

应用国产激素进行奶牛超数排卵的研究

敖琦 田金如 李继军* 邓瑞广 贺文杰
朱云芝 郭淑珍 徐民然

(河南省农业科学院畜牧研究所, 郑州 450002)

摘要 研究了国产激素(FSH)在使用方法、时间、剂量、配制比例等方面对奶牛超数排卵效果的影响,并对供体牛的年龄、胎次、产后日期、重复超排及季节、气候等各种因素在超数排卵效果方面进行了探讨。研究结果还表明国产FSH超排效果比较稳定。

关键词 奶牛 激素 超数排卵 胚胎移植

胚胎移植是近代细胞生物工程应用于畜牧业生产的一项新技术,而超数排卵则是为提供较多优质胚胎和进行胚胎移植工作的核心技术,也是胚胎冷冻保存、胚胎分割、细胞融合、体外受精、胚胎性别鉴定等生物工程技术研究与应用的基础。目前国内外对家畜超排均采用FSH(促卵泡素)和PMSG(孕马血清促性腺激素)两种激素。此类药品不仅进口困难,而且价格昂贵,在国内推广应用受到很大限制。而对国产激素的应用,国内有关研究单位尚持有不同意见及看法。因此研究国产激素的应用和处理程序是亟待解决的问题。此外,我们在应用国产激素的同时,对影响超数排卵的各种因素作了进一步探讨,以期寻找稳定的超排效果提供科学依据。

材料和方法

一、供体牛的选择

供体牛为黑白花奶牛,年龄1.5~9岁,身体健康,营养中等,性周期正常,无繁殖疾病史。

二、药品和器械

试验所用激素均为国产,垂体促卵泡素(FSH)系宁波生物制品厂生产;前列腺素(PGF_{2α})系上海五洲制药厂生产;麻醉药品为盐酸利多卡因;PBS液为自己配制。

三、超数排卵处理程序

采用FSH配合PGF_{2α}进行处理,将总剂量为400~440单位的FSH在供体牛性周期8~12天间的任何一日开始作多次递减法注射,日剂量分别为70、70; 60、60; 50、50; 40、40

1990-03-20收稿。 * 执笔人。

本研究为“七五”期间河南省科委重点招标课题。

单位,共注射4天,每天分早晚两次注射,间隔10~12小时。于第4日另加注PGF_{2α}总量为3.6~4.0mg,分早晚两次肌注。上述处理后24小时观察发情,见发情后开始输精,一般2~3次,间隔10~12小时,输精剂量加倍〔2,6〕。

四、胚胎采集、检查及评定

在供体母牛输精后6.5~7.0天采用子宫冲洗法进行胚胎采集,用加有1~2%犊牛血清的改进杜氏磷酸缓冲液(PBS),于每侧子宫角内注入400ml左右,然后回收此冲卵液,静置30分钟后,采用虹吸法弃去上清液,留下50ml沉淀液进行镜检。根据胚胎的完整性、受精程度、卵裂球数目、颜色及细胞质均匀度等进行综合判定,并按A、B、C、D进行分级〔3〕。

结果与分析

一、1986~1989年超数排卵的效果

4年共超排供体牛133头,成功111头,成功率为83.46%,其中采卵成功牛95头,成功率为87.16%。获总卵数749枚,平均每头获卵6.75枚;其中可用胚561枚,平均每头可用胚5.15枚,达到国内较高水平〔1〕(表1)。

表1 1986~1989年超数排卵效果

年度	处 理 供体牛	超 排 成功数	成功率 (%)	采卵成 功头数	成功率 (%)	获总卵 数 量	每头平均 获 卵 数	可用胚 总 数	每头平均 可用胚数
1986	41	35	85.37	32	91.43	293	8.37	204	5.83
1987	43	34	79.10	26	81.25	188	5.88	169	5.28
1988	28	25	89.29	21	84.00	139	5.56	82	3.28
1989	21	17	80.95	16	94.12	129	7.59	106	6.24
总计及平均	133	111	83.46	95	87.16	749	6.87	561	5.15

二、供体牛个体情况对超数排卵的影响

1. 年龄对超排效果的影响 4年来所用供体牛的年龄为1.5~8岁,在饲养条件、激素处理、采卵方法等相同情况下,以不同年龄组进行对比试验,结果表明,不同年龄组供体牛的排卵数及卵的回收数具有一定差异。青年母牛的采卵数及可用胚数均不低于经产牛。随着年龄的增长,卵的数量有逐渐减少的趋势,8岁以上的经产母牛卵的数量偏少〔1〕(表2)。

表2 年龄对超排效果的影响

年 龄 区 分	超 排 情 况			采 卵 情 况			获 卵 情 况		
	头 数	成功 数	超排成功 率(%)	头 数	采到卵 头 数	采卵成功 率(%)	总 数	头均采 卵 数	可 用 胚 总 数 头 均
< 3岁	42	32	76.2	30	27	90.0	240	8.00±6.38	182 6.07±4.60
4—6岁	66	55	83.3	55	47	85.5	351	6.38±6.06	269 4.89±4.95
7—9岁	25	24	96.0	24	21	87.5	158	6.58±6.94	110 4.58±5.27

2. 胎次对超数排卵的影响 2~4 胎生殖力高峰期的供体牛可获得较好的超排效果, 头均可用胚均在 4.67 枚以上。青年母牛虽然平均得可用胚 4.4 枚(可用胚率 69.5%), 但无泌乳活动, 生殖道感染少, 超排效果理想(表 3)。

表3 不同胎次的超排效果

胎次 区分	超排情况			采卵情况			获卵情况			
	头数	成功数	超排成功率(%)	头数	采到卵头数	采卵成功率(%)	总数	头均采卵数	可用胚总数	头均
0 胎	22	16	72.7	15	13	86.7	95	6.33±4.88	66	4.40±3.11
1 胎	40	30	75.0	30	29	96.7	238	7.93±6.59	166	5.53±4.64
2 胎	29	24	82.0	24	20	83.3	148	6.17±6.16	126	5.25±5.77
3 胎	24	22	91.0	22	19	86.4	162	7.36±6.36	133	6.05±4.95
4 胎	12	12	100	12	9	75.0	88	7.33±8.64	56	4.67±6.17
5 胎	6	6	100	6	5	83.3	18	3.00±4.53	14	2.33±4.23

3. 产后日期与超排效果 产后 45~60 天的母牛超排处理, 头均获可用胚 5.8 枚, 可用胚率 43.3% (29/67), 异常胚及未受精卵占 56.7% (38/67); 产后 120~150 天超排效果较好, 头均获可用胚 10.00±4.64 枚; 产后 150 天以上超排效果较差, 取得了与北京、日本等地试验相似的结果[1, 7]。

表4 母牛产后不同天数超排效果

产 后 天 数	超 排 情 况			采 卵 情 况				获 卵 情 况							
	头 数	成 功 数	超排 成功 率(%)	头 数	采到 卵 头数	采卵 成功 率(%)	总 数	头 均 采卵数	可用 胚 总数	头 均		异常 胚 头 均		未受 精 头 均	
										总数	头 均	总数	头 均	总数	头 均
45~90	6	6	100	5	5	100	67	13.4 ±8.62	29	5.80±5.12	16	3.20±2.17	22	4.40±5.86	
60~90	23	20	87.3	20	20	100	141	7.05±5.04	126	6.30±5.39	12	0.60±1.23	3	0.15±0.49	
90~120	18	15	83.3	15	15	100	116	7.73±5.79	92	6.13±4.94	15	1.00±1.31	9	0.06±0.99	
121~150	6	5	83.3	5	5	100	51	10.2 ±4.55	50	10.0±4.64	0	0	1	0.20±0.45	
151~300	33	26	78.8	26	20	76.9	145	5.58±6.63	112	4.31±5.01	25	0.96±1.43	6	0.31±0.84	
> 300	25	23	92.0	23	17	73.9	134	5.83±7.22	86	3.74±5.10	32	1.39±2.15	16	0.78±1.26	

4. 重复超排对超排效果的影响 选择部分供体母牛进行重复超排, 试验表明, 超排间隔半年以上不影响超排效果(表 5)。

5. 超排后被爬稳定时间对超排效果的影响 母牛超排后发情高峰时间(被爬稳定)多集中在 24~48 小时, 在采卵的 109 头供体牛中, 超排后 24 小时以内, 24~48 小时和 48 小时以上发情达高峰的供体牛分别为 3 头、91 头和 15 头; 头均获可用胚分别为 5.33±1.53 枚、5.64±5.04 枚和 2.13±3.56 枚; 可用胚率分别为 57.1% (16/28)、76.9% (513/667) 和 59.3% (32/54)。结果表明, 在 24~48 小时以内达发情高峰的供体牛, 超排效果明显优于 24 小时以内和 48 小时以上达发情高峰的供体牛 ($P<0.05$)。

表5 重复超排对超排效果的影响

处理 次数	超排情况			采卵情况			获卵情况			
	头	成功	超排成功	头	采到卵	采卵成	总	头均采	可用胚	
	数	数	率(%)	数	头数	功率(%)	数	卵数	总数	头均
1	13	12	92.3	12	11	91.7	124	10.33±6.77	79	6.58±4.87
2	13	10	76.9	10	8	80	76	7.60±6.96	56	5.60±5.26

三、环境条件对超排的影响

1. 不同季节对超排的影响 从1986~1989年累计25批次的超排结果为: 4月份超排头均可用胚为 5.40 ± 5.19 枚; 5月份为 4.57 ± 6.05 枚; 6月份为 6.22 ± 4.69 枚; 7~8月份为 4.40 ± 5.03 枚; 9月份为 7.15 ± 5.57 枚; 10~11月份为 3.05 ± 3.76 枚。结果表明, 在我省除炎热的8月及较冷季节的超排效果较差外, 其它季节均可获得较好的超排效果。

2. 饲养管理条件对供体牛超排的影响 在4年试验中共选择10个单位分三种不同类型的饲养水平进行对比试验, 第一种类型为饲养管理条件较好的国营奶牛场, 第二种类型为中等饲养管理水平的小型奶牛场, 第三种类型为饲养管理非规范化的个体户。这三种类型奶牛场超排结果所获得头均可用胚数依次为 6.12 ± 5.07 枚、 4.43 ± 3.96 枚和 2.36 ± 2.92 枚, 表明超排效果与饲养水平密切相关。

四、不同超排激素对超排效果的影响

1988年用美国的PMSG与国产的FSH两种激素在相同的试验条件下(个体差异除外)进行了对比试验(PMSG为每公斤体重5 IU, 在性周期第11天一次肌注)。结果表明, FSH超排效果优于PMSG。但数据偏少, 还有待于进一步探讨(表6)。

表6 国产FSH与PMSG(美产)超排效果比较

超排 激素 种类	超排情况			采卵情况			获卵情况						
	头	成功	超排成	头	采到卵	采卵成功	总	头均采	可用胚	头	异常胚	头	未受精
	数	数	功率(%)	数	头数	数率(%)	数	卵数	总数	均	总数	均	总数
PMSG	4	4	100	4	4	100	19	4.75±2.22	8	2.00±2.16	10	2.50±1.91	1
FSH	9	9	100	4	4	100	19	9.67±9.35	51	5.57±7.02	13	2.00±2.40	18

讨 论

1. 关于国产激素的应用问题 4年来使用国产激素FSH与PGF_{2α}对133头供体母牛进行超排试验, 头均获可用胚5.15枚, 达到国内较高水平, 接近于国际水平。证明使用国产激素不仅可以达到与进口激素相似的超排效果, 且其成本仅相当于进口激素的1/10^(3, 4), 为胚胎移植技术立足于国产激素并尽快在生产中推广应用提供了科学依据。

2. 供体牛的年龄问题 试验表明,青年母牛的获卵数及可用胚数均不低于经产牛,且超排效果理想。这是因为青年母牛的卵巢对外来激素反应敏感,子宫角细、短,易于冲卵液的回收,且由于其未产过犊,生殖器官疾病相对较少,在超排过程中也不存在影响产奶量的问题〔1〕。我们认为青年母牛也可做为供体牛。8岁以上经产母牛超排效果较差,是由于老龄母牛子宫松弛下沉,冲卵液回收率较差,且卵巢对外源激素反应敏感性较低及子宫感染等生殖疾病较多,从而影响超排效果〔4〕。

3. 重复超排的效果问题 由于超数排卵是利用外源激素强行打破母牛的正常性周期及卵巢的排卵规律,使卵巢上多个卵泡同时发育排卵,因此母牛在超排后需经过一段时间进行本身的自我调节,排出外源激素,使卵巢恢复正常生理机能。对母牛实施重复超排,只有在母牛生理机能完全恢复情况下才不影响超排效果。关于重复超排的最短间隔时间已有报道,为2个月〔6〕。我们只对间隔180天的母牛作了重复超排研究,取得了满意的效果。对于180天之前重复超排的效果问题有待今后进一步研究。

4. 产后超排日龄问题 分娩距超排处理间隔时间越短,越能尽快参加配种繁殖利用,这样才能获得好的经济效益。因此在不影响超排效果的前提下,产后超排日龄应尽量提前。产后45~60天的母牛,虽然生殖机能及体况没有完全恢复,且处于泌乳高峰期,在一般情况下超排结果可用胚率较低,异常胚及未受精卵较多。但我们的试验结果仍获得了头均可用胚5.8枚,且超排距产后日龄仅45~60天。因此,我们认为对产后的母牛在直检且产犊都比较正常的情况下,45~60日龄时即可用于超排处理〔9〕。产后120~150天的母牛,之所以能获得较理想的超排效果,可能是由于产后三个月以上的母牛其泌乳高峰期已过,体况开始好转,生殖器官已得到恢复,泌乳及发情的内分泌激素已处于协调状态的缘故〔7〕。

参 考 文 献

- 1 董伟.影响牛超数排卵效果因素的分析.见:全国奶牛胚胎移植培训班资料,1987
- 2 周颂成.奶牛受精卵的移植及其冷冻保存新技术的初报.上海农学院学报,1987,5(3):207~213
- 3 桑润滋等.应用胚胎移植使黄牛繁殖奶牛的综合技术研究.见:中国奶牛协会等编.全国牛胚胎移植论文选集(1978~1987),65~76
- 4 贾福德等.奶牛超数排卵的研究.黑龙江畜牧兽医,1990,(4)
- 5 铃木达行.畜产的研究,1986,40(4):7~11
- 6 Sreenan J M. The Veterinary Record, 1983, (25): 624~629
- 7 Kweon O K. The Japanese Journal of Veterinary Research, 1986, 43(3): 495~502
- 8 Foote R H. Theriogenology, 1988, 29(1): 111~123
- 9 Takahashi Y. Japanese Journal of Animal Reproduction, 1983, 29(2): 74~79

Studies on the Superovulation of Cows by Using Hormones (FSH, $\text{PGF}_{2\alpha}$) Produced in China

Ao Qi Tian Jienru Li Jijun Deng Ruiguang
He Wenjie Zhu Yunzhi Guo Suzhen Xu Minran

*(Institute of Animal Husbandry and Veterinary, Henan Academy of
Agricultural Sciences, Zhengzhou)*

Abstract Two hormones (FSH, $\text{PGF}_{2\alpha}$) produced in China were used to study the effects of methods, timing, dosages, combination ratios and treatment procedures on superovulation. And the influences of ages, embryo number, post-partum periods, seasons, climate and repeated superovulation on the superovulation of donor cows were also studied during 1986—1989. The results indicated that the superovulation could be obtained by FSH treatment.

Key words: Cow; Hormone; Superovulation; Embryo transplantation