

犬发情鉴定

Identification of Dog Estrus

王晓民^{1,2}, 赖良学^{1,*}

¹中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州, 广东省; ²生命科学学院, 西湖大学, 杭州, 浙江省

*通讯作者邮箱: lai_liangxue@gibh.ac.cn

引用格式: 王晓民, 赖良学. (2022). 犬发情鉴定. *Bio-101* e1010970. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010970.

How to cite: Wang, X. M. and Lan, L. X. (2022). Identification of Dog Estrus. *Bio-101* e1010970. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010970. (in Chinese)

摘要:

母犬在整个发情周期中, 生殖系统及激素水平会发生一系列的变化。通过对这一系列变化的观察和鉴定, 可以掌握母犬所处的发情阶段, 进而判断排卵及卵子成熟的时间。同时结合阴道涂片法、孕激素浓度测定法及公犬试情等方法, 可以准确把握母犬发情排卵时间, 从体内获得成熟的卵母细胞或受精卵用于后续的体细胞克隆或基因编辑实验。

关键词: 孕激素, 发情鉴定, 阴道涂片, 排卵

材料与试剂

1. 姬姆萨染色液 (Solarbio)
2. 孕激素检测试剂盒 (Cayman)
3. 载玻片 (世泰)
4. 棉签 (泰隆宇)
5. 生理盐水 (格美研)

仪器设备

1. 酶标仪 (Thermo)
2. 光学显微镜 (Leica)

实验原理及步骤

阴道涂片法的原理

犬的发情周期分为发情前期、发情期、间情期和乏情期。在发情期期间，阴道细胞组织会发生一系列的变化，根据这些变化可以大致判断母犬所处的发情阶段。发情前期阴道涂片中能够观察到很多固缩的角质化上皮细胞、红细胞、少量白细胞和大量碎屑；发情中期，有很多角质化上皮细胞、红细胞，而无白细胞；排卵后，白细胞占据阴道壁，同时出现退化的上皮细胞。

阴道涂片法的步骤

1. 挑选处于发情期的母犬，以阴门水肿第一天出现滴血为准；
2. 在出现滴血第一天开始阴道涂片，将棉签用生理盐水浸湿，伸入母犬阴道内并转几圈，取出后涂抹在玻片上，每天涂片一次检测；
3. 涂片根据购买试剂盒提供的方法进行染色，并在光学显微镜下观察；
4. 当阴道上皮细胞角质化（细胞形态变形、不规则）程度达到 90%以上时可判断为排卵期。

孕激素浓度测定法的原理

在母犬发情周期中，激素水平会发生一系列的变化。在发情期时，孕激素水平会一直升高，根据这一特点可以通过测定血液中孕激素的水平判断母犬的发情排卵时间。

孕激素浓度测定法的步骤

1. 母犬阴门滴血第一天开始采血；
2. 离心分离血清；
3. 根据试剂盒提供的方法测定血清中孕激素浓度；
4. 当血清中孕激素浓度大于 4.0-7.5 ng/ml 时可判断为发情排卵期。

公犬试情法的原理

发情期的母犬会有一系列的行为学表现，当与公犬接触时，会有行为反应，根据这些反应可以判断母犬的发情阶段。

公犬试情法的步骤

1. 母犬滴血第一天起每天与公犬独处一段时间，观察母犬的行为；
2. 若母犬不允许公犬靠近，不接受公犬爬跨，判断为发情期前期；
3. 若母犬主动靠近公犬，接受公犬爬跨，判断为发情期中期；
4. 母犬接受公犬爬跨第二或第三天可判断为发情排卵期。

结果与分析

1. 判断发情排卵时间最好将阴道涂片、孕激素浓度测定及公犬试情等三种方法结合起来使用，这样可以大大提高判断的准确率；
2. 当三种方法比较一致时，可较好确定发情排卵时间；若三种方法结果不统一时，可放弃挑选的母犬。

失败经验

1. 挑选发情母犬时最好选择三个情期或以上的犬，尽量不要挑选首次发情母犬。首次发情母犬情期不稳定，变化波动较大，可重复性差，较难做出正确的判断。

致谢

1. 感谢十二五国家科技重大专项“实验用 Beagle 犬及疾病模式犬研究开发平台”[2011ZX09307-304]提供的经费支持；
2. 感谢广州生物医药研究总院有限公司提供的实验场地、实验用犬及相关技术支持；
3. 感谢北京希诺谷生物科技有限公司共同参与的技术研究；
4. 研究成果以“Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system ; Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer”分别发表在 Journal of Molecular Cell Biology 和 Journal of Genetics and Genomics 杂志上。

参考文献

1. 胡敏华，周志东，王晓民，龙海斌，倪庆纯，刘运忠. (2015) [实验用 Beagle 犬的繁殖性能分析](#). 广东畜牧兽医科技, 3: 41-44.

2. 张敦伟, 王晓民, 连雪科, 刘运忠, 高翔, 倪庆纯. (2013) [Beagle 犬活体取胎及其成纤维细胞的培养](#). *实验动物与比较医学*, 3: 210-214.
3. Bouchard, G. F., Solorzano, N., Concannon, P. W., Youngquist, R. S., Bierschwal, C. J. (1991) [Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone](#). *Theriogenology* 3: 603-11.
4. Feng, C., Wang, X. M., Shi, H., Yan, Q. M., Zheng, M., Li, J., Zhang, Q. J., Qin, Y. M., Zhong, Y. G., Mi, J. D., Lai, L. X. (2018) [Generation of ApoE deficient dogs via combination of embryo injection of CRISPR/Cas9 with somatic cell nuclear transfer](#). *J Genet Genomics* 45: 47-50.
5. Concannon, P. W. (1986) [Canine pregnancy and parturition](#). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 16: 453-75.
6. Evans, J.M., and Savage, T.J. (1970) [The collection of vaginal smears from bitches](#). *The Veterinary record* 87: 598-599.
7. Jang, G., Kim, M. K., Oh, H. J., Hossein, M. S., Fibrianto, Y. H., Hong, S. G., Park, J. E., Kim, J. J., Kim, H. J., Kang, S. K., Kim, D. Y., Lee, B. C. (2007) [Birth of viable female dogs produced by somatic cell nuclear transfer](#). *Theriogenology* 5: 941-7.
8. Zou, Q. J., Wang, X. M., Liu, Y. Z., Ouyang, Z., Long, H. B., Wei, S., Xin, J. G., Zhao, B. T., Lai, S. S., Shen, J., Ni, Q. C., Yang, H. Q., Zhong, H. L., Li, L., Hu, M. H., Zhang, Q. J., Zhou, Z. D., He, J. X., Yan, Q. M., Fan, N. N., Zhao, Y., Liu, Z. M., Guo, L., Huang, J., Zhang, G. G., Ying, J., Lai, L. X., Gao, X. (2015) [Generation of gene-target dogs using CRISPR/Cas9 system](#). *J Mol Cell Biol* 6: 580-3.