

专题 3 胚胎工程

通常情况下，一只母羊一胎只生1~2只羔羊。畜牧业生产上需要快速增加高产肉羊或奶羊的数量。怎样才能提高羊的繁殖速率呢？

能不能在体外获得高产肉羊或奶羊的大量胚胎，再分别移植到低产的母羊体内，以获得多个高产羊呢？通过胚胎工程的迅猛发展，这一设想正在变为活生生的现实。你看，一只优秀的高产肉羊，经采用胚胎移植技术处理，一次就出生了这么多羔羊！

胚胎工程的应用当然不只限于羊，在猪、牛等家畜的养殖，以及人类的生殖和医药卫生方面同样可以发挥重要作用。



胚胎工程是指对动物早期胚胎或配子所进行的多种显微操作和处理技术，如体外受精、胚胎移植、胚胎分割、胚胎干细胞培养等技术。经过处理后获得的胚胎，还需移植到雌性动物体内生产后代，以满足人类的各种需求。



供体母羊
(布尔山羊)



受体母羊 (云南黑山羊)



云南黑山羊产下的纯种羔羊 (布尔山羊)

胚胎移植用于山羊



道赛特肉用试管羊

作为胚胎工程技术之一的胚胎移植技术,至今已有100多年的研究历史。1890年,英国剑桥大学的生物学家将纯种安哥拉兔的两个4细胞胚胎移入一只纯种比利时兔的输卵管内,成功地得到两只纯种安哥拉子兔。这个实验首次证实同种动物的胚胎在异体动物体内发育的可能性。随后又在许多实验动物方面重复了类似的实验。20世纪30~70年代,相继获得了绵羊、山羊、猪和马等胚胎移植的后代,胚胎移植的技术日渐成熟。20世纪60年代以后,牛、羊的胚胎移植开始在畜牧生产领域应用,并且成为许多胚胎工程不可缺少的基础环节。

胚胎移植技术的成功和应用带动和加速了体外受精技术的研究。1951年,美籍华人生殖生物学家张明觉和澳大利亚生物学家奥斯汀(C.R. Austin)在研究家兔体外受精时,发现了哺乳动物精子在与卵子受精前的获能现象。进一步的研究揭示了精子获能的机理,并改进了卵母细胞体外培养条件。这些理论和技术上的成就,推动了哺乳动物体外受精技术的进一步发展和应用。20世纪60~80年代,试管小鼠、试管大鼠、试管牛、试管羊、试管猪以及试管婴儿等相继问世。这项技术的应用可望解决胚胎移植中胚胎的生产成本高及来源缺乏等关键问题,并为其他胚胎工程技术提供了丰富的实验材料和必要的研究手段。

20世纪80年代以来,在胚胎移植和体外受精技术成熟的基础上,科学家又进行了不懈的探索,使胚胎分割、性别鉴定、体细胞克隆、转基因胚胎、胚胎干细胞培养等技术应运而生。这些技术与胚胎移植和体外受精技术相互配合,将进一步挖掘动物的繁殖潜力,在畜牧业和制药业等领域发挥重要的作用。尽管其中的某些技术尚处于深入研究和试用阶段,但应用前景是无限光明的。

3.1 体内受精和早期胚胎发育

胚胎工程 (embryo engineering) 的许多技术，实际是在体外条件下，对动物自然受精和早期胚胎发育条件进行的模拟操作。因此，了解哺乳动物受精和早期胚胎发育的规律，就显得十分重要了。

精子和卵子的发生

精子的发生

哺乳动物精子的发生 (spermatogenesis) 是在睾丸(图 3-1)内完成的。雄性动物从初情期 (相当于人的青春期) 开始，直到生殖机能衰退，在睾丸的曲细精管内不断进行着生殖细胞的增殖，源源不断地产生精子。

各种家畜精子发生的过程大体可以分为三个阶段。

第一阶段，位于曲细精管管壁的精原细胞进行数次有丝分裂，产生大量的精原细胞，其中部分精原细胞经过染色体复制和其他物质的合成，进一步形成初级精母细胞。

第二阶段，初级精母细胞连续进行两次分裂 (即减数分裂，包括 MI 和 MII)：第一次分裂产生两个次级精母细胞，每个次级精母细胞再分裂一次产生两个含单倍染色体的精子细胞。

第三阶段，圆形的精子细胞经过变形 (图 3-2)，其

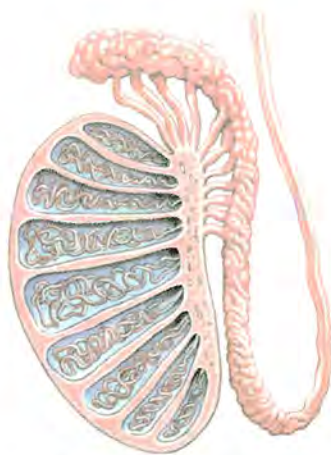


图 3-1 哺乳动物的睾丸

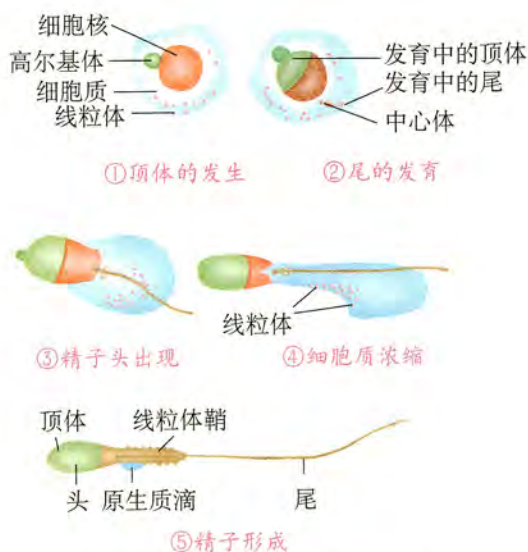


图 3-2 精子细胞变成精子示意图

小知识

几种主要家畜
每次射精量和精子数 (平均值)

种类	射精量 / mL	精子数 / 亿
牛	5	50
绵羊	1	30
猪	215	215
马	70	70
兔	1	7

中的细胞核变为精子头的主要部分，高尔基体发育为头部的顶体，中心体演变为精子的尾，线粒体聚集在尾的基部形成线粒体鞘。同时，细胞内的其他物质浓缩为球状，叫做原生质滴，随精子的成熟过程向后移动，直到最后脱落。对于多数家畜来说，精子在睾丸内形成的时间为两个月左右。

哺乳动物成熟的精子外形似蝌蚪，分头、颈和尾三大部分。不同种动物精子的形态相似，大小略有不同(图3-3)，与动物的体型大小无关。例如，大鼠的精子190 μm 长，而大象的精子却只有50 μm 长。

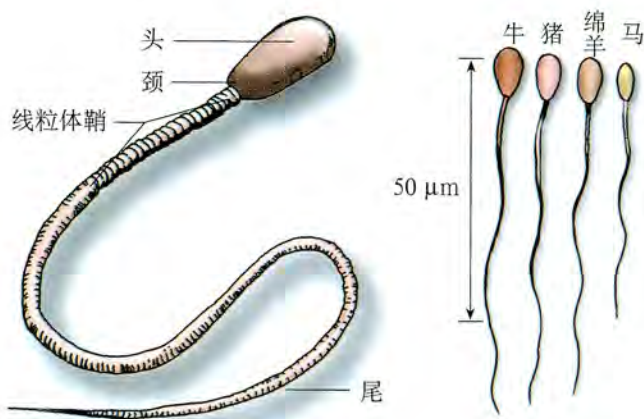


图3-3 成熟精子和几种主要家畜的精子

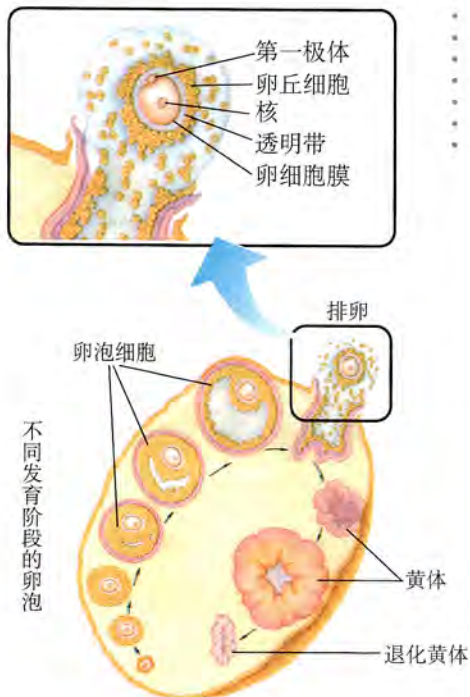


图3-4 哺乳动物卵巢、卵泡和卵子的关系



讨论

1. 家畜每次射精排出的精子数以亿计,但是通常只有一个精子能够与卵子结合,这能说是一种浪费吗?怎样理解这一现象?

2. 精子细胞变成精子的过程中,细胞中很多结构会消失,而细胞核和线粒体都保留下来,对这一现象怎样理解?为什么精子中的线粒体集中在尾的基部?

卵子的发生

卵子的发生(oogenesis)是在雌性动物的卵巢内完成的(图3-4)。动物的胚胎在性别分化以后,雌性胎儿卵巢内的卵原细胞,就通过有丝分裂的方式不断增加其数量,并进一步演变为初级卵母细胞,这时,它被卵泡细胞包围,形成卵泡。初级卵母细胞需经过减数分裂才能变为成熟的卵

子。减数第一次分裂是在雌性动物排卵前后完成的，其结果产生一个次级卵母细胞和第一极体，进入输卵管，准备与精子受精。减数第二次分裂是在精子和卵子结合的过程中完成的，次级卵母细胞经分裂产生一个成熟的卵子和第二极体(图3-5)。当在卵细胞膜和透明带的间隙可以观察到两个极体时，说明卵子已经完成了受精，这是判断卵子是否受精的重要标志。

哺乳动物卵泡的形成和在卵巢内的储备，是在出生前(即胎儿时期)完成的，这是精子和卵子在发生上的重要区别。

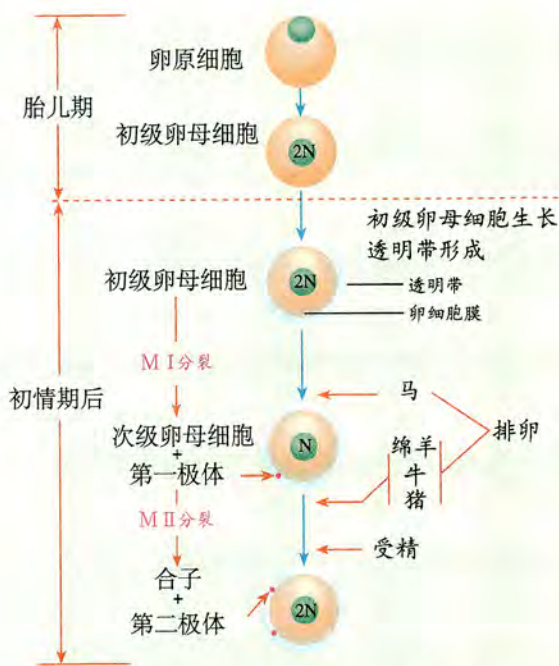


图 3-5 家畜卵子发生和成熟示意图

小知识

牛刚出生时，每侧卵巢大约含有 15 万个卵泡，每个卵泡内都有一个初级卵母细胞。出生后能够发育成熟排卵的卵泡只有 200 个左右，一生产下犊牛 4~5 头。其他哺乳动物的情况相似，可见哺乳动物一生中卵母细胞的有效利用率很低，这正是胚胎工程要研究解决的问题之一。

讨论

1. 一个卵泡中能形成几个成熟的卵子？
2. 排卵是指卵子从卵泡中排出，还是指卵泡从卵巢中排出？
3. 刚排出的卵是成熟的卵子吗？它在母体的什么部位与精子受精？

受精

受精 (fertilization) 是精子与卵子结合形成合子 (即受

· 精卵)的过程。它包括受精前的准备阶段和受精阶段。在
· 自然条件下,受精是在雌性的输卵管内完成的。

· **准备阶段1——精子获能**

· 生殖生物学家张明觉早年进行过兔的体外受精研究。
· 他曾用各种方法处理取自附睾的精子,但都无法使这些精
· 子与卵子在体外受精。这是什么原因呢?后来他发现在多
· 种动物中,进入雌性动物生殖道的精子虽然运行的时间不
· 长,但必须经过这一时段才能与排出的卵子受精。也就是
· 说,刚刚排出的精子,不能立即与卵子受精,必须在雌性
· 动物生殖道发生相应的生理变化后,才能获得受精能力。
· 1951年,张明觉和奥斯汀发现了这一生理现象,并把它称
· 为“精子获能”(capacitation)。这一发现加速了科学家对精
· 子获能机理的研究,并且找到了使精子在体外获能的物质,
· 实现了各种哺乳动物精子在体外条件下的获能。

· 张明觉,美籍华人,生殖生物学家、育种学家和避孕药的
· 创始人。1908年生于山西省,1933年毕业于清华大学心理系。
· 1938年赴英国,在剑桥大学主攻动物育种和人工授精,并获得
· 博士学位。1945年任美国乌斯特实验生物研究所研究员,研究
· 成果很多。1951年发现“精子获能”现象,为哺乳动物体外受
· 精奠定了理论基础。由于他在体外受精和胚胎移植研究中作出
· 的重大贡献,被人们誉为“试管婴儿”的先驱。

· **准备阶段2——卵子的准备**

· 卵子一般在排出后2~3h才能被精子穿入。一些实验
· 证据表明,卵子在受精前也要经历类似精子获能的过程。
· 动物排出的卵子成熟程度不同,有的可能是初级卵母细胞,
· 如马、犬等,有的可能是次级卵母细胞,如猪、羊等。但
· 它们都要在输卵管内进一步成熟,当达到减数第二次分裂
· 的中期时,才具备与精子受精的能力。

· **受精阶段**

· 哺乳动物的受精过程主要包括:精子穿越放射冠和透
· 明带,进入卵细胞膜,原核形成和融合(图3-6)。

· 获能后的精子与卵子相遇时,首先发生顶体反应,使
· 顶体内的酶释放出来(图3-7)。放射冠是包围在卵子透明
· 带外面的卵丘细胞群,精子所释放的顶体酶可直接溶解卵
· 丘细胞之间的物质,形成精子穿越放射冠的通路。

· 穿过放射冠的精子立即与透明带接触,顶体酶随后将
· 透明带溶出一条孔道,精子借自身运动穿越透明带,并接
· 触卵细胞膜。在精子触及卵细胞膜的瞬间,会产生阻止后
· 来的精子进入透明带的生理反应,这个反应称做透明带反
· 应,它是防止多个精子进入透明带,引起多精子入卵受精

2 进行体外受精时,将卵母细胞取出后,是否应当将它置于与输卵管中相似的环境,让它进一步成熟?

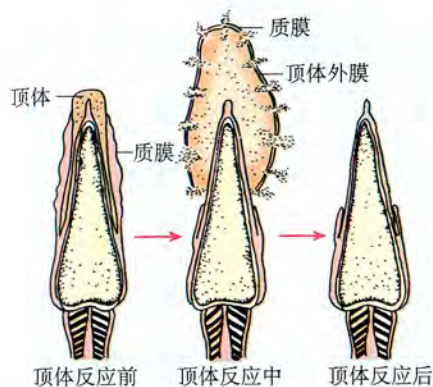
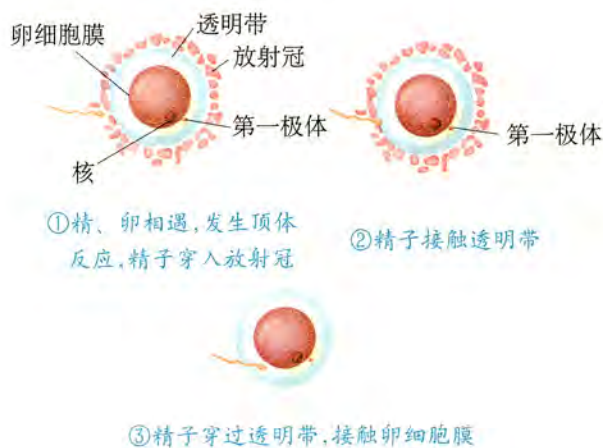


图 3-7 哺乳动物精子的顶体反应示意图

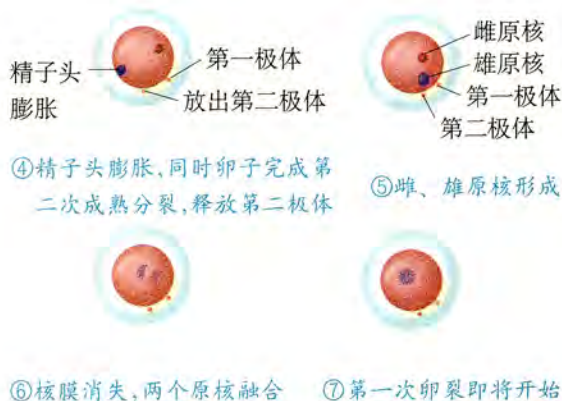


图 3-6 哺乳动物受精过程示意图



小知识

多数哺乳动物的第一极体不进行减数第二次分裂形成两个第二极体。

的第一道屏障。

只有穿过透明带的精子才能与卵细胞膜接触。由于卵细胞膜表面有大量的微绒毛，当精子与卵细胞膜接触时，立即被微绒毛抱合，随后，精子外膜和卵细胞膜相互融合，精子入卵。

精子入卵后，卵细胞膜会立即发生一种生理反应，拒绝其他精子再进入卵内，这种生理反应称做卵细胞膜反应。这是防止多精入卵受精的第二道屏障。

精子入卵后的另一个变化，是尾部脱离，并且原有的核膜破裂；随后，精子形成一个新的核膜，最后形成一个比原来精子核还大的核，叫做雄原核。与此同时，精子入卵后被激活的卵子完成减数第二次分裂，排出第二极体后，形成雌原核，雌原核一般略小于雄原核。

雄、雌原核充分发育后，相向移动，彼此接触，二者体积缩小、合并，两组核染色体合为一组，形成一个含二

倍染色体的合子，也就是受精卵。受精过程至此结束，受精卵的发育也由此开始。

胚胎发育

合子形成后即在输卵管内进行有丝分裂，开始发育。

胚胎发育的早期有一段时间是在透明带内进行的，这一时期称为卵裂 (cleavage) 期。其特点是：细胞分裂方式为有丝分裂，细胞的数量不断增加，但胚胎的总体积并不增加，或略有缩小。

根据胚胎形态的变化，可将早期发育的胚胎分为以下几个阶段 (图 3 - 8)。

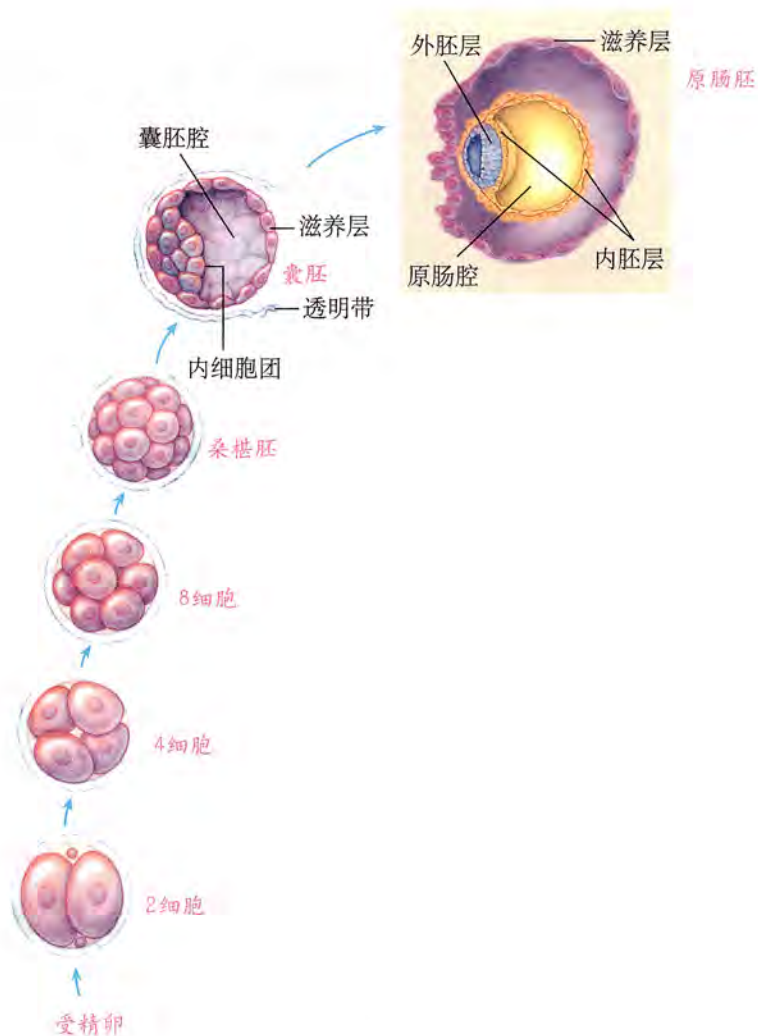


图 3-8 哺乳动物早期胚胎的发育

桑椹胚 当胚胎细胞数目达到32个左右时，胚胎形成致密的细胞团，形似桑椹，叫做桑椹胚 (morula)。实验证实，这一阶段前的每一个细胞都具有发育成完整胚胎的潜

能，属于全能细胞。

囊胚 桑椹胚进一步发育，细胞开始出现分化。聚集在胚胎一端，个体较大的细胞，称为内细胞团 (inner cell mass, ICM)，将来发育成胎儿的各种组织，而沿透明带内壁扩展和排列的、个体较小的细胞，称为滋养层细胞，它们将来发育成胎膜和胎盘。

随着胚胎的进一步发育，胚胎的内部出现了含有液体的囊腔——囊胚腔，这个时

期的胚胎叫做囊胚 (blastula)。囊胚进一步扩大，会导致透明带的破裂，胚胎从其中伸展出来，这一过程叫做孵化 (hatching)。

原肠胚 囊胚孵化后，再进一步发育，内细胞团表层的细胞形成外胚层，下方的细胞形成内胚层。这时的胚胎称为原肠胚 (gastrula)，由内胚层包围的囊腔叫原肠腔。滋养层则发育为胎儿的胎膜和胎盘。



资料分析

不同动物受精卵的发育及其进入子宫的时间有明显的差别。请分析下表，讨论相关问题。

表 3-1 各种动物受精卵发育及进入子宫的时间

动物种类	受精卵发育 / h					进入子宫时发育天数和发育阶段	
	2 细胞	4 细胞	8 细胞	16 细胞	桑椹胚	天	发育阶段
小鼠	24~38	38~50	50~60	60~70	68~80	3	桑椹胚
山羊	24~28	48~60	72	72~96	96~120	4	10~16 细胞
绵羊	36~38	42	48	67~72	96	3~4	16 细胞
猪	21~51	51~66	66~72	90~110	110~114	2~2.5	4~6 细胞
马	24	30~36	50~60	72	98~106	6	囊胚
牛	27~42	44~65	46~90	96~120	120~144	4~5	8~16 细胞

注：马、牛为排卵后时间，其他动物为交配后时间。

讨论

- 1. 表中哪种动物的胚胎在进入子宫时发育程度最高？
- 2. 将体外培养的马胚胎移植到母马子宫时，应选择什么阶段的胚胎？如果换

- 成牛又该怎样处理？
- 3. 为什么说关于动物的体内受精和胚胎发育的研究，会为胚胎工程提供理论基础？请结合本节内容举例说明。



思考与探究

1. 以精子的运行途径为线索,设计一幅简图,来说明哺乳动物的受精过程。
2. 哺乳动物精子和卵子的发生主要有哪些相似点或不同点?
3. 当你了解到精子需要获能,受精过程中有防止多精入卵的现象时,你是否提出过这样

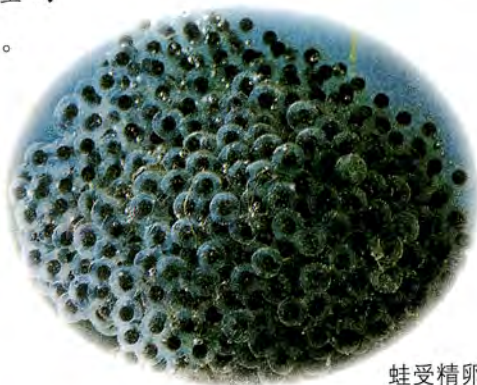
的问题:精子在雌性生殖道内是如何获能的?
防止多精入卵的两道防线的形成机制究竟是什么?如果你提出过这样的问题,并能通过查阅书籍,上网或请教专家来解决问题,说明你在深入探讨问题方面又前进了一大步。除了这两个问题外,你还能提出其他问题吗?



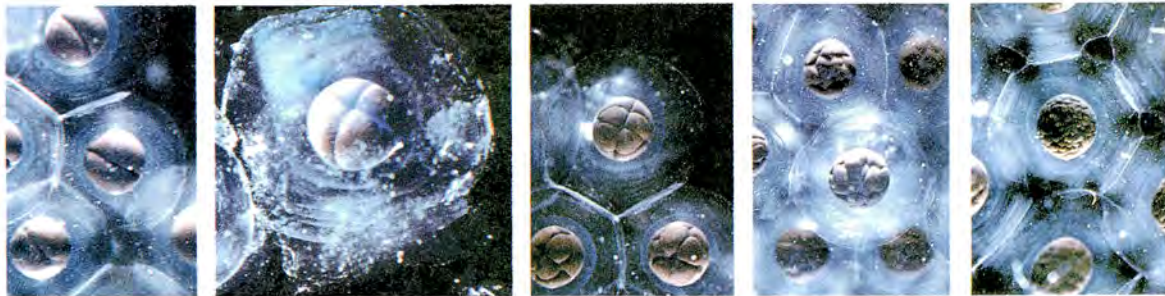
课外活动

观察蛙受精卵的分裂

春天的清晨,在小河、池塘和水田旁边仔细观察,往往会看到一团团漂浮在水面上的蛙受精卵。球状受精卵的外面有胶膜包裹着,上面呈黑色,下面呈白色。取一个广口瓶,瓶中装 $2/3$ 的澄清池水,再放入一些金鱼藻。采集少量的蛙受精卵,放进广口瓶中,每100 mL水中最多放50粒。将广口瓶放在向阳、温暖的地方,观察并记录蛙受精卵的发育情况(可使用放大镜或解剖镜观察)。一般情况下,蛙卵受精后经过2~3 h,就开始第一次分裂。注意观察胚的外形和体积有没有变化。能否看到胚细胞数目的增多?小蝌蚪发育成幼蛙后,你应当怎么办?



蛙受精卵



蛙受精卵的分裂

3.2

体外受精和早期胚胎培养

你听说过试管牛、试管羊吗？你知道什么是试管动物技术吗？试管动物技术是指通过人工操作使卵子和精子在体外条件下成熟和受精，并通过培养发育为早期胚胎后，再经移植产生后代的技术。发展这种技术有什么意义呢？

从试管牛说起

我国大多数牛的品种，产肉量或产奶量与国际上的优良品种相比都有一定差距。例如，我国目前每头奶牛年平均产奶量为3 000 kg左右，而国际上良种奶牛年平均产奶量可达10 000 kg；我国蒙古黄牛平均每头体重300 kg左右，而澳大利亚纯种海福特牛两岁时体重就可达到800 kg（图3-9）。因此，需要从国外引进优良品种，而引进一头成年牛需要3万~5万元，如此高昂的价格使得我们不可能靠大量引进良种牛来提高产量。那么，能不能让引进的良种牛快速地大量繁殖呢？遗憾的是，牛的生育率很低，一头牛一胎一般只产一头犊牛，一生约生育四五次。如何解决这个难题呢？

我们知道，牛的生育率虽然低，但是母牛体内的卵母细胞却相当多，其卵巢中的卵母细胞数要比一生中正常排出的卵子多1 000倍。公牛产生的精子数量就更多了。如果能够分别采集牛的精子和卵母细胞，让它们在体外完成受精并且发育成一个个小胚胎，再将这些胚胎移植到一个本地牛（如黄牛）体内“借腹怀胎”，不就可以实现良种牛的快速大量繁殖吗？这的确是很好的设想，但是，要将这一美好设想变成现实，又需要付出艰苦的努力，需要开发相应的技术。在这项技术中首先要做的是体外受精和早期胚胎的培养。

体外受精

哺乳动物的体外受精主要包括卵母细胞的采集、精子的获取和受精等几个主要步骤。

卵母细胞的采集和培养

对于实验动物如小鼠、兔，以及家畜猪、羊等，采用的主要方法是：用促性腺激素处理，使其排出更多的卵子，然后，从输卵管中冲取卵子，直接与获能的精子在体外受精。

对于大家畜或大型动物，如牛，采用的主要方法是：



图3-9 试管牛(两头小牛)

小知识

超数排卵处理的做法是给供体注射促性腺激素，使一头母畜一次排出比自然情况下多几倍到十几倍的卵子，用于体外受精和早期胚胎培养。

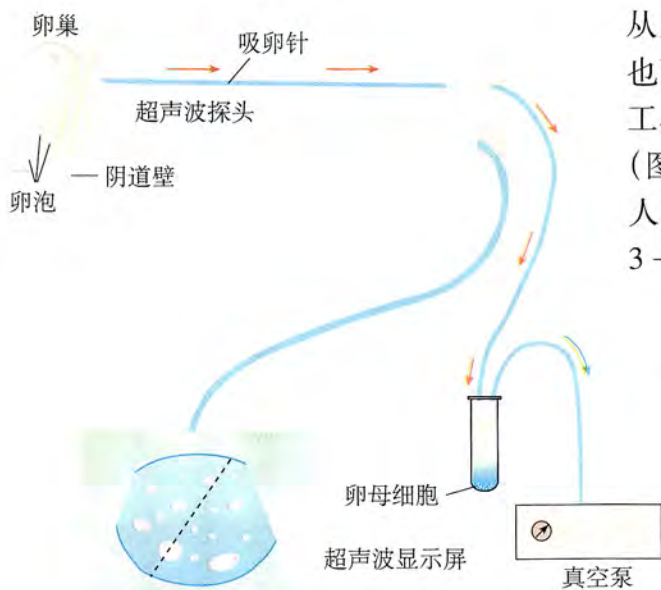
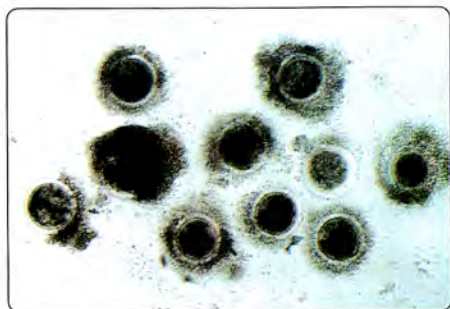


图 3-10 牛活体采卵示意图

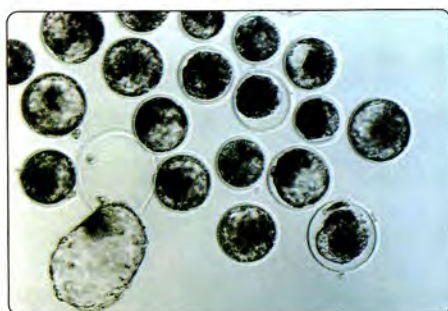
从屠宰场已屠宰母畜的卵巢中采集卵母细胞，也可以借助超声波检测仪、内窥镜或腹腔镜等工具，直接从活体动物的卵巢中吸取卵母细胞（图 3-10）。采集的卵母细胞，都要在体外经人工培养成熟后，才能与获能的精子受精（图 3-11）。活体采卵在一些畜牧业发达的国家已开始商业化生产，它对充分发挥优良母畜的繁殖潜力具有重要意义。



牛卵巢



牛卵母细胞



体外受精胚胎

图 3-11 牛卵巢、卵母细胞和体外受精胚胎

精子的采集和获能

收集精子的方法有假阴道法、手握法和电刺激法等。

假阴道法是采用仿生学的方法，模仿发情雌性动物阴道环境设计的装置，它能够满足雄性动物交配时对压力、温度和润滑度的要求，同时配有与采精动物相适应的活台

畜或假台畜（图3-12）。使用假台畜时，要训练被采精动物爬跨台畜，并将精液射入假阴道，以便收集。

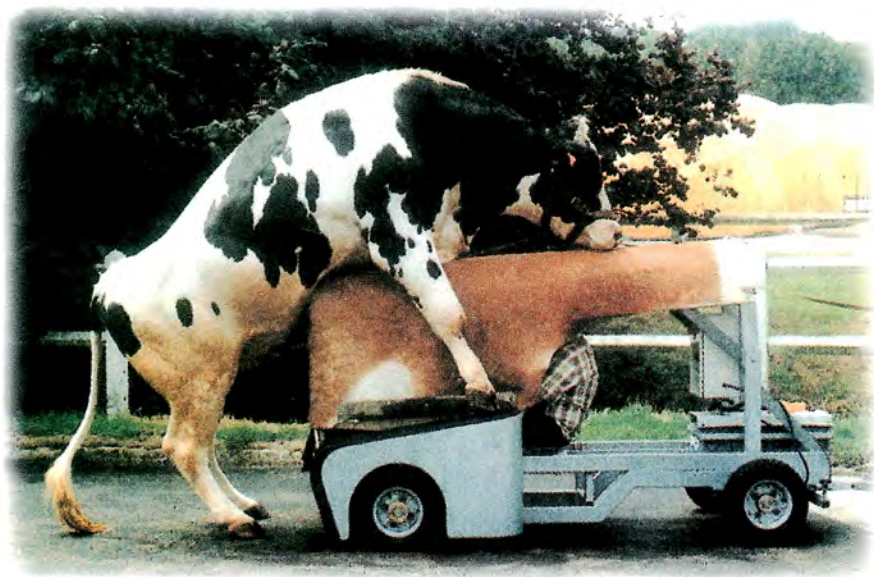


图 3-12 家畜采精用假台畜



生物技术资料卡

收集精子的其他方法——手握法和电刺激法



收集精子除假阴道法外还有手握法和电刺激法。



手握法不需要任何设备，徒手或戴上乳胶手套，直接把握雄性动物的阴茎，给予适当的压力和刺激，就可引起射精。这种方法只适于猪和犬等体型较小，易于控制的家畜。



电刺激法是将动物麻醉后，用特制的电极伸入动物的直肠，直接刺激位于腰荐部的射精中枢神经，引起射精。这种方法多用于野生或经济动物。

在体外受精前，要对精子进行获能处理。通常采用的体外获能方法有培养法和化学诱导法两种：对于啮齿动物、家兔和猪等动物的精子，一般采用培养法，即将取自附睾的精子，放入人工配制的获能液中，培养一段时间后，精子就可获能；对于牛、羊等家畜的精子常采用化学诱导法，即将精子放在一定浓度的肝素或钙离子载体 A23187 溶液中，用化学药物诱导精子获能。

受精

获能的精子和培养成熟的卵子，一般情况下都可以在获能溶液或专用的受精溶液中完成受精过程（图3-13）。



图 3-13 在培养皿中使动物的精子和卵子结合

精子和卵子一般要放在培养液小滴内共同培养一段时间才能完成受精（图 3 - 14）。

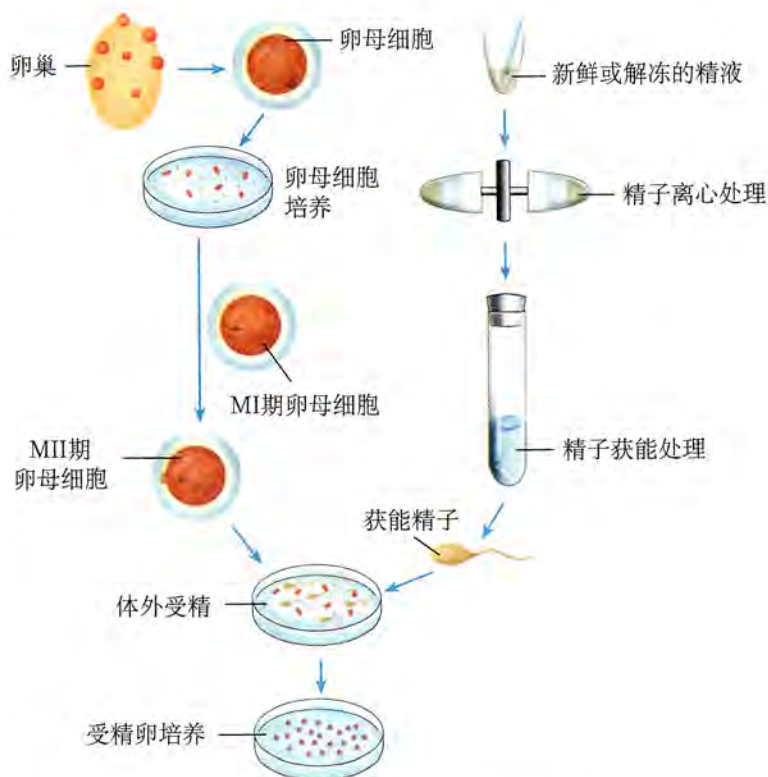


图 3-14 哺乳动物体外受精过程示意图

胚胎的早期培养

精子与卵子在体外受精后，应将受精卵移入发育培养液中继续培养，以检查受精状况和受精卵的发育能力。哺乳动物胚胎的培养液成分一般都比较复杂，除一些无机盐和有机盐类外，还需添加维生素、激素、氨基酸、核苷酸等营养成分，以及血清等物质。

当胚胎发育到适宜的阶段时，可将其取出向受体移植，或冷冻保存。

不同动物胚胎移植的时间不同，例如，牛、羊一般要培养到桑椹胚阶段或囊胚阶段才进行移植，小鼠和家兔等实验动物可在更早的阶段移植，人的体外受精胚胎，即试管胚胎，可在 8~16 个细胞阶段移植。

体外受精技术经过 20 多年的研究，已经取得很大进展，效率也不断提高，其中以牛的体外受精技术水平最高。目前，从屠宰场废弃的卵巢中，每个卵巢平均可采集 10 枚可

► 奇思妙想

为充分利用屠宰母畜卵巢上的卵母细胞，不妨将屠宰场和“胚胎工厂”合建。这样屠宰场的产品就不仅是鲜肉，还会生产出大量的胚胎和胚胎工程所需的原材料，你看这个想法可行吗？

用的卵母细胞，经体外培养成熟和受精后，约可获得4枚可用的胚胎，移植给受体母牛最终可能产下1~2头犊牛。牛体外受精胚胎的工厂化生产已经成为可能（图3-15）。

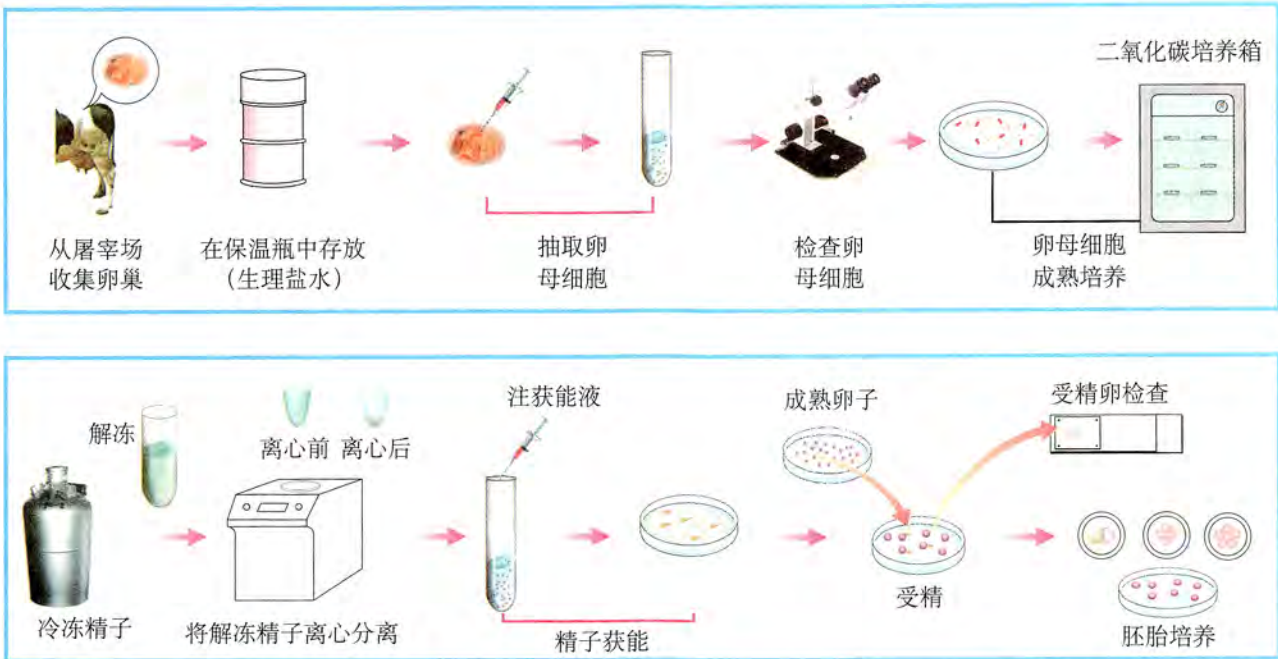


图3-15 牛体外受精胚胎工厂化生产流程图

思考与探究

下面是从互联网看到的我国某良种家畜公司的产品介绍。

(1) 肉牛胚胎工程产业化

从美国、加拿大引进国际一流良种红安格斯肉牛，生产和销售良种肉牛胚胎和冷冻精液（国家发展和改革委员会高科技化示范工程项目，陕西省“十五”重大科技产业化项目，总投资5 000万元）。

(2) 奶牛胚胎工程产业化

从美国引进国际一流超高产良种荷斯坦奶牛，生产和销售良种奶牛胚胎和冷冻精液（国家“948”项目，农业部农业科技成果转化项目）。

(3) 肉羊胚胎工程产业化

从澳大利亚和新西兰引进国际一流良种无角道赛特肉用绵羊和布尔肉用山羊，生产和销售良种羊胚胎和冷冻精液（国家“948”项目，总

投资3 000万元）。

① 通过这些介绍，你对体外受精和胚胎培养的应用前景有什么认识？

② 看过这些介绍后，你愿意向你的家人或亲友讲一讲试管家畜的事情吗？请你用尽量通俗的语言介绍体外受精和早期胚胎培养的技术。



良种荷斯坦奶牛

3.3 胚胎工程的应用及前景

胚胎工程技术包含的内容很丰富，目前在生产中应用较多的是家畜的胚胎移植、胚胎分割和体外生产胚胎技术。还有多项胚胎工程技术仍在深入研究或小规模试用。

胚胎移植

胚胎移植 (embryo transfer) 是指将雌性

动物体内的早期胚胎,或者通过体外受精及其他方式得到的胚胎,移植到同种的、生理状态相同的其他雌性动物的体内,使之继续发育为新个体的技术(图3-16)。其中提供胚胎的个体称为“供体”(donor),接受胚胎的个体叫“受体”(recipient)。胚胎移植实际上是生

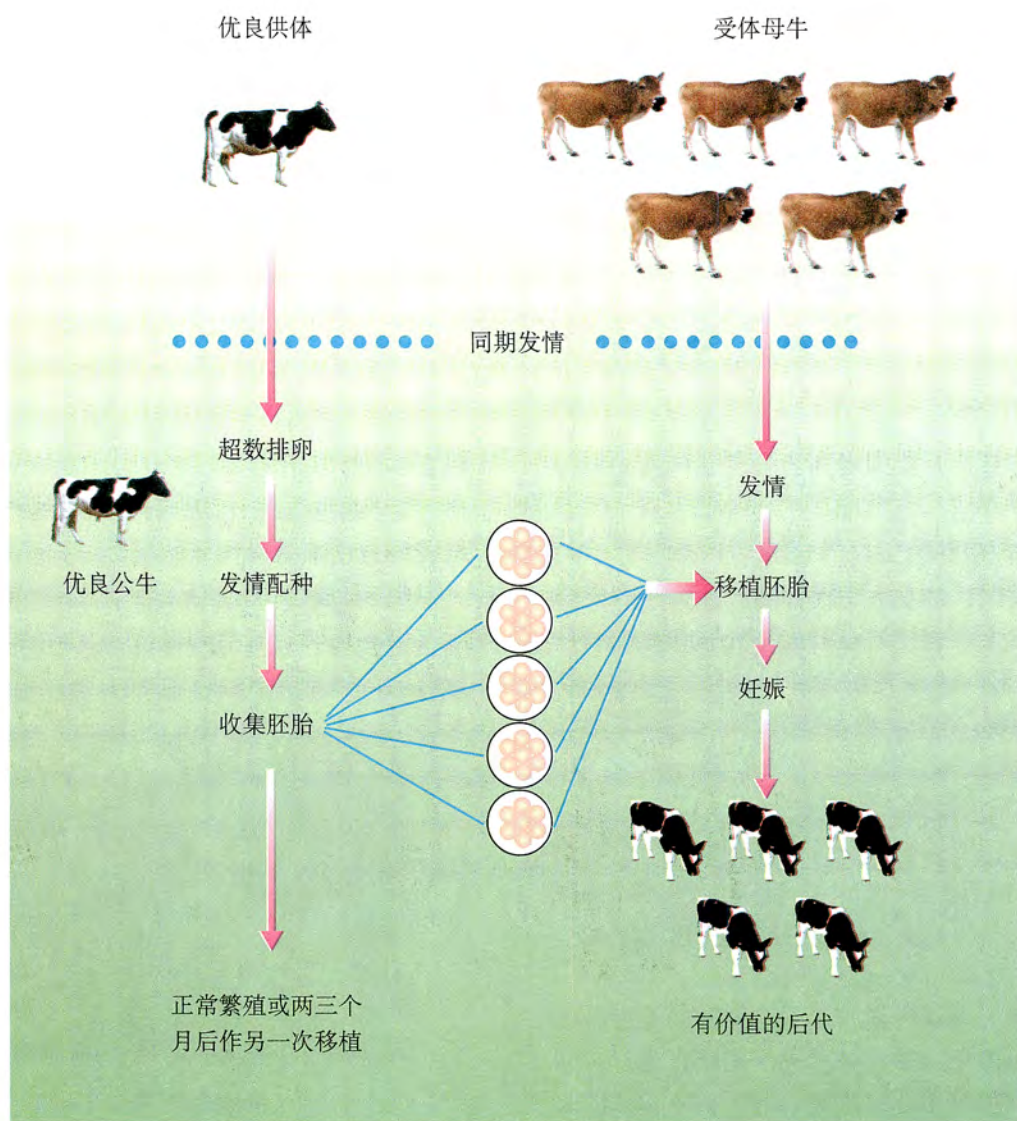


图3-16 牛胚胎移植示意图

产胚胎的供体和孕育胚胎的受体共同繁殖后代的过程。在胚胎工程中通过任何一项技术，如转基因、核移植，或体外受精等技术获得的胚胎，都必须移植给受体才能获得后代。因此，胚胎移植又是胚胎工程其他技术的最后一道“工序”。

胚胎移植的现状和意义

近20年来，在胚胎移植中，牛的胚胎移植技术较为成熟。以奶牛为例，目前已达到一头供体牛平均每次处理收集到的胚胎，经移植可产下3~4头犊牛，由于每年可处理4~5次，这样，一头良种母牛一年生下的后代可达数十头，远远超过在自然状态下一生所得的后代数量。羊的胚胎移植效率比奶牛还要高。

自20世纪60年代以来，我国家兔、绵羊、牛、马和山羊的胚胎移植相继获得成功。近10年来，牛、羊的胚胎移植在我国部分地区已进入生产应用阶段，这些成果大大推动了我国畜牧业的发展。

进行胚胎移植的优势是可以充分发挥雌性优良个体的繁殖潜力(图3-17)。在这项技术中，供体的主要职能变为只产生具有优良遗传特性的胚胎，繁重而漫长的妊娠和育仔的任务由受体取代，这就大大缩短了供体本身的繁殖周期。同时，在对供体施行超数排卵处理后，可获得多枚

良种畜群迅速扩大,加速了育种工作和品种改良。

在世界范围内,胚胎移植不受时间和地域的限制,大量节省了购买种畜的费用。



在肉用家畜的生产中,一次给受体移入多个胚胎,可增加双胎和多胎的比例。



利用胚胎冷冻保存技术,建立胚胎库,保存品种资源和濒危物种。



图3-17 胚胎移植可充分发挥雌性优良个体的繁殖潜力

小知识

我国现有奶牛 600 万头左右, 每头奶牛年均产奶量只有 3 000 kg (有一部分高产奶牛可达 7 000 kg 以上); 我国有黄牛 9 000 万头。选用高产奶牛作供体生产胚胎, 或者从国外引进高产奶牛胚胎, 用黄牛做受体进行胚胎移植, 生产纯种高产奶牛, 是我国当前迅速扩大高产奶牛数量, 满足对牛奶需求的有效方法。近几年, 我国每年移植奶牛胚胎 2 万~3 万枚, 获母犊牛 5 000~6 000 头。

胚胎, 经移植可得到多个后代, 使供体生产下的后代数是自然繁殖的十几倍到几十倍。

胚胎移植的生理学基础

准备移植的胚胎, 移植到任何一头母牛的子宫内都能发育吗? 供体与受体之间进行胚胎移植时, 会不会发生免疫排斥反应? 要解决这些问题都需要对胚胎发育进行生理学方面的研究。

胚胎移植能否成功, 与供体和受体的生理状况有关。

第一, 哺乳动物发情排卵后, 不管是否妊娠, 在一段时间内, 同种动物的供、受体生殖器官的生理变化是相同的, 这就为供体的胚胎移入受体提供了相同的生理环境。第二, 哺乳动物的早期胚胎形成后, 在一定时间内不会与母体子宫建立组织上的联系, 而是处于游离状态, 这就为胚胎的收集提供了可能。第三, 大量的研究已经证明, 受体对移入子宫的外来胚胎基本上不发生免疫排斥反应, 这为胚胎在受体内存活提供了可能。第四, 供体胚胎可与受体子宫建立正常的生理和组织联系, 但移入受体的供体胚胎的遗传特性, 在孕育过程中不受任何影响。



讨论

1. 在胚胎移植操作中, 怎样才能使胚胎在移植前后所处的生理环境保持一致? 例如, 供、受体的发情时间要一致吗? 供体胚胎移入受体子宫的位置, 应与在供体内的位置相同或相似吗?

2. 胚胎移植实质上是早期胚胎在相同生理环境条件下空间位置的转移。你认为这样的概括正确吗?

胚胎移植的基本程序

以家畜的胚胎移植为例, 胚胎移植主要包括对供、受体的选择和处理, 配种或进行人工授精, 对胚胎的收集(图 3-18)、检查、培养或保存, 对胚胎进行移植, 以及移植后的检查等步骤(图 3-19)。

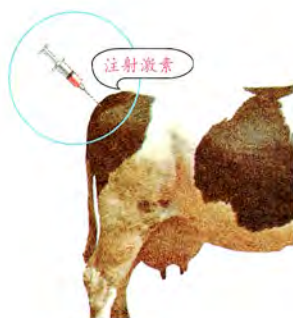
与胚胎工程中的其他技术相比, 胚胎移植已经是较为成熟的技术, 但就目前发展的情况看, 还需要进一步简化操作程序。



图 3-18 羊的手术冲卵



① 对供、受体母牛进行选择，并用激素进行同期发情处理。



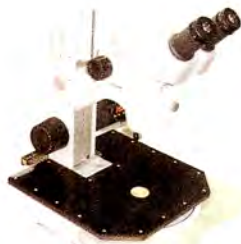
② 用激素对供体母牛做超数排卵处理。



③ 超数排卵的母牛发情后，选择同种优秀的公牛进行配种或人工授精。



④ 胚胎的收集：配种或输精后第7天，用特制的冲卵装置，把供体母牛子宫内的胚胎冲洗出来（也叫冲卵）。



⑤ 冲卵后，对胚胎进行质量检查。这时的胚胎应发育到桑椹胚或囊胚阶段。



⑥ 将收集的胚胎直接向受体移植或放入 -196°C 的液氮中保存。



⑦ 胚胎的移植：(1)手术法：引出受体子宫和卵巢，将胚胎注入子宫角，缝合创口。(2)非手术法：将装有胚胎的移植管送入受体母牛子宫的相应部位，注入胚胎。



⑧ 对受体母牛进行是否妊娠的检查。



⑨ 受体母牛产下胚胎移植的犊牛。

图 3-19 牛胚胎移植流程图

在我国，牛和羊的胚胎移植技术已日臻完善和成熟，不久的将来，很有可能成为一项常规的繁殖技术。畜牧业发展和胚胎工程技术研究的不断深入，为胚胎移植的应用提供了广阔的平台。胚胎移植作为胚胎工程的最终技术环节，也将推动胚胎工程其他技术的研究和应用。

胚胎分割

能不能将一个胚胎分割成几份，从而提高胚胎的利用率呢？基于这样的设想，胚胎分割技术逐渐发展和成熟。

胚胎分割 (embryo splitting) 是指采用机械方法将早期胚胎切割成2等份、4等份或8等份等，经移植获得同卵双胎或多胎的技术 (图3-20)。来自同一胚胎的后代具有相同的遗传物质，因此，胚胎分割可以看做动物无性繁殖或克隆的方法之一。

发展简史 1978年，科学家将小鼠桑椹胚一分为二，获得了成功。1979年，科学家分割绵羊胚胎获得同卵羔羊。20世纪80年代后，人们建立了系统的胚胎分割方法，并相继得到1/4和1/8分割胚胎的后代。目前，已得到1/2胚胎后代的动物有小鼠、家兔、绵羊、山羊、牛、马和猪等；得到1/4胚胎后代的有家兔、绵羊、猪、牛和马等；得到1/8胚胎后代的有家兔、绵羊和猪等。但目前，仍然以二分胚胎的分割和移植效率最高，已成为提高家畜胚胎利用率的手段之一。

近20年来，我国的胚胎工程专家也进行了胚胎分割移植的试验研究，相继成功地对小鼠、家兔、绵羊、山羊和牛等动物进行了分割胚胎移植，并将二分胚分割技术应用到牛和羊的胚胎移植中 (图3-21)。



图3-20 切割同卵双驹



图3-21 切割同卵双犊和三卵六羔羊

胚胎分割所需要的主要仪器设备为实体显微镜和显微操作仪(图3-22)。

进行胚胎分割时,应选择发育良好、形态正常的桑椹胚或囊胚,将其移入盛有操作液的培养皿中,然后,用分割针或分割刀进行分割。对于不同发育阶段的胚胎,分割的具体操作不完全相同。

具体操作时,用分割针或分割刀片将胚胎切开,吸出其中的半个胚胎,注入预先准备好的空透明带中,或直接将裸半胚移植入受体。在对囊胚阶段的胚胎进行分割时,要注意将内细胞团均等分割,否则会影响分割后胚胎的恢复和进一步发育(图3-23)。

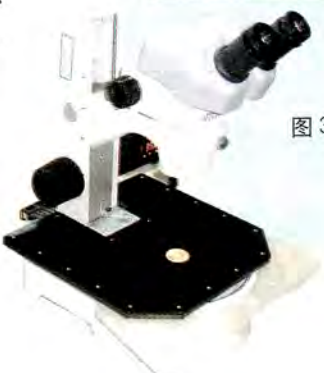


图3-22 显微操作仪(上)和实体显微镜(下)



在显微镜下
切割胚胎

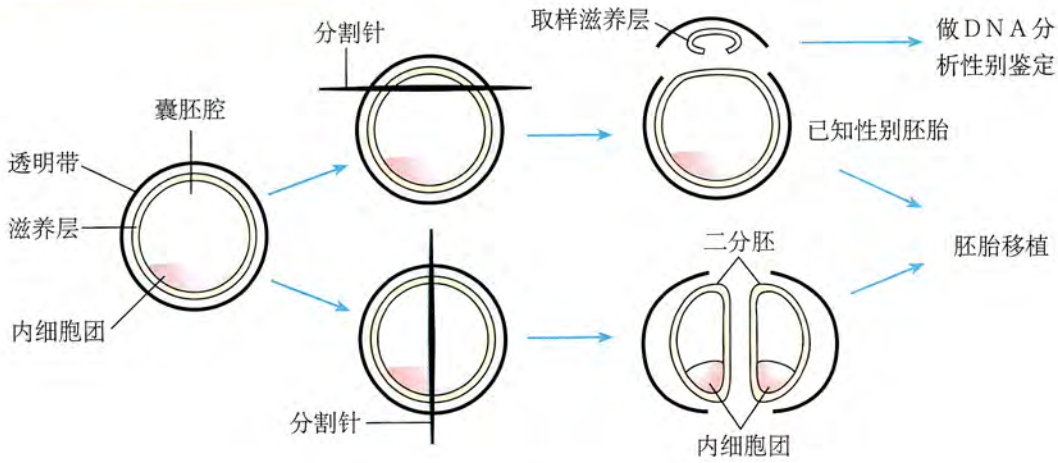


图3-23 牛胚胎性别鉴定和分割示意图

尽管胚胎分割技术已在多种动物中取得成功,但仍存在一些问题,如刚出生的动物体重偏低,毛色和斑纹上还存在差异等。实践证明,采用胚胎分割技术产生同卵多胚的可能性是有限的,到目前为止,最常见的是经分割产生的同卵双胞胎,而同卵多胎成功的比例都很小。

对囊胚阶段的胚胎进行分割时,为什么要将内细胞团均等分割?

胚胎干细胞

哺乳动物的胚胎干细胞(embryonic stem cell)简称ES或EK细胞,是由早期胚胎或原始性腺中分离出来的一类细胞。ES细胞具有胚胎细胞的特性,在形态上,表现为体积小、细胞核大、核仁明显;在功能上,具有发育的全能性,即可以分化为成年动物体内任何一种组织细胞(图3-24)。另外,在体外培养的条件下,ES细胞可以增殖而不发生分化。对它可以进行冷冻保存,也可进行遗传改造。

ES细胞的分离和培养成功是胚胎工程中的重大成就之一,在基础生物学、畜牧学和医学上都具有十分重要的应用价值。

ES细胞可以用于治疗人类的某些顽症。人类由于细胞坏死、退化或功能异常引起的疾病,如帕金森综合征、少年糖尿病和老年痴呆症等,已成为医学上尚未攻克的顽症。利用ES细胞可以被诱导分化形成新的组织

细胞的特性,移植ES细胞可使坏死或退化的部位得以修复并恢复正常功能。目前,在动物实验方面,用ES细胞诱导分化出的某些组织细胞已成功地治愈糖尿病、肝衰竭、心衰竭和成骨不良等疑难病症。也许在不久的将来,当我们的身体某一类细胞功能出现异常或退化时,就可以通过诱导ES细胞定向分化来及时修补。

随着组织工程技术的发展,通过ES细胞体外诱导分化,还可以培育出人造组织器官,解决目前临床上存在的供体器官不足和器官移植后免疫排斥的问题。

ES细胞也是研究体外细胞分化的理想材料。ES细胞在饲养层细胞上^①,或在添加抑制因子的培养液中,能够维持不分化的状态。在培养液中加入分化诱导因子,如牛磺酸、丁酰环腺苷酸等化学物质时,就可以诱导ES细胞向不同类型的组织细胞分化,这为揭示细胞分化和细胞凋亡的机理提供了有效的手段。

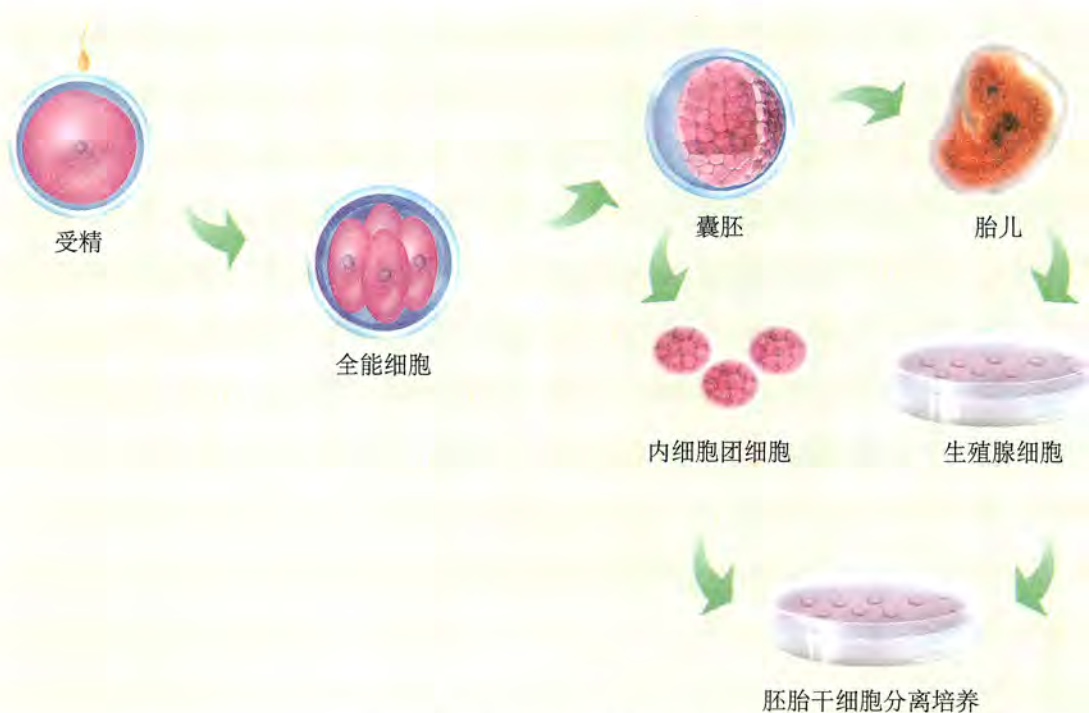


图3-24 胚胎干细胞分离途径示意图

^① 饲养层细胞一般为输卵管上皮细胞,在干细胞培养时,可作为提供干细胞分裂、增殖的营养细胞。

胚胎干细胞还可用于对哺乳动物个体发生和发育规律的研究。由于ES细胞可分化为胚胎的内胚层、中胚层和外胚层中任何一类细胞,于是可以将带有遗传标记的ES细胞注入早期胚胎的囊胚腔,通过组织化学染色,了解ES细胞的分化特点,这就为研究胚胎发育过程中的细胞分化及组织和器官形成的规律,进而研究动物体器官形成

的时间、发育过程以及影响的因素等提供了可能。

ES细胞的应用前景吸引着众多科学家投入到这一领域的研究中。目前,ES细胞的分离、培养体系的研究,以及ES细胞的选择、检测和全能性的维持,不仅是胚胎工程的前沿课题之一,也是当前生命科学研究的热门课题之一。

思考与探究

1. 右图是同学们到某良种场进行参观时,看到的胚胎移植繁育良种奶牛的技术流程示意图。请看图思考并讨论以下各题。

(1) 用文字完成右侧的流程图。

(2) 应该怎样选择供体公、母牛和受体母牛? 在②中,为什么要用促性腺激素处理供体母牛? 在促性腺激素处理供体母牛前,需要对供体和受体母牛进行同期处理吗?

(3) 在右侧的流程图中,哪一步需要进行冲卵? 冲卵是把母牛的卵子冲出来吗?

(4) 用胚胎移植繁育良种种畜具有哪些实用意义?

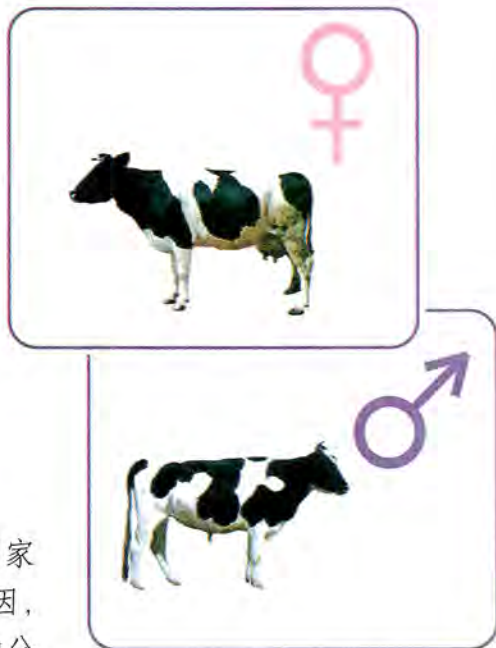
2. 荷斯坦奶牛是世界上产奶量最高的奶牛品种之一。某良种公司引进了纯种荷斯坦奶牛,并用胚胎分割的技术繁育出了荷斯坦良种奶牛群体。如果你是一名科技专栏的记者,现在需要写一篇关于用胚胎分割技术繁育良种奶牛的报道。请写出你准备向胚



胎专家提出的三个问题,然后再以访谈录的形式回答这三个问题(回答不出的问题可通过网络、书籍或向专家请教等方式解决)。



当你用战神的矛和盾“♂”来表示哺乳动物的雄性，用爱神的镜子“♀”来表示哺乳动物的雌性的时候，是否想到过让哺乳动物按照人的意愿生产所需性别的后代？的确，这是人们由来已久的愿望。因为控制哺乳动物的性别对于畜牧生产有着十分重要的意义。例如，对奶牛、奶山羊等以产奶作为主要生产性状的家畜，人们希望多生母畜；而对于肉用牛、羊和毛用牛、羊等，人们又希望多生公畜（肉用和毛用牛、羊的雄性生产性能明显高于雌性）。那么，人们是如何控制哺乳动物性别的呢？



早期研究者们试图采用物理或化学的方法控制家畜的性别，但这种探索多因效率低、重复性差等原因，难以在生产实际中应用。20世纪以来，随着细胞和分子生物学技术的迅速发展，以及人们对精子、卵子和胚胎认识的不断加深，一些新的控制性别的方法相继出现，其中，具有应用价值的两项技术是“X精子与Y精子的分离技术”和SRY—PCR胚胎性别鉴定技术。

X精子与Y精子的分离技术

我们已经知道哺乳动物的精子中所含的性染色体有X和Y两种，它们各占50%；而卵子的性染色体只有X一种。当含Y的精子（简称Y精子）与卵子结合时，受精卵将发育为雄性；当含X的精子（简称X精子）与卵子结合时，受精卵将发育为雌性。因此，在畜牧业生产中，如果能把X精子和Y精子分开，并分别用X精子或Y精子给母畜输精（或进行体外受精），就会得到已知性别的胚胎或后代。那么，怎样将X精子和Y精子分开呢？

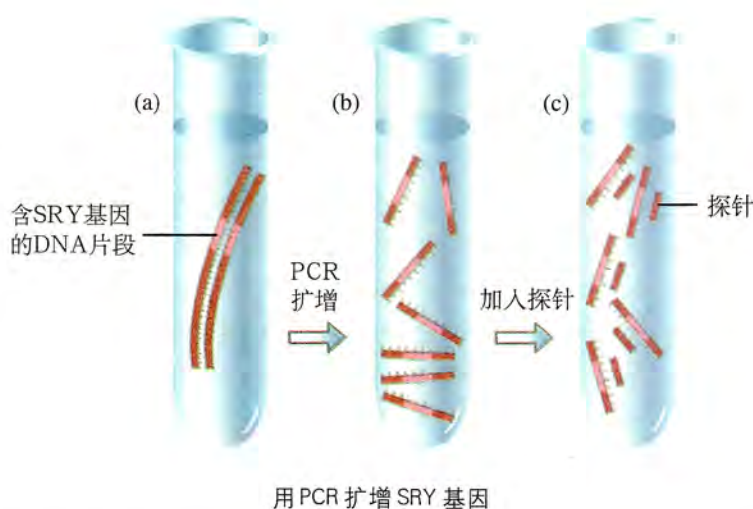
经过大量的研究发现，X精子的DNA含量比Y精子高出4%左右。根据这一差异，科技人员采用一种能够对流动的细胞进行分类检测的仪器，对X精子和Y精子进行分离，其准确率可超过90%。随着分离技术的发展，分离效率也逐步提高。以奶牛的精子分离为例，目前已能够做到每台仪器、每小时可分离X精子和Y精子各1 000万个。如果每天开机20小时，那么，X精子和Y精子的日产量就可以分别达2亿个。用这些分离的精子去做母牛的人工授精或体外受精，可得到理想性别的胚胎或犊牛。

由于采用母牛人工授精，每次输精的最低精子数都在1 000万个以上，因此，目前的分离速度尚显太慢；同时，由于分离的时间较长，也会造成精子在生存和受精能力上有不同程度的降低，因此，进一步改进仪器的分离速度，简化分离程序，已成为目前精子分离

技术在畜牧生产中应用和推广的关键。

SRY—PCR 胚胎的性别鉴定技术

对移植前的胚胎进行性别鉴定，然后移入受体，同样可以控制后代的性别，只不过这种控制是在精子和卵子受精后，胚胎本身已经有了性别的前提下进行的。目前最有应用前景的方法是 SRY—PCR 法。它是利用分子生物学的原理建立起来的一种方法，也是现阶段进行胚胎性别鉴定最准确和最有效的方法。操作的基本程序是：先从被测胚胎中取出几个细胞，提取 DNA，然后用位于 Y 染色体上的性别决定基因，即 SRY 基因的一段碱基作引物，用胚胎细胞中的 DNA 为模板，进行 PCR 扩增，最后用 SRY 特异性探针对扩增产物进行检测。出现阳性反应者，胚胎为雄性；出现阴性反应者，胚胎为雌性。这种方法准确率高达 90% 以上。采用这种方法的优点是：取样少，检测时间短，对胚胎损伤小，在生产上应用方便等，因此，具有很高的应用价值。虽然这种方法目前还存在一些问题，如由于灵敏度高，容易因污染而出现假阳性的结果，但作为一种先进的技术，它为动物性别的人工控制展示了可喜的前景。



进展追踪

通过报纸、杂志、互联网或其他媒体搜集资料，了解胚胎工程的新进展，就自己感兴趣的方面，自定选题，写一篇专题综述报告。

参考选题：1. 体外受精的新技术；
2. 我国畜牧业中胚胎移植的推广情况；
3. 胚胎工程与畜牧业发展；4. 胚胎干细胞研究进展。

专题小结

哺乳动物在自然条件下，配子的发生、受精和早期胚胎的发育规律是胚胎工程的理论基础。体外受精和早期胚胎培养是人们模拟自然情况经反复探索得到的技术方法。

体外受精技术不仅可以为胚胎工程提供实验的原材料，也是胚胎工程关键的技术环节之一。胚胎移植在畜牧生产中已经显示出大幅度提高供体母畜繁殖力的作用，它又是胚胎工程技术的终端环节，即任何

胚胎只有移植给受体才能获得后代。当前，胚胎工程研究的领域不断扩大，内容不断丰富，技术不断改进，效率也在逐步提高。经不同技术操作产生的具有不同遗传特性的胚胎，通过移植产生的后代，将不断向人们提供所需要的目的产品，为人类的生产、生活、医疗、卫生和健康服务。我们期待着更多的胚胎工程技术走出实验室，进入生产应用领域。



书海导航

1. 家畜繁殖学。张忠诚主编，北京：中国农业出版社，2000年（第三版）。
2. 受精生物学。陈大元主编，北京：科学出版社，2000年。
3. 家畜胚胎工程。郭志勤主编，北京：中国科学技术出版社，1998年。