

林峰,宋欢,黄承俊,等.不同培养条件对奶牛体外受精效果的影响[J].江苏农业科学,2017,45(15):137-139.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.036

# 不同培养条件对奶牛体外受精效果的影响

林峰,宋欢<sup>1</sup>,黄承俊<sup>1</sup>,高腾云<sup>1</sup>,李明<sup>1</sup>,刘海军<sup>2</sup>

(1.河南农业大学牧医工程学院,河南郑州 450002;2.天津市畜牧兽医研究所,天津 300384)

**摘要:**为了提高奶牛体外受精效果,研究了体外成熟卵母细胞在 IVF-100、BO、TALP 3 种体外受精液中的受精效果,同时比较了裸卵(NOs)与卵丘卵母细胞复合体(COCs)对受精效果的影响。结果显示,体外成熟卵母细胞在受精液 IVF-100 中的卵裂率显著高于 BO 液( $P < 0.05$ ),而 TALP 液中的卵裂率与 IVF-100 和 BO 液的差异都不显著( $P > 0.05$ );裸卵(NOs)的卵裂率低于卵丘卵母细胞复合体(COCs),但差异不显著( $P > 0.05$ );NOs 的囊胚率极显著低于 COCs( $P < 0.01$ )。不同受精液及有无卵丘细胞对卵母细胞的体外受精效果有明显的影响。

**关键词:**奶牛;卵母细胞;体外受精;卵裂率;囊胚率

**中图分类号:** S823.9<sup>+</sup>13 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)15-0137-02

随着配子与胚胎生物技术与应用,对胚胎的需求量越来越大。超数排卵和胚胎移植的合理化应用虽能成倍提高优良母畜的繁殖率,但所获得的胚胎数量有限。为了解决这个问题,近年来国内外对奶牛卵母细胞体外受精技术进行了大量的研究。保国俊等通过体外受精技术提供了更多数量、更低成本的胚胎<sup>[1-2]</sup>,IVF 技术是对品种优良的公畜、母畜发挥出超常繁殖能力的一种应用。

由于体外受精技术操作环节十分复杂,影响结果因素较多,且卵母细胞在体外的生长繁殖对生存环境要求特别高,易导致试验体系不够稳定,从而对试验结果的准确性造成很大影响<sup>[3-4]</sup>。本研究通过对比 3 种受精液对卵母细胞体外受精效果的研究,以其为基础来研制出更好的受精液,进而加快我国奶牛业的发展,提高经济效益。裸卵和卵丘卵母细胞体外受精后,都可以发育到囊胚阶段,但裸卵的囊胚率显著低于卵丘卵母细胞的囊胚率。通过对比 2 种卵母细胞的囊胚率,对体外受精时卵母细胞的筛选起着重要作用。本试验就不同受精液、不同形态的卵子对奶牛成熟卵母细胞体外受精能力的影响进行了研究,旨在为优化奶牛体外受精提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 卵巢的采集与保存** 本试验所用奶牛卵巢来自河南省郑州市郊个体屠宰场。屠宰后立即采集卵巢并除去多余的脂肪组织,然后用加有双抗的生理盐水冲洗 5~6 次,保存在装有 37℃ 左右、加有双抗的灭菌生理盐水中,于 2~3 h 内带回实验室。

**1.1.2 主要试剂** 胎牛血清(FBS)(Biotech,P40-47500);肝素钠(Sigma,H3149-25KU);石蜡油(Sigma);TCM-199

收稿日期:2016-07-06

基金项目:国家奶牛产业技术体系专项基金(编号:CARS-37);河南省现代农业产业技术体系肉牛技术创新团队项目(编号:豫农科教 2013-14);天津科技支撑计划重点项目(编号:12ZCDZNC6200)。

作者简介:林峰(1972—),男,山东栖霞人,博士,副教授,主要从事动物生殖调控与胚胎工程研究。E-mail:linfeng7207@163.com。

(Gibco);NaCl(Sigma,S-5886);KCl(Sigma,P-5405);  
NaH<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(Sigma,S-5761);NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Sigma,RDD007);  
CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O(Sigma,C-5080)。

### 1.2 试验方法

**抽吸法:**用无菌纱布将卵巢表面擦干,抽吸法吸取直径 2~8 mm 的卵泡,抽吸液注入培养皿中,挑选裸卵、半裸卵及具有 3 层及其以上卵丘的卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complexes,COCs)用于试验。

### 1.3 卵母细胞分级标准

根据包被卵母细胞的卵丘细胞完整性、卵丘细胞层数以及卵母细胞的胞质均匀性将卵母细胞分为 4 级:A 级,卵丘细胞 3 层以上,胞质均匀;B 级,1~2 层卵丘细胞,胞质均匀;C 级,裸卵,卵丘细胞不完整;D 级是死亡或退化的卵母细胞。A、B 级卵母细胞为可用卵母细胞。

### 1.4 卵母细胞体外成熟培养

将收集的卵母细胞用成熟液洗 3 遍,然后每 40~60 个移入平衡至少 2 h 的 1 mL 成熟液中(四孔板),于 5% CO<sub>2</sub>、95% 空气、38.5℃、饱和湿度的 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 23~24 h。若卵丘细胞共培养则用微滴法(100 μL),以排出第一极体为卵母细胞成熟的标志<sup>[5]</sup>。

### 1.5 卵母细胞的体外受精

受精液为 IVF-100 或 BO 液时运用直接离心法对精子进行洗涤,即用 6 mL 洗精液稀释解冻的精液并于 2 000 r/min 下离心 7 min,弃去上清液,重复 1 次后用受精液稀释精子,密度为  $1 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$  个/mL,然后放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中备用。受精液为 TALP 液时则用上浮法对精子进行 30~60 min 的孵化,然后再离心洗涤。将 23~24 h 成熟的卵母细胞于受精液中洗 3 遍,并用 1 mL 移液管将卵丘细胞部分去除。每 10 枚左右卵子移入平衡 2 h 的覆有石蜡油的 50 μL 受精微滴中,加入 50 μL 精液后于 CO<sub>2</sub> 培养箱中进行受精。IVF-100 受精时间为 6 h,BO 液受精时间为 8 h,TALP 液受精时间为 18 h。

### 1.6 卵母细胞体外成熟判定

卵丘-卵母细胞成熟培养 22~24 h 后,主要通过显微

镜下观察卵母细胞的形态来判断卵母细胞是否成熟。正常成熟的卵母细胞细胞质均匀,没有空泡,其周围的卵丘细胞发生扩展。卵丘细胞扩展常用作判断卵母细胞体外成熟的特征。将培养成熟的卵母细胞放入含有 0.1% 透明质酸酶的成熟培养液中,在 CO<sub>2</sub> 培养箱中孵育 10 min 后用吸尿管轻轻吹打以脱去卵丘细胞,将裸卵在体视显微镜下镜检,含有第一极体的判为成熟<sup>[6]</sup>。若卵周隙明显变大,细胞质中有空泡出现,判定已经开始退化。

1.7 统计分析

用 SPSS 11.0 统计软件进行数据的整理与分析。

2 结果与分析

2.1 不同受精液对受精卵卵裂的效果

将经体外成熟的卵母细胞随机移入 3 种不同的受精液(即 TVF-100、BO 液和 TALP 液)中受精。受精后进行胚胎的体外培养,从受精开始算起 48 h 对各组的卵裂情况进行统计分析。从表 1 可以看出,用 IVF-100 作为受精液,其体外受精 48 h 后的卵裂率显著高于 BO 液的卵裂率( $P<0.05$ ),而以 TALP 液作为受精液,其卵裂率与其他组无差异。说明不同的受精液对卵裂有显著影响,从卵母细胞卵裂率来看,IVF-100 作为受精液显著优于 BO 液和 TALP 液 2 种受精液。

表 1 不同受精液对卵裂的影响

受精液	重复次数	假定合子数(个)	卵裂数(个)	卵裂率(%)
IVF-100	7	156	112	70.39±6.88a
TALP 液	3	68	44	64.37±10.65ab
BO 液	4	133	77	57.94±9.56b

注:数据后不同小写字母者表示差异显著( $P<0.05$ ),不同大写字母者表示差异极显著( $P<0.01$ )。下表同。

2.2 卵丘细胞对卵母细胞受精及受精后胚胎体外发育的效果

选取成熟的裸卵(NOs)和成熟的卵丘卵母细胞(COCs)进行体外受精,并用 IVF-100 受精液稀释精子,受精后进行胚胎的体外培养,从受精开始算起 48 h 对各组的卵裂情况进行统计分析。从表 2 可以看出,虽然 COCs 的卵裂率高于自然裸卵,但差异并不显著( $P>0.05$ ),而其囊胚率极显著高于 COCs 的( $P<0.01$ )。表明卵丘细胞对卵母细胞受精后体外发育的影响要远高于对卵母细胞受精的影响。

表 2 卵丘细胞对卵母细胞受精及发育的效果

卵母细胞	重复次数	假定合子数(个)	卵裂数(个)	卵裂率(%)	囊胚数(%)
COCs	3	40	31	77.5a	12(38.7)A
NOs	3	35	20	57.14a	2(10)B

3 讨论

3.1 不同受精液对奶牛卵母细胞体外受精的影响

影响卵母细胞体外受精的因素很多<sup>[6]</sup>,受精液及其成分以及卵母细胞的形态是主要因素。本试验对比了 3 种不同的受精液对卵母细胞体外受精效果的影响,BO 液和 TALP 液为目前经典的 2 种受精液,这些溶液相对比较简单,主要成分是

无机盐离子,不含复杂的氨基酸和维生素等成分。IVF-100 为商品化的受精液,基础液为 BO 液,效果稳定而且效率较高,对于成熟良好的卵母细胞受精率一般高达 80%~90%。由于其价格较高,常用于活体取得的卵子体外受精或其他特殊卵子的体外受精试验中<sup>[7]</sup>。试验结果显示,IVF-100 作为受精液时的卵裂率显著高于 BO 液的( $P<0.05$ ),虽然在数值上表现出高于 TALP 液的趋势,但统计检验差异不显著。同时 TALP 液与 BO 液的卵裂率也无明显差异。不同受精液对试验结果有着明显的影响。这表明 IVF-100 在促进受精卵的卵裂上的作用要强于 BO 液,同时也说明 BO 液作为体外受精液还存在巨大的改进空间。BO 液对精子的作用比较强烈,因而与受精卵共孵化的时间不能过长。相比之下 TALP 液对精子的作用就比较温和些,与本试验结果相同,许多试验显示其虽然在数值上有高于 BO 液的趋势但统计结果无差异。而且一些试验结果表明其对胚胎发育效果不如 BO 液<sup>[8-9]</sup>,由于这方面受受精时间、卵丘细胞、精子的洗涤等许多因素的制约,其机制仍有待探索。就总体而言,成熟良好的卵母细胞不管用于何种受精液,其受精卵的卵裂率都较高,但 IVF-100 对受精卵卵裂的促进作用要强于其他受精液。IVP 技术作为一个整体,各个环节精密相关,因而要想得到较多的可移植胚,一个相对较好的受精环节是必须的。

3.2 有无卵丘细胞对卵母细胞体外受精效果的影响

本研究在自然裸卵与 COCs 经体外成熟后,对其体外受精的卵裂率及囊胚发育率进行了比较。结果显示,自然裸卵的卵裂率显著低于 COCs 的,并且囊胚发育率的差异达到了极显著水平。李荣凤等试验结果也表明,个别自然裸卵是能够发育到囊胚的<sup>[10]</sup>。Yang 等研究表明,卵母细胞成熟过程中的许多机制都需要通过卵丘细胞来完成,自然裸卵经体外成熟培养后虽然部分能排出第一极体,但没有继续发育的潜力<sup>[11]</sup>。本研究并不排除个别特殊卵母细胞的存在,但其原因仍有待进一步探索。

4 结论

体外成熟卵母细胞在受精液 IVF-100 中的卵裂率优于 BO 液与 TALP 液。裸卵(NOs)的卵裂率低于卵丘卵母细胞复合体(COCs),但差异不显著;NOs 能够发育到囊胚阶段,但囊胚率极显著低于 COCs 的。

参考文献:

[1] 保国俊. 牛卵母细胞体外受精和培养技术[J]. 畜牧兽医杂志, 2010,29(1):34-36.

[2] Ginther O J, Kastelic J P, Knopf L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle [J]. Animal Reproduction Science, 1989,20(3):187-200.

[3] Brackett B G, Bousquet D, Boice M L, et al. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow [J]. Biology of Reproduction, 1982,27(1):147-158.

[4] 刘新峰, 郝志明, 史远刚, 等. 不同培养体系对牛卵母细胞体外受精的影响[J]. 安徽农业科学, 2011,39(2):1049-1050.

[5] 肖西山, 齐军喆, 付静涛, 等. FSH 剂量对绒山羊超数排卵效果的研究[J]. 黑龙江动物繁殖, 2009,17(6):15-16.

[6] 桑润滋. 动物繁殖生物技术[M]. 2版. 北京:中国农业出版社,

查满千,朱 坤,刘佳佳,等.不同乐器演奏的轻音乐对泌乳牛免疫性能的影响[J].江苏农业科学,2017,45(15):139-142.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.15.037

# 不同乐器演奏的轻音乐对泌乳牛免疫性能的影响

查满千<sup>1</sup>,朱 坤<sup>1</sup>,刘佳佳<sup>1</sup>,余 雄

(1.新疆农业大学动物科学学院,新疆乌鲁木齐 830052; 2.新疆肉乳用草食动物营养重点实验室,新疆乌鲁木齐 830052)

**摘要:**2015 年 3—8 月在新疆伊犁新生源公司巴彦岱牛场为研究大提琴、小提琴、低音提琴演奏的轻音乐对泌乳牛免疫机能的影响,选取体质量、年龄、胎次、泌乳量接近、健康状况良好、饲养管理水平完全一致的荷斯坦泌乳牛 36 头,随机分成 2 组,试验组和对照组各 18 头。每期 40 d,试验当天起(0 d),每 20 d 采集血样并测定单产。结果表明,大提琴演奏的音乐能在 20 d 和 40 d 显著提升奶牛牛乳中乳糖含量,降低体细胞数含量;小提琴演奏的音乐整期能够显著提升奶牛血清中谷胱甘肽过氧化酶含量,降低丙二醛含量;低音提琴演奏的音乐整期能够显著提升总抗氧化能力,降低丙二醛含量。大提琴演奏的音乐能有效提高奶牛免疫力水平。

**关键词:**轻音乐;泌乳牛;乳糖;体细胞数;免疫

**中图分类号:**S823.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)15-0139-04

动物会对音乐刺激产生声应激,并对自身生产性能产生影响。近年来,已有有关音乐对奶牛产奶性能影响的研究报道<sup>[1]</sup>。国外学者 Harsha Panicker 等发现,音乐刺激能够促进动物听觉中枢神经的发育和结构的分化<sup>[2-7]</sup>,也能够对内脏活动及情绪等起到协调作用,同时通过神经中枢调节机体内分泌,减缓疲劳,降低焦虑情绪。据 Mara 等报道,给小鼠连续 8 d、每天持续 5 h 播放音量较低的某德国乐曲,结果 7~12 周龄小鼠 T 细胞数量增长<sup>[4]</sup>。国内相关报道表明,优美和缓的乐曲可显著缓解应激并提高产奶量,本研究的前期试验结果也表明,适当的音乐能够提高奶牛产奶量<sup>[8]</sup>。不同类型的乐器可演奏出不同音色不同风格的音乐,检索发现,有关不同乐器演奏的音乐对奶牛免疫性能影响的深层次、系统的科学研究未见报道,可进一步研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验设计与动物选择

收稿日期:2016-03-30

基金项目:现代农业(奶牛)产业技术体系建设专项(编号:CARS-37);国家科技支撑计划(编号:2012BAD12B09、2011BAD47B02、2012BAD45B01);新疆维吾尔自治区重大专项(编号:201231101);2015 年度新疆农业大学研究生科研创新项目(编号:XJAUGRI2015004);新疆肉乳用草食动物营养实验室开放课题。

作者简介:查满千(1991—),女,新疆人,硕士研究生,研究方向为反刍动物营养。E-mail:694167404@qq.com。

通信作者:余 雄,教授,博士生导师,研究方向为奶业生产技术。

E-mail:yuxiong8763601@123.com。

试验于 2015 年 3 月 20 日至 2015 年 8 月 1 日在新疆伊犁新生源公司巴彦岱牛场进行,均选取年龄为 5~6 岁、胎次为 3 胎、体质量为 550~600 kg、泌乳量接近、健康状况良好、饲养管理水平完全一致的荷斯坦泌乳牛 36 头,随机分为 2 组,即试验组和对照组,每组 18 头,试验分 3 期进行,3 期试验皆选用不同牛群,每期 40 d,每期之间间隔 7 d。试验前测定各组奶牛生长环境的背景音分贝数,测调后将背景音控制在 65~75 分贝。预试验开始在试验组奶牛栏中播放音乐,试验组在挤奶前 04:30—06:30、12:30—14:30 及 18:30—20:30 进行每天 3 次、每次 2 h 的音乐播放;音乐选用唱片播放经典提琴曲《Mother》,本试验前期试验中,轻音乐可在一定时间内促进奶牛泌乳,《Mother》属于轻音乐,所以选用其作为试验音乐。首期试验采用大提琴播放的轻音乐《Mother》,第二期和第三期分别采用小提琴和低音提琴演奏的同首曲目《Mother》,播放全程保持音量恒定。对照组与试验组的饲养管理完全一致但无音乐播放。

### 1.2 日粮与饲养管理

日粮参考 NRC(2001)配制,对照组和试验组日粮组成见表 1。

3 期所有试验组与对照组样本牛均选用年龄为 5~6 岁、胎次为 3 胎、体质量为 550~600 kg 的荷斯坦奶牛,分别置于相距 200 m 以上且隔音效果良好的 2 个半开放散栏式牛舍内饲喂,牛舍内卧床长、宽、高分别为 2.1、1.2、1.1 m。试验组牛舍内墙壁与运动场墙壁每隔 3 m 安装 1 个小喇叭,牛舍与运动场内的音量均衡,奶牛可随意进出运动场。3 期试验均在每天 09:00 给料 1 次,牛群自由采食,自由饮水,所有饲养

2006:328-330。

[7] 马学海,王安江,张居农.关于影响性控精子体外受精的因素及应用前景展望[J].中国奶牛,2007(5):28-30。

[8] 晁生玉,赵 鑫,巴文胜,等.利用腹腔镜技术观察发情藏羊黄体的研究[J].中国草食动物,2009,29(6):6-8。

[9] 穆春雨.影响牛体外受精若干因素的研究及性控精液体外受精

初探[D].武汉:华中农业大学,2007。

[10] 李荣凤,薛晓先,刘 哲.牛卵母细胞皮层颗粒荧光染色法成熟鉴定[J].畜牧兽医学报,2000,31(3):203-210。

[11] Yang N S, Lu K H, Gordon I. *In vitro* fertilization(IVF) and culture (IVC) of bovine oocytes from stored ovaries[J]. Theriogenology, 1990,33(1):352。