

刘西梅,任红艳,华再东,等. 猪体内定时定点取卵技术的研究[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):163-165.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.041

# 猪体内定时定点取卵技术的研究

刘西梅,任红艳,华再东,肖红卫,李莉,张立革,程妮,毕延震

(湖北省农业科学院畜牧兽医研究所/动物胚胎及分子育种湖北省重点实验室,湖北武汉 430064)

**摘要:**为获得大量的优质体内卵,探索了湖北白猪的取卵时间、位置及排卵激素等因素。结果显示,以 1 000 IU 的 HCG 处理刚发情的后备猪,24 h 输卵管取卵效果最佳;而以 200 IU 的 HCG 处理,24 h 卵巢取卵效果最好。

**关键词:**猪;定时;定点;取卵

**中图分类号:**S814.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0163-02

体内卵是一种特殊资源,从取卵时间、位置及动物生长发育阶段分析,取到成熟优质的卵是一项耗时、费力、高成本的工作<sup>[1-3]</sup>。但高质量的体内成熟卵对于体外受精、单精子注射、体细胞克隆、卵子发育研究和应用都是无法有效替代的良好的原始材料<sup>[4-6]</sup>。单胎生物如牛、人等一次性排卵持续短,取卵时间、地点(位置)易于掌握<sup>[7-9]</sup>,收卵效率也非常高;而多胎动物猪排卵持续时间长,如不采取人为干预措施,卵的回收效率非常低,而且获得的卵质量参差不齐,动物及卵的利用率非常低<sup>[10-11]</sup>。本研究利用后备猪,从不同时间、位置采集卵母细胞,以研究定时、定点采卵方法,提高猪体内卵母细胞的收获率。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验动物为后备湖北白猪(母),体质量约 100 kg<sup>[12]</sup>。

试剂耗材:人绒毛膜促性腺激素(HCG)、孕马血清促性腺激素(PMSG),均购自宁波激素二厂;收集卵所用溶液为 DPBS,购自 GIBCO 公司<sup>[13]</sup>。

### 1.2 试验设计

以不同剂量 HCG 处理,在不同时间取卵(从输卵管中),由此筛选出最有效的取卵时间,并以此时间为基准,研究不同剂量处理在输卵管和卵巢中取卵的效果。

### 1.3 方法

**1.3.1 超排处理** 主要用 PMSG 处理,具体剂量、方法等参考魏庆信等的操作程序<sup>[12]</sup>。

**1.3.2 取卵** 试验所有取卵均采用手术取卵,取卵溶液 DPBS,取卵位置分卵巢和输卵管 2 个地点,具体操作过程及程序等均参照文献[1-2];值得注意的是用 10 mL 注射器接 16 号及以上型号的针头在卵巢中抽卵最为有效<sup>[14-16]</sup>。

收稿日期:2018-02-08

基金项目:国家生物新品种培育专项(编号:2016ZX08006-003、2016ZX08010-3);湖北省农业科技创新中心资助项目(编号:2018-620-001-003)。

作者简介:刘西梅(1963—),女,陕西蒲城人,副研究员,主要从事细胞生物学研究。E-mail:anbit20@qq.com。

通信作者:毕延震,研究员,主要从事动物生物技术研究。E-mail:anbit20@163.com。

**1.3.3 卵的计数及鉴别** 收集的含卵溶液在实体显微镜下仔细挑取所有卵,然后在倒置显微镜上——鉴别卵的质量分别为未成熟、成熟、老化、裂解<sup>[13,17]</sup>。

### 1.4 数据处理

试验数据应用 SPSS 17.0 软件统计和 SNK 多重比较法分析和差异显著性比较<sup>[18]</sup>。结果以“平均值±标准差”表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 输卵管取卵时间

试验猪自然发情开始时,用相应剂量的 HCG 处理,以 12 h 间隔分组,在输卵管冲卵,收集成熟的卵母细胞,各组收卵率见表 1。由表 1 可知,使用 HCG 的剂量 500~1 500 IU,注射后 12 h 在输卵管中冲卵收卵率均很低,每头猪只能获得 0.17~0.23 枚,且注射 HCG 剂量影响不明显,但剂量有提高收卵率的趋势;24 h 取卵时,500 IU 组明显低于其他 2 组(1 000 IU、1 500 IU);同样 500 IU 组,24 h 获得卵率也低于其后时间组(36~72 h),36 h 及以后时间组之间变化不明显,但从 36 h 开始有老化卵现象(退化卵)。由此可见,发情开始注射 1 000 IU HCG,24 h 后输卵管取卵是最佳时间,且可以获得最佳取卵效果。

### 2.2 不同剂量 HCG 对不同位置取卵数量的影响

猪自然发情开始,用不同剂量 HCG 处理 24 h,分别在输卵管和卵巢中取卵,收获卵的数量见表 2。由表 2 可知,随着 HCG 使用量增加,输卵管收集卵也越多。其中,1 000 IU 及以上剂量组之间差异不明显,但均显著高于 0、200、500 IU 组( $P<0.05$ ),且这 3 组之间差异明显。相反在卵巢中取卵, HCG 使用剂量越小,取卵越多,而且 1 000 IU 及以上剂量组之间差异不明显,但都显著低于 1 000 IU 以下剂量组( $P<0.05$ ),并且 0、200、500 IU 单位之间差异显著( $P<0.05$ )。然而,卵巢与输卵管收集卵平均数之和均在 12.21~14.28 之间,与湖北白猪正常排卵数<sup>[1]</sup>相一致。从获卵数量和质量综合分析,发现 1 000 IU 组输卵管取卵、200 IU 组卵巢取卵收获率高,残次率低,是一个最有效的收卵时机。

### 2.3 超排处理对取卵数量的影响

正常发情周期内,距上次发情 16~17 d,按 1 000 IU/头剂量肌肉注射 PMSG<sup>[5]</sup>,出现发情症状时注射 HCG,再过 24 h 取卵,结果见表 3。

表 1 自然发情猪注射 HCG 后取卵时间

取卵时间(h)	500 IU 组(枚/头)	1 000 IU 组(枚/头)	1 500 IU 组(枚/头)	备注
12	0.17 ± 0.11d(13/76)	0.20 ± 0.15d(11/56)	0.23 ± 0.12d(16/69)	
24	7.14 ± 2.12c(571/80)	13.11 ± 2.99a(1 154/88)	13.36 ± 2.76a(1 269/95)	
36	9.94 ± 3.04b(686/69)	13.67 ± 3.15a(998/73)	14.01 ± 3.14a(1 079/77)	少数卵老化
48	11.31 ± 3.12a(814/72)	14.51 ± 3.61a(885/61)	15.07 ± 2.31a(874/58)	部分卵老化
60	11.20 ± 3.33a(661/59)	14.44 ± 3.18a(780/54)	14.31 ± 2.25a(701/49)	部分卵老化、裂解
72	9.65 ± 2.89b(444/46)	12.06 ± 3.00a(603/50)	11.90 ± 3.02a(619/52)	大部分卵老化、裂解

注:数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。

表 2 自然发情使用不同剂量 HCG 后取卵位置与数量变化

HCG 剂量(IU/头)	输卵管取卵(枚/头)	卵巢取卵(枚/头)	均值合计(枚/头)	备注
0	3.30 ± 1.32d(267/81)	8.91 ± 3.14a(775/87)	12.21	卵巢卵部分未成熟
200	5.35 ± 1.73c(412/77)	6.76 ± 2.08b(575/85)	12.11	
500	7.10 ± 2.14b(632/89)	5.06 ± 1.65c(420/83)	12.16	
1 000	13.00 ± 2.97a(1 118/86)	1.06 ± 0.71d(105/99)	14.06	
1 500	13.60 ± 2.18a(1 238/91)	0.68 ± 0.33d(77/113)	14.28	少数卵老化
2 000	13.43 ± 1.93a(1 128/84)	0.64 ± 0.29d(61/95)	14.07	少数卵老化

注:同列数据后不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ ),表 3 同。

由表 3 可知,超排处理后,随 HCG 剂量增加,输卵管(自然排卵)中收集的卵数量依次增加,0、200、500 IU 各剂量段显著增加( $P < 0.05$ ),1 000 IU 以上增加不明显,而从卵巢中抽卵数依次减少,且低剂量时(0、200、500 IU)显著减少( $P < 0.05$ ),1 000 IU 以上减少不明显。但各剂量组间,输卵管收集卵与卵巢抽卵获卵数均值合计在 21.17 ~ 22.96,变化不明显。但比较表 2 和表 3,发现自然发情获卵均值合计为

12.21 ~ 14.28 枚,比超排的 21.17 ~ 22.96 枚少获卵 8.99 枚,这说明超排能获得更多的卵,这提示超排处理尽管可以排出大量卵,但猪的子宫内着床胚胎的数量有限,产仔数无限增加不合逻辑,所以生产中猪不宜超排。当然,如果仅为获得卵或早期胚胎,超排还是有效的,而且 1 000 IU HCG 可以起到理想效果,但超排后发育的卵虽然较多,但部分卵发育不同步或发育不全,会致其未成熟。

表 3 超排处理猪注射不同剂量 HCG 后取卵数量比较

HCG 剂量(IU/头)	输卵管取卵(枚/头)	卵巢取卵(枚/头)	均值合计(枚/头)	备注
0	1.44 ± 1.12d(112/78)	19.73 ± 6.03a(1 322/67)	21.17	卵巢卵部分未成熟
200	5.45 ± 2.16c(458/84)	16.07 ± 5.15b(1 141/71)	21.52	
500	7.29 ± 2.54b(671/92)	14.59 ± 3.79c(1 007/69)	21.88	
1 000	18.39 ± 4.71a(1 755/90)	4.44 ± 4.19d(382/86)	22.83	
1 500	19.73 ± 5.01a(1 697/86)	3.23 ± 3.08d(255/79)	22.96	少数卵老化
2 000	20.80 ± 4.80a(1 581/76)	1.67 ± 3.32d(139/83)	22.47	少数卵老化

3 结论与讨论

试验研究及生产中渴望有大量的优质体内卵,无论是自然发情,还是超排处理,都会有所收获,但最大限度地利用供体猪生产卵才是需求者不断追求的目标,特别是同步化优质的卵<sup>[19-21]</sup>,这其中除了使用合适剂量排卵激素(HCG)外,定时、定点取卵也非常关键。理论上应该在排卵前 2 ~ 3 h 从卵巢中取卵,排卵后 1 ~ 2 h 内在输卵管中取卵,这对单胎动物不是难事<sup>[9]</sup>,而多胎动物猪在自然状态下很难做到,这就需要使用合适剂量的排卵激素处理,在合适的位置、合适的时间收集卵<sup>[22-23]</sup>,本研究结果,在 1 000 IU 24 h 于输卵管取卵或 200 IU 24 h 于卵巢取卵,收获的成熟卵最多,可达到理想状态,即实现定时、定点取卵可以在后备猪取得良好效果。

参考文献:

[1]魏庆信,樊俊华,李荣基. 猪胚胎移植试验[J]. 湖北农业科学, 1990(2):36-37.  
[2]周 荣,俊 松,王青来,等. 猪卵母细胞体外成熟培养的研究进

展[J]. 广东畜牧兽医科技,2017,42(2):5-7.  
[3]赵浩斌,陈乃清,魏庆信,等. 猪卵核移植的研究[J]. 武汉大学学报(自然科学版),1997,43(4):505-510.  
[4]Lin T, Oquani R K, Lee J E, et al. Co-culture with good quality COCs enhances the maturation and development rates of poor-quality COCs[J]. Theriogenology, 2016, 85(3):396-407.  
[5]魏庆信,樊俊华,郑新民,等. 提高猪基因导入效率的研究[J]. 高技术通讯,1997,7(2):39-43.  
[6]华再东,郭 帅,肖红卫,等. 体内、外卵母细胞对猪体细胞克隆胚胎发育潜力的影响[J]. 畜牧兽医学报,44(11):3143-3148.  
[7]覃现才,吴 师. 绒毛膜促性腺激素(HCG)对母牛受胎率的影响[J]. 广西畜牧兽医,2008,24(5):300-301.  
[8]Piquette G N. The *in vitro* maturation (IVM) of human oocytes for *in vitro* fertilization (IVF): is it time yet to Switch to IVM-IVF? [J]. Fertility and Sterility, 2006, 85(4):833-835.  
[9]李延鹤,刘 军,张 勇,等. 动物胚胎育种及应用中的技术策略[J]. 畜牧兽医学报,2016,47(10):1954-1960.  
[10]Berardenelli P, Nardinocchi D, Russo V, et al. Dynamic study on nuclear pore complexes in swine oocyte matured *in vivo* and *in vitro*

陈 阳,秦立志,赵博昊,等. 獭兔 *CREB1* 基因的编码区克隆、生物信息学及表达规律分析[J]. 江苏农业科学,2018,46(23):165-168.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.042

# 獭兔 *CREB1* 基因的编码区克隆、生物信息学及表达规律分析

陈 阳<sup>1</sup>, 秦立志<sup>1</sup>, 赵博昊<sup>1</sup>, 胡帅帅<sup>1</sup>, 穆 琳<sup>1</sup>, 翁巧琴<sup>2</sup>, 鲍国连<sup>3</sup>, 吴信生<sup>1</sup>

(1. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009; 2. 浙江省余姚市欣农兔业有限公司, 浙江余姚 315400;

3. 浙江省农业科学院, 浙江杭州 310021)

**摘要:**利用分子克隆技术和生物信息学方法,对獭兔 *CREB1* 基因编码区序列(coding sequence, CDS)进行克隆和生物信息学特征分析,同时比较其不同毛色獭兔的皮肤组织中的表达水平差异。结果表明,*CREB1* 基因 CDS 长 984 bp,共编码 327 个氨基酸,在不同的哺乳动物中具有较高的同源性,系统进化情况与其亲缘关系远近一致。经 Hopfield、Swiss-model 等预测发现,*CREB1* 基因编码蛋白为亲水蛋白质,其二级结构包含  $\alpha$  螺旋(h)33.33%、无规则卷曲(c)44.95%、延伸链(e)21.71%;三级结构为 1 条简单的螺旋链。荧光定量 PCR 结果显示,*CREB1* 基因在黑色獭兔和青紫蓝色獭兔皮肤组织中的表达量极显著高于白色獭兔( $P < 0.01$ ),且在黑色獭兔中表达量最高。该结果为进一步探索 *CREB1* 基因在哺乳动物毛色形成过程中的功能奠定了基础。

**关键词:**獭兔;*CREB1* 基因;克隆;表达规律

**中图分类号:** S829.9      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2018)23-0165-04

獭兔,即力克斯兔(Rex rabbit),是皮用型兔的代表之一,其被毛颜色丰富多样,且纯天然的被毛不掉色或褪色,深受消

收稿日期:2017-08-23

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项资金(编号:CARS-44-A-1);浙江省农业(畜禽)新品种选育重大科技专项(编号:2016C02054-10)。

作者简介:陈 阳(1988—),女,河南信阳人,博士,讲师,主要从事动物遗传育种与繁殖的研究。E-mail:yangc@yzu.edu.cn。

通信作者:吴信生,博士,教授,主要从事动物遗传育种与繁殖的研究。E-mail:xswu@yzu.edu.cn。

using field-emission scanning electron microscopy[J]. Veterinary Research Communications,2006,30(suppl.1):159-161.

[11] Munari E, Asti A, Colombani C, et al. Competence of swine oocytes matured by three-dimensional gonadotropin-free co-culture[J]. Veterinary Research Communications,2007,31(1):181-184.

[12] 魏庆信,樊俊华,陈东宝,等. 湖北白猪导入 *OMP/PGH* 基因的整合、表达和遗传[J]. 华中农业大学学报,1993,12(6):606-611.

[13] 华再东,郑新民,魏庆信,等. 体细胞核移植生产巴马猪[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(10):192-197.

[14] 钮莹芳,吴彩凤,张树山,等. 凋亡抑制剂 Z-VAD-FMK 在猪卵母细胞冷冻保存中的应用[J]. 上海农业学报,2017,33(3):124-129.

[15] 陈长超,王令怡,孙嘉豪,等. 秋水仙碱对猪卵母细胞成熟及 M I 期纺锤体的影响[J]. 南京农业大学学报,2016,39(5):825-830.

[16] 郭润发,宋玉然,海 棠,等. 生理浓度氨基酸对猪卵母细胞体外成熟及孤雌胚胎发育的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医,2017(7):110-112.

[17] 魏庆信,樊俊华,胡宏宇,等. 猪体外受精及其受精卵移植试验

费者青睐。目前,美国认可的獭兔毛色有 14 种,欧洲认可的有 30 种,我国以青紫蓝色、黑色、海狸色、白色为主。一般而言,动物的毛色与皮肤中黑色素的数量和分布密切相关,同时许多内在因子也影响着毛色性状的表现<sup>[1]</sup>。哺乳动物毛色主要取决于黑色素沉积,黑色素细胞产生真黑素和棕黑素,二者分布的不同致使哺乳动物形成多种毛色类型<sup>[2-3]</sup>。笔者所在课题组前期利用表达谱芯片筛选与獭兔毛色形成相关的基因,发现 *CREB1* 基因在不同毛色的獭兔皮肤中表达差异显著,表明该基因可能参与到獭兔的毛色形成过程中<sup>[4]</sup>。

环腺苷酸反应元件结合蛋白(cAMP responsive element

[J]. 湖北农业科学,1992(11):29-32.

[18] 黄小萌,张 超,武 丽,等. 小檗碱对猪卵母细胞体外成熟过程 miRNA 及脂质代谢相关基因的影响[J]. 中国畜牧杂志,2017,53(10):47-51.

[19] 姜 泽,玄 彪,李作臣,等. LDL 对玻璃化冷冻解冻培养 M II 期猪卵母细胞线粒体膜电位和透明带泛素化水平的影响[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(7):1961-1966.

[20] Maraa L, Casub S A, Cartac M D. Cryobanking of farm animal gametes and embryos as a means of conserving livestock genetic[J]. Animal Reproduction Science,2013,138:25-38.

[21] Pereira R M, Marques C C. Animal oocyte and embryo cryopreservation[J]. Cell and Tissue Banking,2008,9(4):267-277.

[22] 史文姝,金 一. 抑制 UCHL1 对猪卵母细胞体外成熟、透明带泛素化及多精入卵的影响[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(12):3563-3569.

[23] 吴国权,权国波,吕春荣,等. 猪卵母细胞在 GV 期与 M II 期的冷冻保存效果比较研究[J]. 中国畜牧兽医,2017,44(3):807-812.