

DB61

陕西省地方标准

DB61/T 1521.8—2021

奶山羊养殖技术规范 第8部分：胚胎移植

Technical Specifications for Dairy Goat Farming—
Part 8: Embryo transfer of dairy goat

地方标准信息服务平台

2021 - 12 - 17 发布

2022 - 01 - 17 实施

陕西省市场监督管理局 发布

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 供体羊选择与饲养管理.....	1
5 供体羊超数排卵和人工授精.....	2
6 胚胎的采集.....	2
7 胚胎冷冻保存及解冻.....	3
8 受体羊选择与饲养管理.....	4
9 奶山羊胚胎移植.....	4
10 妊娠羊饲养管理.....	4
附录 A（规范性） 胚胎冷冻保存和解冻.....	5
附录 B（规范性） 奶山羊胚胎移植程序.....	7

地方标准信息服务平台

前 言

DB61/T 1521《奶山羊养殖技术规范》分为如下部分：

- 第1部分：关中奶山羊良种鉴定；
- 第2部分：引进奶山羊良种鉴定；
- 第3部分：双基因良种选育；
- 第4部分：种公羊饲养管理；
- 第5部分：后备羊培育；
- 第6部分：泌乳奶山羊健康养殖；
- 第7部分：人工授精；
- 第8部分：胚胎移植；
- 第9部分：苜蓿半干青贮；
- 第10部分：疫病防控；
- 第11部分：机器挤奶。

本部分为DB61/T 1521的第8部分。

本文件根据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》的规则起草。

本部分由西北农林科技大学提出。

本部分由陕西省农业农村厅归口。

本部分起草单位：西北农林科技大学、杨凌职业技术学院、陕西关中奶山羊产业研究院、陕西省奶山羊养殖工程技术研究中心、陕西省羊产业技术创新与产业发展战略联盟、陇县畜产局、三原县动物疫病预防控制中心。

本部分主要起草人：付明哲、侯金星、安小鹏、李广、雷安民、赵晓娥、田秀娥、陈小强、曹斌云、闫柏平、张磊、杨少华、吴双虎。

本部分由西北农林科技大学负责解释。

本部分首次发布。

联系信息如下：

单位：西北农林科技大学

电话：029-87092102

地址：陕西杨凌示范区西农路22号

邮编：712100

奶山羊养殖技术规范 第8部分：胚胎移植

1 范围

本部分规定了奶山羊胚胎移植供体羊选择与饲养管理，供体羊超数排卵和人工授精，胚胎的采集、冷冻保存及解冻，受体羊选择与饲养管理，奶山羊胚胎移植，妊娠羊饲养与管理的要求和方法。

本部分适用于奶山羊胚胎移植、胚胎冷冻保存等。

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 20557 山羊冷冻精液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本部分。

3.1

奶山羊胚胎移植 embryo transfer of dairy goat

将通过体内或体外受精及其他方式得到的奶山羊早期胚胎，移植到处于相似生理状态的母羊体内，使之继续发育为新个体的方法。

3.2

供体 donor

提供胚胎的母羊。

3.3

受体 receptor

接受胚胎的母羊。

4 供体羊选择与饲养管理

4.1 供体羊的选择

品种优良，系谱清楚，遗传性能稳定，生产性能突出；体质健康，无传染性疾病，繁殖机能正常；体重60 kg，泌乳期产奶量超过800 kg，经产1胎~3胎，产后90 d以上的母羊作为供体。

4.2 供体羊饲养管理

饲养环境稳定，舍内温度控制在10℃~26℃，圈舍卫生、干燥。根据膘情调整饲料配方，保持中等以上膘情。

5 供体羊超数排卵和人工授精

5.1 超数排卵

5.1.1 超数排卵所用激素

在奶山羊繁殖最佳季节进行超数排卵,一般为9月~11月。选用进口或国产的垂体促卵泡激素(FSH),氯前列烯醇(pGF2 α 类似物),促黄体素释放激素A3(LHRH-A3),用于超数排卵。

5.1.2 激素剂量

按照产品说明使用。

5.1.3 超排程序

第0天供体母羊阴道内放置羊用硅胶阴道栓,同时肌肉注射氯前列烯醇,第16天肌肉注射FSH,每天早晚间隔12 h注射1次FSH,连续3 d~4 d,剂量依次递减。在最后1次注射FSH的同时,肌肉注射氯前列烯醇,撤除阴道栓观察发情,同时注射促黄体素释放激素A3;未按时发情羊注射FSH,PGF2 α ,促使发情。

5.1.4 供体羊发情鉴定

在撤除阴道栓后的12 h~72 h,对超排供体羊进行发情观察,以接受公羊爬跨作为配种起始时间。

5.2 配种

5.2.1 供体羊选择

在公羊充足的情况下,供体羊宜选择本交进行配种。公羊不足时,供体羊可采用常规人工授精输精。

5.2.2 本交

供体羊每8 h交配一次,直至发情结束。

5.2.3 常规人工授精

输精器械保持清洁无菌,并对母羊外阴清洗消毒。利用鲜精人工授精时,每次输入的有效精子数不低于 1.0×10^8 个,注入精液0.5 mL。每间隔8 h输精一次,直到停止发情为止,适宜输精次数为3次~5次。

5.2.4 腹腔镜子宫输精

5.2.4.1 利用鲜精输精时,可在供体羊撤栓后的36 h~48 h进行,借助腹腔镜观察母羊子宫、卵巢、卵泡发育情况,用腹腔输精枪在两侧子宫角大弯处各输精1次,注入精液0.1 mL~0.2 mL,有效精子数不低 0.5×10^8 个。

5.2.4.2 利用冻精输精时,可在供体羊撤栓后的30 h~36 h进行,用腹腔输精枪分别输精2次,注入精液0.2 mL,有效精子数不低 3.5×10^7 个,间隔8 h~12 h再输精一次。

6 胚胎的采集

6.1 药品、试剂器械

6.1.1 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、表面皿(120 mm)、头皮针(尖端磨钝)、硅胶管双路通管(8 mm)、螺旋回收针、注射器(10 mL, 20 mL)、玻璃管(8 mm)和培养皿(5 mm)等。

6.1.2 冲胚所需药品

杜氏磷酸盐缓冲液(PBS)、胚胎培养液、75%酒精、碘伏、新洁尔灭、0.9%生理盐水、兽用麻醉药和解麻药等。

6.2 供体羊胚胎采集

6.2.1 麻醉与保定

供体羊首次配种后的第5天空腹24 h进行麻醉, 仰卧保定。选择鼠蹊部作为手术部位并剃毛(20 cm×20 cm)。

6.2.2 胚胎采集

6.2.2.1 术部清洗消毒后, 固定创巾。避开乳房和大血管, 纵向切开皮肤3 cm~5 cm长的创口, 分离结缔组织、肌肉层和腹膜, 轻轻拉出子宫和卵巢, 观察和记录两侧卵巢黄体 and 卵泡数。

6.2.2.2 从双侧子宫角回收胚胎。胚胎回收时可用长柄肠钳(齿槽外套乳胶管)夹于子宫角基部, 将子宫角胚胎回收专用管头端植入子宫腔内, 尾端贴于集胚杯的内壁, 拉直宫管结合部, 用连有12号针头的注射器吸取30 mL专用冲胚液, 刺入宫管结合部进行冲胚, 将含有胚胎的冲胚液回收至专用集胚杯内。

6.2.3 胚胎收集

6.2.3.1 胚胎检测无菌室的室温20℃~25℃, 采用体式显微镜在集胚杯中仔细查找并收集胚胎。

6.2.3.2 将检出的胚胎收集到盛有保存液的培养皿中。

6.2.3.3 检出后的胚胎用保存液冲洗3次~4次后再进行质量鉴定。

6.2.4 胚胎质量鉴定

6.2.4.1 根据卵裂球的发育质量和整个胚胎的形态结构, 可将胚胎分为A、B、C、D四个等级:

- a) A级: 胚胎发育阶段与胚龄相吻合, 透明带完整, 卵裂球均匀紧凑, 轮廓清楚, 透明度好, 饱和充盈于透明带内, 整个胚胎呈球形;
- b) B级: 胚胎发育阶段与胚龄相符, 卵裂球均匀紧凑, 透明度好, 无畸形;
- c) C级: 胚胎发育阶段与胚龄相符, 透明带畸形或部分缺失, 卵裂球轮廓不清楚, 细胞分散, 色泽过暗或过淡;
- d) D级: 胚胎发育阶段与胚龄相符, 卵裂球已分散开或细胞已破裂, 失去了继续发育的潜力。

6.2.4.2 A、B级胚胎可用于冷冻保存; A、B、C级胚胎可用于鲜胚移植; D级为不可用于胚胎移植。

6.2.5 创口处理

用37℃的生理盐水将子宫及卵巢冲洗干净以后送入腹腔，给腹腔注入适量抗菌素预防感染。创口采用两层缝合法缝合，其中腹膜连同肌肉进行缝合，皮肤进行结节缝合，针孔间距1 cm。

7 胚胎冷冻保存及解冻

胚胎冷冻保存及解冻按附录A进行。

8 受体羊选择与饲养管理

8.1 受体羊的选择

选择健康、体况中等偏上，年龄在2胎~4胎的中低产经产奶山羊（产后90 d以上）作为受体羊。严禁用患有子宫、卵巢、乳房疾病及发情周期不正常个体作为受体羊。

8.2 受体羊的饲养管理

受体羊统一打号、建档，保持饲养管理稳定，避免各种应激反应，同时做好预防注射和驱虫工作。常规饲养管理，保持中等以上体况，严禁与公羊混群饲养。

9 奶山羊胚胎移植

9.1 受体羊同期发情处理

见附录B表B.1。

9.2 受体羊发情鉴定

从撤除阴道栓后的12 h~36 h开始，观察受体羊发情情况，每6 h记录发情1次。

9.3 胚胎移植

9.3.1 移植时间

受体羊在发情后5 d~6 d之间进行胚胎移植。

9.3.2 移植方法

9.3.2.1 术前禁食 24 h、禁水 12 h 后麻醉。

9.3.2.2 术前母羊仰卧保定在专用手术架。

9.3.2.3 在乳房基部前方沿腹中线向前及两侧区域处进行剃毛（12 cm×12 cm），术部清洗消毒后，固定手术创巾。

9.3.2.4 用套管针在腹中线两侧分别刺入腹腔开孔，将腹腔镜经套管插入腹腔右孔，通过腹腔镜观察受体羊的卵巢、黄体发育情况，将黄体发育好的一侧子宫角轻轻拉出腹腔，在子宫角前端的 1/3 处避开血管扎孔，将装有胚胎的移植针从此针眼进入子宫腔注入胚胎，子宫送入腹腔，缝合创口。

9.3.2.5 术后护理，无感染羊一周后拆线，感染羊进行外科消毒处理。

9.3.2.6 妊娠诊断，术后受体羊 45 d~60 d 采用 B 超进行怀孕诊断。

10 妊娠羊饲养管理

严禁饲喂发霉变质饲料和冰冻饲料，注意防寒保暖，减少应激，同时做好布病和衣原体病的检测及净化工作，防止流产。

地方标准信息服务平台

附 录 A
(规范性)
胚胎冷冻保存和解冻

A.1 胚胎的冷冻保存

A.1.1 仪器、器械

实体显微镜、胚胎冷冻仪、吸胚管、0.25ml麦管、麦管塞、装管器、细菌滤器(0.22 μ m针头式)、培养皿等。

A.1.2 溶液

保存液:含有0.4%牛血清蛋白的PBS。10%甘油冷冻液:用保存液配制成10%甘油冷冻液。1.5 mol/L乙二醇冷冻液:用保存液配制含1.5 mol/L乙二醇和0.1mol/L蔗糖的冷冻保护液。

A.1.3 甘油胚胎冷冻法

A.1.3.1 冷冻方法

第一步,胚胎在保存液中清洗5次~10次后移入1/3 10%甘油冷冻液再加入2/3保存液平衡5 min~7 min;

第二步,胚胎移入2/3 10%甘油冷冻液再加入1/3保存液平衡5 min~7 min;

第三步,胚胎移入10%甘油冷冻液平衡5 min~7 min。

A.1.3.2 冷冻程序

胚胎经三步预处理后装入细管(在10 min~20 min内完成),然后放入胚胎冷冻仪中冷冻。

冷冻程序:以1 $^{\circ}$ C/min速率降温,在-6 $^{\circ}$ C~-7 $^{\circ}$ C下平衡5 min,在-7 $^{\circ}$ C~-7.5 $^{\circ}$ C下平衡10 min,以0.3 $^{\circ}$ C/min速率降温,在-36 $^{\circ}$ C~-38 $^{\circ}$ C下平衡10 min;最后浸入液氮中保存。

A.1.4 乙二醇胚胎冷冻法

A.1.4.1 冷冻方法

胚胎在保存液冲洗5次~10次,然后将胚胎转移到含有0.5 mol/L、1.0 mol/L乙二醇冷冻液中各平衡5 min,转入1.5 mol/L乙二醇冷冻液常温条件下平衡15 min~20 min,并将胚胎装入细管(在10 min~20 min内完成),然后放入胚胎冷冻仪中进行冷冻。

A.1.4.2 冷冻程序

按照 A.1.3.2甘油胚胎冷冻法进行胚胎冷冻。

A.2 胚胎的解冻

A.2.1 器械

实体显微镜、温度计、解冻用水杯、0.25 mL麦管、吸卵管、细管推杆、装管器、细菌滤器(0.22 m针头式)、4个100 mm塑料培养皿。

A.2.2 溶液

A.2.2.1 冷冻液：含 10 %甘油的保存液、1.5 mol/L 乙二醇的保存液。

A.2.2.2 解冻液：用保存液配制的含 1 mol/L 蔗糖溶液。

A.2.2.3 保存液：含有 0.4 %牛血清蛋白的 PBS 液。

A.2.3 胚胎解冻方法

A.2.3.1 胚胎从液氮中取出在空气中停留 10 s，在 30 °C 水浴中解冻 1 min，擦干细管、剪去管塞，推出胚胎，然后进行三步脱甘油或乙二醇操作。

A.2.3.2 冷冻胚胎在 1/3 解冻液,2/3 冷冻液中平衡 5 min~7 min；

A.2.3.3 冷冻胚胎在 1/3 解冻液,1/3 冷冻液,1/3 保存液中平衡 5~7min；

A.2.3.4 冷冻胚胎在 1/3 解冻液,2/3 保存液中平衡 5 min~7 min，最后保存液洗 2 次~3 次，转移到显微镜下进行鉴定。

地方标准信息服务平台

附 录 B
(规范性)
奶山羊胚胎移植程序

B.1 奶山羊胚胎移植程序

奶山羊胚胎移植程序见表B.1。

表 B.1 奶山羊胚胎移植程序

处理时间	供体处理方法	处理时间	受体处理方法
第 0 d 8:00	肌注 PGF2 α , 放置硅胶栓	第 0 d	肌注 PGF2 α , 放硅胶栓
第 12 d 8:00	肌注 FSH; 换栓。		
第 12 d 20:00	肌注 FSH。		
第 13 d 8:00	肌注 FSH。		
第 13 d 20:00	肌注 FSH。	第 13 d 7:00	肌注 PMSG
第 14 d 8:00	肌注 FSH。	第 14 d 20:00	撤栓, 肌注 PGF2 α ,
第 14 d 20:00	肌注 FSH。		
第 15 d 8:00	肌注 FSH, 肌注 PGF2 α , 供体撤栓。	第 15 d	
第 15 d 20:00	首次发情后肌注 LHRH-3; 配种; 不发情羊肌注 PGF2 α 、FSH。	第 15 d	受体早晚试情, 标记, 分圈。
16 d	供体分别在早上,中午, 晚上进行配种。	16 d	受体早上、晚上试情 标记, 分圈。
17 d		17 d	
18 d		18 d	
19 d		19 d	
20 d	手术前 24h 停食鼠蹊部剃毛	20 d	术前 24h 停食乳房基部正前方, 腹中线两侧剃毛。
21 d	手术冲胚	21 d	移植, 放栓。
28 d	7 d 后拆线。	28 d	7 d 后拆线。