

# 黔北麻羊超数排卵效果分析

朱芳贤<sup>1</sup>, 陈家宏<sup>2</sup>, 许海涛<sup>1</sup>, 陈浩林<sup>2</sup>, 孔德顺<sup>2</sup>, 刘丑生<sup>1</sup>, 毛凤显<sup>3\*</sup>

(1. 全国畜牧总站, 北京 100193; 2. 贵州省畜牧兽医研究所, 贵州贵阳 550004; 3. 贵州省畜禽遗传资源管理站, 贵州贵阳 550001)

**摘要** [目的]探索适宜的地方山羊品种超数排卵方案。[方法]以黔北麻羊为试验动物,比较不同品牌促卵泡素(FSH)、相同品牌不同剂量FSH的超数排卵效果。[结果]41只黔北麻羊的平均黄体数14.59个,平均有效胚数8.39枚。日本产FSH 20.0 AU/只剂量组平均黄体数13.90个,平均有效胚数10.21枚;加拿大产FSH 160 mg/只剂量组平均黄体数14.00个,平均有效胚数7.33枚。[结论]日本产FSH的适宜剂量为20.0 AU/只,加拿大产FSH的适宜剂量为160 mg/只,日本产FSH的超数排卵效果优于加拿大产FSH,但差异不显著。

**关键词** 黔北麻羊;超数排卵;促卵泡素;有效胚

**中图分类号** S826 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)34-0089-03

## Analysis of Superovulation Effect of Qianbei Brown Goat

ZHU Fang-xian<sup>1</sup>, CHEN Jia-hong<sup>2</sup>, XU Hai-tao<sup>1</sup>, MAO Feng-xian<sup>3\*</sup> et al (1. National Animal Husbandry Service, Beijing 100193; 2. Guizhou Animal Veterinary Research Institute, Guiyang, Guizhou 550004; 3. Guizhou Management Station of Livestock and Poultry Genetic Resources, Guiyang, Guizhou 550001)

**Abstract** [Objective] To explore the optimal superovulation scheme for local goats. [Method] Taking Qianbei brown goat as test animals, the superovulation effects among different brands of FSH, same brand FSH with different dosages were compared. [Result] The luteum (CL) number of 41 Qianbei brown goats was 14.59, the number of effective embryos was 8.39. In the group of Japanese FSH with the dose of 20.0 AU/head, the luteum (CL) number was 13.90, the number of effective embryos was 10.21. In the group of 160 mg/head FSH from Canada, the luteum (CL) number was 14.00, the number of effective embryos was 7.33. [Conclusion] The appropriate dose of FSH from Japan was 20.0 AU/head, the suitable dose of FSH from Canada was 160 mg/head, and the superovulation effect of FSH from Japan was better than that of FSH from Canada, but there was no significant difference.

**Key words** Qianbei brown goat; Superovulation; Follicle-stimulating hormone; Effective embryo

黔北麻羊是经过长期选育的特色地方山羊品种,具有适应性强、抗病力强、耐粗饲和肉质优良等特点<sup>[1]</sup>。为了避免在发展过程中因杂交、近交、环境变化等造成的优良基因流失,开展了贵州良种黔北麻羊保种胚胎收集保存工作。利用冷冻胚胎保存动物遗传资源与其他保存技术相比具有突出的优越性,胚胎保存了品种的全部基因,若有数量充足的胚胎,可保存与现有物种遗传多样性一致的遗传资源。细胞可在超低温条件下长期保存,即使活物消失,只要存在同种物种,通过胚胎移植和核移植技术就可以恢复这些遗传资源,因此在保护动物遗传资源,尤其是挽救濒危动物方面,冷冻胚胎技术发挥着越来越重要的作用<sup>[2]</sup>。笔者比较了不同品牌FSH、同一品牌不同剂量FSH对黔北麻羊的超数排卵效果,旨在为提高黔北麻羊品种保存、良种山羊扩繁技术提供参考。

## 1 材料与方 法

**1.1 供体羊** 从主产区挑选纯种优良黔北麻羊在国家肉羊产业体系贵阳综合试验站花溪区麦坪示范基地开展试验。

**1.2 试验时间** 2015年9—10月进行超数排卵处理、胚胎回收和胚胎冷冻保存。

## 1.3 主要药品与仪器

**1.3.1 主要药品。**日本(JP)产FSH(促卵泡素),剂量

10 AU/支;加拿大(CAN)产Follitropin FSH,剂量400 mg/支;促黄体素释放激素A3(促排3号),由宁波三生药业有限公司生产,剂量20 μg/支;氯前列烯醇(PG),由上海市计划生育科学研究所生产,0.2 mg/支;普鲁卡因,由北京市永康药业有限公司生产,40 mg/支;黄体酮阴道缓释剂(CIDR),由新西兰DEC国际有限公司生产,剂量1.9 g/支。

**1.3.2 主要仪器与耗材。**体视显微镜、羊用二通式冲卵管、滞留针、集卵杯、恒温水浴锅、手术器械、自制手术保定架。

**1.4 供体超数排卵处理方案** 将供体母羊随机分成5组:

① I组,注射日本产FSH,剂量为16.0 AU/只;② II组,注射日本产FSH,剂量为20.0 AU,第0天放栓,第9天开始注射,间隔12 h注射1次,注射量依次为3.6、3.2、3.0、2.6、2.4、2.0、1.8、1.4 AU/只,第5次注射时注射PG 0.2 mg/只,第7次注射时撤掉CIDR栓;③ III组,注射日本产FSH,剂量为24.0 AU/只;④ IV组,注射加拿大产FSH,剂量160 mg/只,第0天放栓,第9天开始注射,间隔12 h注射1次,注射量依次为28、24、22、22、18、18、14、14 mg/只,第5次注射时注射PG 0.2 mg/只,第7次注射时撤掉CIDR栓;⑤ V组,注射加拿大产FSH,剂量200 mg/只。各试验组放置CIDR和配种时各注射维生素ADE注射液3 mL,撤栓时用0.9%生理盐水冲洗阴道,配种时注射促排3号3/4支。

**1.5 供体羊配种** 待观察到第1次站立发情12 h后配种,此后间隔10~12 h再配种1次,连续配种2~3次。

**1.6 胚胎的采集与质量鉴定** 以发情之日为第0天,第7天采用手术法回收胚胎。用含1%血清的杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗两侧子宫角,每侧20~30 mL。子宫回液静置3~5 min后在实体显微镜下检出卵子,并保存在保存液中。

**基金项目** 家养动物种质资源平台项目(2014);畜禽遗传物质制作保存和遗传距离测定项目(农财发[2014]35号);国家肉羊产业体系贵阳综合试验站项目(农科教发[2011]3号)。

**作者简介** 朱芳贤(1970—),男,云南昆明人,高级畜牧师,从事动物遗传资源保护和利用研究。\*通讯作者,推广研究员,博士,从事动物遗传育种与繁殖研究。

**收稿日期** 2017-09-14

根据形态学标准进行胚胎分级,通常说的有用胚胎或可移胚胎包括 A、B、C 级胚胎,由于保种需要,该试验中有效胚胎为 A、B 级胚胎。分级标准如下:①A 级。胚胎形态完整,轮廓清晰,呈球形,分裂球大小均匀,结构紧凑,色调和透明度适中,无附着的细胞和泡液,变性细胞少于 15%。②B 级。轮廓清晰,色调及细胞密度良好,可见少量附着的细胞和泡液,变性细胞少于 50%。③C 级。轮廓不清晰,色调发暗,结构较为松散,游离的细胞或泡液较多,变性细胞少于 75%。④D 级。16 细胞以下的受精卵,或有碎片、轮廓不清晰、结构松散,变性细胞在 75% 以上。

**1.7 数据处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件对试验数据进行统计分析,试验数据以“平均值 ± 标准差”表示,采用单因素方差分析对各组数据进行差异显著性分析。超数排卵有效而冲卵失败的个体不计入个体数。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 FSH 剂量超数排卵效果的比较

表 1 不同剂量日本产 FSH 超数排卵效果的比较

组别 Group	个体数 Individual number 只	平均黄体数 Average number of luteum//个	平均卵泡数 Average number of follicle//个	平均卵泡发育数 Average number of developed follicle //个	平均回收卵数 Average number of recovered oocyte//个	卵子回收率 Rate of recovered oocyte//%	平均有效胚数 Average number of effective embryos//枚	有效胚率 Rate of effective embryos//%
I	5	12.00 ± 3.00	1.60 ± 3.57	13.60 ± 6.14 B	7.80 ± 4.32	57	6.60 ± 5.27	85
II	19	13.90 ± 5.82	0.84 ± 2.43	14.74 ± 4.85 B	11.40 ± 6.53	77	10.21 ± 6.40	90
III	6	19.20 ± 7.66	3.60 ± 4.15	22.80 ± 4.49 A	8.40 ± 2.51	37	6.80 ± 2.49	81

注:同列不同大写字母表示差异极显著( $P < 0.01$ )

Note: Different capital letters in the same column indicated extremely significant differences ( $P < 0.01$ )

表 2 不同剂量加拿大产 FSH 超数排卵效果的比较

组别 Group	个体数 Individual number 只	平均黄体数 Average number of luteum//个	平均卵泡数 Average number of follicle//个	平均卵泡发育数 Average number of developed follicle //个	平均回收卵数 Average number of recovered oocyte//个	卵子回收率 Rate of recovered oocyte//%	平均有效胚数 Average number of effective embryos//枚	有效胚率 Rate of effective embryos//%
IV	6	14.00 ± 5.21	1.17 ± 1.83	15.17 ± 5.26	7.67 ± 2.73	51	7.33 ± 2.94	96
V	6	15.67 ± 6.15	1.50 ± 1.76	17.25 ± 6.73	8.50 ± 3.88	49	6.50 ± 2.66	76

**2.2 不同品牌 FSH 超数排卵效果的比较** 由表 3 可知,加拿大产 FSH 处理组平均卵泡发育数、有效胚率均高于日本产 FSH 处理组( $P > 0.05$ ),但平均回收卵数、卵子回收率、平均

同剂量日本产 FSH 处理中,II组超数排卵效果最佳,平均黄体数、平均卵泡发育数(黄体数与卵泡数之和)、平均回收卵数、卵子回收率、平均有效胚数、有效胚率(有效胚占回收卵的比例)分别为 13.90 个、14.74 个、11.40 个、77%、10.21 枚和 90%,III组平均卵泡发育数为 22.80 个,极显著高于 I 组和 II 组( $P < 0.01$ ),III组平均卵泡数为 3.60 个,高于 I 组和 II 组( $P > 0.05$ );I 组和 III 组平均回收卵数、卵子回收率、平均有效胚数、有效胚率均低于 II 组,但差异均不显著( $P > 0.05$ )。由表 2 可知,不同剂量加拿大产 FSH 处理中 IV 组超数排卵效果最佳,平均黄体数、平均卵泡发育数、平均回收卵数、卵子回收率、平均有效胚数、有效胚率分别为 14.00 个、15.17 个、7.67 个、51%、7.33 枚和 96%;V 组平均卵泡发育数(17.25 个)和平均回收卵数(8.50 个)均高于 IV 组,但差异均不显著( $P > 0.05$ );V 组卵子回收率、平均有效胚数、有效胚率均低于 IV 组,但差异不显著( $P > 0.05$ )。

有效胚数均低于日本产 FSH 处理组( $P > 0.05$ ),说明日本产 FSH 的超数排卵效果优于加拿大产 FSH。

表 3 不同品牌 FSH 超数排卵效果的比较

组别 Group	个体数 Individual number 只	平均黄体数 Average number of luteum//个	平均卵泡数 Average number of follicle//个	平均卵泡发育数 Average number of developed follicle //个	平均回收卵数 Average number of recovered oocyte//个	卵子回收率 Rate of recovered oocyte//%	平均有效胚数 Average number of effective embryos//枚	有效胚率 Rate of effective embryos//%
JP - FSH(20.0 AU/只)	19	13.90 ± 5.82	0.84 ± 2.43	14.74 ± 4.85	11.40 ± 6.53	77	10.21 ± 6.40	90
CAN - FSH(160 mg/只)	6	14.00 ± 5.21	1.17 ± 1.83	15.17 ± 5.26	7.67 ± 2.73	51	7.33 ± 2.94	96

## 3 讨论

超数排卵对于供体牛而言是一个复杂的生理过程,超数排卵处理方法通常是根据供体本身血清激素水平的变化而设计的,但对于不同品种、不同个体和不同药物,其处理方法也不尽相同,超数排卵结果也不一。适宜 FSH 剂量是获得最佳超数排卵效果的关键因素之一。若剂量过高会造成较强

的激素应答反应。刘广振<sup>[3]</sup>认为较强的激素应答反应使得部分个体优势卵泡排卵过早,黄体功能不全,分泌孕酮水平较低,从而造成胚胎退化。谭景和等<sup>[4]</sup>、范必勤等<sup>[5]</sup>也认为较强的激素应答反应使得卵巢过度增大,卵泡过度增多,可能卵母细胞质量下降,排卵后卵子未进入输卵管中而直接掉入腹腔,最终卵子回收率低、未受精卵多、可用胚率也很低,

A、B 级胚胎更少。该试验中日本产 FSH 大剂量组 (24.0 AU/只)、加拿大产 FSH 大剂量组 (200 mg/只) 组卵泡发育多,但回收到的卵子少,尤其是有效胚胎少,可能卵子质量差,造成受精率低和退化胚胎多。该试验证实了以上说法,同时也说明黔北麻羊适宜 FSH 剂量为 20.0 AU/只的日本产 FSH 和 160 mg/只的加拿大产 FSH。

超数排卵所用激素不同品牌、不同批次也是影响超数排卵效果的主要因素之一。桑润滋<sup>[6]</sup>认为,不同品牌、不同批次都存在质量差异和效价不稳定,纯度及所含促黄体素 (LH) 活性成分的多少,以及用于不同品种、不同个体超数排卵效果也不相同。该试验中日本产 FSH 超数排卵效果优于加拿大 FSH,但差异不显著,说明日本产 FSH 更适合贵州黔北麻羊,同时也建议大规模进行超数排卵前应做预试验。

#### 4 结论

该试验中用促卵泡素处理 41 只贵州黔北麻羊,平均黄体数 14.59 个,平均获有效胚 8.39 枚,日本产 FSH 的适宜剂

量为 20.0 AU/只,平均黄体数 13.90 个,平均回收卵数 14.74 个,平均获有效胚 10.21 枚;加拿大产 FSH 的适宜剂量为 160 mg/只,平均黄体数 14.00 个,平均回收卵数 7.67 个,平均获有效胚 7.33 枚;日本产 FSH 效果优于加拿大产 FSH,但差异不显著,说明日本产 FSH 更适合贵州黔北麻羊,同时也建议大规模进行超数排卵前应做预试验。

#### 参考文献

- [1] 国家畜禽遗传资源委员会组. 中国畜禽遗传资源志:羊志[M]. 北京:中国农业出版社,2011:370-373.
- [2] 赵永聚. 动物遗传资源保护概论[M]. 重庆:西南师范大学出版社,2007:49-51.
- [3] 刘广振. 奶牛胚胎体内死亡的因素分析及预防措施[J]. 乳业科学与技术,2005,27(5):225-227.
- [4] 谭景和,秦鹏春. 超数排卵及其存在的问题(综述)[J]. 黑龙江畜牧兽医,1987(5):33-37.
- [5] 范必勤,熊慧卿,邵春荣. 家兔超数排卵的研究[J]. 中国养兔杂志,1987(1):25-30.
- [6] 桑润滋. 动物繁殖生物技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002:220-225.
- [7] 何焯,庞丽娜,杨平. 污泥发酵产酸强化技术研究及应用进展[J]. 环境科学与技术,2017,40(4):56-63.
- [8] 李平,朱凤霞,王丽苹,等. 基于碳源回用目标的剩余污泥水解酸化产物调控研究[J]. 生态环境学报,2017,26(4):676-680.
- [9] KAYHANIAN M, TCHOBANOGLOUS G. Computation of C/N ratios for various organic fractions [J]. Biocycle,1992,33(5):58-60.
- [10] RUGHONUNDUN H, MOHEE R, HOLTZAPPLE M T. Influence of carbon-to-nitrogen ratio on the mixed-acid fermentation of wastewater sludge and pretreated bagasse [J]. Bioresource technology,2012,112:91-97.
- [11] WU Q L, GUO W Q, BAO X, et al. Enhancing sludge biodegradability and volatile fatty acid production by tetrakis hydroxymethyl phosphonium sulfate pretreatment [J]. Bioresource technology,2017,239:518-522.
- [12] SU G Q, WANG S Y, YUAN Z G, et al. Enhanced volatile fatty acids production of waste activated sludge under salinity conditions: Performance and mechanisms [J]. Journal of bioscience & bioengineering, 2016, 121(3):293-298.
- [13] 陈小华,朱洪光. 农作物秸秆产沼气研究进展与展望[J]. 农业工程学报,2007,23(3):279-283.
- [14] 王紫琪,周海东,张喆,等. 活性污泥及其与秸秆共基质的厌氧消化特性[J]. 环境科学研究,2017,30(2):315-321.
- [15] 李月寒,王建芳,钱飞跃,等. 剩余污泥与餐厨垃圾共发酵产酸的优化研究[J]. 工业安全与环保,2017,43(4):88-92.
- [16] SEDMAK J J, GROSSBERG S E. A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250 [J]. Analytical biochemistry, 1977,79(1/2):544-552.
- [17] 徐光域,颜军,郭晓强,等. 硫酸-苯酚定糖法的改进与初步应用[J]. 食品科学,2005,26(8):342-346.
- [18] 郭泽冲. 剩余污泥与玉米秸秆的共发酵产酸性能及其数学模型研究[D]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学,2012.
- [19] 刘道广. 表面活性剂促进污泥产生的酸作为生物脱氮除磷碳源的研究[D]. 上海:同济大学,2008.
- [20] FENG L Y, CHEN Y G, ZHENG X. Enhancement of waste activated sludge protein conversion and volatile fatty acids accumulation during waste activated sludge anaerobic fermentation by carbohydrate substrate addition; The effect of pH [J]. Environmental science & technology, 2009,43(12):4373-4380.
- [21] 姚创,岳建雄,罗晓栋,等. 污泥发酵液强化低碳源污水氮磷去除研究[J]. 环境科学与技术,2016,39(6):150-155.
- [22] JIA S T, DAI X H, Zhang D, et al. Improved bioproduction of short-chain fatty acids from waste activated sludge by perennial ryegrass addition [J]. Water research,2013,47(13):4576-4584.
- [23] ZHOU A J, GUO Z C, YANG C X, et al. Volatile fatty acids productivity by anaerobic co-digesting waste activated sludge and corn straw: Effect of feedstock proportion [J]. Journal of biotechnology, 2013, 168(2):234-239.

(上接第 58 页)

由图 6 可知,在发酵刚开始时,VFAs 的组分主要是正戊酸,随着发酵的进行,各处理中 VFAs 组分基本相似,在 VFAs 积累量趋于稳定时,各组分的占比从大到小依次为乙酸、丙酸、正戊酸、正丁酸、异丁酸、异戊酸,且均以乙酸占比值最大。在发酵第 4 天时,污泥对照中乙酸的占比值为 64.0%,而 10% 稻秆和 10% 预处理稻秆处理中乙酸的占比值分别为 91.8% 和 93.7%。且在发酵进行到第 6 天时,10% 预处理稻秆处理中 VFAs 组分以乙酸和丙酸为主,其占比值分别为 94.4% 和 3.49%;10% 稻秆处理中乙酸和丙酸的占比值分别为 91.5% 和 0.43%;而污泥对照的乙酸占比值为 93.5%,丙酸未检出。由此说明,稻秆的投加能够促进大分子有机物向小分子有机物(乙酸、丙酸)转化,在短期内能够提升转化速率,且 10% 预处理稻秆处理大于 10% 稻秆处理,而该类小分子有机物可以用于补充生物处理系统所需碳源来强化氮、磷去除,这与其他共发酵研究结果一致<sup>[17-18]</sup>。

#### 3 结论

(1) 在总固体浓度不变的条件下,稻秆的投加能够改善污泥发酵效果,促进多糖、可溶性蛋白等溶解性有机质释放,使得发酵体系中 SCOD 含量升高,且对有机质释放水平从大到小依次为 10% 预处理稻秆处理、10% 稻秆处理、污泥对照。

(2) 稻秆的投加能够提高共发酵体系中 VFAs 的转化率,缩短发酵时间,且 10% 预处理稻秆处理强于 10% 稻秆处理,但发酵结束后 VFAs 积累量没有增加。

(3) 相比于污泥对照,稻秆的投加能够在短期内促进大分子有机物向小分子有机物(主要是乙酸、丙酸)转化,且小分子有机物的占比值表现为 10% 预处理稻秆处理大于 10% 稻秆处理。

#### 参考文献

- [1] 黄晓婷,袁海平,周熠鸣,等. 基质投加量对生物调理改善污泥脱水性能的影响[J]. 环境科学学报,2017,37(6):2137-2142.