



中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1674—2008

牛羊胚胎质量检测技术规程

Detection procedures for quality evaluation
in embryos of bovine and ovine

2008-08-28 发布

2008-10-01 实施

中华人民共和国农业部 发布

前 言

本标准的附录 A 为规范性附录,附录 B 和附录 C 为资料性附录。

本标准由中华人民共和国农业部畜牧业司提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:全国畜牧总站。

本标准主要起草人:王志刚、刘丑生、朱玉林、赵俊金、孙秀柱、于福清、张桂香、孙飞舟。

牛羊胚胎质量检测技术规程

1 范围

本标准规定了牛羊胚胎形态评定和发育情况检测技术规程。

本标准适用于新鲜的、冷冻的体内胚胎和体外胚胎的质量检测。

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 5458 液氮生物容器

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 术语

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

超低温保存 cryopreservation

在-196℃的超低温中，胚胎新陈代谢停止，从而使其长期保存。

3.2

胚胎解冻 embryo thawing

将冷冻保存的胚胎按一定的程序融化，并脱除冷冻保护剂，使胚胎恢复新陈代谢的过程。

3.3

胚胎体外培养 embryo in vitro culture

胚胎在体外培养液中模拟体内环境培养，使其继续发育的过程。

4 抽样方法和保存

4.1 抽样方法

抽样方法和数量参照 GB/T 18088。

4.2 样品的保存

样品应保存在-196℃的液氮环境中，并符合如下条件：

——存放冷冻胚胎的低温容器应符合 GB/T 5458 规定，使用前经过清洗后加入液氮。取放样品时，在空气中暴露时间不能超过 5 s。

——样品由专人保管，不能脱离液氮。

4.3 信息的记录

抽样时，应详细记录样品包装上标记的信息。

5 检测环境

应在洁净环境条件下进行检测。

6 检测方法

牛羊胚胎质量检测操作方法见附录 A。

7 结果表述

××胚胎的发育阶段为×××；级别为××；在 38℃~39℃、5%二氧化碳、95%空气和相对饱和度条件下培养 24 h(或 48 h)，胚胎由××阶段发育到××阶段。

附 录 A
(规范性附录)
牛羊胚胎质量检测操作方法

A.1 试剂

A.1.1 胚胎培养液(推荐使用 TCM199+20%FCS)

A.1.2 甘油

A.1.3 乙二醇(EG)

A.1.4 蔗糖

A.1.5 PBS 配方

PBS 配方见表 A.1。

表 A.1 PBS 配方

A 液	试剂名称	浓 度
	NaCl	8.0 g/L
	KCl	0.20 g/L
	CaCl ₂	0.10 g/L
	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.20 g/L
B 液	Na ₂ HPO ₄ · 7H ₂ O	2.16 g/L
	KH ₂ PO ₄	0.20 g/L

A.1.5.1 配制好的 A、B 液分别高压灭菌,保存待用。

A.1.5.2 使用前,把 B 液缓慢倒入 A 液,充分混合,每 1 L 溶液中添加丙酮酸钠 0.036 g、葡萄糖 1.0 g、牛血清白蛋白 4.0 g(或灭活血清 10 mL~20 mL)和抗生素(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μg/mL),充分混合后定容,用 0.22 μm 滤器过滤除菌,待用。配成的 PBS 液 pH 为 7.2~7.3,渗透压 290 mOsm~300 mOsm。

A.1.6 成品 PBS 配制

A.1.6.1 用灭菌双蒸水分别将 A、B 原粉溶解,用容量瓶定容到 1 000 mL。

A.1.6.2 加入灭活血清 10 mL~20 mL,充分混匀待用。

A.1.7 保存液:含 0.4%牛血清白蛋白的 PBS 液。

A.2 仪器设备

A.2.1 二氧化碳培养

A.2.2 胚胎冷冻仪

A.2.3 液氮罐

A.2.4 体视显微镜

A.2.5 恒温台

A.2.6 电子天平(精确到 0.1 mg)

A.2.7 超净工作台

A.2.8 超声波清洗器

A.2.9 超纯水器

A.2.10 电热鼓风干燥箱

A.2.11 高压灭菌器

A.3 检测内容与方法

A.3.1 待检胚胎应有完整的系谱资料(适用于体内胚胎和活体采卵体外受精胚胎)

A.3.2 样品包装的标记应规范完整

A.3.3 胚胎质量

A.3.3.1 检测方法

A.3.3.1.1 胚胎的形态学检测

借助于显微镜对胚胎的发育阶段和发育状况进行形态学观察。

A.3.3.1.2 胚胎的体外发育能力检测

在 38℃~39℃,5%二氧化碳、95%空气和相对饱和湿度的条件下,对胚胎进行体外培养并于 24 h 或 48 h 观察胚胎的存活情况和发育阶段。

A.3.3.1.3 冷冻胚胎应按照程序要求进行解冻后检测,胚胎解冻程序参见附录 B。

A.3.3.2 胚胎质量检测内容

A.3.3.2.1 胚胎发育阶段

胚胎的发育阶段应与标注的阶段一致。植入前胚胎各个阶段主要特点如下:

- a) 桑椹胚(morula)——可观察到球状的细胞团,细胞团占透明带内腔 50%~60%。
- b) 致密桑椹胚(compact morula,CM)——卵裂球细胞进一步分裂变小,细胞团占透明带内腔 60%~70%。
- c) 早期囊胚(early blastocyst,EB)——内细胞团的一部分出现囊胚腔,但难以分清内细胞团和滋养层,细胞团占透明带内腔 70%~80%。
- d) 囊胚(blastocyst,BL)——内细胞团和滋养层界限清晰,囊胚腔明显,细胞充满透明带内腔。
- e) 扩张囊胚(expanded blastocyst,EXB)——囊腔体积增大到原来的 1.2 倍~1.5 倍,透明带变薄。
- f) 孵化囊胚(hatched blastocyst,HB)——囊胚腔继续扩大,透明带破裂,细胞团脱出。

A.3.3.2.2 胚胎发育状况

正常发育胚胎透明带完整,形态规则,色调均匀一致,透明度适中。根据形态学及发育程度划分,胚胎质量分为 A、B、C、D 四个等级,参考图片参见附录 C。

A.3.3.2.2.1 A 级

胚胎的发育阶段与预期的发育阶段一致。胚胎形态完整,轮廓清晰,呈球形,分裂球大小均匀,结构紧凑,色调和透明度适中,胚胎细胞团呈均匀对称的球形,透明带光滑完整,厚度适中,不规则的细胞相对较少,变性细胞不高于 15%。

A.3.3.2.2.2 B 级

胚胎的发育阶段与预期的发育阶段基本一致。胚胎形态较完整,轮廓清晰,色调及细胞密度良好,透明带光滑完整,厚度适中,存在一定数量大小和形状不规则的细胞或细胞团,有一定数量细胞的颜色明暗不一、密度不均匀,但变性细胞不高于 50%。

A.3.3.2.2.3 C 级

胚胎的发育阶段与预期的发育阶段不一致。胚胎形态不完整,轮廓不清晰,色调发暗,结构较松散,

游离的细胞较多,但变性细胞不高于 75%。

A.3.3.2.2.4 D 级

胚胎的发育阶段与预期的发育阶段不一致,包括退化的胚胎、未受精卵或 1 细胞胚胎及 16 细胞以下的受精卵。内细胞团有较多碎片、轮廓不清晰、结构松散,变性细胞比例高于 75%。

A.3.3.3 相关要求

A.3.3.3.1 每次至少 2 人参加检测,独立评定,得出综合评定结果。如果二者差异较大,另外安排 2 人重新进行评定。

A.3.3.3.2 鉴定结果应做鉴定记录,资料存档待查。

附 录 B
(资料性附录)
冷冻胚胎解冻方法

B.1 甘油冷冻胚胎的解冻程序

B.1.1 配制解冻液

分别配制含 10%、6%、3%甘油的 0.1 mol/L 蔗糖 PBS 解冻液,用 0.22 μm 滤器过滤除菌。

B.1.2 胚胎解冻

从液氮罐中取出装有胚胎的细管,室温下空气浴 10 s 后投入 32℃~35℃水浴中 2 min。

B.1.3 脱除甘油

用消毒卫生纸擦干细管,剪去封口端,将胚胎推入培养皿中;然后,将胚胎依次移入 6%、3%、0%甘油的 0.1 mol/L 蔗糖 PBS 解冻液中,分别停留 5 min;最后,用保存液洗 3 次,镜检。

B.2 乙二醇冷冻胚胎的解冻程序

B.2.1 胚胎解冻

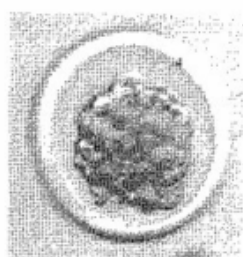
胚胎解冻操作步骤同 B.1.2。

B.2.2 脱除乙二醇

用消毒卫生纸擦干细管,剪去封口端,将胚胎推入培养皿,用保存液洗 3 次,镜检。

附录 C
(资料性附录)
胚胎图片示例

C.1 桑椹胚胚胎质量示例



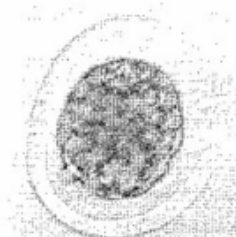
胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:B



胚胎质量:C



胚胎质量:C

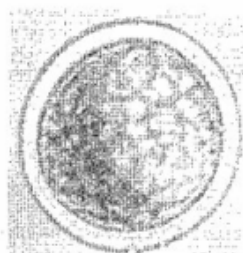


胚胎质量:C

C.2 囊胚胚胎质量示例



胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:A



胚胎质量:B



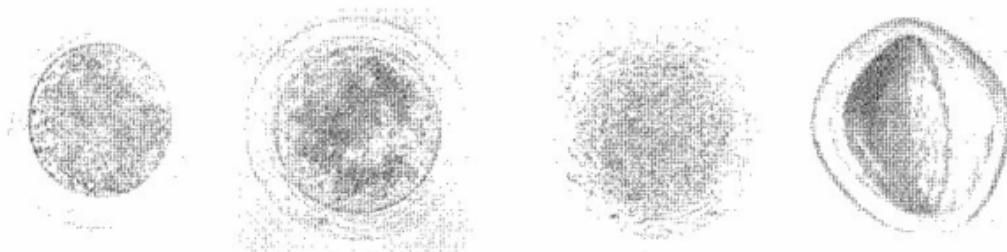
胚胎质量:B



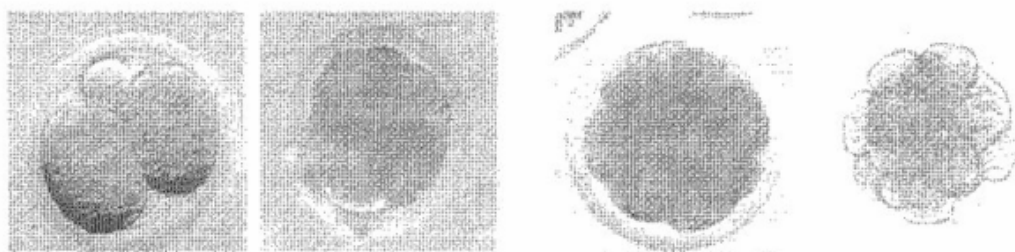
胚胎质量:C

C.3 D级胚胎质量示例

C.3.1 未受精卵



C.3.2 2细胞~16细胞



C.3.3 变异胚胎

