

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1571—2007

羊胚胎移植技术规程

Technology regulations for sheep (goat) 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 F 为资料性附录。

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、陈巴特尔、呼格吉勒图、黄春华、韩锦龙、哈申高娃、栗军、刘长海。

羊胚胎移植技术规程

1 范围

本标准规定了羊胚胎移植技术规程。

本标准适用于羊胚胎生产和移植技术操作。

2 术语和定义

2.1

供体羊 donor

指提供胚胎的母羊。

2.2

受体羊 recipient

指接受胚胎的母羊。

2.3

羊胚胎移植技术 ovine embryo transfer technology

将良种母羊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羊体内,使之继续发育成个体的技术。

3 供体羊的选择与饲养管理

3.1 供体羊的选择

- a) 供体羊品种优良、生产性能好、经济价值高。
- b) 遗传性能稳定、谱系清楚。
- c) 体质健壮、繁殖机能正常、无遗传病、生殖疾病和传染性疾病。年龄在 1~5 周岁。
- d) 产历清楚,性周期正常。
- e) 产羔 90 d 以上,经观察至少有 2 个以上正常发情周期的母羊。

3.2 供体羊的饲养管理

3.2.1 饲养环境

保持饲养环境温度稳定、适宜、卫生、干燥、避免应激反应。

3.2.2 饲喂方式

制定合理的供体羊日粮配方,保证营养平衡,满足清洁饮水,适当的运动。

4 供体羊的超数排卵及人工授精

4.1 超数排卵

4.1.1 超数排卵的季节和发情周期

绵羊和山羊最适超排季节为 9 月上旬至 12 月下旬。绵羊的发情周期在 15 d~17.5 d,山羊在 19 d~22 d。供体母羊在超排前期需要观察 2 个完整的发情周期。

4.1.2 用于超数排卵的激素选择

- a) 国产激素类:FSH(促卵泡素)、LH(垂体促黄体生成素)、PG(前列腺素)、CIDR(含孕激素阴道栓塞)。

b) 进口激素类:可使用国外生产的同类优质产品。

4.1.3 激素剂量(注射总量/只)

FSH(国产)剂量。

绵羊:90 U~200 U。

山羊:90 U~160 U。

LH(国产)剂量:根据 FSH 的注射剂量,肌注 80 U~120 U。

PG 剂量各品种的绵羊和山羊肌注 0.08 mg/次~0.1 mg/次。

注:进口药品参照其产品说明书确定剂量。

4.1.4 超数排卵方法

4.1.4.1 自然发情或 PG 同期法

绵羊以母羊发情之日作为发情周期的 0 d,在母羊发情周期的 13 d 或 13.5 d(周期在 17.5 d 的羊在第 13.5 d)开始,每天早晚各注射 1 次 FSH,中间间隔时间 12 h,连续 3 d,递减注射。

山羊以母羊发情之日作为发情周期的 0 d,在母羊发情周期的 15 d 开始,每天早和晚各注射的 1 次 FSH,中间间隔时间 12 h,连续 3 d,递减注射,注射方法见附录 A。

4.1.4.2 孕激素法

绵羊的放入 CIDR 之日作为 0 d,在放入 CIDR 的 9 d~13 d 开始超排,注射方法见附录 A,在第 6 针注射 FSH 时取出 CIDR。

山羊以放入每一个 CIDR 之日为 0 d,在放入 CIDR 的第 13 d 更换第二个 CIDR,在放入第一个 CIDR 的第 15 d 开始超排,注射方法见附录 A,在第 6 针注射 FSH 时取出 CIDR。

4.1.5 供体羊发情鉴定

在第 6 次注射 FSH 时即对超排供体羊观察发情。观察时间:早晚各 1 次,每次不少于 0.5 h。观察方法:试情公羊系好试情布,放入母羊群中试情,每 30 只~40 只供体羊放 1 只试情公羊,以母羊站立接受试情公羊爬跨作为发情的标准,并记录好发情的准确时间。

4.2 配种

4.2.1 对种公羊的选择

谱系健全,检疫合格,遗传性能稳定,生产性能优良,精液品质良好。

4.2.2 采精、输精

a) 采精前对种公羊外生殖器清洗消毒。采精、精液稀释、输精用的器具严格灭菌、消毒。

b) 母羊外阴部必须经过清洗消毒。

c) 稀释后的精液温度要保持在 25℃左右。

d) 用开膈器打开阴道找到子宫颈外口,将输精器插入子宫颈外口不少于 1 cm,注入定量精液。

4.2.3 配种的最适时间

确认发情时立即进行第一次输精,之后每隔 12 h 输精 1 次。鲜精液活力在 70%以上,每次输精有效精子数不少于 3×10^7 ,输精次数 3 次~4 次。

5 羊手术冲胚及胚胎质量鉴定

5.1 手术冲胚

5.1.1 冲胚主要器材

手术台、剃毛刀、创布、止血纱布、剪毛剪、手术刀柄、手术剪、止血钳、巾帕钳、持针器、肠钳(带乳胶管)、手术刀片、缝合针、镊子、Φ120 mm 表面皿、Φ180 mm 表面皿、6#~8# 头皮针(尖端磨钝)、18#~20# 针头(尖端磨钝)、Φ10 mm 透明硅胶管、10 mL 注射器、20 mL 注射器、Φ8 mm 玻璃管和 Φ35 mm 培养皿等。

5.1.2 冲胚所需药品

酒精、碘酊、新洁尔灭、0.9%生理盐水、青霉素、全麻药和解麻药(山羊麻醉用)等。

5.1.3 冲胚液的配置

杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)配方见附录 B。

5.1.4 供体羊手术冲胚步骤

按附录 C 做好采胚记录。

5.1.4.1 供体羊手术

手术部位在离乳房前端约 2 cm 处,腹中线的两侧均可。

- a) 手术前空腹 24 h~36 h,适量饮水。
- b) 麻醉及保定:麻醉剂量视绵、山羊体重而定,将母羊侧卧或仰卧保定。
- c) 剪去手术部位的毛,剪毛范围约 20 cm×20 cm。用肥皂水清洗手术部位,同时用剃毛刀剃净毛茬,再用水洗净。
- d) 用 0.1%的新洁尔灭消毒手术部位。
- e) 用 2%~4%碘酒消毒。
- f) 用 70%酒精棉球对手术的部位脱碘、晾干。
- g) 盖手术创布,并固定。
- h) 避开血管,用手术刀将手术部位纵向切开 3 cm~5 cm 长的刀口,将皮下结缔组织分离,暴露肌膜。
- i) 用手术刀将肌膜轻轻切开,暴露肌肉层,再用刀柄后端将肌肉层和腹膜钝性分开。
- j) 在骨盆腔,耻骨前沿触膜子宫角,并将子宫、卵巢引出刀口外,记录两侧卵巢黄体 and 卵泡数。

5.1.4.2 输卵管冲胚

在超排羊发情后 66 h~72 h 从输卵管采集 2~8 细胞胚胎。

方法:用 6#~8# 头皮针从宫管连接部的子宫端导入到输卵管峡部,将冲卵管从输卵管喇叭口插入 2 cm 左右,冲卵管远端与 $\Phi 120$ mm 表面皿相接,事先用 10 mL 注射器抽取 5~8 mL 冲卵液,与头皮针连接,把冲卵液缓缓推出,胚胎即通过母羊输卵管回收到表面皿中。另一侧输卵管操作同上。

5.1.4.3 子宫冲胚

在超排母羊发情后 5.5 d~7.0 d,从子宫采集桑椹胚至扩张囊胚,胚胎可用于移植、冷冻、分割及其他研究。

方法:用 18#~20# 针头在子宫角基部扎一小孔,然后将 8#~10# 冲卵管从此孔导入子宫角大弯处,给冲卵管气囊,充气(充气量 2 mL~5 mL),拔出冲卵管内芯,在宫管连接部用 6#~8# 针头扎入子宫角,用 20 mL 注射器与针头连接,把冲胚液注入子宫腔。用 $\Phi 180$ mm 表面皿接收冲胚液。另一侧子宫角冲胚方法同上。每侧子宫角需 40 mL 冲胚液。

可根据实际需要选择输卵管冲胚法或子宫胚法。

冲胚完毕后,用 25℃~30℃的生理盐水将子宫及卵巢洗干净。

供体母羊创口采用两层缝合法。即腹膜与肌肉进行缝合;皮肤进行节结缝合;针角间距 1 cm。在肌肉与皮肤间撒适量青霉素粉,以防创口感染。

5.2 胚胎发育期鉴定

5.2.1 检胚

盛有冲胚回收液的表面皿放在体视显微镜下,在 18℃~25℃内镜检,将检出的胚胎放入盛有保存液的 $\Phi 35$ mm 培养皿中。

5.2.2 胚胎形态学鉴定方法

- a) 输卵管胚:胚胎处于 2~8 细胞发育期;卵裂球轮廓清楚,球体饱满,明暗度适中,数目吻合,为

可用胚。

b) 子宫胚胎:处于3~7发育期的胚胎质量鉴定,分为1、2、3、4级。

1级:发育正常,胚龄与发育期相吻合,卵裂球轮廓清楚,明暗度适中,细胞密度大,卵裂均匀。细胞变性率不超过10%,见附录C。

2级:胚龄与发育期基本吻合,轮廓清楚,明暗适中或稍暗或稍淡,细胞密度较小或小型卵形球过多,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,细胞变性率为30%~40%。

4级:退化胚、变性胚。

6 胚胎的冷冻保存及解冻

6.1 胚胎的冷冻保存

6.1.1 胚胎冷冻保存所需仪器、器材

体视显微镜、胚胎冷冻仪、吸尿管、细管、细管塞、装管器、细菌过滤器、培养皿。

6.1.2 胚胎冷冻保存所需溶液

保存液:含有0.4%牛血清白蛋白或20%血清的PBS液。

10%甘油冷冻液:用保存液配制。

1.5 mol/L 乙二醇冷冻液(含0.1 mol/L 蔗糖):用保存液配制。

6.1.3 胚胎冷冻保存操作步骤

6.1.3.1 胚胎装管及记录

1、2级胚胎用于冷冻,冷冻前将胚胎在保存液中冲洗4次~6次,然后直接放入冷冻液,并将胚胎装入细管。

认真填好附录D所有明细;细管中胚胎的发育期、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。

6.1.3.2 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。

6.2 胚胎的解冻

6.2.1 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 针头式细菌滤器等。

6.2.2 胚胎解冻所需溶液

保存液:含0.4%牛血清白蛋白或20%血清的PBS液。

解冻液:1 mol/L 蔗糖保存液。

6.2.3 胚胎解冻方法

a) 10%甘油冷冻胚胎的解冻:

装胚细管→空气浴(18℃~25℃)10 s→32℃水浴10 s→揩干细管→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。

b) 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℃)10 s→32℃水浴10 s→揩干细管→剪去细管塞→镜检。

7 受体羊的选择及饲养管理

7.1 受体羊的选择

- a) 繁殖性能良好,发情周期正常,无繁殖机能疾病,经检疫无传染疾病,营养状况良好。
- b) 年龄在1~4周岁母羊。
- c) 产羔90 d以上,发情正常。

7.2 受体羊的饲养管理

- a) 受体羊在移植前8周开始加强饲养管理。
- b) 受体羊单独组群、编号,保持环境相对稳定,避免应激反应。

8 绵羊、山羊胚胎手术移植

8.1 受体羊的同期发情处理

8.1.1 同期发情处理方法:

药品:前列腺素(PG)、CIDR。

PG法:

第一次注射:任意一天肌注 PG0.1 mg/只。

第二次注射:绵羊在第一次注射后7 d,山羊在第一次注射后9 d~10 d,注射剂量同第一次。第二次注射后12 h~72 h观察发情。

CIDR法:以放入CIDR之日为0 d,绵羊9 d,山羊12 d后取出CIDR,并在取出的前36 h肌注 PG0.1 mg/只,取出CIDR后,12 h~72 h,观察发情。

8.1.2 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 E。

8.2 受体绵羊、山羊的胚胎移植

8.2.1 受体移植所需器械、药品

手术台、剃毛刀、剪毛剪、手术刀柄、止血钳、巾帕钳、持针器、手术刀片、缝合针、缝合线、创布、纱布、16# 针头(尖端磨钝)、35 mm 培养皿、移植器、针头式细菌滤器、5 mL 一次性注射器、酒精、碘酊、新洁尔灭、生理盐水和青霉素等。

8.2.2 受体绵羊、山羊胚胎移植操作步骤

- a) 手术过程同供体母羊的冲胚手术。
- b) 吸取胚胎:用移植器先吸一段约0.5 cm 长的保存液,吸一段约0.3 cm 的空气,然后吸取含胚胎的保存液0.5 cm,吸0.2 cm 空气,然后再吸取0.3 cm 保存液。
- c) 输卵管内移植:将有黄体侧的输卵管伞部拨开,找到管口,把装有胚胎的移植器从管口插入2~3 cm,然后将胚胎轻轻推出即可。
- d) 子宫内移植:将有黄体侧的子宫角取出,用尖端磨钝的16# 针头在子宫壁上扎一小孔,把装有胚胎的移植器从此孔插入子宫腔内,伸至子宫角尖端后将胚胎轻轻推出即可。
- e) 按附录 E 做好受体移植记录。
- f) 受体创口缝合步骤同供体创口缝合。

附 录 A
(资料性附录)

表 A.1 绵羊(山羊)FSH 3 d 注射法

时 间 \ 剂 量 \ 配种周期天数	13 (15)	14 (16)	15 (17)	16 (18)	17 (19)
早	FSH 30	FSH 25	FSH20+PG 0.08 mg	发情 AI LH:120 U	发情 AI
晚	FSH 30	FSH 25	FSH20+PG 0.08 mg	发情 AI	发情 AI
早	FSH 28	FSH 23	FSH18+PG 0.08 mg	发情 AI LH:110 U	发情 AI
晚	FSH 28	FSH 23	FSH18+PG 0.08 mg	发情 AI	发情 AI
早	FSH 25	FSH 20	FSH15+PG 0.08 mg	发情 AI LH:110 U	发情 AI
晚	FSH 25	FSH 20	FSH15+PG 0.08 mg	发情 AI	发情 AI
早	FSH 24	FSH 19	FSH14+PG 0.08 mg	发情 AI LH:110 U	发情 AI
晚	FSH 24	FSH 19	FSH14+PG 0.08 mg	发情 AI	发情 AI
早	FSH 22	FSH 17	FSH12+PG 0.08 mg	发情 AI LH:100 U	发情 AI
晚	FSH 22	FSH 17	FSH12+PG 0.08 mg	发情 AI	发情 AI
早	FSH 20	FSH 15	FSH10+PG 0.08 mg	发情 AI LH:110 U	发情 AI
晚	FSH 20	FSH 15	FSH10+PG 0.08 mg	发情 AI	发情 AI

注:括号中的数字为山羊 FSH 注射周期天数。
 (1)AI 表示人工授精。
 (2)FSH(100 U 安瓿)和 LH(200 U/瓶)用生理盐水稀释。
 (3)在第 5、6 次注射 FSH,同时肌肉注射 PG。
 (4)确定超排处理羊发情后立即注射 LH 同时配种。如果 FSH 未注射完供体羊已发情,停止注射 FSH,立即注射 LH。

附 录 B
(资料性附录)

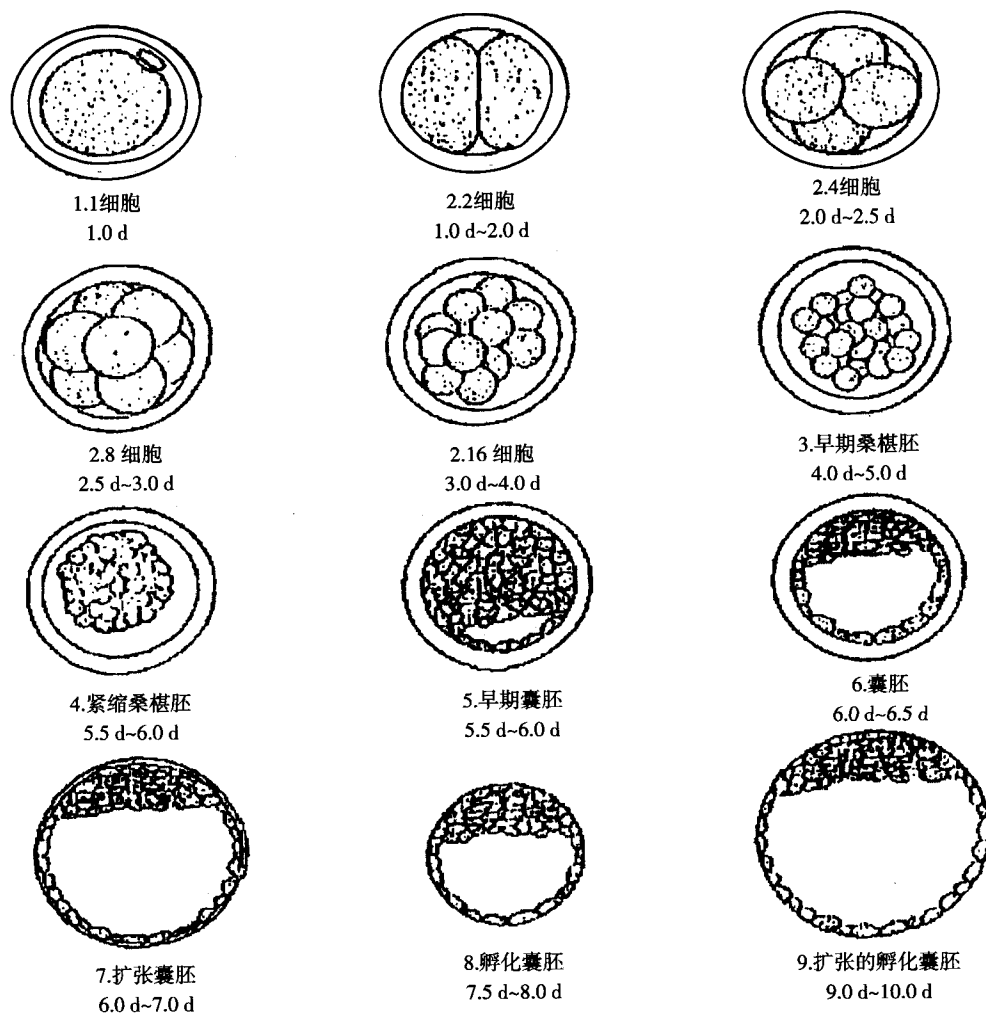
表 B.1 杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)配方

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(0.2133)
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 的所用药品必须是分析纯以上的化学试剂。也可以使用进口成品 PBS 粉剂, 详见产品使用说明书。
- 2) 配制 PBS 所用水是阻值超过 18 MΩ 的超纯水。
- 3) 配好的冲卵液需灭菌, pH 为 7.2~7.6, 渗透压为 270 mOs~290 mOs, 低温保存(4℃~5℃)。

附录 C
(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
2. 2-16-细胞胚胎,为2~4日龄胚胎
3. 早期桑椹胚,为4~5日龄胚胎
4. 紧缩桑椹胚,为5.5~6.0日龄胚胎
5. 早期囊胚,为5.5~6.0日龄胚胎
6. 囊胚,为6.0~6.5日龄胚胎
7. 扩张囊胚,为6.5~7.5日龄胚胎
8. 孵化囊胚,为7.5~8.0日龄胚胎
9. 扩张的孵化囊胚,为9.0~10.0日龄胚胎

图 C.1 早期胚胎的发育形态模式图

附 录 D
(资料性附录)
供体羊采样记录

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)

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)
桑椹胚(M)	5.5 d±0.5 d
早期囊胚(EB)	6.0 d±0.5 d
囊胚(B)	6.5 d±0.5 d
扩张囊胚(EXB)	7.5 d±0.5 d

