

ICS 65.020.30

B 40

中华人民共和国国家质量监督
检验检疫总局备案号：52077-2016

DB53

云南省地方标准

DB53/T 760.3—2016

云南半细毛羊养殖 第3部分：胚胎移植

2016-09-10 发布

2016-12-01 实施

云南省质量技术监督局 发布

前 言

DB53/T 760-2016《云南半细毛羊养殖》分为以下部分：

- 第1部分：品种
- 第2部分：人工授精；
- 第3部分：胚胎移植；
- 第4部分：营养需要；
- 第5部分：饲草饲料；
- 第6部分：饲养管理；
- 第7部分：疫病防治；
- 第8部分：羊舍建设；
- 第9部分：档案管理。

本部分为DB53/T 760的第3部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本部分由云南省农业厅提出。

本部分由云南省农业标准化专业技术委员会（YNTC07）归口。

本部分起草单位：云南省畜牧兽医科学院。

本部分主要起草人：权国波、洪琼花、杨红远、李东江、兰蓉、邵庆勇、赵远崇、曾明洋。

云南半细毛羊养殖 第3部分：胚胎移植

1 范围

本部分规定了供体羊的选择与饲养管理、超数排卵和配种、胚胎回收、胚胎质量鉴定、胚胎冷冻与解冻、胚胎移植等技术要求。

本部分适用于云南半细毛羊快速扩繁。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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。

NY/T 826 绵羊胚胎移植技术规程

NY5027 无公害食品 畜禽饮用水水质

DB53/T760.2 云南半细毛羊养殖 第2部分：人工授精

3 供体羊的选择与饲养管理

3.1 供体羊的选择

供体羊应符合以下条件：

- a) 符合云南半细毛羊的典型特征，系谱清楚，遗传性能稳定，种用价值高；
- b) 健康、体质健壮、膘情中等及以上；
- c) 发情周期正常，生殖机能正常，无遗传性或传染性疾病；
- d) 年龄 1.5 周岁～5 周岁，体重 40 kg 以上；
- e) 经产母羊产后 90 d 以上，生殖机能恢复正常。

3.2 饲养管理

供体羊的饲养管理应满足以下要求：

- a) 分群饲养，专人管理；
- b) 保持饲养环境相对稳定，饲养环境卫生、干燥、圈舍温度适宜，避免应激反应；
- c) 加强饲养，保证营养均衡；饮水按 NY5027 要求执行。

4 超数排卵和配种

4.1 超数排卵

4.1.1 超排激素

FSH（促卵泡素）、P（孕酮，激素包埋在硅胶内，埋置于阴道内缓慢释放）。

4.1.2 超排方法

于发情周期的任意一天埋置阴道孕酮硅胶栓（CIDR），计为第1 d，第8 d更换第二个CIDR，第12 d开始采用等量法每天早、晚间隔12 h各注射一次FSH，连续注射4 d共8次，在第7次注射FSH时取出CIDR；FSH注射总剂量按供体羊体重计算，宜为0.20 mg/kg~0.25 mg/kg。

4.2 配种

供体羊撤栓后12 h~36 h进行发情鉴定，发情母羊进行本交或人工授精，发情鉴定和人工授精方法按DB53/T760.2要求执行。

5 胚胎回收（冲胚）

5.1 时间

供体羊发情后第一次配种或输精当日为0 d，在第2 d~3 d或6 d~7 d用手术法分别从输卵管或子宫角回收胚胎，母羊回收胚胎前禁食24 h，禁水12 h。

5.2 冲胚方法

5.2.1 输卵管法

操作方法按NY/T 826执行。

5.2.2 子宫法

子宫法冲胚按照以下步骤和要求进行：

- 按NY/T 826规定准备药品、器材、配制冲胚液，也可以使用外购的专用冲胚液；
- 将供体羊仰卧于手术保定架上，按每公斤体重静脉注射0.02 mL~0.03 mL 2%静松灵麻醉；
- 手术部位一般选择乳房前腹中线部，剪去术部毛，刮净毛茬，分别用清水和消毒液清洗，然后由里向外涂以2%~4%的碘酒，待干后再用75%的酒精棉脱碘；
- 盖上创巾，使预定的切口部位暴露在创巾开口的中部。按皮肤、皮下组织、肌肉、腹膜的顺序切口，然后将食指及中指由切口伸入腹腔，在骨盆腔、膀胱周围触摸子宫，并将子宫、卵巢引出切口外，记录两侧卵巢黄体 and 卵泡数；
- 用小号止血钳在子宫体基部打孔，将冲卵管插入，依据羊只发情到冲胚当天时间间隔，使气球在子宫角中部，冲卵管尖端靠近子宫角前端；
- 使用5 mL一次性注射器缓慢注入3 mL~4 mL气体，冲卵管另一端接大平皿；
- 用套管针在子宫角细部无血管处插入，外接抽取25 mL 37℃冲胚液的注射器，一只手的手指在套管针头后方捏紧子宫角细部，另一只手推注射器，缓慢平稳的注入液体，使液体顺畅地从冲卵管流入大平皿中待检；
- 冲完后气球放气，抽出冲卵管和套管针，用同样方法回收另一侧胚胎。

6 胚胎质量鉴定

6.1 检胚

检胚按下列要求进行：

- a) 实验室温度 20℃~25℃，检胚者应熟悉体视显微镜的结构和操作，检胚的顺序应由低倍到高倍，一般在 100 倍左右即能发现胚胎，对胚胎鉴定分级时再转向高倍。
- b) 根据胚胎的比重、大小、形态和透明带折光性等特点找胚。胚胎的比重比冲卵液大，一般位于集卵皿的底部；绵羊胚胎直径为 150 μm~200 μm，是一球形体，在光镜下呈圆形，其外层是透明带，镜检找到的胚胎数应和卵巢上黄体数大致相当。
- c) 将检出的胚胎放入盛有保存液的 Φ35 mm 培养皿中，冲洗胚胎 3 次~5 次，然后把全部胚胎移至另一个培养皿；一只供体羊的胚胎放在同一个皿内。

6.2 胚胎的质量鉴定

6.2.1 发育阶段鉴定

在 40 倍~120 倍的体视显微镜下，对受精卵观察胚胎发育状态、形态轮廓、色泽、卵裂球的大小、均匀度、细胞密度、变性程度以及胚龄与发育期是否相吻合等。

超数排卵发情供体羊第一次配种后胚胎发育期划分为下列七个阶段：

- a) 受精卵：第 2 d~3 d 从输卵管回收的胚胎，发育阶段为 2 细胞期~8 细胞期，可清楚地观察到卵裂球，卵黄腔内空隙较大。
- b) 桑椹胚：第 3 d~4 d 回收的胚胎，可以观察到球状的细胞团，分不清卵裂球，细胞团占据卵黄腔的大部分。
- c) 致密桑椹胚：第 4 d~5 d 回收的胚胎，细胞团变小，占卵黄的 60%~70%。
- d) 早期囊胚：第 5 d~6 d 回收的胚胎，细胞团的一部分出现发亮的胚泡团和滋养层。
- e) 囊胚：第 6 d~6.5 d 回收的胚胎，内细胞团和滋养层界线清晰，胚泡腔明显，细胞充满卵黄腔。
- f) 扩张囊胚：发情后第 6.5 d~7.0 d 回收的胚胎，囊腔明显扩大，体积增大到原来的 1.2 倍~1.5 倍，与透明带之间无空隙，透明带变薄，相当于正常厚度的 1/3。
- g) 孵化胚：一般在发情后第 7 d~8 d，由于胚泡腔继续扩张，致使透明带破裂，胚细胞脱出。

6.2.2 质量等级

胚胎质量分为以下四个级别：

- a) A 级：优质胚。发育正常，胚龄与发育期相吻合，桑椹胚期前胚胎卵裂球轮廓清楚，透明度适中，细胞密度大，卵裂均匀，无变性的细胞。
- b) B 级：良好胚。发育基本符合预定胚龄，轮廓清楚，明暗适中或稍暗稍淡，细胞密度较小或小型卵裂球过多，细胞变性率为 10%~20%。
- c) C 级：一般胚。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%。
- d) D 级：不可用胚。未受精卵和变性胚。

6.3 记录

供体羊超数排卵和胚胎回收记录参见 NY/T 826 执行。

7 胚胎冷冻保存与解冻

7.1 保存

7.1.1 仪器及材料

体视显微镜、程序冷冻仪、0.25 mL塑料冷冻细管、培养皿、封口粉、冷冻记号笔等。

7.1.2 试剂

冲胚液、以冲胚液为基础液配制的0.5 mol/L乙二醇、1.0 mol/L乙二醇、1.5 mol/L乙二醇、0.5 mol/L蔗糖。

7.1.3 冷冻

冷冻按下列顺序进行：

- 标记：在0.25 mL细管上用冷冻记号笔写上品种、耳号、胚胎数量、发育阶段和质量等级；
- 洗涤与平衡：需冷冻胚胎先在冲胚液中洗涤3次，再分别在0.5 mol/L和1.0 mol/L乙二醇中平衡5 min后装管；
- 装管：用0.25 mL细管吸取少量0.5 mol/L蔗糖、空气、1.5 mol/L乙二醇、空气、1.5 mol/L乙二醇并在此段放入已平衡2次的胚胎、空气、1.5 mol/L乙二醇、空气、0.5 mol/L蔗糖，最后，用封口粉封口；0.25 mL冷冻细管各段分布图详见图1：

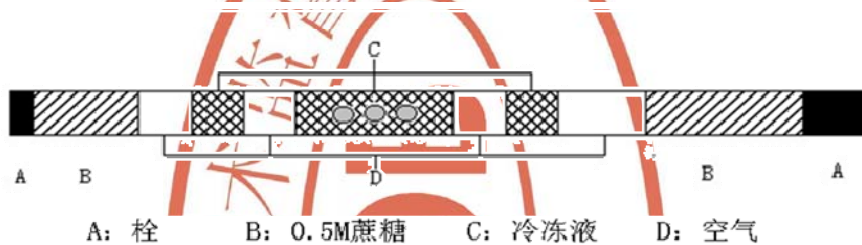


图1 胚胎冷冻保存细管（0.25 ml）装管图

- 冷冻：胚胎放入1.5 mol/L乙二醇时开始计时，到15分钟时将装好胚胎并封口的细管放入程序冷冻仪中，以 $-3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率从室温降至 $-6.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 并植冰（用沾有液氮的脱脂棉轻触胚胎段两头的冷冻液，诱发细管内冰晶的形成），在此温度下平衡10 min，再以 $-0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速率降至 $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，平衡10 min后投入液氮保存，程序图详见图2；

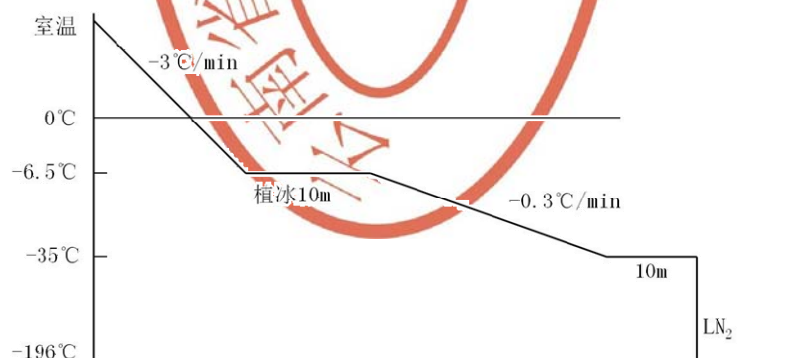


图2 胚胎冷冻过程图

7.2 解冻

解冻按照以下步骤进行：

- 从液氮中取出装有胚胎的细管，空气浴7 s~10 s后 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴10 s；
- 用消毒纸巾擦干细管，再用半干的酒精棉球擦拭细管表面，剪掉细管两端封口；

- c) 将细管内液体盛放于培养皿中,于体视显微镜下快速检出胚胎后移入 0.5 mol/L 蔗糖缓冲液中平衡 5 min,将乙二醇去除后用冲胚液洗涤 3 次以去除蔗糖。

8 胚胎移植

8.1 受体羊选择

受体羊选择应符合以下要求:

- a) 空怀;
- b) 繁殖性能良好、健康,膘情在 7 成以上;
- c) 年龄 1.5 岁~5 岁,经观察有两个正常发情周期;
- d) 供、受体羊发情时间差在 ± 12 h 内。

8.2 受体羊饲养管理

受体羊应按以下要求管理:

- a) 单独组群加强饲养,在移植前 1 个月开始补饲;
- b) 保持饲养环境相对稳定,避免应激反应;
- c) 加强公羊管理,避免偷配。
- d) 新购进受体羊需进行驱虫和综合免疫处理,隔离观察、复膘并适应新环境,发情周期正常后再安排使用。

8.3 受体羊同期发情处理

将孕酮硅胶栓(CIDR,孕酮含量为300 mg/个)或海绵栓(孕酮含量为400 mg/个)埋置入母羊阴道,放置15 d后取出,取栓时肌注孕马血清促性腺激素(PMSG) 200 IU/只~250 IU/只,24 h~48 h内观察发情。受体羊发情之日为0 d,按胚龄要求进行移植。

8.4 受体羊发情鉴定

受体羊的发情鉴定按DB53/T ****.2执行。严格管理发情羊,避免公羊偷配。

8.5 移植要求

胚胎移植应满足以下要求:

- a) 根据发情记录判定供体(胚龄)与受体羊的发情时间差,以此确定移植时间,原则上要求供、受体羊发情时间差在 ± 12 h 内。
- b) 移植操作前应对受体羊黄体发育情况作出判断,按黄体突出卵巢的直径,将黄体发育程度分为优:0.6 cm~1.0 cm、中:0.5 cm、差:小于 0.5 cm,宜在黄体发育中等程度以上进行移植操作,没有黄体不可进行移植操作。
- c) 胚胎移植部位应与供体母羊回收胚胎的部位一致,即输卵管回收的胚胎移植于输卵管,子宫角回收的胚胎移植于子宫角。
- d) 受体羊术前需禁食 24 h、禁水 12 h。

8.6 移植操作

8.6.1 手术法

将受体羊仰卧于手术保定架上，按每公斤体重静脉注射0.01 mL~0.02 mL 2%静松灵，手术部位及手术要求执行5.2.2相关规定。

- a) 输卵管移植:将有黄体一侧的输卵管全部拨开，找到管口，把装有胚胎的移植器从此插入3 cm~4 cm，然后将胚胎轻轻推出即可，操作中不可用力牵拉卵巢，不能触摸黄体。
- b) 子宫移植:将黄体较好一侧的子宫角拉出，避开血管，用曲别针制成的打孔针在子宫角打孔，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。

8.6.2 腹腔内窥镜法

将受体羊仰卧于手术保定架上，按每公斤体重静脉注射0.01 mL~0.02 mL 2%静松灵，手术部位及手术要求执行5.2.2相关规定。内窥镜法胚胎移植按照以下步骤进行：

- a) 用手术刀片在腹中线两侧，距乳房2 cm处，各切一个1 cm~1.5 cm的小口；
- b) 用与腹腔镜配套的专用打孔器将腹膜、肌肉打通，在两侧刀口内放入腹腔镜和子宫钳；
- c) 在子宫不暴露于体外的情况下，利用腹腔镜观察卵巢上黄体发育情况；
- d) 用子宫钳夹住黄体较好侧子宫角尖端系膜并将其拉出，避开血管，用曲别针制成的打孔针在子宫角打孔；
- e) 将装有胚胎的移植枪朝子宫角方向推出胚胎。

8.7 移植记录

胚胎移植记录参见表1。

表1 胚胎移植记录表

受体耳号	发情时间	黄体发育		供体耳号	胚胎数量	胚龄、质量	移植部位	产羔日期	产羔数	备注
		左 侧	右 侧							

8.8 术后管理

8.8.1 创口处理及观察

术后创口处理及观察要求如下：

- a) 供体冲胚完毕后，用37℃灭菌生理盐水湿润母羊子宫，冲去凝血块，将器官复位，腹腔内倒入250 mL 37℃灭菌生理盐水。腹膜、肌肉层采用连续缝合后撒适量青霉素粉，皮肤层采用节节缝合法缝合后伤口用碘酒消毒。从手术当天开始每天早、晚肌肉注射青霉素、链霉素各80万IU，同时用碘酒对伤口进行消毒，连续3 d。第7 d可拆线。
- b) 受体羊移植胚胎后，将子宫角复位即可缝合，方法和供体羊一致，缝合完毕后肌肉注射孕酮2 mL。
- c) 供、受体羊术后观察24 h后才能跟群放牧或其他羊只混群。必须仔细观察羊只，如有卧地不起、弓腰努责或不进食不排粪的现象，应及时检查创口缝合情况，必要时拆线重新缝合。

8.8.2 喂养

术后喂养应注意以下事项：

- a) 术后不要马上饲喂精料，只喂给优质的干草及清洁的饮水，最好是加盐的温水。术后 3 d，恢复术前常规精料饲喂量，对于移入胚胎的受体羊，要继续补充足够的维生素，满足母体及胎儿的需要，并加强饲养管理，避免应激反应。
 - b) 受体羊术后 1 个发情周期~2 个发情周期内要注意观察返情情况，若返情则应及时安排配种或下一次移植。对过了 2 个发情周期但未返情的羊初步判断为妊娠，对妊娠羊应加强饲养管理，尤其要满足其对蛋白质的需要。
 - c) 妊娠母羊产羔期需精心管理，做好助产、产羔记录和羔羊培育工作，保证母羊哺乳期营养需要。产羔记录主要包括产羔母羊耳号、供体耳号、产羔日期、羔羊数、羔羊初生重。
-

