

ICS 65.020.30
CCS B 44

团体标准

T/CAAA XXXX—2022

马鹿冷冻胚胎生产技术规程

Frozen embryo production technical code of practice for wapiti deer

(征求意见稿)

2022-XX-XX发布

2022-XX-XX实施

中国畜牧业协会 发布

前 言

本文件按照 GB/T1.1-2020 《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。

请注意本文件中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。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：黑龙江八一农垦大学、哈尔滨工业大学、哈尔滨博蒙生物科技有限公司、黑龙江普惠特产有限公司、黑龙江省农垦科学院哈尔滨特产研究所、新疆畜牧科学院畜牧业质量标准研究所、新疆农业大学、黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所、黑河市吉骏鹿业有限公司、乌鲁木齐绿洲绿岛牲畜养殖农民专业合作社。

本文件主要起草人：韩欢胜、赵列平、赵晓静、许艳丽、孙东波、道楞、库尔班·吐拉克、马强、郭喜明、王雪、王敏、孙义乐、许红喜、郑家三、张爱忠、史文清、柴孟龙、徐馨、黄翠、肖洪梅、韩志强、李宁、韩彦、张震、曲凤玲、孟庆超、白伟忠、李勇、宋吉骏。

马鹿冷冻胚胎生产技术规程

1 范围

本文件规定了马鹿胚胎冷冻生产基本要求、超数排卵、采胚、检胚及冻前处理、胚胎冷冻与贮存。

本文件适用于马鹿的冻胚生产和胚胎遗传资源的保存。

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 25881 牛胚胎

NY/T 1900 畜禽细胞与胚胎冷冻保种技术规范

NY/T 1674 牛羊胚胎质量检测技术规程

3 术语定义

本文件没有需要界定的术语和定义。

4 基本要求

4.1 人员

4.1.1 由鹿保定人员、操作助手、采胚人员、胚胎检测人员组成。

4.1.2 应具有一定的专业理论基础或现场工作经验，无人兽共患传染病。

4.1.3 操作时应严格消毒，戴手套，穿工作服。

4.1.4 应事先分工，操作过程须密切配合。

4.2 操作室

4.2.1 应有采胚、检胚、冻胚的功能分区。

4.2.2 应安全、通风、保温和卫生，设照明、电源插座和操作台，面积 15 m²~25 m²为宜。

4.2.3 墙壁、地面应采用便于消毒、防水的材质。

4.2.4 操作前应采用无刺激性气味的消毒液和紫外线灯进行消毒杀菌。

4.3 药品器械

4.3.1 操作前应备齐药品与器械，具体参见附录 A。

4.3.2 接触胚胎的器皿应清洁卫生。

4.3.3 消毒后的器械应用铝箔纸或封口纸封好备用。

4.4 供体鹿

4.4.1 健康无传染性疾病。

4.4.2 无繁殖性疾病。

4.4.3 生殖器官、机能正常。

4.4.4 体况良好，中上等体况。

4.4.5 经产、产后 120 天以上的母鹿。

5 超数排卵

5.1 宜 9 月份~12 月份。

5.2 超数排卵前应补饲 20 天以上，主要补饲 VA、VD、VE、Se、Zn 等维生素和微量元素。

5.3 程序

5.3.1 宜采用 CIDR+FSH 方案，具体程序参见附录 B。

5.3.2 埋栓和取栓。埋置阴道栓 CIDR（孕酮含量 500mg），埋置当天记为第 0 天，第 9 天开始注射促卵泡素（FSH），每天早晚各注射 1 次，间隔 12 小时，4 天 8 次等量或减量注射，共注射 FSH640 mg，第 7 次注射 FSH 时取栓。

5.3.3 人工输精。取栓后 50 小时、58 小时进行两次定时输精。或结合试情方法进行，母鹿从接受试情公鹿爬跨到拒绝爬跨行为变的较安稳时进行第 1 次输精，间隔 6 小时~8 小时进行第 2 次输精。

6 采胚

6.1 应在人工输精后 6 天~7 天采集胚胎。

6.2 采胚前应检查冲卵管气囊是否漏气，冲胚液预热到 35℃~37℃。

6.3 对采胚鹿麻醉保定后运回采胚室，放于保定架上，呈前高后低的仰卧姿势。

6.4 宜采用非手术法进行胚胎采集。

6.4.1 掏出直肠粪便，用温水清洗阴部及外阴，75%酒精消毒，生理盐水冲洗，最后用灭菌的棉巾擦拭干净。

6.4.2 把握直肠用子宫颈扩张棒扩张子宫颈，插入粘液吸除器至宫颈处吸取粘液，反复操作 2 次~3 次将粘液吸净。

6.4.3 将带有内芯的冲胚管经过子宫颈轻轻地插入一侧子宫角大弯处，抽出约 4 cm 内芯，再把冲胚管往子宫角前端推进，当内芯再次抵达子宫角弯曲处时，再向外抽出内芯 4 cm~8 cm，直到冲胚管到达子宫角前端小弯基部为止。

6.4.4 用 20 mL 注射器由助手给气囊充气，先充一定量气，待确定气囊位置后，再根据母鹿子宫大小和冲胚管的深度确定充气量，一般充气 8 mL~10 mL，固定冲胚管，抽出内芯，连接三通管。

6.4.5 将预热到 35 °C~37 °C 采胚液吊瓶挂在距母鹿外阴部 1.0 m 高处，接通三通管、采胚管及集卵杯。根据子宫角的膨胀程度确定采胚液的注入量，一般每次注入 30 mL~50 mL 采胚液，视液体回流情况，反复多次冲灌，每侧子宫角用液量 300 mL~500 mL。

6.4.6 冲完一侧子宫角后将内芯再插入采胚管并放气，固定内芯，把采胚管退到子宫体，转向插入另一侧子宫角，重复 7.4.5 条款的操作。

6.4.7 两侧子宫角胚胎采集完毕，将集卵杯快速送至检胚室，将气囊空气放出，冲卵管抽至子宫体。向子宫体灌注抗生素，一般青霉素 80 万 IU、链霉素 100 万 IU，肌注 PG 0.4 mg。

7 检胚及冻前处理

7.1 检前处理

检胚前滤去多余的回收液，将过滤杯中留下的 20 mL~30 mL 回收液倒入平皿，再用少量冲卵液冲洗过滤杯 2 次~3 次，一并倒入平皿待检。

7.2 镜检

7.2.1 将回收冲胚液的平皿在 10 倍~20 倍体视显微镜下，从上到下、从左到右或从外到内 Z 字形移动，用吸胚管将找到的胚胎移入培养皿中的保存液小滴中。

7.2.2 再将同一供体母鹿的胚胎从液滴中全部吸出移到新液滴，反复洗涤胚胎 3 次~5 次。

7.2.3 将体视镜放大至 50 倍以上，进行胚胎质量鉴定和分级。

7.3 胚胎等级鉴定

7.3.1 胚胎发育阶段分类参见附录 C 或 NY/T 1674。

7.3.2 胚胎质量形态学鉴定及分级参见附录 D 或 GB/T 25881。

7.3.3 胚胎等级达到 A 级、B 级的可用于冷冻。

7.4 胚胎洗涤

用于冷冻的胚胎应用保存液洗涤 5 次，每次洗涤不少于 200 μ L，每组清洗胚胎数不能超过 10 枚，每次清洗应更换吸管，每次清洗胚胎带入平皿中的液体量不能超过 1%。

8 胚胎冷冻

8.1 乙二醇冷冻法

8.1.1 平衡。将胚胎放入 1.5 mol/L 或 1.8 mol/L 乙二醇冷冻保护液中，平衡 10 min。

8.1.2 装管。平衡后应迅速将胚胎装入 0.25 mL 细管，每支细管以装 1 枚胚胎为宜，装管顺序应按乙二醇液、气泡、含有胚胎的乙二醇液、气泡、乙二醇液进行，装管后，用标签塞插入封口端进行封口。

8.1.3 标记。细管应进行明确的标记，注明生产单位、生产时间、品种、供体鹿号、发育阶段、等级、质量级别、数量等。

8.1.4 植冰。将冷冻仪的程序调到“0”程序时，等温度达到 $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时将胚胎放入冷冻仪平衡5 min后，用经过液氮冷却后的镊子夹住远离胚胎端的细管封口端植冰。

8.1.5 程序冷冻。植冰后，平衡10 min，以 $0.3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ~ $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率进行降温，达到 $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ ~ $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 时，平衡10 min，把细管投入液氮中。

8.2 甘油冷冻法

应按NY/T 1900的附录操作进行。

9 贮存

细管无破损，标记清晰、完整、准确后贮存，并进行记录（见附录E）。

附录 A
(资料性)

冷冻胚胎生产常用器材药品表

A.1 冷冻胚胎生产常用器材药品表

冷冻胚胎生产常用器材药品见表 A.1。

A.1 冷冻胚胎生产常用器材药品表

项目	序号	器材	药品
超数排卵	1	CIDR	FSH
	2	埋栓器	PMSG
	3	吹管/吹弹	促排 3 号
	4	输精枪	麻醉、苏醒药
	5	工作服、乳胶手套	75 %酒精
	6	紫外线消毒灯	0.9 %生理盐水
	7	恒温水浴锅	
	8	注射器	
冲胚	9	保定架	Holding 胚胎保护液
	10	子宫颈扩张棒	PG 氯前列烯醇
	11	子宫颈粘液吸除器	抗生素
	12	冲卵管	
	13	集卵杯	
	14	过滤器	
检胚	15	体视显微镜	
	16	培养皿	
	17	吸尿管	
	18	移液器	
胚胎冷冻	19	胚胎冷冻仪	1.5 mol/L 或 1.8 mol/L 乙二醇冷冻保护液 (自配)
	20	液氮罐	1.4 mol/L (10 %) 甘油冷冻保护液 (自配)
	21	0.25 mL 细管	
	22	细管棉塞	
	23	指拇管	
	24	油性号笔	

附录 B
(资料性)

超数排卵用药程序

B.1 超数排卵用药程序

超数排卵用药程序见表 B.1。

B.1 超数排卵用药程序表

项目	埋栓、取栓						输精
时间	第 0 天	第 9 天	第 10 天	第 11 天	第 12 天	取栓后 公鹿试情输 精或 50 小时、 58 小时各输 精 1 次
处理	埋栓		第 7 次注射 FSH 时取栓				
	注射 FSH	等量法	早：80 IU 晚：80 IU	早：80 IU 晚：80 IU	早：80 IU 晚：80 IU	早：80 IU 晚：80 IU	
		递减法	早：100 IU 晚：100 IU	早：90 IU 晚：90 IU	早：70 IU 晚：70 IU	早：60 IU 晚：60 IU	

附录 C
(资料性)
胚胎发育阶段分类

C.1 胚胎发育阶段分类

胚胎发育阶段分类见表 C.1。

表 C.1 胚胎发育阶段分类表

胚胎发育阶段	形态特征
早期桑椹胚/EB	含有 16 个细胞以上，卵裂球紧界限清晰，没有形成致密细胞团，细胞团占据透明带内的 50 %~60 %空间。
致密桑椹胚/CM	卵裂球进一步分裂变小，紧缩为团块状，看不清卵裂球界限，细胞团占据透明带内的 60 %~70 %空间。
早期囊胚/EM	细胞团中出现散在的囊腔，细胞团占据透明带内的 70 %~80 %空间。
囊胚/BL	已经分化的滋养层和内部致密的、颜色发暗的内细胞团和囊胚腔明显是主要特征。滋养层与内细胞团的形态比较容易区别。此时的胚胎细胞充满整个透明带内。
扩张囊胚/EXB	整个胚胎直径增大，囊胚腔充分扩张，与透明带之间无间隙，透明带变薄，大约是原来厚度的 1/3。
孵化囊胚/HB	正处于孵化阶段的胚胎透明带破裂或胚胎细胞团正在脱出或者已脱离透明带。

附录 D
(资料性)
胚胎质量形态学鉴定及分级

D.1 胚胎质量形态学鉴定及分级

胚胎质量形态学鉴定及分级见表 D.1。

表 D.1 胚胎质量形态学鉴定及分级

等级	特征
A 级	胚胎发育阶段与胚龄一致，透明带光滑无缺陷，胚胎细胞团形态完整，轮廓清晰，卵裂球大小均匀，结构紧凑、色泽和透明度适中，无游离细胞或很少，变性细胞比例少于 10 %。
B 级	胚胎发育阶段与胚龄基本一致，轮廓清晰，胚胎细胞团形态较完整，卵裂球大小基本一致，色泽和细胞透明度良好，变性及游离细胞约占 10 %~30 %。
C 级	胚胎发育阶段与胚龄不太一致，且胚胎细胞团轮廓不清，色泽和透明度变暗，卵裂球较松散，游离，变性及游离细胞约占 30 %~50 %。
D 级	未受精卵，或发育停滞变性、卵裂球不规则、少而散。

附录 E
(资料性)
冷冻胚胎生产记录

E.1 冷冻胚胎生产记录表

冷冻胚胎生产记录见表 E.1。

表 E.1 冷冻胚胎生产记录表

品种			制作地点						日期			
供体号	母畜：				公畜：							
超排情况	黄体数——左侧：		右侧：		卵泡数——左侧：		右侧：		其他：			
鲜胚数及 质量评定	可用胚胎数								不可用胚胎数			未受精
	总数	等级	EM	M	CM	EB	BL	EXB	总数	2-8 细胞	退化	
		A										
		B										
		C										
	D											
合计												
细管号	数量		阶段	级别	小筒号		提漏号	储存罐号		备注		