

荷斯坦牛生产技术规范 第4部分：胚胎移植

Technical specification of production for Holstein-
Part 4: Embryo transfer

2022 - 08 - 24 发布

2022 - 09 - 24 实施

目 次

前言.....	II
1 范围.....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义.....	1
4 供体和受体的选择.....	1
5 供体超数排卵和受体同期发情.....	1
6 供体母牛的发情鉴定和配种.....	3
7 胚胎采集.....	3
8 拣胚与质量鉴定.....	3
9 胚胎的保存.....	3
10 胚胎移植.....	4
附录 A（资料性） 二步法玻璃化冷冻.....	5
附录 B（资料性） 胚胎移植器操作步骤.....	6

地方标准

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。本文件为 DB61/T 367-2022《荷斯坦牛生产技术规范》的第4部分。DB61/T 367-2022已发布了以下文件：

- 第1部分：牛场建设
- 第2部分：良种登记
- 第3部分：人工授精与妊娠诊断
- 第4部分：胚胎移植
- 第5部分：犊牛饲养管理
- 第6部分：育成牛饲养管理
- 第7部分：青年牛饲养管理
- 第8部分：泌乳牛饲养管理
- 第9部分：干奶牛饲养管理
- 第10部分：青贮玉米制作与使用
- 第11部分：牛场环境控制与无害化处理
- 第12部分：机械挤奶
- 第13部分：传染性疫病防治
- 第14部分：寄生虫病防治
- 第15部分：营养代谢病防治
- 第16部分：肢蹄病防治
- 第17部分：乳房炎防治
- 第18部分：公牛育肥

本文件代替DB61/T 367.1~23-2005《荷斯坦牛标准综合体规划》第8部分，与DB61/T 367.8-2005相比，除结构和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 标准名称修改为：《荷斯坦牛生产技术规范》第4部分胚胎移植。
- 增加了规范性引用文件GB/T 5458、GB/T 25881、GB/T 35568、NY/T 1445，删除了规范性引用文件中《种畜禽管理条例》和地方标准的引用（见内容2）。
- 删除了标准中“3 术语和定义”条款中的内容（见内容3）。
- 将原标准中“4 胚胎移植的基本原则”修改为“4 供体和受体的选择”。
- 将原标准中“4.1 胚胎移植前后所处环境的同一性”和“4.4 供体、受体的状况”的内容修改为“4.1 供体的选择”和“4.2 受体的选择”（见内容4、4.1、4.2）。
- 将原标准中“5 胚胎移植的技术程序”修改为“5 供体超数排卵和受体同期发情”，删除了原标准中“5.2.2 用药方式”的内容，增加了“5.2 供体超数排卵”和“5.3 受体同期发情”的条款和内容，将原标准中“5.4 供体母牛的发情鉴定和配种”修改为“6 供体母牛的发情鉴定和配种”，“5.5 胚胎采集”、“5.6 胚胎的拣出与鉴定”、“5.7 胚胎的保存”、“5.8 胚胎的移植”、修改为“7 胚胎采集”、“8 拣胚与质量鉴定”、“9 胚胎的保存”、“10 胚胎的移植”等内容（见内容5、6、7、8、9、10）
- 增加了“附录A”和“附录B”条款和内容（见附录A、B）。

本文件由陕西省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：西北农林科技大学、杨凌职业技术学院、现代牛业生物技术与应用国家地方联合工程研究中心。

本文件主要起草人：管林森、王国华、辛亚平、田万强、李炳志。

本文件由西北农林科技大学负责解释。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2005年首次发布为DB61/T 367.8-2005；

——本次为第一次修订。

联系信息如下：

单位：西北农林科技大学

电话：029-87091148

地址：陕西省杨凌示范区邠城路3号

邮编：712100

地方标准

荷斯坦牛生产技术规范第4部分：胚胎移植

1 范围

本文件规定了荷斯坦牛在胚胎移植操作过程中的技术要求。

本文件适用于荷斯坦牛的胚胎移植。

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/T 3157 中国荷斯坦牛

GB/T 5458 液氮生物容器

GB/T 25881 牛胚胎

GB/T 35568 中国荷斯坦牛体型鉴定技术规程

NY/T 1445 奶牛胚胎移植技术规程

3 术语和定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 供体和受体的选择

4.1 供体的选择

4.1.1 应选择系谱清楚，综合评定指数或育种值高的母牛。

4.1.2 具有良好的繁殖能力，既往繁殖史正常、易配易孕、没有遗传缺陷、分娩顺利的经验牛，年龄在3岁~6岁之间。

4.1.3 健康无疾、饲养条件稳定、体质健壮及膘情符合 GB/T 35568 的规定。

4.2 受体的选择

4.2.1 受体母牛可选用非优良品种的个体，健康无疾、繁殖性能良好、体格较大、膘情中等、无难产史等。

4.2.2 选择与供体发情同期的母牛，二者发情同步差不宜超过 24 h。

5 供体超数排卵和受体同期发情

5.1 药物选择

根据激素的不同功能,选择FSH(促卵泡素)、PG(前列腺素及其类似物)、CIDR®或CUE-MATE™(孕酮阴道栓)、GnRH(促性腺激素释放激素)、LH(促黄体素)等不同的激素产品对供体牛和受体牛进行处理。

5.2 供体超数排卵

5.2.1 FSH+PG法

在发情周期(发情当天为0 d)的9 d~13 d中的任何一天开始肌注FSH。以递减剂量连续肌注4 d,剂量按总剂量200 mg~400 mg(进口激素)或300 IU~500 IU(国产激素)的40%:30%:20%:10%进行注射。每天注射2次(间隔12 h),总剂量按牛只体重、胎次作适当调整。在第一次注射FSH后48 h及60 h,各肌注一次PG,每次0.4 mg~0.6 mg,若采用子宫灌注剂量可减半。

5.2.2 CIDR®(CUE-MATE™)+FSH+PG法

任意一天(发情日除外)放入CIDR®(CUE-MATE™),第5 d开始递减注射FSH连续4 d,剂量按总剂量200 mg~400 mg(进口激素)或300~500 IU(国产激素)的40%:30%:20%:10%进行注射。与第4针间隔12 h后注射第5针,间隔12 h后注射第6针,每次注射PG 0.4 mg~0.6 mg,注射第6针同时取出CIDR®(CUE-MATE™)。配种前12 h注射GnRH 200 μg,16 d回收胚胎。

5.3 受体同期发情

5.3.1 PG法

5.3.1.1 一次注射法:对受体牛在发情周期的任意一天(除发情当日外)直肠检查,只对卵巢上有黄体的一次性注射PG 0.4 mg~0.6 mg,在注射PG后24 h~96 h查情。

5.3.1.2 两次注射法:在受体牛发情周期的任意一天(除发情当日外),不论卵巢上有无黄体,先注射PG一次0.4 mg~0.6 mg,间隔11 d~14 d再用等量注射一次,在第二次注射后24 h~96 h内观察发情。

5.3.2 CIDR®(CUE-MATE™)+PG法

在受体牛发情周期的任一天(除发情当日外),无论卵巢上有无黄体,将CIDR®(CUE-MATE™)孕酮阴道栓置入阴道内,以置栓之日为0 d,在第7 d一次性肌注PG 0.4 mg~0.6 mg,第9 d取出CIDR®(CUE-MATE™),或在第8 d撤栓的同时注射PG 0.4 mg~0.6 mg。

5.3.3 EB+CIDR®(CUE-MATE™)+PG法

在受体牛发情周期的任一天,将CIDR®(CUE-MATE™)置入阴道内,同时肌肉注射EB(Estradiol Benzoate, EB, 苯甲酸雌二醇)2 mg;第7 d再次注射PG 0.4 mg~0.6 mg,第8 d撤栓,同时再次肌注同等剂量PG。不观察发情,在第16 d~17 d检查黄体状况。

5.3.4 GnRH+PG法

对受体牛不作黄体检查,第1 d注射GnRH或类似物(Fertagy)100 μg或促排3号(LHRH-A3)25 μg,第7天肌注PG 0.4 mg~0.6 mg,第9 d再次肌注同等量的GnRH或类似物(Fertagy)或促排3号(LHRH-A3)。不观察发情,在第16 d检查黄体状况。

6 供体母牛的发情鉴定和配种

应按DB61/T 367.3-2022第3部分人工授精和妊娠诊断要求执行。

7 胚胎采集

7.1 采胚时间与方法

在供体牛发情配种后6 d~7 d, 采用非手术法采集胚胎。

7.2 采胚前的准备

将采胚供体牛牵入保定架内, 呈前高后低姿势。于采胚前10 min, 在尾椎硬膜外注射2 %利多卡因3 mL~5 mL进行麻醉, 也可在颈部或臀部肌注2 %静松灵0.2 mg/kg~0.6 mg/kg麻醉。同时对外阴部冲洗和消毒。

7.3 采胚

7.3.1 操作者将手伸入直肠, 清除粪便, 检查两侧卵巢黄体数目。将冲胚管经子宫颈缓缓导入一侧子宫角基部, 由助手抽出部分不锈钢导杆, 操作者继续向前推进冲胚管, 到达子宫角大弯附近时, 助手从进气口注入12 mL~25 mL空气。气囊位置和充气量合适时, 抽出全部不锈钢导杆。助手用注射器吸取事先加温至37 °C的冲胚液, 从冲胚管的进液口推进, 进入子宫角内, 冲胚液的注入量由刚开始的20 mL~30 mL逐渐加大到50 mL。再将冲胚液连同胚胎抽回注射器内, 如此反复冲洗和回收5次~6次。

7.3.2 每次回收的冲胚液收入集胚器内, 置于37 °C的恒温箱或无菌检胚室内等待检胚。一侧子宫角冲胚结束, 按上述方法再冲洗另一侧子宫角。结束后, 可向子宫内注入或肌注PG, 也可注入抗菌素预防感染。

8 拣胚与质量鉴定

8.1 拣胚

在20 °C~25 °C的无菌操作室内, 体视显微镜下从冲胚液中拣出胚胎。

8.2 胚胎质量鉴定

按GB/T 25881的要求执行。

9 胚胎的保存

9.1 鲜胚保存及运输

9.1.1 鲜胚保存

将鲜胚保存液预热到37 °C, 倒入培养皿中。把合格的胚胎转移到鲜胚保存液里, 用“4节5段”(4个气节, 5段鲜胚保存液)式把胚胎装入细管, 胚胎放到中段液体中。装好胚胎的细管出口端用管塞或热封法封口, 置于37 °C恒温箱中保存。

9.1.2 鲜胚运输

将专用的细胞运输箱，提前预热到37℃，把装好胚胎的细管放入运输箱中，运送到移植地点使用。短距离运输也可将细管贴身保存携带。运输和移植过程中，避免温度骤降、阳光直射。

9.2 冷冻保存

宜采用二步法玻璃化冷冻（见附录A），后置于液氮（-196℃）中保存胚胎，液氮容器应符合GB/T 5458规定。

10 胚胎移植

10.1 鲜胚移植

将胚胎细管装入胚胎移植器中（见附录B）。先将受体直肠内的宿粪掏净，确定黄体侧并记录发育情况，助手分开阴唇，移植者将移植器插入阴道，当移植器前端插入子宫颈外口时，撤回移植器外套上的塑料薄膜套。按直肠把握输精的方法，缓缓将移植器前端插入有黄体侧子宫角的前1/3处，助手迅速将推杆推进，通过细管棉塞把含胚胎的培养液推到移植器前端，经开口处移入子宫角内。

10.2 冻胚移植

10.2.1 胚胎解冻

将装有胚胎的细管用长柄镊子迅速从液氮罐中取出，在空气中晃动5s，浸入30℃~35℃的温水中，轻轻摇动30s后取出立刻装枪移植。

10.2.2 移植时间和方法

在受体牛发情结束的6d~7d解冻胚胎进行移植，移植方法同鲜胚移植。

地方标准

附 录 A
(资料性)
二步法玻璃化冷冻

A.1 二步法玻璃化冷冻

A.1.1.1 宜采用乙二醇或丙三醇以及乙二醇和DMSO为主体抗冻保护剂，配置成玻璃化冷冻液。

A.1.1.2 先用PBS溶液将胚胎洗净，在室温（20℃~25℃）条件下，将胚胎置于10%乙二醇（或丙三醇、或10%乙二醇+10%DMSO）溶液中预处理5 min。

A.1.1.3 在体式显微镜下，采用“4节5段”（4个气节，5段鲜胚保存液）方式将胚胎转入含有上述相同玻璃化冷冻液的细管中，平衡30s后，将细管封口。

A.1.1.4 将封好口的细管倾斜的放入液氮中冷冻10 min后置于液氮罐中长期保存。液氮面应没过细管的胚胎保存位置。

地方标准

附 录 B
(资料性)
胚胎移植器操作步骤

B.1 胚胎移植器操作步骤

- B.1.1 将输胚细管插入输胚软套管中；
- B.1.2 用迷你标签棒将细管完全推入输胚软套管中直至细管完全进入软套管顶部；
- B.1.3 将输胚枪外套管套在输胚枪上，将外套管完全推至底部；
- B.1.4 将输精枪配套推杆插入内置套筒；
- B.1.5 将已经装置好的软套管套在输胚枪内置套筒上；
- B.1.6 将带有输胚细管的软套管完全套在枪膛内置套筒上，直至卡紧；
- B.1.7 推动输胚枪推杆，标签棒前进碰到棉塞，直至软套管接头处有稀释液流出时停止；
- B.1.8 拧开内置套筒的卡扣螺丝，将内置套筒完全拉出并拧紧枪膛螺丝；
- B.1.9 套上输胚枪专用软外套（进入宫颈前将外套管顶端推出软薄膜后再进入宫颈）；
- B.1.10 穿过宫颈后，松开卡扣螺丝并推动内置套筒上的软套筒直至选定的子宫角处；
- B.1.11 软套筒到达正确位置后，完全推进红色推杆输出胚胎。

地方标准

