

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1445—2007

奶牛胚胎移植技术规程

Procedure of embryo transfer technology in dairy cattle

2007-09-14 发布

2007-12-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

为规范我国奶牛胚胎移植技术在推广应用中的操作,满足奶牛胚胎生产与销售的需要,依据 GB/T 1.1-2000《标准化工作导则 第1部分:标准的结构与编写规则》编写本标准。

本标准的全部技术内容为推荐性。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F 为规范性附录,附录 G、附录 H、附录 I 为资料性附录。

本标准由北京三元集团有限责任公司提出。

本标准由中华人民共和国农业部农垦局归口。

本标准起草单位:北京奶牛中心。

本标准主要起草人:孙凤俊 张新慧 薛建华 吴胜权 宣柏华 赵鹏 李艳华 麻柱 吕善潮 韩广文等。

奶牛胚胎移植技术规程

1 范围

本标准规定了供体牛的选择、超数排卵、人工授精、胚胎采集、胚胎质量鉴定、胚胎冷冻保存与解冻、受体牛的选择与同期发情处理、胚胎移植等技术操作的基本原则、要求和方法。

本标准适用于奶牛胚胎移植技术。

2 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)或修订版均不适用于本标准,然而,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。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB 4143 牛冷冻精液

NY/T 34-2004 奶牛饲养标准

3 术语和定义

下列术语与定义适用于本标准。

3.1

胚胎移植 embryo transfer, ET

将体内外生产的奶牛早期胚胎移植到与其生理状态相同或相近的母牛子宫内,生产优良奶牛后代的技术。

4 药品、器械和实验室要求

4.1 试剂和药品

所用的试剂和药品及要求见附录 A。

4.2 设备、器械与环境

4.2.1 所需的设备与耗材:见附录 B。

4.2.2 器械、设备的清洁、消毒:见附录 C。

4.2.3 胚胎实验室:为胚胎操作专用,应保持室内无菌、无尘,室内温度保持在 20℃~25℃,避免阳光直射。

4.2.4 采胚室:为胚胎采集专用,应保持清洁,地面要防滑,便于清洗、消毒,设有保定栏,与检胚室之间安装传递窗,室内温度不低于 15℃。

5 超数排卵

5.1 供体选择和超数排卵

5.1.1 供体牛的选择

5.1.1.1 供体牛应选择遗传性能稳定,系谱清楚,以及个体生产性能优良的奶牛。

5.1.1.2 供体牛要求健康状况良好,体况中等以上,生殖系统和繁殖功能正常,无遗传和传染性疾病。

5.1.1.3 成年母牛要有一胎以上的正常繁殖史,10 岁以上的母牛一般不选作供体,青年母牛应在 14 月龄以上或达到成年牛体重 70% 以上。

5.1.1.4 超排处理时,供体牛应具有两个正常发情周期,卵巢发育正常、丰满有弹性,并有发育良好的黄体。

5.1.1.5 筛选出的供体牛应在牛体上做好标记,仔细观察发情,并记录耳号和发情时间。

5.1.2 供体牛的饲养管理

5.1.2.1 供体牛饲养管理见 NY/T 34—2004。

5.1.2.2 应提供较高能量日粮标准,并适量补充青绿饲料、维生素 A、维生素 D、维生素 E 和微量元素硒。

5.1.3 超数排卵处理方法

5.1.3.1 对于发情记录准确的供体母牛,以发情之日为 0 d,在发情后的第 9 d~13 d 的任意一天开始连续 4 d 肌肉注射促卵泡素(FSH),每天 2 次,间隔 12 h,在首次注射 FSH 后 48 h 肌肉注射氯前列烯醇(PG)0.4 mg/头·次。注射 PG 48 h 后观察发情,发情后 12 h 进行人工授精。

5.1.3.2 对直检卵巢上有功能性黄体的供体牛,可肌注 PG 0.4 mg/头·次,使其发情排卵,然后在发情后的第 9 d~13 d 进行肌肉注射 FSH,具体方法同 5.1.3.1。

5.1.3.3 诱导卵泡波同步发生方法进行超数排卵处理,即在发情周期的任意一天放入含孕激素的阴道栓,具体方法见附录 D(规范性附录),同时肌肉注射 17β -雌二醇 5 mg 或苯甲酸钠雌二醇 2 mg 和黄体酮 50 mg~100 mg。放置阴道栓 4 d 后(放阴道栓当天为 0 d),开始连续 4 d 肌肉注射 FSH,每天 2 次,间隔 12 h。在首次注射 FSH 后 48 h 肌肉注射 PG 0.4 mg/头·次,再间隔 12 h 撤栓。注射 PG 后 48 h 观察发情和人工授精。

5.1.3.4 一般情况下,供体牛重复超排,每次处理应间隔 60 d 左右;对于超排效果良好的个体,可采用 5.1.3.3 方法间隔 30 d 左右进行超排处理。

5.1.3.5 不同 FSH 制剂应根据使用说明来确定用法和用量,使用新厂家或新批号的 FSH 时,应做超排效果预试验。进行重复超排时,应适当增加剂量。

5.2 供体牛的人工授精

5.2.1 精液质量应符合 GB 4143 的规定。人工授精使用的冷冻精液,应根据供体母牛选种选配的要求,选择遗传性状优良、系谱清楚、并经验证的种公牛冷冻精液。

5.2.2 发情后 12 h 进行第一次输精,每间隔 12 h 再输精一次,每次一支细管精液,共输精 2~3 次。

5.3 胚胎采集(采卵)及处理

5.3.1 胚胎采集时间

供体发情后第 7 d(发情当天为 0 d)采集胚胎。

5.3.2 胚胎采集

5.3.2.1 麻醉

将供体牛前高后低站立保定后,掏净直肠内的宿粪,可采用 2%利多卡因在荐椎和第一尾椎间隙注射 4 mL~5 mL,实施硬膜外腔麻醉,其他麻醉剂按说明书使用。

5.3.2.2 外阴清洗、消毒

麻醉后将牛尾拴系在牛体一侧,用清水冲洗会阴部和外阴周围,再用 0.1%新洁尔灭或 0.1%高锰酸钾冲洗消毒,用灭菌纸巾擦干,最后用酒精棉球擦拭消毒外阴部。

5.3.2.3 吸除子宫颈黏液

用黏液吸除器吸除子宫颈黏液。对青年母牛或子宫颈通过困难的供体牛,可先用子宫颈扩张棒扩张子宫颈,再吸除子宫颈黏液。

5.3.2.4 采胚

通过直肠把握,将带有钢芯的冲胚管经过子宫颈轻轻地插入一侧子宫角大弯处,抽出少许钢芯,再将冲胚管送到子宫角大弯前至小弯基部。给气囊充气,根据母牛年龄及子宫大小和冲胚管的深度确定充气量,一般青年牛充气 8 mL~10 mL,经产牛为 12 mL~15 mL。固定冲胚管,抽出钢芯,开始灌注冲胚液,用前加温至 37℃。冲胚液配制方法见附录 E(规范性附录)。

采胚时,将冲卵液吊瓶挂在距外阴部 1.0 m 高处,接通三通管(Y 型)及冲卵管与集卵杯。根据子宫角的膨胀程度确定冲卵液注入量的多少,一般每次注入 30 mL~50 mL 冲卵液,视液体回流情况,然后反复多次冲灌,每侧子宫角用液量 300 mL~500 mL。冲完一侧子宫角后将钢芯再插入冲卵管并放气,小心固定钢芯,把冲卵管退到子宫体,转向插入另一侧子宫角,重复上述操作。

5.3.2.5 采胚后处理

两侧子宫角采胚完毕,向子宫体灌注抗生素(青霉素 80 万 IU 和链霉素 100 万 IU)或 0.1%~0.2% 碘甘油溶液 30 mL~40 mL。同时,肌肉注射 PG 0.4 mg,在采胚 2 d 后,再注射 0.4 mg PG。

5.3.3 检胚

5.3.3.1 回收液处理

5.3.3.1.1 集卵杯法:用 20 G 针头的注射器吸 20 mL 冲胚液从上向下冲洗集卵杯内侧的尼龙网 4 次~5 次,清除杯中的泡沫后镜检。

5.3.3.1.2 过滤杯法:冲胚时滤去回收液,最后将杯中留下的 20 mL~30 mL 回收液倒入平皿,再用少量冲卵液冲洗过滤杯 2 次~3 次,一并倒入平皿镜检。

5.3.3.2 镜检

将回收冲胚液的平皿在 10 倍~20 倍体视显微镜下,从上到下、从左到右或从外到内 Z 字形移动,用吸胚管(直径 200 μ m~300 μ m)将找到的胚胎移入培养皿中的保存液小滴中,然后将同一供体母牛的胚胎从液滴中全部吸出移到新液滴,并反复洗涤胚胎 3 次~5 次。然后将体视镜放大至 50 倍以上,进行胚胎质量鉴定和分级。

5.3.3.3 胚胎发育阶段分类

胚胎发育阶段分类应符合表 1 的要求。

表 1 胚胎发育阶段和形态特征

胚胎发育阶段	形态特征
早期桑葚胚(Early Morula, EM)	含有 16 个以上细胞,卵裂球界限清晰,没有形成致密细胞团
致密桑葚胚(Compacted morula, CM)	卵裂球进一步分裂变小,紧缩为团块状,看不清卵裂球界限,细胞团占据透明带内的 60%~70% 空间
早期囊胚(Early blastocyst, EB)	细胞团中出现散在的囊腔,细胞团占据透明带内的 70%~80% 空间
囊胚(Blastocyst, BL)	已经分化的滋养层和内部致密的、颜色发暗的内细胞团和囊胚腔明显是主要特征。滋养层与内细胞团的形态比较容易区别。此时的胚胎细胞充满整个透明带内
扩张囊胚(Expanded blastocyst, EXB)	整个胚胎直径增大,囊胚腔充分扩张,与透明带之间无间隙,透明带变薄,大约是原来厚度的 1/3
孵化囊胚(Hatching blastocyst, HB)	正处于孵化阶段的胚胎透明带破裂或胚胎细胞团正在脱出或者已脱离透明带

5.3.3.4 胚胎发育日龄标准

胚胎发育日龄标准应符合表 2 的要求。

表 2 胚胎发育日龄标准

胚胎发育阶段	胚胎日龄	胚胎发育阶段	胚胎日龄
单细胞	1 d	致密桑葚胚	6 d
2-细胞	2 d	早期囊胚	7 d
4-细胞	3 d	囊胚	7 d~8 d
8-细胞	4 d	扩张囊胚	8 d~9 d
16-细胞	5 d	孵化囊胚	9 d~10 d
早期桑葚胚	5 d~6 d		

5.3.3.5 胚胎质量形态学鉴定及分级

胚胎质量形态学鉴定及分级应符合表 3 的要求。

5.3.4 胚胎洗涤

5.3.4.1 常规胚胎洗涤程序

5.3.4.1.1 胚胎应用无菌的保存液洗涤 5 次,每次洗涤不少于 200 μL 。

表 3 胚胎形态学鉴定及分级

等级	特 征
A 级	胚胎发育阶段与胚龄一致,透明带光滑无缺陷,胚胎细胞团形态完整,轮廓清晰,卵裂球大小均匀、结构紧凑、色泽和透明度适中,无游离细胞或很少,变性细胞比例少于 10%
B 级	胚胎发育阶段与胚龄基本一致,轮廓清晰,胚胎细胞团形态较完整,卵裂球大小基本一致,色泽和细胞透明度良好,变性及游离细胞约占 10%~30%
C 级	胚胎发育阶段与胚龄不太一致,且胚胎细胞团轮廓不清,色泽和透明度变暗,卵裂球较松散游离,变性及游离细胞约占 30%~50%。可用作鲜胚移植
D 级	未受精卵,或发育停滞变性、卵裂球不规则、少而散。D 级不可用

5.3.4.1.2 每组清洗胚胎数不能超过 10 枚。

5.3.4.1.3 每次清洗应更换无菌吸管。

5.3.4.1.4 每次清洗胚胎带入平皿中的液体量不能超过 1%。

5.3.4.2 胰蛋白酶液洗涤程序

5.3.4.2.1 每次清洗应使用新的灭菌吸管。

5.3.4.2.2 每次清洗胚胎带入平皿中的液体量不能超过 1%。

5.3.4.2.3 每组清洗胚胎数量不超过 10 枚。

5.3.4.2.4 胚胎清洗前应有完整的透明带。

5.3.4.2.5 用保存液洗涤 5 次。

5.3.4.2.6 在 0.25% 胰蛋白酶液中(不含 Ca、Mg 离子的 Hanks 液)洗涤 2 次。在胰蛋白酶液中总的清洗时间 60 s~90 s。胰蛋白酶液配制方法见附录 F。

5.3.4.2.7 再用含 10% FCS 的 PBS 液洗涤 5 次。

5.4 胚胎冷冻保存与解冻

5.4.1 甘油法冷冻

5.4.1.1 1.4 mol/L(10%)甘油保护液的配制

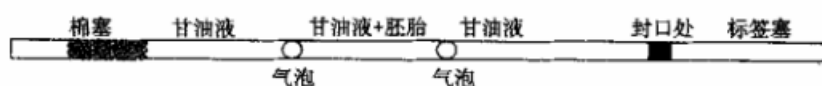
取9 mL含20%胎牛血清的D-PBS液,加入1 mL甘油,用吸管反复吹吸混合15次~20次,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤器过滤到灭菌容器内待用。

5.4.1.2 平衡

将胚胎直接移入10%的甘油冷冻保存液,平衡10 min后,迅速装管冷冻。

5.4.1.3 装管

使用0.25 mL细管,装管前用胚胎冷冻液清洗细管内壁5遍。装管顺序是,一段甘油冷冻保护液,气泡;一段甘油冷冻保护液与胚胎,气泡;最后一段甘油冷冻保护液(见图)。每支细管可装1枚或1枚以上胚胎。



5.4.1.4 标记

装管后,采用聚乙烯醇粉或封口机封口,或用标签塞插入封口端,标记内容:生产单位(代号)标记品种和供体牛号及种公牛号,胚胎发育阶段、等级及数量,胚胎生产时间等,乙二醇冷冻的胚胎应标记直接移植DT符号。

5.4.1.5 植冰

将装有胚胎的细管放入预冷至 $-6\ ^\circ\text{C}$ 或 $-7\ ^\circ\text{C}$ 的冷冻仪内,平衡5 min后,用经过液氮冷却后的镊子夹住塑料细管封口端(远离胚胎端)植冰。

5.4.1.6 冷冻

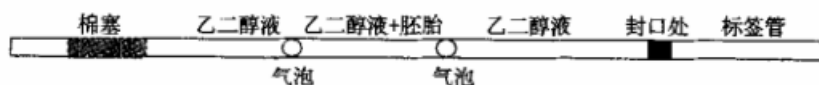
植冰后,平衡10 min,以 $0.3\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ ~ $0.5\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率降温,降到 $-35\ ^\circ\text{C}$ 时,平衡10 min,直接投入液氮中保存。

5.4.2 甘油法解冻

从液氮中取出细管,在空气中停留10 s,然后投入 $35\ ^\circ\text{C}$ 水浴中解冻10 s,用酒精棉球消毒、用灭菌纸巾擦干。用细管剪刀剪去封口端,推出细管中的胚胎,在1 mol/L蔗糖液中平衡4 min~10 min,然后将胚胎转移至保存液中洗涤5遍,胚胎质量鉴定合格后装管移植。

5.4.3 乙二醇冷冻胚胎直接移植法程序

5.4.3.1 将胚胎放入1.5 mol/L或1.8 mol/L乙二醇冷冻保护液中,平衡10 min,迅速装入0.25 mL细管。装管顺序:乙二醇液,气泡,含有胚胎的乙二醇液,气泡,乙二醇液,封口。见下图:



5.4.3.2 植冰:胚胎放入 $-6\ ^\circ\text{C}$ 或 $-7\ ^\circ\text{C}$ 冷冻仪平衡5 min后,用经过液氮冷却后的镊子夹住塑料细管封口端(远离胚胎端)植冰。

5.4.3.3 冷冻:植冰后,平衡10 min,以 $0.3\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ ~ $0.5\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ 速率进行降温,达到 $-32\ ^\circ\text{C}$ ~ $-35\ ^\circ\text{C}$ 时,平衡10 min,把细管投入液氮中。

5.4.3.4 解冻:从液氮罐中取出细管,空气中停留5 s,投入 $32\ ^\circ\text{C}$ 水浴中,待冰晶消失后取出细管,用酒精棉球擦干、消毒后,剪开封口,直接装入移植器,进行移植。

6 受体牛的选择及胚胎移植

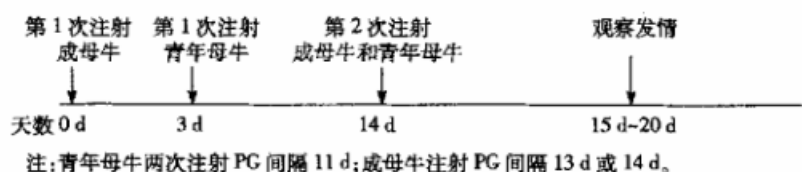
6.1 受体牛的选择与管理

要求体型较大,膘情适中,发情周期正常,生殖系统无疾患。青年牛16~18月龄以上;成母牛2~6

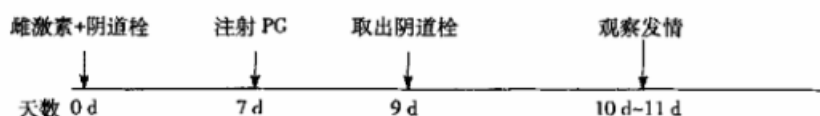
周岁,产后2个月以上。产犊性能和泌乳性能良好,无流产史。受体牛群的饲养管理和供体牛同样重要,给予充足清洁的饮水和足够的草料。

6.2 受体牛同期发情处理

6.2.1 前列腺素(PG)法



6.2.2 阴道栓结合 PG 法



6.3 胚胎移植

6.3.1 准备工作

6.3.1.1 器械和药品:器械包括胚胎移植枪、无菌塑料硬外套、无菌塑料软外套、剪毛剪、细管剪、温度计、解冻杯、一次性注射器等,药品有2%利多卡因、0.1%新洁尔灭、70%酒精棉球等。

6.3.1.2 受体牛的准备:根据发情记录,确定待移植的受体牛,并做直肠检查,确定排卵侧有功能性黄体,子宫形态和质地正常。移植前用2%利多卡因实施硬膜外腔麻醉,对外阴部用0.1%的新洁尔灭溶液清洗消毒,用酒精棉球擦拭、消毒,并用纸巾擦干。受体牛发情后天数与胚龄相差不应超过 ± 1 d。

6.3.1.3 胚胎的准备:根据受体牛的发情后天数选择胚胎的发育阶段;一般将致密桑葚胚、早期囊胚和囊胚,分别移植给发情后6 d、7 d和8 d的受体母牛。然后将甘油作冷冻保护剂,冷冻的胚胎按5.4.2要求解冻后,装入0.25 mL细管,再装入移植枪,套好保护外套备用;乙二醇作冷冻保护剂的冷冻胚胎按5.4.3.4要求解冻后,直接装入移植枪,套好保护套备用。

6.3.2 移植操作

分开外阴部,插入移植枪,至子宫颈外口,另一只手通过直肠把握子宫颈,移植枪顶开软外套,进入子宫颈。轻轻地将移植枪前端送达有黄体侧的子宫角上1/3处,推入钢芯,将胚胎推入子宫内,然后抽出移植枪。整个操作过程要认真细致、柔和,防止造成子宫内膜出血。

7 记录

7.1 供体牛超排、采胚及胚胎冷冻记录表见附录 G。

7.2 同期发情记录见附录 H。

7.3 受体牛移植记录见附录 I。

附 录 A
(规范性附录)
试 剂 与 药 品

A.1 试剂和药品的要求

A.1.1 所用的试剂除特殊规定外,包括氯化钠(NaCl)、氯化钾(KCl)、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、磷酸二氢钾(KH_2PO_4)、氯化钙(CaCl_2)、氯化镁(MgCl_2)以及葡萄糖、丙酮酸钠、甘油、乙二醇等,均为分析纯及其以上纯度的化学试剂。

A.1.2 冲胚液、保存液、冷冻保护液和解冻液等使用的血清、牛血清白蛋白(BSA)和抗生素应符合组织培养要求。胎牛血清(FCS)使用前需经过质量检测,无菌、无支原体、无病毒和内毒素;肉眼观察呈淡黄色,澄清透明,无杂质。使用前需置于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中灭活 30 min ,在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冷冻保存,用前解冻并过滤。

A.2 同期发情、超数排卵和胚胎采集所需药品和溶液

A.2.1 同期发情和超数排卵所需要的药品和激素

A.2.1.1 5%~10% 碘酊。

A.2.1.2 0.1% 新洁尔灭。

A.2.1.3 生理盐水溶液。

A.2.1.4 促卵泡素(FSH)。

A.2.1.5 前列腺素(PG)或其类似物。

A.2.1.6 孕激素(P_4)。

A.2.1.7 雌二醇(E_2)。

A.2.2 胚胎采集所需药品和溶液

A.2.2.1 5%~10% 碘酊。

A.2.2.2 0.1% 新洁尔灭。

A.2.2.3 生理盐水溶液。

A.2.2.4 2% 利多卡因或 2% 普鲁卡因等。

A.2.2.5 青霉素和链霉素。

A.2.2.6 改进的杜氏磷酸盐缓冲液(D-PBS)、冲卵液、保存液、冷冻液等,配方和配制方法见附录 E。

附 录 B
(规范性附录)
设 备 与 耗 材

B.1 超数排卵、人工授精和胚胎移植所需器材

- B.1.1 5 mL、10 mL、20 mL、50 mL 一次性注射器及针头。
- B.1.2 牛用开膈器。
- B.1.3 CIDR 放置器。
- B.1.4 牛用输精枪;输精枪塑料硬外套;输精枪塑料软外套膜。
- B.1.5 胚胎移植枪;移植枪塑料硬外套;移植枪塑料软外套膜。
- B.1.6 解冻杯、温度计、剪毛剪等。

B.2 胚胎采集所需器材

- B.2.1 冲卵管(二路式),16[#]~18[#]用于青年牛,20[#]用于经产母牛。
- B.2.2 冲卵管内钢芯。
- B.2.3 子宫颈扩张棒。
- B.2.4 子宫颈黏液吸除器。
- B.2.5 三通管。
- B.2.6 二通管。
- B.2.7 硅胶管。
- B.2.8 20 mL 注射器。
- B.2.9 10 mL 注射器。
- B.2.10 5 mL 注射器。
- B.2.11 集卵漏斗或底部带格的过滤式集卵杯。
- B.2.12 直径 35 mm 和直径 100 mm 的培养皿。
- B.2.13 剪毛剪。
- B.2.14 1 000 mL 容量瓶。
- B.2.15 封口膜,70%酒精棉球。

B.3 胚胎处理、鉴定和冷冻保存所需设备和器材

- B.3.1 体视显微镜 10×~100×。
- B.3.2 电热恒温盘或恒温板。
- B.3.3 直径 35 mm、直径 100 mm 的培养皿。
- B.3.4 胚胎吸管、微量移液器。
- B.3.5 胚胎程控冷冻仪。
- B.3.6 0.25 mL 塑料细管。

B.3.7 0.22 μm 针头式过滤器。

B.3.8 细管塞。

B.3.9 塑料薄膜封口机。

B.3.10 标签记号笔。

附 录 C
(规范性附录)
器具的洗涤与消毒

C.1 器具洗涤

C.1.1 玻璃器皿的洗涤

C.1.1.1 浸泡:新购置的玻璃器皿使用前应先用自来水简单刷洗,然后用5%稀盐酸溶液浸泡12 h以上;培养后的玻璃器皿用后要立即浸入清水中,不应留有气泡。

C.1.1.2 刷洗:浸泡后的玻璃器皿用毛刷沾洗涤剂洗涤(宜选用软毛刷和优质的洗涤剂,如高级洗衣粉或洗洁精)洗刷,洗刷时用力要轻,防刮底,防死角。或用超声波洗涤器洗涤20 min~30 min,水中加入洗涤剂。

C.1.1.3 浸酸:对于含有污垢难以洗刷的器皿要先在清洗液中(勿留气泡)浸酸。浸酸时间不应少于6 h。

C.1.1.4 冲洗:刷洗和浸酸后都必须用水充分冲洗,使之不留任何残迹。冲洗宜用洗涤装置,以保证冲洗效果,如用手工操作,每瓶都得用水灌满,倒空,重复10次以上,最后再用蒸馏水漂洗2次~3次,晾干备用。

浸泡/清洗液配方:

【强 液】重铬酸钾 63 g
浓硫酸 1 000 mL
蒸馏水 200 L

【次强液】重铬酸钾 120 g
浓硫酸 200 mL
蒸馏水 1 000 mL

【弱 液】重铬酸钾 100 g
浓硫酸 100 mL
蒸馏水 100 mL

矽酸钠洗液:

先配制成100×贮存液:矽酸钾80 g,偏磷酸钠9 g,加热溶解在1 000 mL蒸馏水中。使用时,用蒸馏水100倍稀释。

C.1.2 胶塞的清洗

C.1.2.1 新购置的胶塞先用自来水冲洗干净后,再做常规处理。

C.1.2.2 常规处理方法:浸泡,2% NaOH煮沸10 min~20 min,自来水冲洗烘干后,1%稀盐酸浸泡30 min,自来水冲洗和蒸馏水各清洗2次~3次,晾干备用。

C.1.3 塑料器皿的清洗

培养使用的塑料器皿是一种无毒并已经消毒过的灭菌密封包装的一次性使用物品。用时,只要打开包装即可。集卵杯、冲卵管等可重复使用物品用后应立即浸入水中,并用流水冲洗干净,晾干。

C.2 器具消毒

C.2.1 紫外线消毒

C.2.1.1 对空气、操作台表面和一些不能使用其他方法进行消毒的培养器皿(如塑料培养皿、培养板等)采用紫外线消毒。

C.2.1.2 培养室的紫外线灯应距地面 2.5 m,塑料制品可放在无菌间距紫外灯 50 cm~80 cm 处,使每平方厘米有 0.06 μ W 能量的照射,容器内侧向上,塑料吸管需垂直置于紫外灯下照射 30 min 以上。

C.2.2 干热消毒灭菌

耐高温的玻璃及金属器具,包装好后放入烘干消毒箱内 160 $^{\circ}$ C 处理 1 h~1.5 h,或者在温度升至 180 $^{\circ}$ C 以后,关闭开关,待恢复常温取出。

C.2.3 高压湿热消毒灭菌

适用于玻璃器具、金属制品、耐压耐热的塑料制品以及可用高压灭菌的无机盐溶液、液体石蜡油等。上述物品经包装放入高压灭菌器内,在 121 $^{\circ}$ C (0.105 MPa)高压灭菌 20 min~30 min。

C.2.4 过滤消毒

胚胎培养液、冷冻液、保存液等用 0.22 μ m 滤膜过滤,血清、PBS 液等用 0.45 μ m 滤膜过滤,过滤时应弃去开始的 2 滴~3 滴。

C.2.5 酒精浸泡消毒

聚乙烯冲胚管以及乳胶管等可在 70%酒精液中浸泡消毒 30 min 以上,然后用超纯水冲洗,使用前再用冲胚液冲洗。

附 录 D
(规范性附录)
放置阴道栓方法

D.1 准备工作

- D.1.1** 放置阴道栓器械的准备:根据所采取的超排或同期发情处理方案,使用 CIDR 投放器放置 CIDR。
- D.1.2** 器械消毒:使用规定的消毒剂并按使用说明配制。
- D.1.3** 牛的保定:采取站立保定方法。

D.2 操作

- D.2.1** 用 0.1% 新洁尔灭(或其他消毒液)清洗外阴。
- D.2.2** 将 CIDR 放入放置器内,通过阴门将 CIDR 推入阴道内,注意 CIDR 两角水平放置。
- D.2.3** 放置 CIDR 时一定要注意不要造成母牛阴道的损伤。

附 录 E
(规范性附录)
各种溶液的配制

E.1 杜氏磷酸盐缓冲溶液(改进的 D-PBS 液)配方

为了便于保存,可用双蒸水或三蒸水分别配制成 A 液和 B 液,按附录 C(规范性附录)高压灭菌,也可配制成浓缩 10 倍的原液。

D-PBS 液配方

原液类别	成 分	含量(g/L)
A 液	NaCl	8.00
	KCl	0.20
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.836
	或 Na_2HPO_4	1.15
	KH_2PO_4	0.20
B 液	CaCl_2	0.10
	或 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.132
	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.10

* 注:配制说明:PBS 所有成分应是分析纯以上的化学试剂;所用水电阻值应大于 18 M;配制的液体 pH 为 7.2~7.6,渗透压为 270 mOsm~290 mOsm;配制好的 A、B 原液分别在 121℃ (0.105 MPa) 高压灭菌 20 min~30 min, 4℃ 低温保存。

E.2 冲胚液配制

将 D-PBS 的 A、B 液(各 500 mL)分别倒入 1 000 mL 容量瓶中混合,加入 FCS(胎牛血清 10 mL 或 BSA(牛血清白蛋白)3.0 g,加入丙酮酸钠 36 mg、葡萄糖 1.0 g、链霉素 0.5 g(5 万 IU)和青霉素 0.075 g(10 万 IU),混匀过滤,备用。如果使用 D-PBS 浓缩 A、B 原液,各取 100 mL,注入 1 000 mL 容量瓶中,缓慢加入灭菌超纯水 800 mL 充分混合。取其中 20 mL A、B 混合液,再在其中添加丙酮酸钠 36 mg、葡萄糖 1.0 g、牛血清白蛋白 3.0 g(或胎牛血清 10 mL)、链霉素 0.5 g(5 万 IU)和青霉素 0.075 g(10 万 IU),充分混合均匀后用 0.22 μm 过滤器过滤灭菌,倒入容量瓶混合均匀。

E.3 保存液的配制

将青霉素、链霉素各 100 IU/mL 分别添加到含 20% m FCS 或 0.4% BSA 的 D-PBS 液中,充分混合后,用 0.22 μm 过滤器过滤灭菌备用。

E.4 血清灭活

将装有血清的瓶子放入 56℃ 水浴锅中,灭活 30 min,或在 52℃ 温水中灭活 40 min。灭活后,用 3 500 r/min 离心 10 min,取上清液,再用 0.45 μm 过滤器过滤灭菌,然后分装成 20 mL 小瓶, -20℃ ~ -70℃ 冷冻保存。

E.5 冷冻保护液的配制

E.5.1 10%甘油 PBS 液:取含 20%胎牛血清的 PBS 液 9 mL,加入甘油 1 mL,用吸管反复混合15次~20次,经用 0.22 μm 过滤器过滤灭菌放入灭菌容器内备用。

E.5.2 1.5 mol/L 乙二醇冷冻保护液:用含 0.4%牛血清白蛋白的 PBS 液 9.167 mL,加上乙二醇 0.833 mL,配制成 1.5 mol/L 冷冻保护液。

附 录 F
(规范性附录)

D-Hank's 液和 0.25%胰蛋白酶的配制

F.1 D-Hank's 液配方(无钙、镁离子)

成 分	含 量(g/L)
KCl	0.4 MPa
KH ₂ PO ₄	0.06
NaCl	8.0
NaHCO ₃	0.35
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.132
D-葡萄糖	1.0
酚红(0.1%)	1 mL

依次加入上述试剂至 800 mL 蒸馏水中,溶解后定容至 1 000 mL。高压灭菌,0.105 MPa 15 min(蒸汽相对温度 121℃)。

F.2 0.25%胰蛋白酶配制

D-Hank's 100 mL

胰蛋白酶(Difco 1:250) 0.25 g

用 NaHCO₃ 调节 pH 7.4~7.6,配好后用 0.22 μm 过滤器过滤灭菌、分装。

附 录 G

(资料性附录)

供体牛超排、采卵及胚胎冷冻记录表

供体牛超排、采卵及胚胎冷冻记录表如表 G 所示。

表 G 供体牛超排、采卵及胚胎冷冻记录表

单位及地址:

牛 号			出生日期			品 种			产奶量			
产犊时间			胎 次			最近发情或阴道栓处理时间						
FSH超排处理程序												
日/月									备 注			
	AM	PM	AM	PM	AM	PM	AM	PM	药物厂家	批 号		
FSH												
PG												
撤栓									处理人员:			
发情时间:												
输精时间	一次		二次		三次		种公牛号			输精者		
采胚 操作者:												
采胚日期	年 月 日 时											
直检结果												
采胚结果	获卵总数	可用胚胎						不可用卵				
		合 计	A 级	B 级	C 级	合 计	未受精	变性				
	鲜胚移植											
胚胎冷冻	冷冻数量					贮存罐号:						
								提桶号:				
冷冻仪型号							保存液:					
							冷冻液:					
上机运行	植冰温度:		平衡时间:		结束温度:							
	年 月 日 时 分 至 时 分											
记录人签字	备注:											

附 录 I
(资料性附录)
受体牛胚胎移植记录表

受体牛胚胎移植记录表如表 I 所示。

表 I 受体牛胚胎移植记录表

地址	畜主	受体牛号	发情日期	黄体情况	胚胎移植情况					返情日期	妊娠情况		
					日期	鲜胚	冻胚	胚胎编号和级别	术者		日期	结果	术者