

家兔胚胎移植试验

马玉斌 朱洵美 庄海博

(西北大学) (陕西省动物研究所)

家兔是一种小型实验动物,由于这种动物繁殖快、产仔多,取材容易,所以被选作胚胎移植试验动物。通过这一研究可为家畜胚胎移植寻找共同的规律,提供可靠的理论依据。1979年我们进行家兔胚胎移植试验28例,怀胎9例,共获仔兔29只。同时,还进行了人工超数排卵的试验,现将结果报道如下。

一、材料和方法

(一) 实验动物 实验用兔,主要为大耳白和青紫蓝,有时也选用其它杂种母兔,4—15月龄,体重3—5.5斤。

(二) 人工催情和超数排卵 最初采用苯甲酸雌二醇(770304,上海第九制药厂)+绒毛膜促性腺激素(HCG,780913上海生化制药厂)组配进行人工催情,后来采用促卵泡激素(FSH,790302,武汉生化制药厂)+促黄体生成激素(LH,770319,武汉生化制药厂)或溶黄体素(PGF_{2α},780601,上海前列腺协作组)组配进行人工超排。为使供体和受体母兔同步发情,可选2—4或4—6只二个品种,产次不同而情期状况大抵一致的实验母兔组成一组,先经雌二醇或FSH处理,即每日上、下午各肌肉注射一次,有的母兔经一天处理就可诱发发情,而有的则需经2—3天。使供体母兔与有生殖能力而健康的种公兔交配,最好再与另一公兔复配一次。受体母兔应与结扎输精管(确无精子)的

公兔进行假交配。当供体或受体母兔每次配种后,应立即肌注HCG、LH或PGF_{2α},注射剂量(见表2、3)。

(三) 卵的采集 采用外科手术法收集家兔胚胎,以盐酸普鲁卡因进行局部麻醉。从输卵管部位采卵时,沿腹白线向后作3—5厘米切口,打开腹腔,取出输卵管,用一玻璃探针找出喇叭口,插入内径1—2.5毫米的冲卵管,穿线紧缚,然后从子宫管连接处朝输卵管方向插入带18—22号针头的注射器,注入3—5毫升的冲卵液冲洗,收集于6厘米双层皿中,从子宫部位取卵时,切口位置稍后,约3厘米,打开腹腔,取出子宫角于前1/4—1/3处斜向夹一小血管夹,用兽用16—18号注射针头在夹前无大血管处将宫壁穿一孔,然后由宫管连接部朝子宫腔插入针头,注入5—10毫升冲卵液,卵、液由小孔处流出,收集于双层皿中。

输卵管取卵要比子宫部位取卵效果好,目前采卵回收率可达90—100%。现将采集家兔各期胚胎的时间和部位列于表1。卵采集之后,置于25—40倍解剖镜下拣卵,更换新液数次,再在低倍镜下挑选发育正常的胚胎用于移植。

冲卵液的组成为任-洛氏混合液或杜氏磷酸盐缓冲液(1:1),另加10—20%的同源血清、40国际单位/毫升青霉素和50微克/毫升链霉素,混合液pH6.5—6.7;杜氏液pH6.7—6.9。

(四) 胚胎移植 家兔胚胎移植试验,主要

表1 家兔早期胚胎的采集时间与部位

项 目	单细胞 受精卵	2 细胞	3 细胞	4 细胞	5—6细胞	8 细胞	9—16 细胞	32 细胞	桑椹胚	囊胚
取卵时间(交配后,小时)	21	22—25	24—26	25—31	30—35	35—42	41—50	48—55	55—70	70—120
取卵部位	输 卵 管								子 宫	

是在大耳白和青紫蓝两个品种之间的互移，通常采用外科手术法，其切口部位和切口大小与外科采卵相同。一般将 8 细胞及其以后发育各期的胚胎进行子宫移植，而将早于 8 细胞各期胚胎进行输卵管移植。

进行输卵管移植时，找出喇叭口后，将内径 0.5—1 毫米特制玻璃吸管吸取待移胚胎连同 0.05 毫升的移卵液小心地插入喇叭管，慢慢地放入输卵管，胚胎移入后应用手指捏住喇叭管下部片刻，防止卵液流失。

进行子宫移植时，用兽用针头在受体子宫角前 1/4—1/5 无大血管处戳一小孔，以内径

0.5 毫升的吸管吸取胚胎连同 0.1 毫升移卵液由小孔处向子宫角前插入子宫腔，胚胎移入子宫角应愈前愈好。通常是行两侧输卵管或子宫角移植的，每侧移植 3—5 个胚胎。

采卵和移植应尽量在无菌条件下操作，手术要做到准确迅速，卵在外停留时间愈短愈好，胚胎移植时室温为 18—25℃，全过程约 30 分钟。

二、结果与讨论

(一) 苯甲酸雌二醇对家兔超数排卵的效果 (见表 2 和 3)

表 2 苯甲酸雌二醇和绒毛膜促性腺激素、前列腺素 $F_{2\alpha}$ 进行家兔人工超排的效果

药物组配	注射总剂量 (微克)	母兔只数	排 卵 数		卵 子 回 收		
			总 数	平 均 数	总 数	平 均 数	%
苯甲酸雌二醇 + HCG*	100	6	51	8.5	34	5.7	67
	120	1	3	3	3	3	100
	160	1	8	8	8	8	100
	200	2	8	4	8	4	100
总 数		10	70	7	53	5.3	76
对 照		2	20	10	12	6	60
苯甲酸雌二醇 + PGF _{2α} **	40	5	1	0.2	1	0.2	100
	66	3	—	—	—	—	—
对 照		2	13	6.5	13	6.5	100

* HCG 60—120。

** PGF_{2 α} 0.1 毫克。

由表 2 可以看出，利用苯甲酸雌二醇对家兔进行超数排卵，注射总剂量 100—200 微克者都能顺利地诱发母兔发情、交配，平均排卵数 7 个，但超过 10 个者少，往往不如同时期自然排卵状况。注射总剂量在 40—60 微克者，虽亦能促使母兔发情、交配，但卵巢增大不显，成熟滤泡不多，虽配合注射 PGF_{2 α} 促排，但排卵者极少，与自然排卵状况悬殊。根据多次实验，对 3—4 月未成熟母兔人工超排，即使卵巢增大，形如桑椹，子宫极度充血。由此看来，使用苯甲酸雌二醇进行家兔人工催情，可以取得预期效果，适量注射可以取得少量卵、胚，但此药物对家兔

超排，似无实效。

(二) FSH 对家兔超排的效果 表 3 证明，使用 FSH 和 LH 组配进行超排，对家兔有明显的效果，尤以每次注射 2—3Ru (大鼠单位)。2—3 天连续注射 4—6 次者为佳。但每次剂量增加到 4Ru 以上者，经过 4—6 次连续注射，则常有加速兔卵在生殖管道中的运行速度，提早到达子宫和阴道的趋势，这是因为药物过量处理，增进生殖管道收缩的节律所致。这样，有利于家兔和家畜的非手术法从阴道取卵。但 FSH 过量，有时可以导致卵胚畸形。

采用 FSH + PGF_{2 α} 组配对母兔超数排卵，

表 3 FSH 与 LH、PGF_{2α} 组配进行家兔人工超排的效果

药物组配	注射总剂量 (Ru)	母兔只数	排 卵 斑		卵 子 回 收		
			总 数	平 均 数	总 数	平 均 数	%
FSH + LH*	2—6	4	75	18.8	67	16.8	89
	8—10	5	161	32.2	147	29.4	93
	12	6	89	14.8	71	11.8	80
	15—16	2	68	34	28	34	41
	18—20	4	117	29.3	74	18.5	63
	24—32	3	36	12	25	8.3	67
总 数		24	546	23.8	412	17.2	75
对 照		6	45	7.5	35	5.8	78
FSH+ PGF _{2α} **	12	3	181	60.3	181	60.3	100
对 照		1	9	9	9	9	100

* LH 1—8Ru。

** PGF_{2α} 0.1 毫克。

可以获得更显著的结果。最多可从一只母兔获得 68 个卵, 平均采卵 60.3 个。

(三) 胚胎移植结果 进行家兔胚胎移植试验 28 例, 其中有 2 细胞期 2 例、4 细胞期 1 例、8 细胞期 1 例(输卵管移植); 另有 8 细胞期 3 例、16 细胞期 17 例和囊胚期 4 例(子宫移植), 取得胚胎移植成功者 9 例, 共获仔兔 29 只(见表 4、5)。

这 9 例中, 剖腹检查 3 例, 怀仔 12 个; 产仔者 6 窝, 共获仔兔 17 只。生下的仔兔中有不同

的移植情况: 30 号供体青紫蓝母兔 × 青紫蓝种公兔, 取其 16 细胞胚胎借腹于 20 号受体大耳白母兔, 怀胎 31 天生下一只具有青紫蓝遗传特征的仔兔, 29 号供体大耳白母兔 × 大耳白种公兔, 将其囊胚移植给 51 号受体青紫蓝母兔, 借腹怀胎 28 天, 生下 3 只大耳白遗传性状的仔兔(见图 1 和 2)。通过胚胎移植试验说明, 受体所生下的仔兔保持了供体母兔原有的表型, 同时也有力地证明了家兔胚胎移植试验不仅可在同一品种间移植取得成功, 而且在不同品种间



图 1 供体大耳白母兔 × 大耳白公兔, 将其胚胎移植给受体青紫蓝母兔生下大耳白仔兔

图 2 供体青紫蓝母兔 × 青紫蓝公兔, 将其胚胎移植给受体大耳白母兔生下青紫蓝仔兔

表 4 家兔胚胎移植成功概况

供体母兔		种公兔	受体母兔				取卵状况					移植数量				剖腹检查		产仔状况				
兔号	品种		兔号	品种	月龄	产况	取卵时间	取卵部位	冲卵液	时间(小时)	胚胎发育期	移植时间	输卵管		子宫		左	右	产仔日期	怀孕天数	产仔兔数	仔兔特征
18	大耳白	大耳白	62	青紫蓝		经产	6.23 10:00	输卵管	任洛氏混合液	44	16细胞	6.23 10:30			4	3			7.22	30	3	大耳白
30	青紫蓝	青紫蓝	20	大耳白	7	经产	6.27 9:00	输卵管	任洛氏混合液	47	16细胞	6.27 9:25			2				7.28	31	1	青紫蓝
57	青紫蓝	白兔	19	大耳白	4	初产	7.6 9:25	输卵管	任洛氏混合液	48	16细胞	7.6 9:55			4	1			8.6	30	1	白兔
29	大耳白	大耳白	51	青紫蓝		经产	7.10 9:30	子宫	任洛氏混合液	72	囊胚	7.10 10:00			2	3			8.8	28	3	大耳白
37	大耳白	大耳白青紫蓝	125	青紫蓝	7	经产	9.22 10:30	输卵管	任洛氏混合液	42	16细胞	9.22 11:00			7	6			10.21	30	3	2大耳白 1青紫蓝
129	大耳白	大耳白	128	大耳白	12	经产	9.25 14:35	输卵管	任洛氏混合液	46	16细胞	9.25 15:00			6	7	2	4				
142	青紫蓝	青紫蓝	141	大耳白	7	经产	10.4 10:00	输卵管	杜氏液	50	16细胞	10.4 11:00			5	5			11.3	30	6	青紫蓝
40	大耳白	白兔	140	大耳白		经产	10.4 11:30	输卵管	杜氏液	27	4细胞	10.4 12:00	2	3				2			15	
116	大耳白	青紫蓝	58	青紫蓝		经产	11.6 10:00	输卵管	杜氏液	43	16细胞	11.6 10:45			5	5		2			14	

表 5 家兔胚胎移植结果

胚胎发育分期	受体母兔只数	移植胚胎数	产仔母兔只数	产仔总数	受体母兔产仔率(%)	胚胎成活率(%)
2 细胞	2	14	—	—	—	—
4 细胞	1	5	1	2*	100	40
8 细胞	4	19	—	—	—	—
16 细胞	17	119	7	24**	41.18	20
囊 胚	4	21	1	3	25	14.3
总 数	28	178	9	29	32.14	16.3

* 剖腹所得的仔兔。

** 其中剖腹得 10 个仔兔。

移植也可取得成功。

* 一般说, 胚胎取自那一部位应移至相应部位, 但通过家兔胚胎移植实验, 证明并非完全如

此, 在我们的试验中, 16 细胞期的胚胎全由输卵管部位取得, 但数例移入子宫角成功。