

广西壮族自治区地方标准

DB45/T XXXX—XXXX

奶水牛胚胎移植操作规程

Technical code of practice for processing of embryo transfer in
buffalo

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 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 缩略语 2

5 操作流程 2

6 技术操作 2

 6.1 一般原则 2

 6.2 供体水牛的选择和饲养 2

 6.3 受体水牛的选择和饲养 3

 6.4 受体水牛的同期发情处理和发情鉴定 3

 6.5 胚胎生产 4

 6.6 受体水牛的胚胎移植 5

 6.7 受体水牛的妊娠诊断 6

7 档案记录 6

附录 A（资料性） 受体水牛排卵第（5±1）天黄体级别..... 7

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。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由广西壮族自治区农业农村厅提出并宣贯。

本文件由广西畜牧业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区水牛研究所、广西皇氏赛尔生物技术有限公司。

本文件主要起草人：谭正准、黄荣春、李辉、黄健、陈明棠、杨春艳、郑海英、覃广胜、李兆和、鄢胜飞、韦亮源、尚江华、黄加祥、梁淦、罗华。

奶水牛胚胎移植操作技术规程

1 范围

本文件界定了奶水牛胚胎移植技术涉及的术语和定义，给出了奶水牛胚胎移植操作程序，规定了奶水牛胚胎移植技术的供体水牛的选择和饲养、受体水牛的选择和饲养、受体水牛的同期发情处理和发情鉴定、胚胎生产、受体水牛的胚胎移植、受体水牛的妊娠诊断等方面的操作指示，描述了操作过程信息的追溯方法。

本规程适用于广西壮族自治区行政区域内奶水牛的胚胎移植操作。

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 5458 液氮生物容器
- DB45/T 916 水牛胚胎体外生产技术操作规程
- DB45/T 1682 水牛胚胎检测技术规程
- DB45/T 1951 水牛胚胎冷冻保存技术操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胚胎移植 embryo transfer, ET

将良种母畜开展活体采卵、体外受精及其他方式获得的胚胎，移植于同种的生理状态相同的母畜体内，使之继续发育成为新个体的技术。

3.2

供体水牛 donor buffalo cow

提供卵子和胚胎的优秀繁殖母水牛。

3.3

受体水牛 receptor buffalo cow

接受胚胎（移植）的母水牛。

3.4

同期发情 estrus synchronization

使用外源激素来调控母水牛的发情进程，使之在预定的时间内集中发情和排卵。

3.5

黄体 corpus luteum

水牛排卵后由卵泡迅速转变成的富有血管的腺体样结构。

4 缩略语

下缩略语列适用于本文件。

GnRH: 促性腺激素释放激素 (gonadotropin-releasing hormone)

PGc: 氯前列醇注射液 (cloprostenol injection)

CIDR: 阴道孕酮缓释栓 (controlled internal drug releasing)

5 操作流程

奶水牛胚胎移植技术流程见图1。

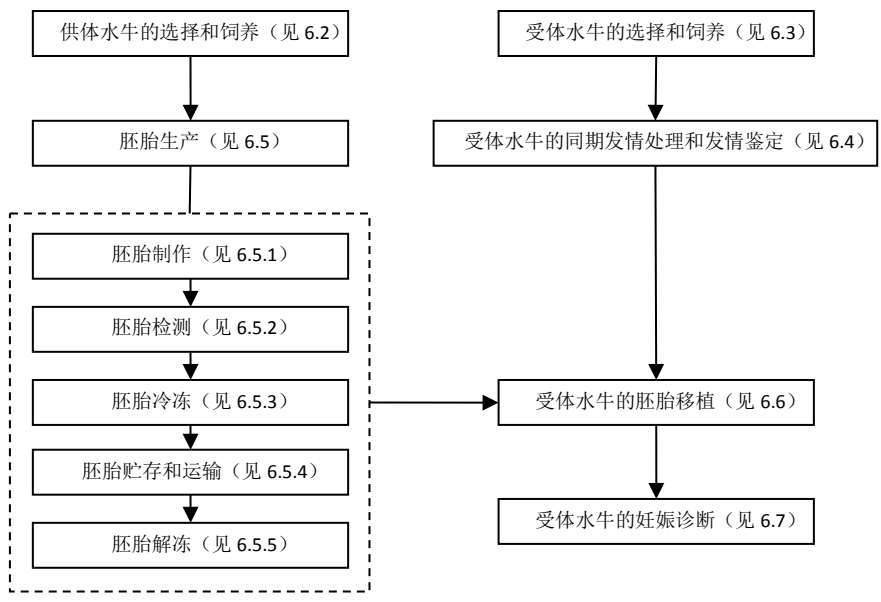


图1 奶水牛胚胎移植技术流程图

6 技术操作

6.1 一般原则

6.1.1 供体和受体母水牛为同一属种。

6.1.2 供、受体母水牛发情时间相差不超过 24 h。

6.2 供体水牛的选择和饲养

6.2.1 供体水牛的选择

6.2.1.1 供体水牛选择年龄在 14 月龄到 10 岁之间。

- 6.2.1.2 供体水牛品种优良、生产性能好，具有较高的育种价值。
- 6.2.1.3 遗传性能稳定、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。
- 6.2.1.4 体质健壮、繁殖机能正常，无遗传和传染性疾病。
- 6.2.1.5 生殖器官正常，无阴道炎、子宫内膜炎、卵巢囊肿等疾病。

6.2.2 供体水牛的饲养

- 6.2.2.1 供体水牛饲养在相对固定栏舍内，密度适中，环境卫生好，饮水清洁卫生。
- 6.2.2.2 活体采卵前 5 周，加强饲养管理，在饲料中添加多维（包括维生素 A、D、E）和微量元素，剂量参见产品说明。
- 6.2.2.3 采卵前 2 周，避免疫苗注射和转群应激。

6.3 受体水牛的选择和饲养

6.3.1 受体水牛的选择

- 6.3.1.1 受体水牛选择年龄在 24 月龄至 6 周岁。
- 6.3.1.2 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。
- 6.3.1.3 经产水牛分娩在 90 d 以上，产犊性能和哺乳能力良好，无流产史。
- 6.3.1.4 配种两个情期以上的难孕母水牛不作为受体。

6.3.2 受体水牛的饲养

- 6.3.2.1 受体水牛单独组群、编号、饲养，保持环境相对稳定，避免应激反应。
- 6.3.2.2 受体水牛在移植前 5 周，注射维生素 ADE 针剂，补充微量元素，如硒、锌等。
- 6.3.2.3 受体水牛在移植前 7 周开始补饲，加强饲养管理。
- 6.3.2.4 妊娠受体水牛在饲喂全价日粮饲料基础上，要补充矿物质和维生素，产前 3 个月适当限制能量摄入，加强舍外运动，保证胎儿的正常发育，避免难产。

6.4 受体水牛同期发情处理和发情鉴定

6.4.1 同期发情处理

同期发情处理之前先对受体水牛进行直肠触摸和B超检查，检查卵巢是否有周期性黄体，一般取第 5 d、6 d、7 d 黄体的受体水牛做胚胎移植。同期发情处理可选用下列方法之一。

——GnRH+PG_c+GnRH 法：

- 第一次注射：在发情周期的任意一天（除发情当日）肌肉注射GnRH100 ug/头，以肌肉注射GnRH之日为0 d；
- 第二次注射：在第一次注射后第7 d，一次性肌肉注射PG_c(0.4~0.6) mg/头；
- 第三次注射：第9 d再次肌肉注射GnRH100 ug/头；
- 第10 d~13 d观察发情，第15 d~17 d对黄体合格的水牛进行胚胎移植。

——CIDR+PG_c法：

- 在发情周期的任意一天放入CIDR栓（CIDR+维生素ADE 10 mL/头），放CIDR栓日定为0 d；
- 在第9 d取出CIDR栓，并肌肉注射PG_c(0.4~0.6) mg/头；第11 d观察发情；第15 d~17 d对黄体合格的水牛进行胚胎移植。

6.4.2 发情鉴定

6.4.2.1 外部观察法

观察母水牛性欲和外阴部变化。如母水牛相互爬跨，外阴部有较多黏液或后躯粘有黏液的痕迹，鸣叫、不安，食欲减退、奶量减少等。

6.4.2.2 阴道检查法

检查阴道、子宫颈和粘液变化。

6.4.2.3 直肠检查法

触摸卵巢大小和卵泡发育情况。通过检查受体水牛的发情、排卵、生成新黄体情况，判断胚胎移植时间，并做好记录。

6.5 胚胎生产

6.5.1 胚胎制作

采用水牛胚胎体外生产技术，包括：卵母细胞采集、卵母细胞的体外成熟、精子的体外获能和精卵体外受精、早期胚胎的体外培养、胚胎的形态学鉴定等环节，具体操作按DB45/T 916的规定进行。

6.5.2 胚胎检测

按DB45/T 1682的规定进行。体外生产的早期囊胚、囊胚或扩张囊胚，根据其形态、结构和发育能力划分胚胎质量，分为A、B、C和D四级：

- 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，变性细胞比例少于10%；
- 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，变性细胞比例为10%~20%；
- 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，变性细胞比例为20%~40%；
- 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-细胞胚胎以下的受精卵。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40%，为不可用胚胎。

6.5.3 胚胎冷冻

按DB45/T 1951的规定进行。将装好胚胎的冷冻细管装入加好液氮的程序化降温仪内，棉塞一头朝上或者朝外，以4℃/min的速率降至-7℃，用镊子缠好灭菌棉，浸入液氮，迅速接触细管棉塞和冷冻液的交界面进行植冰。植冰后在-7℃平衡5min，以0.3℃/min的降温速率降至-36℃后，将细管投入液氮内。

6.5.4 胚胎贮存和运输

- 6.5.4.1 贮存冻胚和液氮的生物容器均不可叠放。用液氮生物容器贮存时，细管完全浸没到液氮中。液氮容器应符合 GB/T 5458 的规定。
- 6.5.4.2 移动液氮生物容器时，轻拿轻放，防止冲撞、震动和倾倒。
- 6.5.4.3 运输时，有专人负责，途中及时检查和补充液氮。运输过程中注意防挤压、防冻、防雨淋、防晒、通风散热。具体操作按 DB45/T 1951 的规定进行。

6.5.5 胚胎解冻

按DB45/T 1951的规定进行。从液氮中取出装有胚胎的细管，空气浴6 s后32 ℃~35 ℃水浴10 s，用消毒纸擦干细管，再用半干的酒精棉球擦拭细管表面，晾干，剪开细管封口端（如用细管塞封口的则拔出即可），细管棉塞端朝里装入移植枪供移植，并在解冻后30 min内完成移植。

6.6 受体水牛的胚胎移植

6.6.1 移植方法

采用非手术法移植。通过直肠把握子宫角的方法用移植枪将胚胎移入有黄体侧的子宫角内。

6.6.2 材料和设备准备

包括但不限于保温箱、胚胎移植枪、移植枪塑料硬外套管、隔离无菌软外套、长臂手套、碘酊棉球、剪毛剪、70%酒精棉球、无菌纸、生理盐水棉球。

6.6.3 黄体判定

胚胎移植前一天或移植当天，对发情正常的受体水牛进行直肠检查，根据黄体的大小、弹性、突出状况确定是否合格，只对黄体合格（A、B级）且黄体所处的时期与胚龄一致的受体水牛移植。水牛胚胎移植时（排卵第5±1天）的黄体级别判断参见附录A表A.1。

6.6.4 移植时间的确定

根据受体水牛排卵时间和移植前黄体检查结果，判定最终移植时间。原则上要求黄体日龄与胚龄同步。如不能同步，二者排卵时间差小于1天。奶水牛胚胎移植时间的选择见表1。

表1 奶水牛胚胎移植时间的选择

胚龄与受体水牛的排卵 时间差天数		-1	0	+1
排卵时间	早	移植	移植	移植
	晚	移植	移植	不移植

6.6.5 胚胎移植操作

- 6.6.5.1 将受体水牛固定于保定架内，清洗消毒受体水牛的外阴部。
- 6.6.5.2 对照供体水牛采胚记录表和合格受体水牛的发情记录，受体水牛和胚胎胚龄相吻合。
- 6.6.5.3 按 6.5.5 解冻胚胎。
- 6.6.5.4 将胚胎装入 0.25 mL 塑料细管。

6.6.5.5 细管装入移植枪，移植枪的前端保持无菌。

6.6.5.6 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。

6.6.5.7 采用直肠把握法将移植枪插入阴道，穿破软外套，移植枪把胚胎送到合格黄体侧子宫角的大弯处，推出胚胎，缓慢地抽出移植枪。

6.7 受体水牛的妊娠诊断

在胚胎移植30 d~40 d后用B超对受体水牛进行早期妊娠检查，第60 d~90 d用直肠检查，确定妊娠与否。

7 档案记录

7.1 档案记录内容包括但不限于：

- 超数排卵、入工授精和胚胎采集记录；
- 胚胎质量鉴定与分级的记录及照片；
- 胚胎冷冻与保存记录；
- 受体胚胎移植记录；
- 妊娠检查的记录以及供体和受体的饲养管理记录等。

7.2 记录档案保存2年以上。

附 录 A
(资料性)

受体水牛排卵第 (5±1) 天黄体级别

表A. 1给出了受体水牛排卵第 (5±1) 天黄体级别判定和选择的参考依据。

表A. 1 受体水牛排卵第 (5±1) 天黄体级别

牛品种	黄体判定参考标准
奶水牛	A 级：黄体明显突出卵巢表面，顶部有冠状开口（呈火山口样），直径约 1.5 cm，弹性好。 B 级：黄体突出卵巢表面，直径约 1.2 cm，弹性适中。 C 级：黄体不突出，直径<1.0 cm，硬、弹性差；直径>1.0 cm，但突出不明显或不突出，质地过软，弹性差。
注：C级以下（含C级）或有大卵泡同时存在者不宜移植。	