



张元来, 杨成文, 张杰, 等. 不同季节对西门塔尔牛活体采卵和体外胚胎生产的影响[J]. 畜牧兽医杂志, 2025, 44(3): 40-43.

ZHANG Yuanlai, YANG Chengwen, ZHANG Jie, et al. Influence of different seasons on in vivo oocyte retrieval and in vitro embryo production in Simmental cattle[J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2025, 44(3): 40-43.

不同季节对西门塔尔牛活体采卵和体外胚胎生产的影响

张元来¹, 杨成文^{1*}, 张杰², 王红兵³, 阚丰年⁴, 孔伟^{5**}

(1. 武威市畜牧兽医总站, 甘肃武威 733000; 2. 凉州区双城镇农业农村服务中心, 甘肃武威 733000;
3. 甘肃省牛胚胎技术有限公司, 甘肃金昌 737100; 4. 甘肃渤丰农牧科技有限公司,
甘肃武威 733000; 5. 甘肃省家畜繁育改良管理站, 甘肃武威 733000)

摘要:为进一步研究西门塔尔牛体外胚胎生产移植效果, 有效提高优秀核心群母牛繁殖效率, 迅速解决优秀核心育种群数量少, 优质种源供给不足等问题。在武威市省级西门塔尔肉牛种牛场筛选 1~2 岁性成熟的核心群优秀供体 15 头, 在不同季节对其进行超声引导下卵泡穿刺术(OPU)提取卵母细胞, 对其进行体外受精(IVF)、体外培养、冷冻保存等流程, 监测分析各环节数据。结果表明: 经优化后的 OPU-IVF 流程头均可采卵 17.58 枚, 体外受精后培养卵裂率达到 69.67%, 囊胚率可达到 36.19%, 头均获 OPU-IVF 胚胎 3.75 枚, 鲜胚移植怀孕率 53.37%。研究认为, 西门塔尔牛体外胚胎生产及移植技术成功率受多种因素影响, 如供体牛的年龄、营养状况、激素处理方案、实验室环境条件、体外培养、冷冻保存及移植等环境。在中国西北方, 西门塔尔牛活体采卵在春秋季节进行同期发情处理、采卵效果及体外受精培养效果明显好于冬季, 这可能应该与气候条件和肉牛的生理周期有关, 说明西门塔尔牛活体采卵在春秋季节进行效果更好。

关键词: 肉牛; 活体采卵; 体外胚胎; 试验; 分析

[中图分类号] S823.8 [文献标志码] A [文章编号] 1004-6704(2025)-03-0040-04

Influence of Different Seasons on in Vivo Oocyte Retrieval and in Vitro Embryo Production in Simmental Cattle

ZHANG Yuanlai¹, YANG Chengwen^{1*}, ZHANG Jie²,

WANG Hongbing³, KAN Fengnian⁴, KONG Wei^{5**}

(1. Wuwei Animal Husbandry and Veterinary General Station, Wuwei, Gansu 733000, China; 2. Liangzhou District Shuangcheng Town Agricultural and Rural Service Center, Wuwei, Gansu 733000, China; 3. Gansu Province Cattle Embryo Technology Co., Ltd., Jinchang, Gansu 737100, China; 4. Gansu Bofeng Agricultural and Animal Husbandry Technology Co., Ltd. Wuwei, Gansu 733000, China; 5. Gansu Province Livestock Breeding and Improvement Management Station, Wuwei, Gansu 733000, China)

Abstract: In order to further study the effect of in vitro embryo production and transplantation in Simmental cattle, and to effectively improve the efficiency of excellent core group of cows, and to quickly solve the problems of small number of excellent

[收稿日期] 2024-11-13
[基金项目] 甘肃省农业农村厅科技支撑项目(KJZC-2024-10); 东西部科技协作专项(24CXNH008)
[第一作者] 张元来(1984-), 男, 兽医硕士, 主要从事畜牧兽医技术研究推广工作。E-mail: zhangyuanlai126@126.com
* [通信作者] 杨成文, E-mail: 125344608@qq.com
** [共同通信作者] 孔伟, E-mail: jdk5840@126.com

core breeding groups and insufficient supply of high-quality breeding sources. In provincial Simmental beef cattle breeding farm in Wuwei city, 15 excellent core group donors aged 1—2 years were selected, and their oocytes extracted by ultrasound-guided follicle puncture(OPU) in different seasons. The oocytes were then subjected to in vitro fertilization(IVF), in vitro culture, and cryopreservation. The data at each stage were ana-

lyzed. The results showed that after optimization, the OPU-IVF process could collect average of 17.58 oocytes per donor, with a cleavage rate of 69.67% after in vitro fertilization, and aocyst rate of 36.19%. Each donor could produce an average of 3.75 OPU-IVF embryos, and the pregnancy rate after embryo transplantation was 53.37%. This study concluded that the success rate of in vitro embryo production and transplantation in Simmental cattle is affected by various, such as the age of the donor cows, nutritional status, hormone treatment plan, laboratory environmental conditions, in vitro culture, cryopreservation, and transplantation environment In Northwest China, the collection of oocytes from live Simmental cattle should be carried out in spring and autumn, with significantly better results than in winter ($P<0.5$), which may be related to the climate conditions and the physiological cycle of the beef cattle.

Key words: beef cattle; ovum pick-up; in vitro embryos; experiment; analysis

为进一步研究西门塔尔牛体外胚胎生产移植效果,有效提高优秀核心群母牛繁殖效率,研究和推广肉牛体外胚胎生产移植高效扩繁关键技术,解决西门塔尔种牛遗传性能参差不齐,人工授精、自然交配等方式改良繁育周期长,遗传选育进程缓慢,优秀核心育种群数量少,优质种源供给不足等制约肉牛产业高质量发展的问題,本试验旨在研究不同季节对牛活体采卵和和体外胚胎生产的影响。

1 材料和方法

1.1 试验时间及地点

试验于2024年4月到2024年11月进行,供体牛筛选、同期发情处理及胚胎移植工作在武威市金绿源农业科技发展有限公司进行,活体采卵、检卵等工作在武威市牛胚胎生物实验室开展,卵母细胞体外成熟、体外受精、培养及鉴定在甘肃省牛胚胎有限公司进行。

1.2 试验动物

在武威市凉州区一省级西门塔尔种牛场筛选1~2岁性成熟的核心群优秀西门塔尔母牛15头,分栏同一标准化饲养管理,在不同季节对筛选的15头供体牛重复开展活体采卵、胚胎生产试验。

1.3 试验方法

试验分别于2024年5月选取15头西门塔尔母牛、2024年9月选取12头西门塔尔母牛及2024年11月选取15头西门塔尔母牛进行发情处理,然后进行活体采卵(OPU),卵母细胞体外成熟、体外受精、培养及鉴定。最后对头均获卵数、卵裂数、卵裂

率、囊胚数、囊胚率、头均胚胎数、可冷冻胚胎数、可冷冻胚胎比率、鲜胚移植怀孕率等指标进行测量计算^[1]。计算公式为:

头均获卵=实际采卵数/实际采卵供体牛数

卵裂率=卵裂数/培养的卵母细胞数 $\times 100\%$

囊胚率=囊胚数/培养的卵母细胞数 $\times 100\%$

可冷冻胚胎比率=可冷冻胚胎数/囊胚数 $\times 100\%$

1.3.1 同期发情处理方案 同期发情处理采用7 d处理方式。第1天7:00 准时对筛选的供体牛进行 ADE 10 mL+放 CIDR 处理,下午直肠检查子宫左侧和右侧情况,第3天7:00 进行 GNRH 2.2 mL,第4天7:00 FSH 2.5 mL,19:00 FSH 2.0 mL,第5天7:00 进行 FSH 2.0 mL,19:00 FSH 1.8 mL,第6天7:00 进行 FSH 1.6 mL,下午直肠检查供体牛两侧子宫卵泡发育情况,第7天进行活体采卵^[2]。

1.3.2 活体采卵流程 保定供体牛→清除宿粪→2%利多卡因硬膜外麻醉→0.01%高锰酸钾清洗会阴部及外阴→75%酒精消毒外阴后用生理盐水冲洗→灭菌纱布擦拭外阴→将含采卵液的离心管和集卵杯置于恒温槽上→连接集卵杯与负压泵和穿刺针→活体采卵仪的超声波探头插入供体牛阴道至穹隆处→另一只手通过直肠把握卵巢→通过超声波探头确定卵巢上的卵泡位置→使卵泡位于进针线上→推进穿刺针对卵泡进行穿刺→确认所有2~8 mm 卵泡完全抽吸→确保 COCs 进入集卵杯→收集的卵泡液置于60 mm 培养皿中→体视显微镜下收集 COCs →转移到恒温台上(38.5℃的采卵液中)→体外成熟。

1.3.3 卵母细胞体外成熟、体外受精、培养及鉴定 (1) 卵母细胞体外成熟:在体视显微镜下挑选 COCs。根据 COCs 外观特征,将其分为四类:A、B、C、D类,选择A、B和C类的COCs进行体外成熟培养。挑选的COCs在采卵液中清洗3遍,在预先平衡的成熟培养液中清洗3遍,每个微滴可培养15~20个COCs,置于38.5℃、5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中进行成熟培养。(2) 体外受精:成熟培养20~22 h后,用 HEPES-TALP 液体清洗 COCs,转移到体外受精微滴中清洗3次,置于体外授精微滴中。用恒温精液解冻杯解冻细管精液。将解冻后的精子缓慢加入含5 mL mBO 的15 mL 离心管底部,倾斜45度放入培养箱中,静置30~40 min。吸取离心管上层的3~4 mL 上清,200 g 离心5 min 后弃上清,加入 mBO 重悬精子,调整精子密度至 1.7×10^7 个/mL,放回培养箱待用。将调整好密度的

精子悬液加入含有 COCs 的受精液微滴中,每个微滴加入 12 μ L 的精子重悬液,放入 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂/饱和湿度的细胞培养箱中共孵育 10~12 h。

(3)胚胎体外培养及质量鉴定:精卵共孵育结束后,将 COCs 移入透明质酸酶中,用吸管轻轻反复抽吸,以彻底去除卵丘细胞及黏附的精子。在体视显微镜下检查第二极体排出情况,将含有第二极体的受精卵在胚胎培养液微滴中清晰 3 次,移入胚胎培养液微滴中,在 38.5 $^{\circ}$ C、5% CO₂、7% O₂、饱和湿度的细胞培养箱中培养。第 0 天记录授精卵数,第 2 天记录受精卵的卵裂数,第 5 天记录桑椹胚数,在第 7 天记录囊胚数。选择 A 级、B 级和 C 级胚胎进行移植或者冷冻保存^[3]。

2 结果与分析

2.1 不同时间对西门塔尔肉牛采卵的影响

表 1 是不同时间(2024 年春季、秋季和冬季)对西门塔尔肉牛活体采卵相关数据,36 头西门塔尔肉牛活体采卵数 633 个,头均获卵可达到 17.58 个,通过检卵培养,卵裂率可达到 69.67%,该结果说明春季活体采卵效果明显高于秋冬季节,秋冬季节区别不明显;春季体外受精培养效果明显高于秋冬季节,卵裂率高达 73.23%。

2.2 不同时间对西门塔尔肉牛胚胎生产的影响

表 2 是不同时间(2024 年春季、秋季和冬季)对

西门塔尔肉牛胚胎生产相关数据,培养卵母细胞 373 个,发育成熟为囊胚 135 个,囊胚率达 36.19%,头均获得胚胎数为 3.75 个,可冷冻胚胎比率为 76.3%,鲜胚移植怀孕率 53.37%。该结果说明春秋季节培养成熟的囊胚明显高于冬季,囊胚率达 39.8%;胚胎冷冻处理和鲜胚移植受季节影响不明显,这应该是气候条件和肉牛的生理周期有关。Chasombat 等^[4]对青年牛进行 FSH 不同处理,获得头均可用卵子数约 13 枚,本研究中西门塔尔牛头均卵子数 17.58 枚,可能和 FSH 来源与剂量、牛的品种有关。

3 讨 论

超数排卵是提高体外胚胎生产效率的关键技术环节,直接影响着卵母细胞和胚胎的数量及质量。除供体牛自身品种及个体差异外^[5-6],超排效果还受到激素剂量^[7]、供体牛月龄、营养水平、饲养管理^[8]、季节等因素的影响^[9]。肉牛体外胚胎生产及移植技术成功率受多种因素影响,如供体牛的年龄、营养状况、激素处理方案、实验室环境条件、体外培养、冷冻保存及移植等环境。通过在不同季节开展西门塔尔肉牛活体采卵、体外受精培养、冷冻移植等工作,发现在春秋季节开展此项工作效果较好,这与北方气候条件、肉牛生理周期等因素有关,因此,开展此项工作多应在春秋季节开展。

表 1 不同时间对西门塔尔肉牛采卵的影响

Table 1 Egg collection data of Simmental beef cattle at different times

试验时间	超排处理 供体牛数 /头	实际采卵 供体牛数 /头	实际 采卵数 /个	头均获卵 /个	卵裂数 /个	卵裂率 /%
2024 年春季(5 月)	15	13	254	19.54	186	73.23
2024 年秋季(9 月)	12	10	169	16.9	118	69.82
2024 年冬季(11 月)	15	13	210	16.15	137	65.24
总 评	42	36	633	17.58	441	69.67

表 2 不同时间对西门塔尔肉牛胚胎生产的影响

Table 2 Embryo production data of Simmental beef cattle at different times

试验时间	培养卵母 细胞数 /个	囊胚数 /个	囊胚率 /%	头均 胚胎数 /枚	可冷冻 胚胎数 /枚	可冷冻 胚胎比率 /%	鲜胚移植 怀孕率 /%
2024 年春季(5 月)	160	63	39.38	4.85	50	79.37	54.55
2024 年秋季(9 月)	103	41	39.8	4.1	29	70.73	55.55
2024 年冬季(11 月)	110	31	28.18	2.38	24	77.42	50
总 评	373	135	36.19	3.75	103	76.3	53.37

优质的实验室环境与规范化操作是保证 OPU-IVF 技术稳定性与可重复性的关键因素。试验人员应严格遵循无菌操作原则,控制实验环境的温度(38.5℃)、湿度(95%)及 CO₂ 浓度(5%),选用性能稳定的试剂与耗材,并对关键技术参数进行实时监测与优化调整。OPU-IVF 技术已成为肉牛育种的重要手段,但其推广应用仍面临诸多挑战,如操作规程繁多、技术成本高、规模化生产程度低。未来研究应着眼于进一步优化 OPU-IVF 技术体系,提高单个供体的胚胎产量,降低胚胎移植成本,加强与分子生物学、基因组学等学科的交叉融合,深入探索影响胚胎发育的关键基因与调控机制,为肉牛品质改良提供新思路。Balboula 等^[10] 研究报道在 OPU 卵子成熟液中添加 E-64(Cathepsin Binhibitor)能提高卵母细胞发育能力与囊胚质量。因此,在培养液中添加外源因子提高活体采卵与体外胚胎生产效率是将来需重点关注的研究方向。

参考文献:

[1] 孙伟,赵勇超,吕和,等.西门塔尔牛体外胚胎生产效率分析[J].草食家畜,2023(2):14-19.
SUN W, ZHAO Y CH, LÜ H, et al. Analysis of in vitro embryo production efficiency of Simmental cattle [J]. Grass-Feeding Livestock, 2023(2): 14-19.

[2] 邱金龙,史延,李爽,等.牛活体采卵和体外胚胎生产技术的应用现状和展望[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2022,48(5):557-565.
QIU J L, SHI Y, LI SH, et al. Application status and prospect of bovine ovum pick-up and in vitro embryo production technologies [J]. Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences), 2022, 48(5): 557-565.

[3] 史文秀,何曙光,包玲玲,等.不同超排方案对牛超数排卵效果的影响研究[J].现代畜牧科技,2024(1):27-29.
SHI W X, HE SH G, BAO L L, et al. Study on the effect of different superovulation schemes on superovulation in cattle [J]. Modern Animal Husbandry Science

& Technology, 2024(1): 27-29.

[4] CHASOMBAT J, NAGAI T, PARNPAI R, et al. Ovarian follicular dynamics, ovarian follicular growth, oocyte yield, in vitro embryo production and repeated oocyte pick up in Thai native heifers undergoing superstimulation [J]. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 2013, 26(4): 488-500.

[5] 张传师,杨兴东,马建山,等.人工授精+胚胎移植法诱发肉牛双胎的试验研究[J].畜牧兽医杂志,2006,25(6):20-21.
ZHANG CH SH, YANG X D, MA J SH, et al. The testing and research of inducing twining of meat cattle with artificial insemination and embryo transplant [J]. Journal of Animal Science and Veterinary Medicine, 2006, 25(6): 20-21.

[6] 刘大伟,王晨,姜宁,等.影响牛超数排卵效果因素分析[J].黑龙江畜牧兽医,2013(10):81-82.

[7] 房义,李树静,余文莉,等.影响家畜超数排卵效果的研究进展[J].黑龙江动物繁殖,2006,14(2):20-22.
FANG Y, LI SH J, YU W L, et al. Research advancement of factors affecting superovulation in domestic animal [J]. Heilongjiang Journal of Animal Reproduction, 2006, 14(2): 20-22.

[8] 王林,庞云渭,郝海生,等.激素剂量、超排间隔及重复超排次数对和牛重复超排效果的影响[J].中国畜牧兽医,2021,48(9):3394-3402.
WANG L, PANG Y W, HAO H SH, et al. Effects of hormone dosage, superovulation interval and repeated times on repeated superovulation in wagyu cattle [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2021, 48(9): 3394-3402.

[9] YAMANAKA K I, KHATUN H, EGASHIRA J, et al. Heat-shock-induced cathepsin B activity during IVF and culture compromises the developmental competence of bovine embryos [J]. Theriogenology, 2018, 114: 293-300.

[10] BALBOULA A Z, ABOELENAIN M, SAKATANI M, et al. Effect of E-64 supplementation during in vitro maturation on the developmental competence of bovine OPU-derived oocytes [J]. Genes, 2022, 13(2): 324.