牛体外受精胚胎非手术法移植技术操作规程

1. 前 言

本标准用于指导和规范牛体外胚胎生产及移植的技术操作。

本标准的附录A为规范性附录，附录B为资料性附录。

本标准由辽宁省质量技术监督局提出并归口。

本标准由辽宁省畜牧业发展中心负责起草。

本标准主要起草人：李宁、刘海军、刘全、黄承俊、赵刚、杜学海、李傲楠、张文军、张丽君、周成利、唐学成。

牛体外受精胚胎非手术法移植技术操作规程

* 1. 范围

本标准规定了奶牛和肉牛体外胚胎移植技术的采卵、体外成熟、体外受精、体外培养、胚胎质量鉴定、胚胎冷冻及解冻及非手术法胚胎移植各关键技术环节的操作方法。

本标准适用于奶牛和肉牛体外胚胎生产及非手术法移植技术应用。

* 1. 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注明日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用本标准，然后，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的文件，其最新版本适用于本标准。

GB21/T 1648－2008 牛胚胎移植技术操作规程、DB23/T 1278-2008《奶牛、肉牛体外胚胎生产操作技术规程》

* 1. 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 活体采卵（Ovumpick-up，opu）

借助超声波或内窥镜等观察，直接从活体母畜卵巢上抽取卵母细胞的技术

3.2 卵母细胞的体外成熟（In vitro maturation）

充分生长发育且处于第一次减数分裂前期的双线期（VG期）的卵母细胞，在体外与专门的营养盐类一起培养，使其恢复减数分裂并达到第二次减数分裂中期（MⅡ）的过程。

3.3 体外受精（In vitro fertilization，IVF）

人为地将精子和卵子置于适宜的培养条件下使之完成受精的过程，称为体外受精

3.4 受精卵的体外培养（In vitro culture, IVC）

人为地将受精卵置于适宜的培养条件下使之继续孵化，称为体外培养

3.5 供体（Donor）

提供胚胎或卵母细胞的母畜。

3.6受体（Rebipient）

接受胚胎的母畜。

3.7同期发情 （Estrus synchronization）

利用外源性激素处理，人为地控制或调整母畜发情周期，使处于不同发情周期的母畜在同一时间（2～5d）内发情。

3.8超数排卵 （Superovulation）

在发情周期的一定时间（通常在第8～12d）内，给母牛注射促卵泡素（FSH）或孕马血清（PMSG）等促性腺激素，使卵巢上有更多的卵泡发育成熟并排卵。

3.9冷冻液(Freezing solution)

用于胚胎冷冻的抗冻保护液。

3.10解冻液(Thawing solution)

用于冻胚解冻并复苏的生物制剂。

3.11平衡(Balancing)

在胚胎冷冻过程中，胚胎在同一温度、试剂浓度环境中停留一段时间，使其达到胚胎及其细胞内外的温度、渗透压等一致的过程。

3.12植冰(Ice seeding)

胚胎冷冻过程中，当温度降至冷冻液冰点或以下时（通常为-5℃～-6℃），用浸入液氮冷却后的镊子夹住胚胎所处的上端液柱，使抗冻液瞬间产生冰晶。

3.13程序冷冻法(Programmed freezing)

借助程序控温仪使胚胎以适当的速度缓慢降温而完成冷冻的方法。

3.14 胚胎移植（Embryo Transfer，ET）

 将体内、外生产的哺乳动物早期胚胎移植到同种的生理状态相同的雌性动物生殖道内，使之继续发育成正常个体的生物技术。

4 仪器设备

4.1 二氧化碳培养箱

38.5℃，5%CO2饱和湿度的培养环境

4.2 超净台

使用前打开风机并用75%的医用酒精进行表面灭菌，液体操作时需点燃酒精灯

4.3 水浴锅

液体为蒸馏水，使用温度为37℃

4.4 恒温加热板

使用温度为37℃

5 液体的制备

5.1 常用溶液

生理盐水、采卵液、M199、BO、CR1aa、胚胎冷冻液、胚胎解冻液

5.2 配制液体

按配方称量配制。基础溶液需用超纯水进行溶解，且前一药品溶解后方进行下一药品的称量。配制完成后需调试PH值，然后进行0.22um孔径滤膜除菌，并在无菌环境下装瓶封口备用。配制型溶液或使用液用基础溶液配制完成后需再次进行滤膜除菌。各溶液按要求存放及保存，不得使用变质或过期的溶液。

5.3成品试剂配制

根据要求或试验设计，称量好所有药品后用成品试剂进行一次性溶解，然后用0.22um孔径滤膜除菌备用。不添加任何药品的成品试剂可直接使用。

5.4溶液的使用

生理盐水与采卵液的使用温度为37℃。洗卵液、成熟液、洗精液、受精液和培养液在使用前需于二氧化碳培养箱中预平衡2小时左右，但平衡时间不得过长。

6 卵母细胞的获取

6.1活体采卵

6.1.1供体牛的选择

除了妊娠3~4月以后的、卵巢严重发育不良的、产后卵巢功能尚未恢复的、无法进行直肠把握的牛以外，都可进行活体取卵。

6.1.2采卵频率

一周1次或２次采卵，于采卵前48小时肌注FSH 100或200IU。

6.1.3尾椎硬膜外腔麻醉

于尾椎和荐椎结合处或第一与第二尾椎结合处注射2.5mL5％盐酸利多卡因进行硬膜外腔麻醉

6.1.4 采卵

将带有超声波探头和采卵针（18G或21G的一次性短针头）的采卵器插入到阴道穹隆处，通过直肠把握法，将卵巢贴在探头上，于40mmHg（18G）或120mmHg（21G）负压下，根据B超屏幕上所显示的卵泡位置进行穿刺，吸取卵母细胞。所用吸卵液为洗卵液，见附件A。每采一头牛的卵子，需洗管3次，并将采集好的液体标注好信息，于37℃环境中保存。运回实验室后，每头牛需分开捡卵、洗涤及培养，并全程标注好信息。

6.1.5 供体牛的饲养管理

良好的营养状况是牛卵巢创伤恢复的必要条件，为供体牛提供足够的优质干草、青贮或多汁饲料、精料以及清洁的饮水，保证日粮营养全面、平衡。

6.2 屠宰场卵巢卵母细胞的获取

6.2.1 良种牛卵巢卵母细胞的获取

6.2.1.1 系谱的跟踪

确定良种牛卵巢系谱的可溯性

6.2.1.2 卵巢的摘取

分袋包装，每袋只装一头牛的卵巢，并标注好识别信息。袋中为含青链霉素（0.075g/L）的37℃生理盐水。于保温杯或保温箱中运回实验室。若运输时间长于11小时，则可于4℃或其他低温保存环境中运回实验室。

6.2.1.3 卵母细胞的获取

每头牛的卵巢用不同的10ml注射器进行抽卵，卵子的分拣、洗涤及培养分别单独进行，并标注好信息。

6.2.2 普通牛卵巢卵母细胞的获取

6.2.2.1 卵巢的摘取

将卵巢置于含青链霉素（0.075g/L）的37℃生理盐水中，于保温杯或保温箱中运回实验室。若运输时间长于11小时，则可于4℃或其他低温保存环境中运回实验室。

6.2.2.2 卵母细胞的获取

用10ml注射器进行抽卵，可一次性将所有卵巢卵母细胞抽出，然后集中捡卵、洗涤与培养。也可以每5~6个卵巢捡卵一次，或捡卵洗涤一次，然后进行培养。

7 卵母细胞的体外成熟

7.1 成熟液的预平衡

在取卵前2个小时，制备好成熟盘与洗涤盘（1~2ml成熟液/次），并于二氧化碳培养箱中预平衡。

7.2 卵母细胞的挑选

选择形态正常，胞质均匀，色泽发黑，周围带有致密卵丘细胞的卵丘-卵母细胞复合体，于洗涤液中洗3~5次备用。操作温度为室温。

7.3 卵母细胞的培养

将洗涤好的卵丘-卵母细胞复合体置于预平衡的成熟液中，密度为1枚/2.5ul或50~100枚/1ml。于二氧化碳培养箱中培养20~24小时。操作温度为室温。

8 体外受精

8.1 受精用液的预平衡

在开始进行体外受精处理前2个小时，制备好受精微滴（50ul/滴，石蜡油覆盖）、精子洗涤液（3~6ml受精液）、卵子洗涤液（1~2ml受精液/次）于二氧化碳培养箱中预平衡。

8.2 精子获能

将有信息明细的冻精于37℃水中解冻，检查活力与密度后，将合格解冻的冻精置于精子洗涤液中，以45度倾斜方式于二氧化碳培养箱中孵化1小时。

8.3 卵细胞的处理

将体外成熟20~24小时的卵母细胞置于卵子洗涤液中，洗涤3~5次，过程中用100ul的移液枪稍微去除下卵丘细胞，然后移入受精微滴中，10~20枚/滴。

8.4 受精精液的制备

孵化后的精子，取上1/3~2/3液体于洗涤液中，于2000r/min下离心7分钟，弃去上清液，再用受精液洗一次后，用受精液调试密度为1×106~6×106 个/ml，然后于CO2培养箱中备用。

8.5 体外受精

将制备好的精液用100ul移液枪移入含有成熟卵母细胞的微滴中，50ul/滴，于二氧化碳培养箱中共培养6~8小时。

9 体外培养

9.1培养液的预平衡

在开始进行体外培养处理前2个小时，制备好培养微滴（100ul/滴，石蜡油覆盖）和洗涤液（1~2ml培养液/次）于二氧化碳培养箱中预平衡。

9.2 体外培养

将体外受精6~8小时后的假合子置于洗涤液中洗涤3~5次，过程中用100ul移液枪或吸卵管轻轻吹打假合子，以去除周围残留的卵丘细胞和精子。将洗涤后的假合子移入培养微滴中，10枚/滴。培养6~10天，中途可换液一次，也可不换，期间将未受精卵及发育停止的胚胎移除微滴。发育到桑囊胚阶段的胚胎，经质量鉴定后，可进行鲜胚移植或冷冻保存。

10 胚胎质量鉴定

10.1胚胎发育阶段

表1给出了不同发育阶段胚胎的特征：

1. 不同发育阶段胚胎的特征

|  |  |
| --- | --- |
| 发育阶段 | 特 征 |
| 桑椹胚（M，Morula） | 受精卵分裂到32个细胞以上，卵裂球隐约可见，内细胞团几乎占满整个卵周间隙。 |
| 致密桑椹胚(CM,Compacted Morula) | 卵裂球进一步分裂变小，看不清卵裂球之间的界限，卵裂球结合成团，内细胞团体积变小，约占卵周间隙的60%～70%。 |
| 早期囊胚(EB, Early Blastocyst) | 细胞团内刚刚形成一个内含液体的透明囊腔，内细胞与滋养层细胞难以分清，细胞团占卵周隙的70%～80%。 |
| 囊胚(BL, Blastocyst) | 囊胚腔扩大，滋养层细胞和内细胞团分化明显，细胞团充满整个卵周隙。 |
| 扩张囊胚(EXB,Expanded Blastocyst) | 囊胚腔充分扩张，胚胎体积增大至1.2～1.5倍，透明带明显变薄。 |

10.2可用胚胎的判定

在80～100倍的实体显微镜下对胚胎进行形态学观察，凡形状呈圆球形或接近圆球形，卵裂球大小一致、胞质均匀、连接紧密，内细胞团外部轮廓清晰、规则，含液泡、胞质浓缩呈颗粒状的退化细胞数

量少，卵周隙内没有或有少量外溢的退化细胞，明暗适中，发育阶段与胚龄相符的胚胎为可用胚胎。

10.3等级评定

可用胚胎分为A、B、C三级，A级和B级胚胎可以直接移植，也可以冷冻，而C级胚胎只能直接移植。表2给出了胚胎等级评定标准。

1. 胚胎等级评定标准

|  |  |
| --- | --- |
| 胚胎级别 | 评 定 标 准 |
| A级 | 胚胎形态完整、规则，内细胞团紧凑成球形、轮廓清晰，分裂球大小均匀、界线明显、连接紧密，胚胎色调和明暗适中，没有或只有10%以下的游离细胞。 |
| B级 | 内细胞团轮廓清晰，卵裂球胞质均匀，色调适中，透明带有少许变形，有少许细胞突出，变性细胞和游离细胞的比例不超过30%。 |
| C级 | 内细胞团结构较松散，轮廓不清晰，色调发暗，已退化或游离细胞占30%～50%。 |

11胚胎冷冻

11.1 洗胚

将胚胎依次在保存液液滴中转移。洗胚时须注意如下几点：

a) 来自不同供体的胚胎，不能同时洗涤。

b) 清洗不同供体胚胎更换吸头。

c) 每枚胚胎至少洗涤10次。

11.2平衡

胚胎在冷冻液中平衡10～20min。

11.3胚胎装管

11.3.1记录。在胚胎专用细管塞或标签纸上依次注明细管号、生产单位、品种、供体母牛号、公牛号、

胚胎数、胚龄、胚胎质量和生产日期。

11.3.2装管。用1ml的注射器将胚胎和冷冻液一同吸入细管中。使用乙二醇和甘油两种冷冻剂分别采用如下装管方法：

a) 乙二醇冷冻剂的胚胎装管时，按含蔗糖的解冻液、乙二醇抗冻液、乙二醇抗冻液和胚胎、乙二醇抗冻液、含蔗糖的解冻液的先后顺序吸入液柱，每两个液柱之间由少量的空气相隔。

b) 甘油抗冻剂的胚胎装管时，按甘油抗冻液、甘油抗冻液和胚胎、甘油抗冻液的先后顺序吸入液柱，每两个液柱之间由少量的空气相隔。

11.4冷冻

胚胎冷冻应采用程序冷冻法。其降温及操作程序为：冷冻仪温度达到-5～-6℃时，将胚胎细管插入冷冻仪细管架内依次完成以下操作：平衡5～10min，植冰，平衡5～10min，以每分钟降低0.3～0.5℃的速度降温至-30～-35℃、平衡5～10min。将冷冻后的胚胎放入液氮中长期保存。

12 胚胎解冻

将胚胎从液氮中取出，在空气中垂直停留8～10s（空气浴）后，快速插入32～35℃的温水中，直至细管中的冰晶完全溶解。乙二醇和甘油为保护剂的冷冻胚胎溶解后分别采用不同的处理方法：

a) 乙二醇保护剂冷冻胚胎直接装枪移植。

b) 甘油保护剂冷冻胚，在实体显微镜下将胚胎从细管中推出，用移胚器移入胚胎解冻液中，平衡4～5分钟，在保存液中清洗5～6次装管后，再装枪移植。

13 非手术法移植胚胎

13.1受体牛的选择

13.1.1 良种牛胚胎受体牛的选择

13.1.1.1年龄在3～8岁、健康、无疾病、体格较大、膘情好。

13.1.1.2繁殖性能正常，产后60d以上，并有两次以上的自然发情记录。

13.1.1.3泌乳性能好，无难产史。两次人工授精未孕的牛不宜使用。

13.1.2 商品用胚胎受体牛的选择

13.1.2.1 未进行过人工授精的受体牛的选择

13.1.2.1.1 达到体成熟、健康、无疾病

13.1.2.1.2 繁殖性能正常、卵巢机能正常

13.1.2.2 进行过人工授精的受体牛的选择

正常人工授精后6~7天的母牛

13.2受体牛的饲养管理

13.2.1做到精心管理，合理饲养，环境清洁。

13.2.2牛群规模适量。

13.2.3长期舍饲的母牛要加强运动。

13.2.3防止在移植前后因饲料及环境改变造成应激反应。

13.3受体牛同期发情

13.3.1受体牛同期发情已采用如下两种方法：

a) 一次PGF2a诱导发情。一般在供体牛注射PGF2a前一天，给处于情期8～15d直检黄体好的受体牛一次肌注PGF2a 4ml诱导发情。

1. 1：此种处理受体牛实现同期发情的方法主要应用于鲜胚移植，受体牛处理日程安排应与供体牛超排处理相吻合。

b) 两次PGF2a处理。在不考虑发情周期的情况下，可间隔11d，前后两次肌注PGF2a 。

1. 2：此种处理受体牛实现同期发情的方法主要应用于冷冻胚胎的移植。

13.3.2发情观察。根据母牛接受爬跨确认发情，至少早、晚各观察30min发情情况。

13.3.3对发情牛做直检以确认卵泡，次日上午或晚上确定是否排卵。若在发情后36h以后排卵不能用作受体。

13.3.4将致密桑棋胚移植给发情6d的受体牛，将早期囊胚移植给发情7d的受体牛，将囊胚胎和扩大囊胚移植给发情8d的受体牛。

13.4移植前受体牛的检查

移植前要对发情牛或发情处理的牛进行黄体直检，要求其直径在11～15mm以上，手感弹性好，质地软而充实。且牛只健康状况良好，无繁殖疾病发生。

对人工授精的牛进行授精记录核对，确保移植当天处于人工授精后6~7天阶段。且牛只健康状况良好，无繁殖疾病发生。

13.5受体牛的保定与消毒

将受体牛保定，清除粪便，肌注2%静松灵1ml或用2%的普鲁卡因3ml在l、2尾椎间硬膜外麻醉。

13.6非手术法移植

运用胚胎移植枪进行移植。术者用左手扒开外阴，右手将装好胚胎的移植器插入阴道。然后左手伸进直肠，移植器到达子宫颈口时，右手用力将移植枪捅破软外套，插入子宫颈。左手在直肠内诱导使枪头插入黄体侧子宫角至大弯处，持移植枪的右手推出胚胎，缓慢旋转地抽出移植枪。

双胚移植时，两枚胚胎可以同时移植在黄体侧或黄体对侧，也可以分别移植在子宫角两侧，但必须保证有一枚胚胎移植在子宫角的深处（小弯）。

对人工授精后6~7天的牛进行胚胎移植时，将胚胎移植在黄体对侧的子宫角深处（小弯）。

14妊娠诊断

妊娠诊断采用如下两种方法：

a) 直肠检查法

通常在移植后3个月开始检查。妊娠90d左右时，直检可感觉到胎儿的浮动，孕角出现孕脉，子宫壁可触到子叶。

b) 超声波诊断（B超）

对妊娠25d以上的受体牛可用B超检查。利用探头通过直肠轻轻地在子宫角滑动，在荧光屏上便可观察到周围黑色中间有一个长 1～2mm灰白色图像，即是胎儿。胎儿60日龄时为6～7cm长，90日龄时为14～17cm长。使用B超探头检查时要特别注意，防止动作过重，引起流产。

1. （规范性附录）
试剂的配制
2. 1采卵液与成熟液配方

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 类别 | 成分 | 含量 |
| 基础液液 | M199 | —— |
| NaHCO3 | 2.200g/L |
| Pyruvic acid | 0.110g/L |
| 青霉素 | 0.076g/L |
| 链霉素 | 0.050g/L |
| 采卵液 | 基础液 | —— |
| FBS | 5% |
| 肝素钠 | 30ug/mL |
| Hepes | 4.766g/L |
| 成熟液 | 基础液 | —— |
| FSH | 10ug/mL |
| LH  | 20ug/mL |
| E2 | 1ug/mL |
| FBS | 10% |

注：液体4℃保存；E2不需过滤；基础液保存时间不超过1个月；采卵液保存时间不超过2个星期；成熟液保存时间不超过1个星期。

表2 BO受精液与洗精液配方

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 类别 | 成分 | 含量 |
| 基础液 | NaCl | 6.550g/L |
| KCl | 0.300g/L |
| CaCl2·2H2O | 0.330g/L |
| NaH2PO4·H2O | 0.113g/L |
| MgCl2·6H2O | 0.106g/L |
| NaHCO3 | 3.104g/L |
| Glucose | 2.500g/L |
| Pyruvic acid | 0.137g/L |
| 青霉素 | 0.076g/L |
| 链霉素 | 0.050g/L |
| Phenol | 100ul |
| 精子洗涤液 | 基础液 | —— |
| 不去脂BSA | 3‰ |
| 受精液 | 基础液 | —— |
| 肝素钠 | 20ug/mL |
| 去脂BSA | 6‰ |

注：液体4℃保存；基础液保存时间不超过1个月；洗涤液与受精液保存时间不超过1个星期；基础液PH=7.8。

表3 CR1aa配方

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 类别 | 成分 | 含量 |
| 基础液 | NaCl | 6.700g/L |
| KCl | 0.230g/L |
| NaHCO3 | 2.200g/L |
| L-乳酸半钙 | 0.550g/L |
| Pyruvic acid | 0.020g/L |
| 青霉素 | 0.076g/L |
| 链霉素 | 0.050g/L |
| Phenol | 100ul |
| 培养液 | 基础液 | —— |
| 去脂BSA | 3.000mg/mL |
| 必需氨基酸 | 2% |
| 非必需氨基酸 | 1% |
| L-谷氨酰胺 | 0.150mg/mL |

注：液体4℃保存；基础液保存时间不超过1个月；培养液保存时间不超过2个星期；基础液PH：7.4

（资料性附录）
记录表

1. 1胚胎冷冻及解冻记录

供体号： 品种： 操作者： 冲卵结束时间： 冷冻时间： 防冻剂： 冷冻方法：

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序号 | 发育阶段 | 级 别 | 特征简图 | Cane号 码 | 简 号 | 解冻温度 | 脱甘油方 式 | 解冻后形 态 | 培养情况 | 用 途 | 备 注 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

1. 2受体牛移植记录

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 序 号 | 畜 主 | 受体牛特 征 | 同期发情 | 发情日期 | 排卵日期 | 黄体发育 | 移植时间 | 胚胎等级 | 妊检 | 术者 | 移植地点 | 备注 |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |