

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1572—2007

牛胚胎移植技术规程

Technology regulations for bovine embryo transfer

2007-12-18 发布

2008-03-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准附录 A 至 G 是资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准起草单位：内蒙古自治区家畜改良工作站。

本标准主要起草人：张立、高雪峰、包呼格吉勒图、呼格吉勒图、陈巴特尔、黄春华、韩锦龙、刘长海、栗军。

牛胚胎移植技术规程

1 范围

本标准规定了牛胚胎移植技术规程。

本标准适用于牛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/T 4143 牛冷冻精液

3 术语和定义

3.1

供体牛 donor

指提供胚胎的母牛。

3.2

受体牛 recipient

指接受胚胎的母牛。

3.3

牛胚胎移植技术 bovine embryo transfer technology

将良种母牛体内早期胚胎或体外受精及其他方式获得的早期胚胎,移植到同种生理状态相同的受体母牛体内,使之继续发育成个体的技术。

4 供体牛的选择与饲养管理

4.1 供体牛的选择

- a) 供体牛品种优良、生产性能好。
- b) 遗传性稳定、谱系清楚、没有流产史、产后 90 d 以上,有两次以上正常发情记录。
- c) 体质健壮、繁殖机能正常,无遗传和传染性疾病。年龄在 14 月龄到 10 岁之间为宜。
- d) 生殖器官正常,无阴道炎、子宫内膜炎、卵巢囊肿等疾病。

4.2 供体牛的饲养管理

- a) 保持供体牛群饲养环境棚舍温度适宜、卫生、干燥,避免应激反应。
- b) 制定合理的供体牛日粮配方。
- c) 满足供体牛清洁饮水的需要。
- d) 供体牛超排前 8 周加强饲养管理。

5 供体牛的超数排卵及人工授精

5.1 超数排卵

5.1.1 供体牛的周期发情处理

药品剂量

注射剂量参考附录 A。

同期发情方法

a) 肌注 PG 法:

第一次注射:在任意一天。

第二次注射:在第一次注射后第 11 d、第二次注射后 24 h~96 h 时观察发情。

b) CIDR 法:在任一天放入 CIDR(含孕激素阴道塞)。

5.1.2 超数排卵方法

FSH4 d 注射法:

以母牛发情或放 CIDR 之日作为发情周期的 0 d,在母牛发情周期或放 CIDR 的第 9 d~13 d 中的任一天,每天早晚各注射 1 次 FSH,间隔 12 h 连续 4 d,递减注射,方法见附录 B。

5.1.3 重复超排

重复超排间隔时间一般为 45 d~60 d,方法同 5.1.2。

5.1.4 供体牛发情鉴定

在第 8 次注射 FSH 之后,对超排供体牛,每隔 6 h 观察一次发情情况,每次 0.5 h 以上。以母牛稳定站立接受其他牛爬跨作为发情的准确时间。

5.2 配种

5.2.1 对种公牛的要求

谱系清楚,检疫合格,遗传性能稳定,生产性能优良,乳用公牛要经过后裔测定。

冷冻精液质量符合 GB 4143 的规定。

5.2.2 配种操作要求

a) 母牛外阴部必须经过清洗消毒;

b) 输精枪必须保持无菌;

c) 选择合适的输精枪和输精部位;

d) 每次输精直线前进精子不少于 3×10^7 精子数,输精次数不少于 2 次;

e) 注意输精时不得触摸卵巢。

5.2.3 配种的最适时间

确认发情时 12 h 后进行第一次人工输精,间隔 12 h 进行第二次人工输精,每次输精有效精子数不少于 3×10^7 。

6 牛非手术冲胚及胚胎质量鉴定

6.1 非手术冲胚

6.1.1 非手术冲胚所需主要器材

冲胚管(二路式:经产牛用 18#~20# 冲胚管、育成牛用 16# 或 18# 冲胚管)、冲胚管内芯、子宫颈扩张棒、宫颈黏液吸除器、三通管、硅胶管、二通管、50 mL 注射器、20 mL 注射器、10 mL 注射器、5 mL 注射器、集卵漏斗、 $\Phi 100$ mm 培养皿(培养皿外底部划间距为 0.5 cm 的横线)、 $\Phi 35$ mm 培养皿、500 mL 量筒、高压灭菌锅、剪毛剪、镊子、胶布、毛巾和棉球等。

6.1.2 非手术冲胚所需药品

酒精、碘酊、新洁尔灭、2%利多卡因、0.9%生理盐水、青霉素、链霉素及其他抗菌素或预防子宫炎药物等。

6.1.3 冲胚液的配制

杜氏磷酸盐缓冲液(PBS),配方见附录 C。

6.1.4 非手术冲胚步骤

供体牛超排发情后 7 ± 0.5 d 冲胚。冲胚之前,所用的仪器、器皿等必须经过严格的消毒灭菌处理。冲卵管必须检查气囊是否漏气。

- a) 将供体牛保定在六柱栏中,用 2%利多卡因在荐椎和第一尾椎结合处或第一尾椎和第二尾椎结合处实行尾椎硬膜外麻醉,直至尾部无知觉。利多卡因用量每头约 5 mL。
- b) 麻醉后将牛尾固定,清除粪便,用清水冲洗会阴部及外阴,用灭菌卫生纸擦干,酒精棉球消毒外阴,最后用灭菌的生理盐水棉球擦拭。
- c) 用扩宫棒扩张子宫颈,然后插入宫颈黏液器将黏液抽出,随后把带内芯的冲卵管慢慢插入适当部位,当冲卵管达到子宫角弯曲处,拔出内芯 5 cm 左右,再把冲卵管往子宫角前端推进。当内芯再次到达子宫角弯曲处时,再向外拔出内芯 5 cm~10 cm,直到冲卵管到达子宫角前端为止。
- d) 冲卵管先冲一定气量,待确定气囊位置后,再充气至所需气量。
- e) 抽出冲卵管内芯。
- f) 连接冲胚和三通导管。
- g) 用 50 mL 注射器每次吸取 30 mL~40 mL 冲卵液,钳住三通导管的输出管,将冲卵液从输入管注入子宫角,然后钳住输入管,使回收液从输出管流到集卵杯(500 mL 容量),反复几次,每个子宫角用 400 mL~500 mL 冲卵液。
- h) 把集卵杯内的回收液在温室(18°C ~ 25°C)下,用集卵漏斗过滤,最后保留 10 mL 左右液体,倒入 $\Phi 100$ mm 培养皿中,进行镜检。
- i) 两侧子宫角冲卵完成后,将气囊空气放出,冲卵管抽至子宫体,灌注青霉素、链霉素或预防子宫炎的药物。
- j) 肌注前列腺素或类似物。

6.2 胚胎的质量鉴定

6.2.1 检胚

把盛有冲胚回收液的培养皿放在体视显微镜下,划分区域检查,避免遗漏,检出胚胎放入盛有保存液的 $\Phi 35$ mm 培养皿中。

6.2.2 胚胎的发育期鉴定

按附录 D 做好采胚记录。

超排后的供体牛在发情后第 7 ± 0.5 d,此时胚胎处于以下发育期:桑椹胚(M)、致密桑椹胚(CM)、早期囊胚(EB)、囊胚(B)、扩张囊胚(EXB)。按国际胚胎移植协会规定的数码依次表示为:4、5、6、7 见附录 E。

6.2.3 形态学胚胎质量鉴定

用形态学方法进行胚胎质量鉴定,将胚胎依次分为 1、2、3、4 四级。

1 级:发育正常,胚龄与发育期吻合,卵裂球轮廓清楚,透明度适中,细胞密度大,卵裂球均匀。

2 级:发育阶段基本符合预定胚龄,轮廓清楚,明暗度适中或稍暗或稍浅,细胞密度较小或小型卵裂球过多,有小部分突出的细胞和水泡样的细胞,细胞变性率为 10%~20%。

3 级:轮廓不清楚,色泽过暗或过淡,细胞密度小,突出细胞占一多半,细胞变性率为 30%~40%。

4 级:变性胚、退化胚。

7 胚胎的冷冻保存及解冻技术

7.1 胚胎的冷冻保存

7.1.1 胚胎冷冻保存所需仪器、器材

体视显微镜、胚胎冷冻仪、胚胎吸管、细管、装管器、玻璃针、细菌滤器、培养皿、记号笔。

7.1.2 胚胎冷冻保存所需溶液

- a) 保存液:含有 0.4%牛血清白蛋白(进口)的 PBS 液。
- b) 10%甘油冷冻液:用保存液配制。
- c) 1.5 mol/L 乙二醇冷冻液(含 0.1 mol/L 蔗糖):用保存液配制。

7.1.3 胚胎冷冻保存操作步骤

胚胎冲洗、装管、记录

- a) 胚胎 1、2 级用于冷冻。冷冻前将胚胎在保存液冲洗 4 次~6 次,然后直接放入冷冻液,并将胚胎装入细管。

认真填好所有明细;细管中胚胎的供体牛号、发育期、数量、质量用以下形式表示:如 1 枚 1 级桑椹胚表示为 1M₁。其中 M 表示发育期,1M₁ 左侧“大 1”表示数量,右侧“小 1”表示质量。

- b) 将细管放到冷冻仪冷冻。

胚胎冷冻程序

胚胎→保存液洗 4 次~6 次→10%甘油/保存液或 1.5 mol/L 乙二醇/保存液→平衡 15 min~20 min 装管→冷冻仪(−5.5℃~−7.0℃)平衡 5 min→植冰→继续平衡 5 min→以 0.3℃/min~0.6℃/min 的速率下降→−32℃~−35℃→平衡 5 min→投入液氮。

7.2 胚胎的解冻

7.2.1 胚胎解冻所需的仪器、器材

体视显微镜、温度计、解冻用保温杯、0.25 mL 塑料细管、吸卵管、细管推杆、装管器、Φ90 mm 塑料培养皿、0.22 μm 针头式细菌滤器。

7.2.2 胚胎解冻所需溶液

保存液:含 0.4%牛血清白蛋白(进口)的 PBS 液。

解冻液:1 mol/L 蔗糖/保存液。

7.2.3 胚胎解冻方法

10%甘油/保存液冷冻胚胎的解冻:

装胚细管→空气浴(18℃~25℃)10s→32℃水浴 10s→擦干细管→剪去细管塞→推出胚胎→解冻液 4 min→保存液,冲洗 5 次~6 次→镜检→装管。

1.5 mol/L 乙二醇/保存液(含 0.1 mol/L 蔗糖)冷冻胚胎的解冻(一步细管法):

装胚细管→空气浴(18℃~25℃)10s→32℃水浴 10s→擦干细管→剪去细管塞→把细管装入移植枪→移植(胚胎解冻后 5 min 内移入受体)。

8 受体的选择及饲养管理

8.1 受体的选择

- a) 有正常的发情周期,无繁殖机能疾病,经检疫无传染疾病,健康、营养状况良好。
- b) 年龄在 18 月龄至 6 周岁,经产牛分娩在 90 d 以上,产犊性能和哺乳能力良好,无流产史。
- c) 配种两个情期以上的难孕母牛不能作为受体。

8.2 受体饲养管理

- a) 受体牛在移植前 8 周开始补饲,加强饲养管理。
- b) 受体牛在移植前 5 周,注射维生素 A、维生素 D、维生素 E 针剂,补充微量元素,如硒、锌等。
- c) 受体牛单独组群、编号、饲养,保持环境相对稳定,避免应激反应。

9 牛胚胎非手术移植

9.1 受体的同期发情处理

9.1.1 同期发情处理方法

同期处理之前受体牛进行直肠触摸,检查卵巢是否有周期性黄体。

肌注 PG 法

第一次注射:在任意一天。

第二次注射:在第一次注射后第 11 d,第二次注射后 24 h~96 h 时观察发情。

CIDR 法

在任意一天放入 CIDR。放 CIDR 日定为 0 d,在第 7 d~9 d 注射 PG,第 9 d~11 d 取出 CIDR,观察发情。

9.2 受体牛的发情鉴定

应对受体牛跟群观察,以受体牛稳定站立接受其他牛爬跨为发情。准确记录。

9.3 受体牛的胚胎移植

9.3.1 移植所需器械、药品

移植枪、塑料硬外套管、隔离无菌外套、碘酊棉球、剪毛剪、2%利多卡因、70%酒精棉球、5 mL 一次性注射器、无菌纸、生理盐水棉球。

9.3.2 受体牛移植操作步骤

- a) 受体牛在发情后 6 d~8 d 均可进行移植(发情之时定为 0 d)。移植前对受体牛进行直肠检查,检查黄体,有发育黄体的母牛用于移植。
- b) 受体牛实行 1~2 尾椎间硬膜外麻醉,清洗消毒外阴部。
- c) 对照供体牛采胚记录表和合格受体牛的发情记录,受体牛和胚胎胎龄相吻合。
- d) 解冻胚胎。
- e) 重新将胚胎装入 0.25 mL 塑料细管(一步细管法不需要重新装管)。
- f) 细管装入移植枪。注意移植枪的前端保持无菌。
- g) 把装有细管的移植枪套上移植硬外套,再套上无菌隔离外套。
- h) 将胚胎移植到受体牛有黄体侧子宫角。
- i) 按附录 G 做好受体牛移植记录。

9.3.3 胚胎发育期与受体移植时间的对应关系

胚胎发育期与受体移植时间的对应关系见附录 F。

10 妊娠的牛饲养管理

在移植后 60 d~90 d 对受体牛进行妊娠检查,对已妊娠的受体牛要加强饲养管理,避免应激反应。

妊娠受体牛在产前 3 个月要补充足量的维生素、微量元素,适当限制能量摄入,保证胎儿的正常发育,避免难产。

附 录 A
(资料性附录)
前期准备激素剂量

A.1 用于超数排卵的激素

FSH(促滤泡素):①国产 FSH,10 mg/瓶;②进口 FSH,400 mg/20 ml/瓶。

前列腺素(PG):①国产前列腺素,0.2 mg/2 ml/瓶。②进口 PG,5 mg/20 ml/瓶。CIDR:含有孕激素阴道塞。

A.2 激素剂量(注射总量/头)

FSH 剂量(肌注)见表 A1。

表 A.1 FSH 推荐剂量

	奶 牛	肉 牛
经产牛	9 mg~11 mg(中国科学院制剂) 300 mg~400 mg(加拿大制剂)	8 mg~9 mg(中国科学院制剂) 250 mg~350 mg(加拿大制剂)
育成牛	8 mg~12 mg(中国科学院制剂) 200 mg~300 mg(加拿大制剂)	6 mg~8 mg(中国科学院制剂) 200 mg~250 mg(加拿大制剂)
注:PG 剂量:各品种的经产牛及育成牛肌注国产 PG 0.6 mg 或进口 PG 3.0 ml。		

附 录 B
(资料性附录)
FSH 4 d 注射法

表 B. 1

发情周期天数 时 间 剂 量		0	9	10	11	12	13	14
早		发情	FSH 2.8 mL	FSH 2.3 mL	FSH 2.3 mL+ 0.6 mL PG	FSH 1.8 mL	发情 AI	AI
晚			FSH 2.8 mL	FSH 2.3 mL	FSH 2.3 mL	FSH 1.8 mL		AI
注：(1)本表以 FSH 总剂量 368 mg 为例： $(2.8+2.3+2.3+1.8) \times 2 \times 20 = 368 \text{ mg}$ ； (2)FSH 为进口(每瓶 400 mg)用 20 mL 生理盐水稀释； (3)第 5 针注射 FSH 时，同时肌注国产氯前列腺烯醇 0.6 mg，或进口 PG 3.0 mL； (4)AI 表示人工授精。								

附录 C

(资料性附录)

杜氏磷酸盐缓冲液 (PBS) 配方

表 C. 1

成 分	g/L
NaCl	8.0
KCl	0.20
Na ₂ HPO ₄ (Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	1.5 (2.916)
CaCl ₂ (CaCl ₂ · 2H ₂ O)	0.10 (0.132)
KH ₂ PO ₄	0.20
MgCl ₂ (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	0.10 (0.213 3)
丙酮酸钠	0.036
葡萄糖 (葡萄糖 · H ₂ O)	1.00 (1.10)
青霉素	0.075
链霉素	0.005

配制说明:

- 1) 配制 PBS 的所有成分必须是分析纯以上的化学制剂。
- 2) 配制 PBS 所用水是电阻值超过 18 MΩ 的超纯水。
- 3) 可以用进口 PBS 粉剂, 直接用超纯水配制, 详见产品使用说明。
- 4) 配好的冲卵液需过滤灭菌、低温保存 (4℃~5℃), pH 为 7.2~7.6, 渗透压为 270 mOs~290 mOs。

附 录 D
(资料性附录)
供体牛采胚记录表

液氮罐_____ 提漏号_____ 国产/进口_____ 冲胚时间_____

畜主_____ 供体_____ 耳号_____

品种_____ 注册号_____ 精液编号_____

公畜_____ 注册号_____ 冷冻日期_____

激素处理：发情日_____ LH_____

FSH 品牌（厂家）_____ 批号_____ 孕酮处理_____

日 期	FSH	备 注
	早	
	晚	
	早	
	晚	
	早	PG
	晚	
	早	
	晚	
	早	

预计发情日_____

实际发情日_____

人工授精日_____

第一次_____

第二次_____

第三次_____

技术员_____

采胚：

时间_____

黄体_____

卵泡_____

回收_____

冷冻_____

移植_____

桑椹胚_____

囊胚_____

退化_____

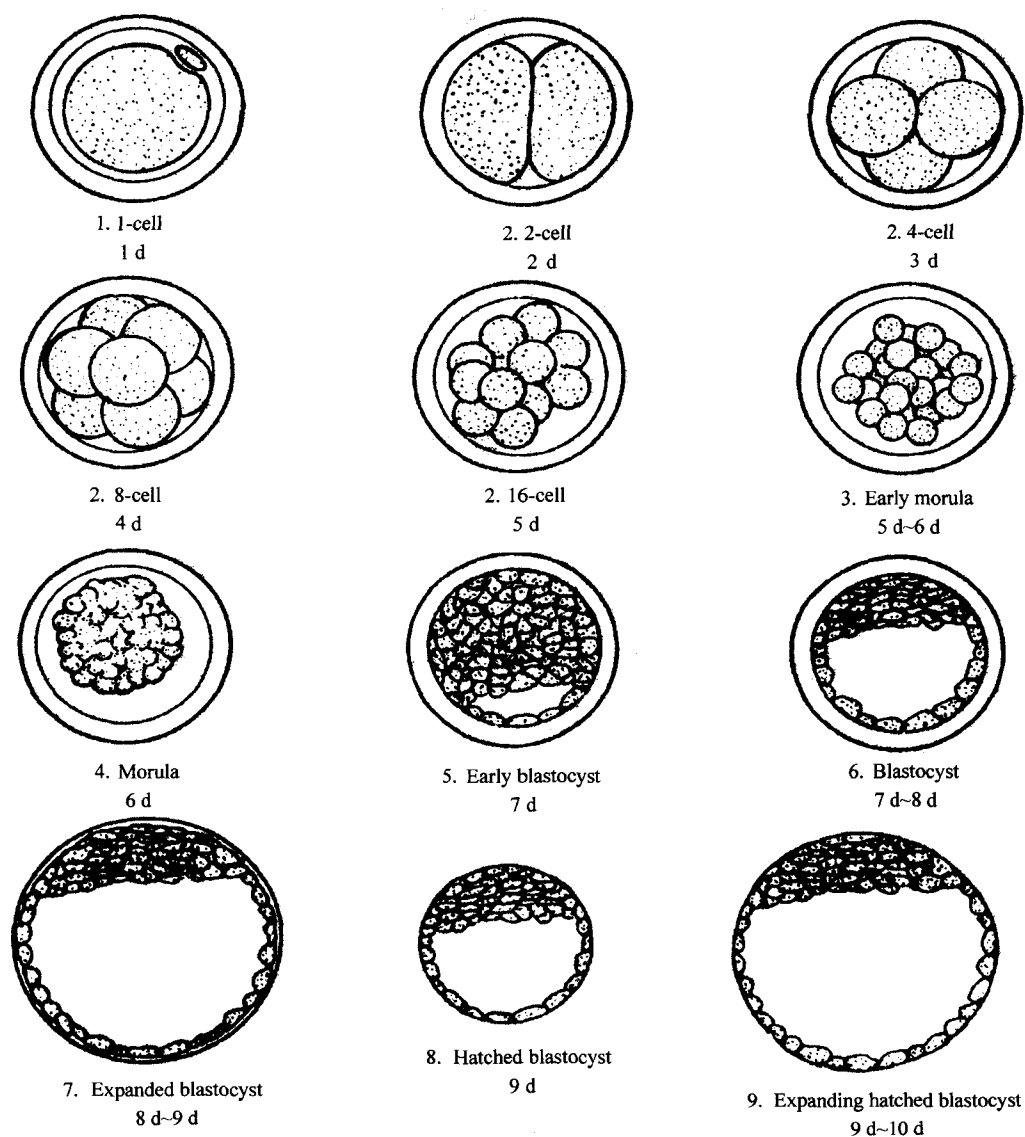
未受精卵_____

小筒编号	细管号和颜色	胚胎数和质量	解冻日期	备 注

冷冻液：10%甘油

1.5 mol/L 乙二醇（直接移植）

附录 E
(资料性附录)
早期胚胎的发育形态模式图



1. 未受精卵或1-细胞胚胎, 为1日龄胚胎
3. 早期桑椹胚, 为4~5日龄胚胎
5. 早期囊胚, 为5.5~6.0日龄胚胎
7. 扩张囊胚, 为6.5~7.5日龄胚胎
9. 扩张的孵化囊胚, 为9.0~10.0日龄胚胎

2. 2-16-细胞胚胎, 为2~4日龄胚胎
4. 紧缩桑椹胚, 为5.5~6.0日龄胚胎
6. 囊胚, 为6.0~6.5日龄胚胎
8. 孵化囊胚, 为7.5~8.0日龄胚胎

图 E.1 早期胚胎的发育形态模式图

附 录 F

(资料性附录)

胚胎发育期与受体移植时间的对应关系

胚胎发育期	受体移植时间 (发情之时为 0 d 时)
桑椹胚胎 (M)	6.0 d~6.5 d
早期囊胚 (EB)	6.5 d~7.0 d
囊胚 (B)	7.0 d~7.5 d
扩张囊胚 (EXB)	7.5 d~8.0 d

附 录 G
(资料性附录)
受体牛胚胎移植记录表

表 G. 1

[illegible]