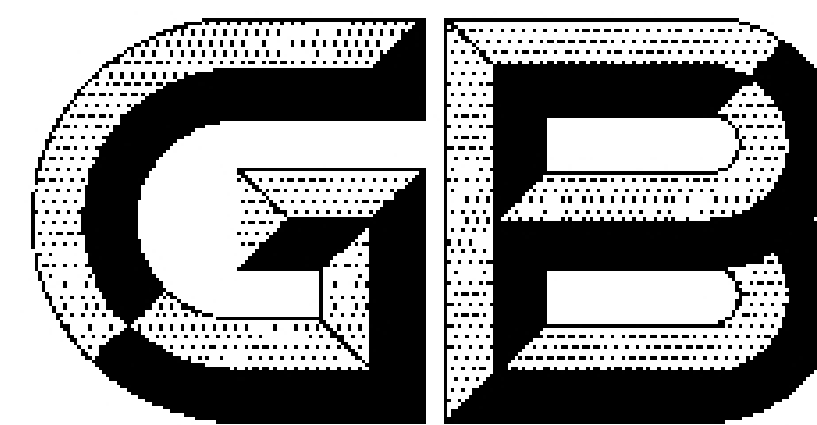




中华人民共和国国家标准

GB/T 26938—2023

代替 GB/T 26938—2011

牛体内胚胎生产与移植技术规程

Code of practice for *in vivo* embryo production and transfer in cattle

2023-05-23 发布

2023-12-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 GB/T 26938—2011《牛胚胎生产规程》，与 GB/T 26938—2011 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了术语“受体”(见 3.1.2)；
- 增加了缩略语(见 3.2)；
- 增加了技术流程(见第 4 章)；
- 更改了供体的选择(见 5.1, 2011 年版的 4.1)；
- 更改了供体的饲养管理(见 5.2, 2011 年版的 4.2)；
- 更改了供体的同期发情处理(见 6.1.1, 2011 年版的 5.1.1)；
- 更改了超数排卵方法(见 6.1.2, 2011 年版 5.1.2)；
- 更改了供体发情鉴定(见 6.1.3, 2011 年版 5.1.4)；
- 将配种更改为人工授精(见 6.2, 2011 年版的 5.2)；
- 增加了现场条件(见 7.1)；
- 更改了非手术法胚胎采集(见 7.2, 2011 年版的 6.1)；
- 更改了胚胎的检出和胚胎质量鉴定(见 7.3、7.4, 2011 年版的 6.2)；
- 增加了胚胎洗涤(见 7.5)；
- 更改了胚胎的冷冻与保存,增加了胚胎的解冻(见第 8 章, 2011 年版的第 7 章)；
- 增加了胚胎移植和妊娠检查(见第 9 章)；
- 增加了证实方法(见第 10 章)；
- 更改了非手术法胚胎采集所需主要器械(见附录 A 中 A.4, 2011 年版的附录 A 中 A.3)。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、北京首农畜牧发展有限公司奶牛中心、山东奥克斯畜牧种业有限公司、内蒙古赛科星家畜种业与繁育生物技术研究有限公司、全国畜牧总站、石家庄天泉良种奶牛有限公司。

本文件主要起草人：朱化彬、赵善江、李竞前、高运东、麻柱、李喜和、李树静、王彦平、孙伟、余文莉、段龙飞、张建聪。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2011 年首次发布为 GB/T 26938—2011；
- 本次为第一次修订。

牛体内胚胎生产与移植技术规程

1 范围

本文件确立了牛体内胚胎生产和移植技术流程,规定了供体的选择与饲养管理、供体的超数排卵与人工授精、非手术法胚胎采集与胚胎质量鉴定、胚胎的冷冻保存与解冻、胚胎的移植与妊娠检查技术操作要求,描述了证实方法。

本文件适用于普通牛体内胚胎生产和移植技术操作。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

- GB 4143 牛冷冻精液
- GB/T 5458 液氮生物容器
- GB/T 25881 牛胚胎
- GB/T 31582 牛性控冷冻精液
- NY/T 1335 牛人工授精技术规程

3 术语、定义和缩略语

3.1 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1.1

供体 donor

用于生产胚胎的母牛。

3.1.2

受体 recipient

用于移植胚胎的母牛。

3.2 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

- CIDR:阴道孕酮缓释栓(controlled internal drug releasing)
- FSH:促卵泡素(follicle-stimulating hormone)
- PGF_{2α}:前列腺素(Prostaglandin F_{2α})

4 技术流程

牛体内胚胎生产和移植技术包括供体的选择与饲养管理、供体超数排卵与人工授精、非手术法胚胎

采集与胚胎质量鉴定、胚胎的冷冻保存与解冻、胚胎的移植和妊娠检查。牛体内胚胎生产与移植技术流程见图 1。

牛体内胚胎生产与移植技术操作流程应保留各环节的记录表、照片和影像等。

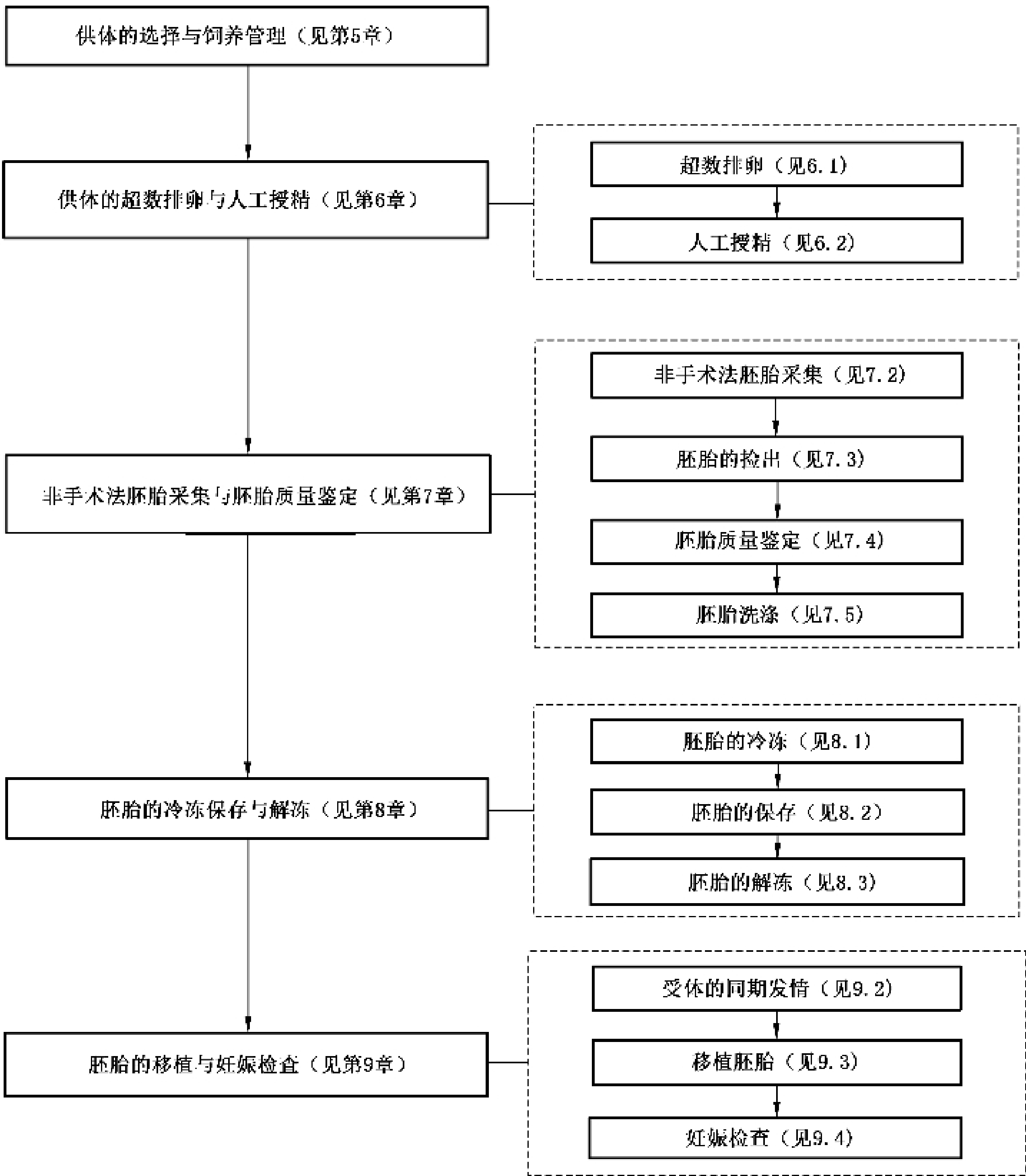


图 1 牛体内胚胎生产与移植技术流程图

5 供体的选择与饲养管理

5.1 供体的选择

供体应满足以下条件：

- a) 品种优良，符合品种特征，生产性能优秀；
- b) 遗传性能稳定，三代系谱完整；
- c) 有 2 次及以上正常发情周期；
- d) 体质健康，生殖器官和繁殖机能正常，无遗传缺陷和传染性疾病。

5.2 供体的饲养管理

供体的饲养管理应满足以下条件：

- a) 饲养密度适宜,饲养环境卫生,温湿度适宜；
- b) 超数排卵前 3 周~5 周应加强饲养管理,可适量补充维生素 A、维生素 D、维生素 E 和微量元素,剂量参见产品说明；
- c) 饮水清洁卫生；
- d) 超数排卵前 4 周,避免注射疫苗；
- e) 超数排卵前 2 周,避免调圈、运输等,以免引起应激。

6 供体的超数排卵与人工授精

6.1 超数排卵

6.1.1 供体的同期发情处理

6.1.1.1 试剂

所用试剂应符合附录 A 的相关规定。

6.1.1.2 同期发情方法

同期发情处理可选用下列方法之一。

- a) 肌肉注射前列腺素法:在发情周期的任意一天注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$,注射后 24 h~96 h 观察发情,以开始站立接受爬跨的时间为发情开始时间。未发情供体可间隔 11 d~14 d 第二次注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$,注射后 24 h~96 h 观察发情。
- b) 阴道埋植孕酮缓释栓法:在发情周期的任意一天阴道埋置 CIDR。

6.1.2 超数排卵方法

超数排卵可选择下列方法之一。

- a) 自然发情或 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法发情的供体,宜在第 9 天~第 13 天中(发情当天为第 0 天)的任意一天开始,肌肉注射 FSH,每天早、晚各 1 次,间隔 12 h,连续 4 d,剂量递减。方法参见附录 B。
- b) 埋植 CIDR 的供体,宜在第 5 天(埋植当天为第 0 天)开始肌肉注射 FSH,每天早、晚各 1 次,间隔 12 h,连续 4 d,剂量递减。方法见附录 B。

6.1.3 供体发情鉴定

按照 NY/T 1335 的规定执行。

6.1.4 重复超数排卵

供体可重复超数排卵,2 次超排间隔时间宜大于 45 d。方法按照 6.1.2 的规定执行。

6.2 人工授精

6.2.1 种公牛的要求

三代系谱完整,检疫合格,遗传性能稳定,生产性能优秀。

6.2.2 人工授精所需器材

人工授精所需器材应符合附录 A 的相关规定。

6.2.3 精液质量的要求

6.2.3.1 常规冷冻精液质量按照 GB 4143 的规定执行。

6.2.3.2 性控冷冻精液质量按照 GB/T 31582 的规定执行。

6.2.4 输精时间与输精剂量

发情开始后 10 h~12 h 第 1 次输精,输精量宜为 2 剂精液。间隔 12 h 第 2 次输精,输精量宜为 1 剂精液。2 次输精后还有发情征状的,宜在第 2 次输精后 6 h~8 h 再输精 1 次,输精量宜为 1 剂精液。

6.2.5 输精部位

第 1 次输精宜每个子宫角输入 1 剂精液,第 2 次、第 3 次输精宜将精液输到子宫体。

6.2.6 输精操作

按照 NY/T 1335 的规定执行。超数排卵与人工授精后,应填写超数排卵与人工授精记录表,见附录 C 中表 C.1。

7 非手术法胚胎采集与胚胎质量鉴定

7.1 现场条件

7.1.1 应具有相对分开的采胚室、捡胚与胚胎冷冻室以及胚胎贮存室等 3 个操作室。

7.1.2 采胚室面积应不小于 20 m²,两侧应留有安全通道,并配备牛保定架、上下水等设备、设施。

7.1.3 捡胚与胚胎冷冻室面积应不小于 15 m²,并配备温度控制和紫外消毒设备,温度应为 18℃~25℃。宜与采胚室相邻并设置传递窗。

7.1.4 胚胎贮存室面积应不小于 15 m²,并配备温度控制和紫外消毒设备。

7.2 非手术法胚胎采集

7.2.1 非手术法胚胎采集器材

器材应符合附录 A 的相关规定。

7.2.2 冲胚液与保存液

见附录 D。

7.2.3 胚胎采集时间

供体超数排卵发情后 7 d±0.5 d(发情当天为 0 d)。

7.2.4 胚胎采集步骤

7.2.4.1 将供体固定在采胚室的保定架内,清理直肠宿粪,直肠触诊或 B 超检查两侧卵巢黄体数。

7.2.4.2 施行荐尾椎硬膜外麻醉,麻醉剂可选用 2%利多卡因。麻醉后将牛尾向前固定于其身体一侧。

7.2.4.3 宜用 0.1%高锰酸钾清洗会阴部及外阴,卫生纸擦拭外阴,75%酒精消毒外阴后用生理盐水

冲洗。

7.2.4.4 用黏液吸除棒插入子宫颈吸除黏液。

7.2.4.5 必要时可用扩宫棒扩张子宫颈。

7.2.4.6 将冲胚管(含有钢芯)缓慢通过子宫颈插入一侧子宫角,当冲胚管前端到达子宫角弯曲处时,拔出钢芯 3 cm~5 cm,并将冲胚管往子宫角前端推送,至冲胚管前端到达子宫角前端 1/3~1/2 处。

7.2.4.7 用 20 mL 注射器先向冲胚管气囊充空气 5 mL~8 mL,确定气囊位置合适后,再充适量空气固定冲胚管。

7.2.4.8 抽出冲胚管钢芯。

7.2.4.9 可选择如下三通管法或注射器法回收冲胚液。

a) 三通管法回收冲胚液步骤如下:

- 1) 三通管一端连接冲胚管,输入管连接注射器,输出管连接集卵杯;
- 2) 夹住输出管,用 50 mL 注射器吸取 30 mL~40 mL 冲胚液注入子宫角;
- 3) 夹住输入管,松开输出管,使子宫角内的冲胚液回流到集卵杯内;
- 4) 反复冲洗子宫角 4 次~5 次。冲胚液适宜用量为 150 mL~200 mL。

b) 注射器法回收冲胚液步骤如下:

- 1) 用 50 mL 注射器吸取 30 mL~40 mL 冲胚液;
- 2) 通过冲胚管向子宫角注入冲胚液,然后回收到注射器内;
- 3) 反复冲洗子宫角 4 次~5 次。冲胚液适宜用量为 150 mL~200 mL;
- 4) 捡胚室内将注射器内回收的冲胚液注射到集卵杯内。

7.2.4.10 一侧子宫角采集完毕后,采集另一侧子宫角内的胚胎,方法按照 7.2.4.6~7.2.4.9 的规定执行。

7.2.4.11 两侧子宫角采集完毕后,可向子宫内灌注适量青霉素和链霉素,亦可向子宫内灌注或肌肉注射土霉素(针剂)。肌肉注射适量前列腺素。

7.3 胚胎的捡出

7.3.1 冲胚液过滤

回收的冲胚液过滤可选用下列方法之一:

- a) 侧漏式集卵杯过滤;
- b) 底漏式集卵杯过滤。

7.3.2 胚胎捡出

捡出胚胎可选用下列方法之一。

- a) 侧漏式集卵杯过滤的,可保留 10 mL~20 mL 冲胚液,体视显微镜下依次寻找并捡出胚胎。捡出的胚胎应移入培养皿的保存液中,一头供体的胚胎应放在一个培养皿内。
- b) 底漏式集卵杯过滤的,可将保留的 10 mL 左右冲胚液移入培养皿中,体视显微镜下依次寻找并捡出胚胎。捡出的胚胎应移入培养皿的保存液中,一头供体的胚胎应放在一个培养皿内。

7.4 胚胎质量鉴定

7.4.1 胚胎发育阶段鉴定

按照 GB/T 25881 的规定执行。

7.4.2 胚胎质量分级

按照 GB/T 25881 的规定执行。

7.5 胚胎洗涤

7.5.1 保存液洗涤

胚胎应用保存液依次洗涤 10 次。洗涤时,每次液滴体积应大于 200 μL ,每次应更换新的胚胎吸管,每次洗涤胚胎数量应不超过 10 枚。

7.5.2 胰蛋白酶液洗涤

7.5.2.1 胚胎应用 0.25% 胰蛋白酶液依次洗涤 2 次。洗涤时,每次液滴体积应大于 200 μL ,每次应更换新的胚胎吸管,每次洗涤胚胎数量应不超过 10 枚,每次在液滴中停留时间 30 s~40 s。

7.5.2.2 0.25% 胰蛋白酶液洗涤后的胚胎应再按 7.5.1 的方法洗涤 5 次。0.25% 胰蛋白酶液的配制见附录 D。

7.5.2.3 胚胎洗涤后应填写非手术法胚胎采集记录表,见表 C.1。

8 胚胎的冷冻保存与解冻

8.1 胚胎的冷冻

8.1.1 胚胎冷冻器材

应符合附录 A 的相关规定。

8.1.2 胚胎冷冻液

见附录 D。

8.1.3 胚胎冷冻方法

常规程序冷冻方法。

8.1.4 胚胎要求

胚胎发育阶段应为桑葚胚、囊胚或扩张囊胚。胚胎质量应为 A 级或 B 级。

8.1.5 胚胎冷冻操作步骤

8.1.5.1 胚胎的洗涤

胚胎冷冻前洗涤方法见 7.5。

8.1.5.2 胚胎的平衡

胚胎宜按照下列过程平衡:

- a) 在 0.75 mol/L 乙二醇的溶液中平衡 3 min~5 min;
- b) 在 1.5 mol/L 乙二醇的冷冻液中平衡 3 min~5 min。

8.1.5.3 胚胎的装管

将平衡后的胚胎装入 0.25 mL 细管,每支细管装 1 枚胚胎。装管顺序为:棉塞(约 2 cm)—冷冻液

(约 2 cm)—气泡(约 0.5 cm)—冷冻液(约 2 cm)—气泡(约 0.5 cm)—含胚胎的冷冻液(约 2.5 cm)—气泡(约 0.5 cm)—冷冻液(约 2 cm)—气泡(约 0.5 cm)—冷冻液(约 1 cm)—细管塞,见图 2。

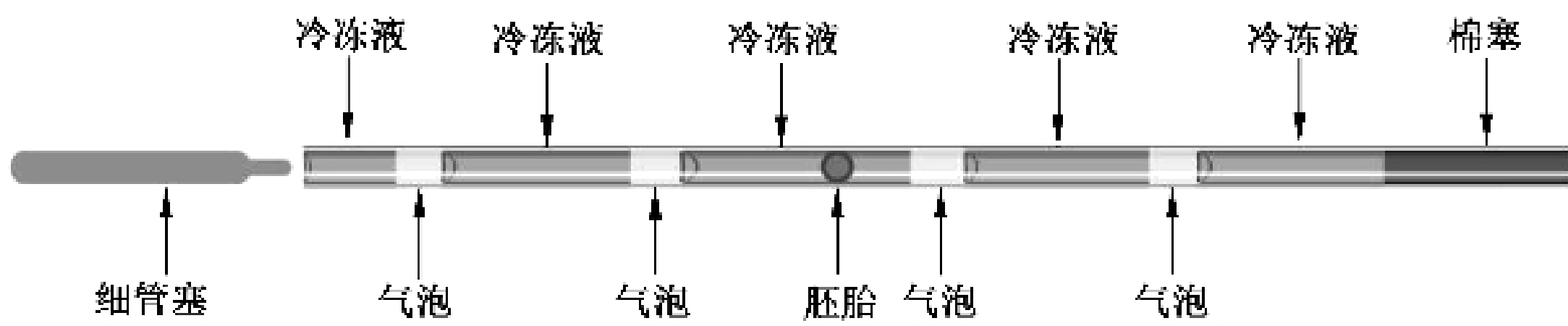


图 2 胚胎冷冻装细管方法

8.1.5.4 胚胎细管标识

冷冻胚胎细管应标识细管号、移植方式、胚胎质量、胚胎发育阶段、供体品种、供体号、公牛品种、公牛号、冷冻日期等内容,示例见附录 E。

8.1.5.5 胚胎冷冻步骤

胚胎冷冻操作步骤如下:

- a) 将胚胎冷冻仪预先冷却至 $-5.5\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-7.0\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) 将装有胚胎的细管插入冷冻槽内平衡 5 min;
- c) 植冰;
- d) 植冰后平衡 5 min;
- e) $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}\sim 0.6\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降温至 $-32\text{ }^{\circ}\text{C}\sim-35\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- f) 平衡 10 min 后投入液氮。

8.2 胚胎的保存

- 8.2.1 冷冻胚胎细管应保存在液氮中。
- 8.2.2 存放冷冻胚胎细管的液氮罐应符合 GB/T 5458 的规定。
- 8.2.3 冷冻胚胎细管宜保存在指形管内,指形管应标注细管号、冷冻日期、供体号、公牛号、细管数量和生产单位,示例见附录 E。指形管宜固定在铝架上,铝架上端应标注供体号和生产日期,示例见附录 E。
- 8.2.4 填写胚胎冷冻与保存记录表,见表 C.2。

8.3 胚胎的解冻

8.3.1 胚胎解冻操作步骤如下:

- a) 从液氮罐中取出冷冻胚胎细管;
- b) 在空气中(温度宜为 $18\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)停留 5 s~7 s;
- c) 投入 $27\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴中解冻 30 s~45 s;
- d) 从水浴中取出胚胎细管,用灭菌卫生纸擦除细管外水分,去除细管塞。

8.3.2 若解冻的胚胎需要推出细管,则应将胚胎细管中的冷冻液及胚胎推出到培养皿中,体视显微镜下将胚胎移入保存液停留 3 min~5 min,然后用保存液洗涤 3 次。

8.3.3 若解冻的胚胎直接移植,则应将胚胎细管装入胚胎移植枪。

9 胚胎的移植与妊娠检查

9.1 受体的选择与饲养管理

9.1.1 受体的选择

受体应满足以下条件:

- a) 青年牛或经产牛；
- b) 有 2 次及以上正常发情周期；
- c) 体质健康，生殖器官和繁殖机能正常；
- d) 膘情适中，体型相对较大。

9.1.2 受体饲养管理

受体饲养管理应满足以下条件：

- a) 受体应编号并相对集中饲养；
- b) 胚胎移植前 4 周应加强饲养管理，宜补充维生素 A、维生素 D、维生素 E，剂量参照产品说明；
- c) 胚胎移植前、后 4 周内避免注射疫苗。

9.2 受体的同期发情

9.2.1 试剂选择

应符合附录 A 的相关规定。

9.2.2 受体同期发情处理

9.2.2.1 同期发情方法

肌肉注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法或阴道埋植孕酮缓释栓法。

9.2.2.2 肌肉注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法

肌肉注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ 法可选择如下 1 次注射法或 2 次注射法。

- a) 1 次注射法：在发情周期任意一天注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ，注射后 24 h~96 h 观察发情。
- b) 2 次注射法：在发情周期任意一天注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ，间隔 11 d~14 d 第二次注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ，注射后 24 h~96 h 观察发情。

9.2.2.3 阴道埋植孕酮缓释栓法

在发情周期任意一天阴道埋置 CIDR(埋植当天为 0 天)，第 7 天早、晚两次注射 $\text{PGF}_{2\alpha}$ ，第 7 天晚上或第 8 天早上撤除 CIDR，12 h~48 h 内观察发情。

9.2.3 发情鉴定

按照 NY/T 1335 的规定执行。

9.3 移植胚胎

9.3.1 试剂和设备的选择

应符合附录 A 的相关规定。

9.3.2 移植方法

采用非手术法移植。

9.3.3 移植时间

在发情周期第 6 天~第 7 天(发情当天为 0 天)。

9.3.4 黄体

受体卵巢上应有发育正常的周期黄体。

9.3.5 移植过程

胚胎移植步骤：

- a) 移植的胚胎可为新鲜胚胎或冷冻-解冻的胚胎；
- b) 受体可保定在采食通道颈夹或保定架内，荐尾椎硬膜外麻醉，外阴擦拭消毒；
- c) 将胚胎细管装入移植枪，在移植枪外套上硬外套，再套上塑料软外套；
- d) 移植枪经阴道到达子宫颈外口时捅破塑料软外套，移植枪通过子宫颈到达黄体侧子宫角前1/3端时推出胚胎；
- e) 退出移植枪；
- f) 填写受体胚胎移植记录表，见表 C.3。

9.4 妊娠检查

9.4.1 检查次数

胚胎移植未返情的受体应 2 次妊娠检查。

9.4.2 检查时间

第一次妊娠检查时间为移植后的第 25 天～第 28 天，第二次妊娠检查时间为移植后的第 50 天。

9.4.3 检查方法

第一次妊娠检查宜用 B 超检查法，第二次妊娠检查可用直肠触诊法或 B 超检查法。

10 证实方法

查验环节的记录表、照片、影像以及记录等，包括：

- a) 超数排卵、人工授精和胚胎采集记录表；
- b) 胚胎质量鉴定与分级的记录及照片；
- c) 胚胎冷冻与保存记录表；
- d) 受体胚胎移植记录表；
- e) 妊娠检查的记录以及供体和受体的饲养管理记录等。

附 录 A
(规范性)
主要设备、器械与试剂

A.1 同期发情、超数排卵与人工授精所需主要试剂

FSH、PGF_{2α}、CIDR 等。

A.2 同期发情、超数排卵与人工授精所需主要器械

CIDR 埋置枪、解冻杯、温度计、细管剪、剪毛剪、镊子、输精枪、输精枪外套、输精枪保温套和注射器等。

A.3 非手术法胚胎采集所需主要试剂

75%酒精、0.1%高锰酸钾、2%利多卡因、兽用青霉素和链霉素、兽用土霉素(针剂)和前列腺素等。

A.4 非手术法胚胎采集所需主要器械

冲胚管(15[#]、16[#]、18[#])、冲胚管钢芯、子宫颈扩张棒、黏液吸除棒、注射器、集卵杯(侧漏式或底漏式)、保温运输箱、蜡笔、剪毛剪、高压灭菌锅和针头等。

A.5 捡胚与胚胎冷冻所需主要操作液

保存液和冷冻液。

A.6 捡胚与胚胎冷冻所需主要设备

体视显微镜、胚胎冷冻仪、液氮罐、0.25 mL 胚胎细管、细管塞、装管器、玻璃针(或胚胎吸头)、培养皿(ϕ 35 mm、 ϕ 90 mm)、加热台、0.22 μ m 针头式滤器和记号笔等。

A.7 胚胎移植和妊娠检查所需主要试剂

润滑液、75%酒精和麻醉药品(2%利多卡因)等。

A.8 胚胎移植和妊娠检查所需主要设备

解冻杯、液氮罐、胚胎移植枪、长臂手套、硬外套管、塑料软外套和兽用 B 超等。

附录 B
(资料性)

FSH 4 d 注射时间、剂量

- B.1 供体注射 FSH 采用 4 d 8 次剂量递减方法,每次注射时间间隔 12 h。
B.2 超排第 3 天注射 FSH,同时注射 PGF_{2α}。
B.3 埋置 CIDR 同期发情的供体在第 6 次或第 7 次注射 FSH 时撤出 CIDR。
B.4 供体注射 FSH 的时间和剂量示例,见表 B.1。

表 B.1 FSH 4 d 注射时间、剂量

处理天数	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
早 7:00~8:00	FSH 2.8 mL	FSH 2.3 mL	FSH 1.8 mL+ PGF _{2α}	FSH 1.3 mL 撤 CIDR	发 情 AI	AI
晚 19:00~20:00	FSH 2.8 mL	FSH 2.3 mL	FSH 1.8 mL+PGF _{2α} 撤 CIDR	FSH 1.3 mL		AI
注 1: 以 FSH 总剂量 328 mg、应用于中国荷斯坦成年牛为例:$(2.8+2.3+1.8+1.3) \times 2 \times 20=328$ mg。 注 2: FSH(每瓶 400 mg)用 20 mL 生理盐水稀释。 注 3: AI 表示人工授精。						

附录 C
(资料性)

牛体内胚胎生产与移植记录表

- C.1 供体超数排卵、人工授精和胚胎采集记录表见表 C.1。
C.2 胚胎冷冻与保存记录表见表 C.2。
C.3 受体胚胎移植记录表见表 C.3。

表 C.1 供体超数排卵、配种和胚胎采集记录表

第__页,共__页

供体与种公牛：		
地 点	牛 场	畜 主
供 体 名	供 体 号	品 种
公 牛 号	公 牛 站	注 册 号
精液质量	精液类型	精液生产日期

超数排卵与配种：		
上次发情日期	发情前处理	超数排卵时卵巢状况
FSH 厂家	批 号	其他药品厂家及批号

时 间	FSH(剂量)	其他处理
	早晨 mL	
	晚上 mL	
	早晨 mL	
	晚上 mL	
	早晨 mL	
	晚上 mL	
	早晨 mL	
	晚上 mL	
总剂量		

预期发情日期

实际发情日期

人工授精(日期、时间及剂量)

第 一 次

第 二 次

第 三 次

输精人员

备注：

胚胎采集

采集时间 采集方法 采集人员 捡卵人员

黄体数右侧卵巢： 左侧卵巢：。卵泡数 右侧卵巢： 左侧卵巢：。

冲胚液用量(mL)：。回收冲胚液量(mL)右侧子宫角： 左侧子宫角：

回收胚胎总数。可用胚胎数

其中： 桑椹胚

囊 胚

退化胚

未受精卵

表 C.2 胚胎冷冻与保存记录表

第__ 页,共__ 页

供体号:_____

注册号:_____

供体品种:_____

牧场名称:_____

地址:_____

配种公牛号:_____

公牛注册号:_____

品种:_____

公牛名字:_____ 精液类型:_____

冷冻日期:_____

供体发情日期:_____

供体配种日期:_____

采集胚胎日期:_____

回收胚胎总数:_____

其中,可用胚胎数:_____

退化胚胎数:_____

未受精卵数:_____

冷冻胚胎数:_____

液氮罐号	提漏号	铝夹号	细管号	胚胎数	胚胎阶段	胚胎质量	洗涤次数	是否用胰蛋白酶处理	透明带是否完整

备注:胚胎冷冻与解冻方法:

1. 胚胎采集到冷冻时间间隔_____ (h)。

2. 冷冻液:_____。

3. 冷冻过程:结晶温度:_____℃ 平衡时间:_____ 降温速率:_____

投入液氮温度:_____ 其他:_____

4. 解冻方法:_____。

冷冻人员签字:_____

技术负责人签字:_____

表 C.3 受体胚胎移植与妊娠记录表

第__页,共__页

移植日期:_____牛场:_____

移植方法:手术法_____非手术法_____。麻醉方法:_____其他处理:_____

移植人员:_____

序号	受体						胚胎阶段与质量				妊娠检查			
	受体号	品种	胎次	同期发情处理	发情日期	黄体级别	移植部位	供体号	胚胎阶段	胚胎质量	是否冷冻	返情日期	妊娠日期	妊娠结果

备注:_____

附录 D
(资料性)
主要液体的配制

D.1 冲胚液

- D.1.1 改进的磷酸盐缓冲液(PBS),配方见表 D.1。
- D.1.2 冲配液使用时宜在 PBS 液中添加一定量的青霉素和链霉素。
- D.1.3 冲胚液为 PBS 液中添加 1%(体积分数)的犍牛或胎牛血清,或 0.04% BSA(质量浓度)。

D.2 保存液

10%(体积分数)胎牛血清或 0.4% BSA(质量浓度)的 PBS 液。

D.3 冷冻液

1.5 mol/L 乙二醇的保存液(含 0.1 mol/L 蔗糖)。

表 D.1 PBS 配方

成分	含量
NaCl/(g/L)	8.0
KCl/(g/L)	0.20
Na ₂ HPO ₄ (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)/(g/L)	1.50(2.916)
CaCl ₂ (CaCl ₂ · 2H ₂ O)/(g/L)	0.10(0.132)
KH ₂ PO ₄ /(g/L)	0.20
MgCl ₂ (MgCl ₂ · 6H ₂ O)/(g/L)	0.10(0.213 3)
丙酮酸钠/(g/L)	0.036
葡萄糖(一水葡萄糖)/(g/L)	1.00(1.10)
青霉素/U	100 000
链霉素/U	50 000
注 1: 配制 PBS 溶液所有的试剂为分析纯以上。 注 2: 配制 PBS 溶液所用水是三级水(见 GB/T 6682)。 注 3: 配制成的 PBS 溶液灭菌后低温冷藏(4 ℃~5 ℃)。 注 4: 配制成的 PBS 溶液 pH 为 7.2~7.6,渗透压为 270 mOsm~290 mOsm。 注 5: 购买的商品 PBS 在有效期内使用。	

D.4 0.25%胰蛋白酶液

D.4.1 D-Hank's 液

D-Hank's 液配方与配制见表 D.2。

D.4.2 0.25%胰蛋白酶液的配制

称取 0.25 g 胰蛋白酶(Difco 1:250)溶解于 100 mL D-Hank's 液中,用 NaHCO_3 将其 pH 调节为 7.4~7.6,用 0.22 μm 针头式滤器过滤灭菌,分装备用。

表 D.2 D-Hank's 液配方

成分	含量
KCL/(g/L)	0.4
KH_2PO_4 /(g/L)	0.06
NaCL/(g/L)	8.0
NaHCO_3 /(g/L)	0.35
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ /(g/L)	0.132
D-葡萄糖/(g/L)	1.0
0.1%酚红/mL	1
注 1: 将上述试剂加入 800 mL 三级水(见 GB/T 6682)中溶解后定容到 1 000 mL。	
注 2: 0.105 MPa,蒸汽相对温度 121 $^{\circ}\text{C}$ 下高压灭菌 15 min。	

附 录 E
(资料性)
冷冻胚胎细管与保存标识

E.1 胚胎冷冻细管标识

E.1.1 冷冻胚胎细管应标识细管号、胚胎数、移植方式、胚胎质量、胚胎发育阶段、供体品种、供体号、公牛品种、公牛号和冷冻日期。供体和公牛品种可用品种代码,按照 GB 4143 的规定执行。

E.1.2 胚胎冷冻细管标识可在细管或细管塞上标注。细管塞上标识示例见图 E.1 。

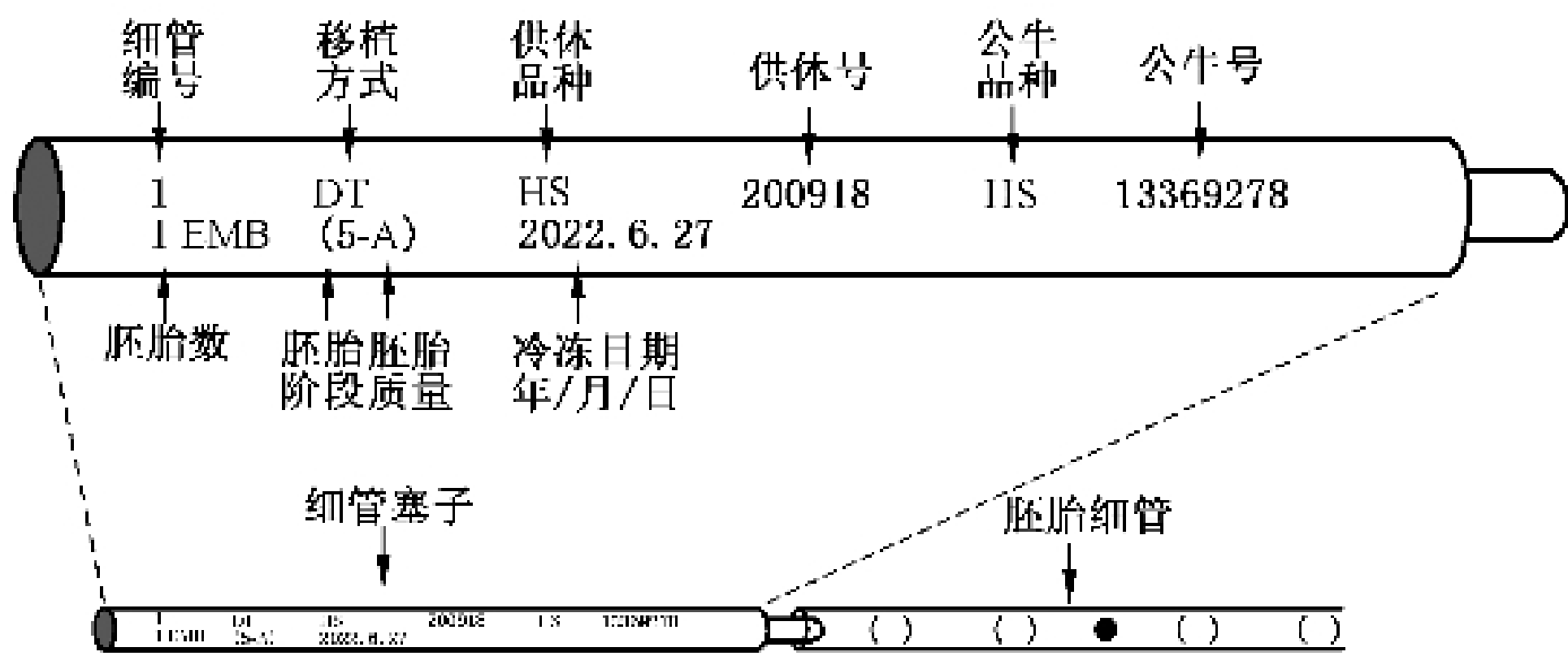


图 E.1 冷冻胚胎细管(塞子)标识示例

E.2 指形管标识

E.2.1 存放冷冻胚胎细管的指形管应标识细管号、冷冻日期、供体号、公牛号、细管数量和生产单位。

E.2.2 指形管标识示例见图 E.2 。

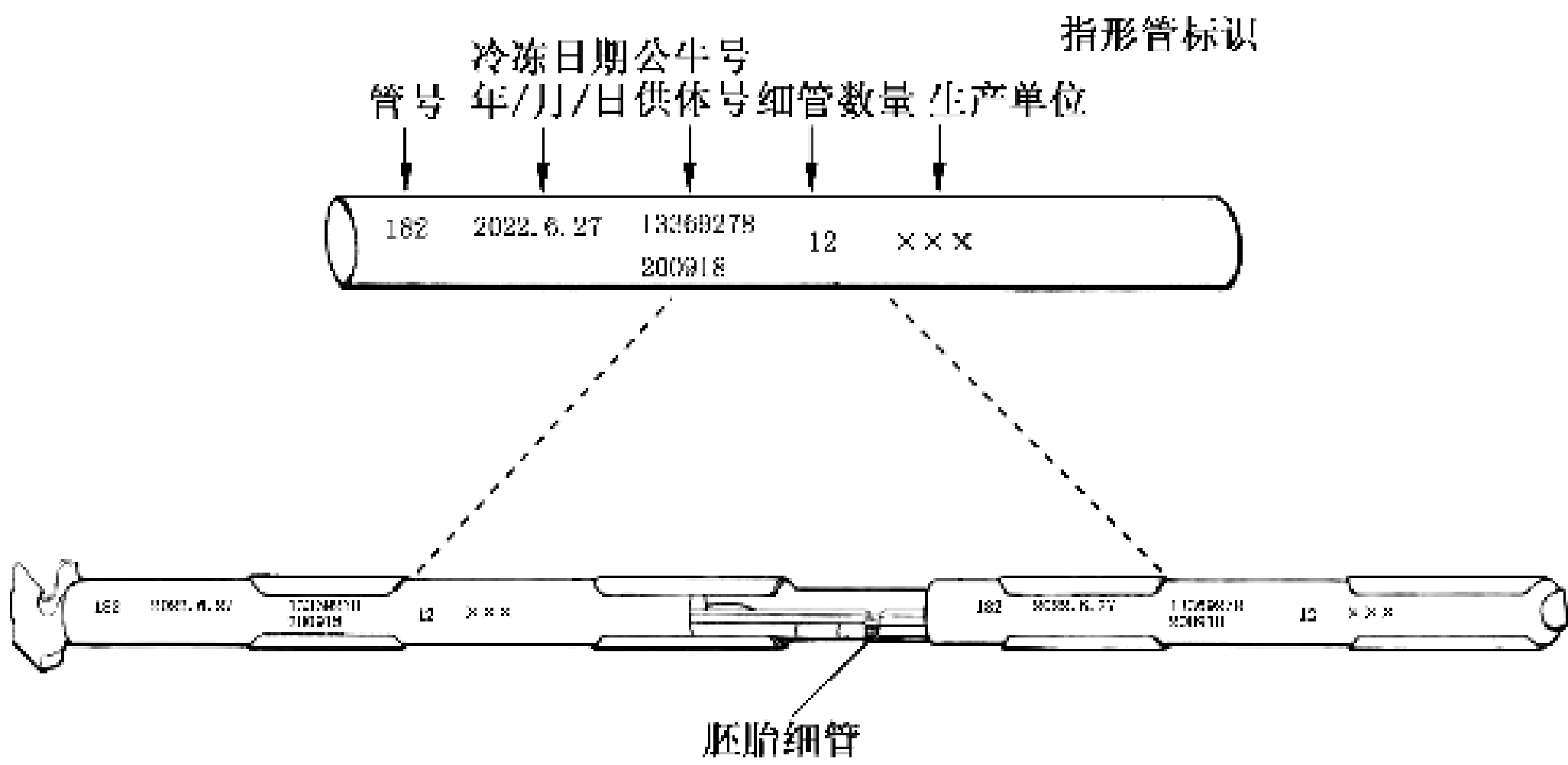


图 E.2 指形管标识示例

E.3 铝架标识

E.3.1 存放指形管的铝架顶端应标识供体号和冷冻日期。

E.3.2 铝架标识示例见图 E.3 。

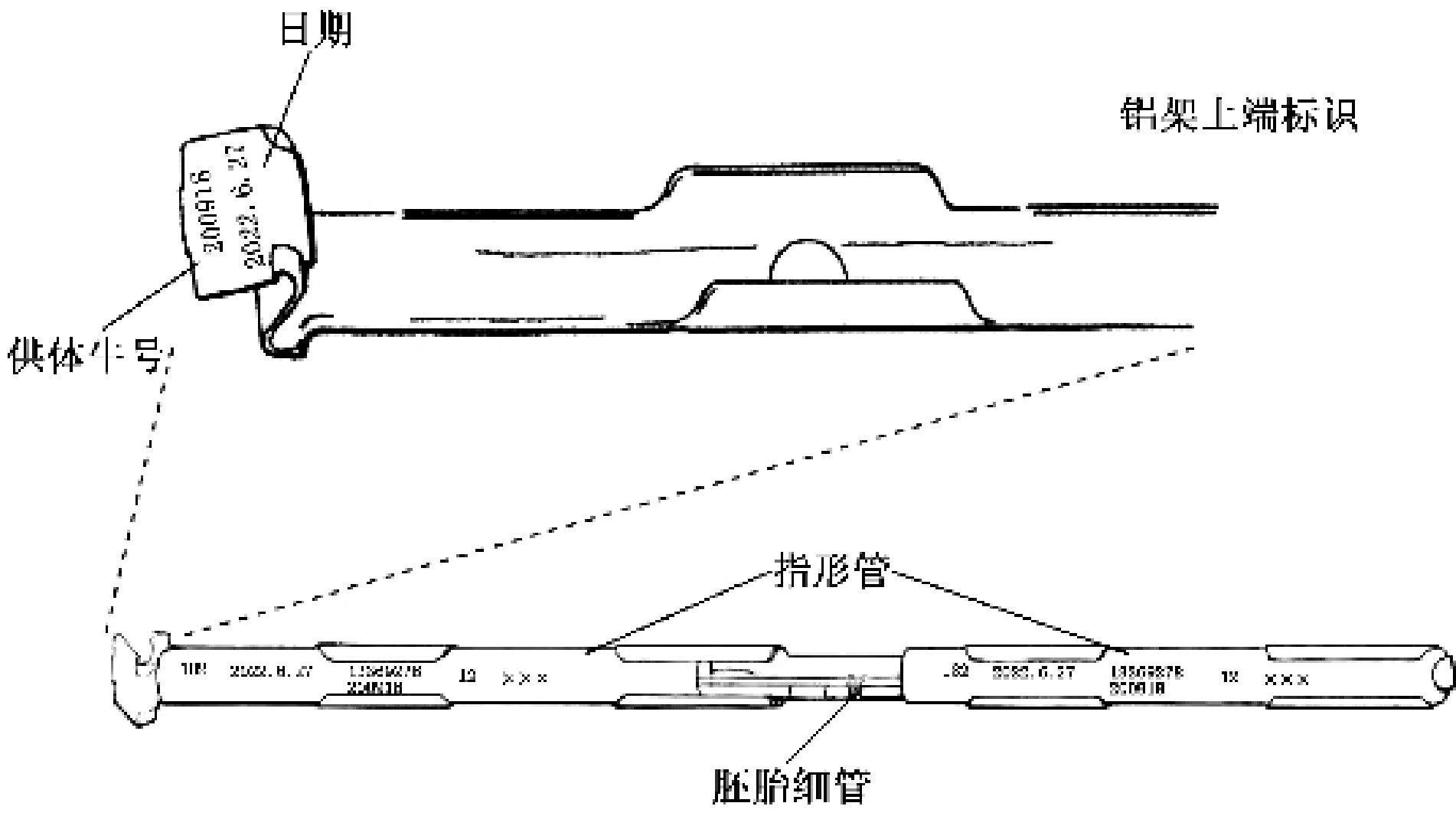


图 E.3 铝架标识示例

参 考 文 献

- [1] GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
-