚胎的细

胞核或卵裂球、胎儿细胞或成年动物体细胞 (核供体) 与去核的成熟卵母细胞 (核受体) 融合, 重新构建胚胎, 不经过有性繁殖过程连续不断地复制遗传上相同的胚胎, 并通过克隆胚胎的移植, 生产大量相同基因型的克隆动物。

核移植技术最早由 Spemann 在 1938 年提出将多细胞胚胎的每一个细胞核, 分别转移到去核的卵母细胞中进行核移植的设想。1952 年 Briggs 和 King 沿用 Spemann 的想法及实验技术, 首先获得了两栖动物美洲豹蛙胚胎核移植后代。Willadsen (1986) 利用绵羊胚胎细胞核移植获得产仔, 阐明了羊桑椹胚细胞核具有发育全能性。随后, 牛 (Prather 等, 1987; Bondioli 等, 1990)、猪 (Prather 等, 1989)、山羊 (Zhang 等, 1990) 的胚胎核移植后代。1997 年初, 苏格兰 Roslin 研究所的 Wilmut 等借助核移植技术, 利用成年母羊的乳腺细胞成功地“复制”出一只雌性小绵羊。这项技术在我国起步较晚。张涌等 (1991) 首次用山羊 32 细胞胚胎核移植产生 2 只后代; 成勇等 (1995) 报道, 利用山羊胚胎克隆后的重组胚在山羊体外培养, 选择其中发育正常的 6~18 细胞的克隆胚, 再克隆。将 129 枚克隆胚和 143 枚再克隆胚移植后, 克隆羊 2 只和再克隆羊 4 只。

表 2 家畜核移植试验结果

Table 2 The result of livestock nuclear transfer

品种	作者 (年份)	核供体	后代数/移植数
绵羊	Willadsen 等 (1986)	8~16 细胞	3/4
	Smith 等 (1989)	16 细胞内细胞团细胞	3/14
	Campell 等 (1996)	内细胞团体外培养细胞	1/8
	Wilmut (1997)	乳腺细胞	5/34
山羊	张涌等 (1991)	4~32 细胞	5/24
兔	Stice 等 (1988)	8 细胞	6/164
	Prather 等 (1987)	2~8 细胞	1/46
猪	Robl 等 (1987)	原核胚细胞	2/2
	Prather 等 (1997)	2~32 细胞	2/19
牛	Bondioli 等 (1990)	16~64 细胞	92/463
	Bondioli 等 (1991)	8~64 细胞	101/302
	日本 (1998)	输卵管子宫内膜细胞	6/10

注: 引自《家畜胚胎工程》第 193 页

多代克隆 (Multiple generational cloning 或 Re-cloning) 是指将核移植胚胎的卵裂球作为核供体, 进行第二代以至重复多代核移植, 产生多代克隆胚胎和克隆动物, 即通过细胞核移植用胚胎生产胚胎的技术。对多代克隆研究尚少。我国已报道山羊胚胎的多代克隆 (成勇, 1995)。国际上有关牛胚胎多代克隆研究已发表多篇论文, 迄今已连续克隆 6

代获得囊胚期胚胎, 移入受体母牛产生了1~3代的克隆牛。从1枚牛胚胎通过3代克隆获43枚胚胎, 通过4代克隆获54枚胚胎。由此可见, 在不久的将来通过多代细胞核移植将实现动物胚胎克隆的商业化生产。若将克隆技术应用到通过基因导入获得的高表达阳性个体上, 这种结合将产生巨大的经济效益。

7 基因导入 (gene transfer)

基因导入是指将体外重组的结构基因导入早期胚胎中, 培育出转基因动物 (transgenic animal) 的技术。转基因动物的研究是人类按照自己的意愿有目的、有计划、有根据、有预见地改变动物的遗传组成, 是基于分子生物学、动物胚胎和配子生物工程的一项实验技术。研究的目标主要集中在提高家畜的经济性状、改变畜产品的结构以及大量生产对人类有用的物质上。

Hammer等(1985)最先将外源基因导入家畜胚胎, 从所获转基因兔和猪血液中检出了人的生长激素 (hCH)。迄今, 通过基因导入技术已成功地获得了转基因鼠 (Gordon等, 1980; Palmiter和Brinster, 1982)、兔 (Hammer等, 1985; Brem等, 1985)、猪 (Brem等, 1985; Hammer等, 1985; 魏庆信等, 1993)、绵羊 (Hammer, 1985; 1986; Nan-carrow等, 1987)、牛 (Church等, 1986)。基因导入常用的方法有^[9]以下4种:

a. 原核期胚胎的显微注射法 (Pronuclear Microinjection) 采用注射法把DNA注入受精卵原核, 再将这个受精卵细胞移植受体动物 (代孕母畜), 在受精卵分裂时, 外源DNA有机会整合进宿主的染色体组。是目前家畜基因导入最常用的方法, 迄今所获得的转基因家畜绝大多数是借助于这种方法。Hammer等(1985)利用该方法成功地制作了转基因兔、绵羊和猪。

b. 反转录病毒载体法 将目的基因整合到反转录病毒 (RNA病毒) 的原病毒上, 然后将其直接注入胚胎, 或给动物培养细胞接毒并与胚胎一起培养, 以使病毒感染胚胎。其外源基因多属单拷贝整合, 这一特性已被广泛应用于基因定位整合等方面的研究中。Salter等用禽白血病病毒感染早期的鸡胚胎制作了转基因鸡, Haskell等应用该方法制作了转基因牛。

c. 精子载体法 以精子为载体进行基因导入

据称是一种既简单又有效的方法。Corrado Spadafora (1989) 利用鼠的精子细胞产生转基因鼠的成功。后来用该法制作成功转基因猪 (Lavitrano等, 1989; Gan-dolfi等 1989), 鸡 (Rottman, 1992), 牛 (Corrado, 1996)。目前, 许多研究者正从各方面加强研究, 期望是精子载体基因导入技术成为实用、快速、简便的转基因途径。

d. 胚胎干细胞 (ES) 技术 胚胎干细胞是早期胚胎经体外分化抑制培养建立的多能性细胞系, 体外培养时保持未分化状态, 可以传代增殖。ES细胞在发育上类似于早期胚胎的内细胞团细胞, 当被注入囊胚腔后可以参与包括生殖腺在内的各种组织嵌合体的形成。ES细胞具有与早期胚胎细胞相似的分化潜能和正常整倍体核型两大特点, 是研究哺乳动物个体发育、胚胎分化以及性状遗传机制的理想模型。在转基因领域, ES细胞是公认的研究基因转移、基因定位整合的一类极有前途的试验材料。

Robertson (1986) 报道, 转化胚胎干细胞的基因已在由其形成的小鼠嵌合体的体细胞中得以表达。出生小鼠表达嵌合现象的百分率非常高 (20/21), 部分嵌合体小鼠可将外源基因DNA传递给F1代。但目前世界范围内只有小鼠干细胞的建系方法比较成熟, 而大家畜干细胞系的建立方法目前还远不够成熟。

目前世界范围内转基因研究的热点之一是利用动物乳腺作为生物反应器生产药用蛋白, 即以分泌型器官乳腺作为转基因的表达部位, 从转基因动物的乳汁中获取目的基因产物。由于牛的产奶量远远高于羊, 因此理论上应以转基因牛的工作为主, 但由于牛供体费用高, 基因整合率和表达率低, 加之卵母细胞体外受精、低温冷冻技术尚未过关, 因此目前的乳腺表达研究以转基因羊为主。美国Genzyme Transgenics公司产生了表达人抗凝血酶III的转基因山羊, 每升乳汁可提取2~3克抗凝血酶III。英国PPL公司产生了表达人抗胰蛋白酶的转基因绵羊。

利用基因转移技术制造具有优良性状的转基因绵羊品种已取得一些结果。Damak等(1996)利用显微注射法, 将小鼠的超高硫角蛋白启动子与绵羊的IGF-I cDNA融合基因显微注入绵羊原核期胚胎, 移植后生出5只羔羊, 其中两只 (一公一母) 为转基因阳性。用转基因公羊与43只母羊交配,

生出 85 只羔羊, 其中 43 只 (50.6%) 为转基因阳性。羔羊在 14 月龄剪毛时, 转基因羊净毛平均产量比其半同胞非转基因羊提高 6.2%。在毛纤维直径, 髓质以及周岁体重方面无显著差异。此外, Powell 等将毛角蛋白 II 型中间细丝基因导入绵羊基因组, 转基因绵羊毛光泽亮丽, 羊毛中羊毛脂的含量得到明显提高^[11]。

目前制作转基因动物效率极低^[11~13]。以显微注射法产生转基因动物为例, 一则统计资料表明, 小鼠转基因阳性率 2.6%, 大鼠 4.4%, 兔子 1.5%, 牛 0.7%, 猪 0.9%, 绵羊 0.9%^[11]。在转基因过程中, 由于转基因在宿主基因组中的插入是随机的, 因此难以控制转基因在宿主基因组中的行为, 其结果便导致转基因阳性个体出现不育、胚胎死亡、畸形等异常现象。

尽管转基因家畜的研究尚处于初始阶段, 进一步深入研究所面临的困难将会更大。但是, 目前的研究进展已经预示, 它将为畜牧业以及生物制剂生产带来巨大的变革和经济效益。

参考文献

- [1] 石国庆, 曾培坚, 杨永林, 等. 绵羊腹腔内窥镜子宫角深部冷冻精液输精试验[J]. 中国畜牧杂志, 1998, 34(2): 34
- [2] 蒋英. 世界养羊科学及生产[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999, 134
- [3] 曾培坚, 石国庆, 皮文辉, 等. 用聚乙烯吡咯烷酮加 FSH 制剂对绵羊一次注射超排效果试验[J]. 中国养羊, 1996, 16(4): 26
- [4] 余文利, 李树静, 乌兰, 等. 绵羊胚胎移植技术在内蒙古的研究和应用[J]. 畜牧兽医学报, 1999, 30(2): 110~116
- [5] 石国庆, 刘守仁, 杨永林, 等. 应用胚胎移植培育“U”系羊新类群的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2000, 36(3): 32~33
- [6] 石国庆, 刘守仁, 曾培坚, 等. 中国美利奴胚胎冷冻移植研究[J]. 中国养羊, 1997, 17(2): 24
- [7] 史洪才. 家畜胚胎冷冻保存的研究进展[J]. 草食家畜, 1999, 1: 31~34
- [8] 郭志勤, 张继慈, 张沅, 等. 家畜胚胎工程[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1998, 167
- [9] 王光亚, 段恩奎. 山羊胚胎工程[M]. 陕西: 天则出版社, 1993, 80, 134~139
- [10] 张锁链, 刘东军, 王建国, 等. 通过体外受精技术缩短山羊育种周期的研究[J]. 中国实验动物学报, 1999, 7(2): 95~98
- [11] 刘建忠, 李宁, 丁翔, 等. 转基因动物研究进展[J]. 农业生物技术学报, 1998, 3, 269~276
- [12] 王鲜忠, 孙新明. 转基因动物研究进展[J]. 动物医学进展, 1999, 20(3): 24~26
- [13] 魏伍川, 王惠生. 基因克隆技术及其在畜牧兽医上的研究应用[J]. 内蒙古畜牧科学, 1999, 2: 30~34

The Application of Biological Technique in Scientific Research of Sheep Husbandry

Liu Shouren

(Xinjiang Academy of Agricultural Reclamation, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

[Abstract] In the article, the application of biological technique in the scientific research of sheep husbandry is introduced. It involves frozen semen, embryo transfer, embryo freezing preservation, embryo splitting, in vitro fertilization, nuclear transfer and cloned embryo, gene transfer and so on. The application of biological technique not only improves the level of sheep breeding and production, but also brings about obvious economical results. Meanwhile, new ways and channels are opened up for scientific research and production in sheep husbandry by the development and maturation of biological technique.

[Key words] biological technique; sheep husbandry