ICS 65.020.30
CCS B 43

DB 15

内 蒙 古 自 治 区 地 方 标 准

DB 15/T XXXX—XXXX

和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术规程

Standard Operation Procedure for Embryo Production Using Ovum Pick-Up/In Vitro Fertilization in Wagyu

（征求意见稿）

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

内蒙古自治区市场监督管理局　　发 布

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。

本文件由内蒙古元牛繁育科技有限公司提出。

本文件由内蒙古自治区畜牧业标准化技术委员会（SAM/TC 19）归口。

本文件起草单位：内蒙古元牛繁育科技有限公司、草原和牛投资有限公司、北京九州大地生物技术集团股份有限公司、内蒙古自治区农牧业科学院。

本文件主要起草人：何牧仁、苏日娜、王标、傅仲、王岗、达来、白苏友拉图、李婉、羿静。

和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术规程

1 范围

本文件确立了和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术流程，规定了供体的选择与饲养管理、活体采卵、体外成熟、体外受精、体外培养及胚胎质量鉴定、胚胎玻璃化冷冻与解冻技术要求，描述了证实方法。

本文件适用于和牛活体采卵/体外受精胚胎生产。

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 4143 牛冷冻精液

GB/T 25881 牛胚胎

GB/T 26938 牛体内胚胎生产与移植技术规程

GB/T 30396 牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输

GB/T 31582 牛性控冷冻精液

3 术语和定义

GB/T 25881 和 GB/T 26938 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

活体采卵 ovum pick up

运用超声波辅助采卵法收集牛卵母细胞的过程。

3.2

卵丘-卵母细胞复合体 cumulus-oocyte complexes

卵母细胞被卵丘细胞包裹形成的复合体。

3.3

体外成熟 in vitro maturation

卵丘-卵母细胞复合体在体外适宜条件下培养，使卵母细胞发育成熟，排出第一极体并具有受精能力的过程。

3.4

体外受精 in vitro fertilization

精子和成熟卵母细胞在体外环境下完成受精的过程。

3.5

受精卵 zygote

精子进入成熟卵母细胞后，激活卵母细胞排出第二极体形成的合子。

3.6

体外培养 in vitro culture

受精卵在体外适宜环境下培养的过程。

3.7

玻璃化冷冻 vitrification

利用高浓度的冷冻保护剂和提高冷冻速率阻止冰晶形成的一种胚胎冷冻方法。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

COCs：卵丘-卵母细胞复合体(cumulus oocyte complex)

DPBS：磷酸缓冲盐溶液（dulbecco’s phosphate puffered）

IVC：体外胚胎培养(in vitro cultore)

IVF：体外受精（in vitro fertilization）

IVM：体外成熟(in vitro maturation)

OCM：卵子培养基(ovum culture media）

OPU：活体采卵（ovum pick up）

5 基本要求

5.1 操作间环境应保持干净卫生，宜配备洁净室。采卵室和捡卵室应用紫外灯照射消毒 1 h～2 h，操作台应用 75%酒精擦拭消毒。

5.2 所用仪器设备、试剂和培养微滴的准备应符合附录 A 的相关规定。

6 技术流程

和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术包括供体的选择与饲养管理、活体采卵、体外成熟、体外受精、体外培养及胚胎质量鉴定、胚胎玻璃化冷冻与解冻。和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术流程见图1。

和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术操作流程应保留各环节的记录表、照片和影像等。

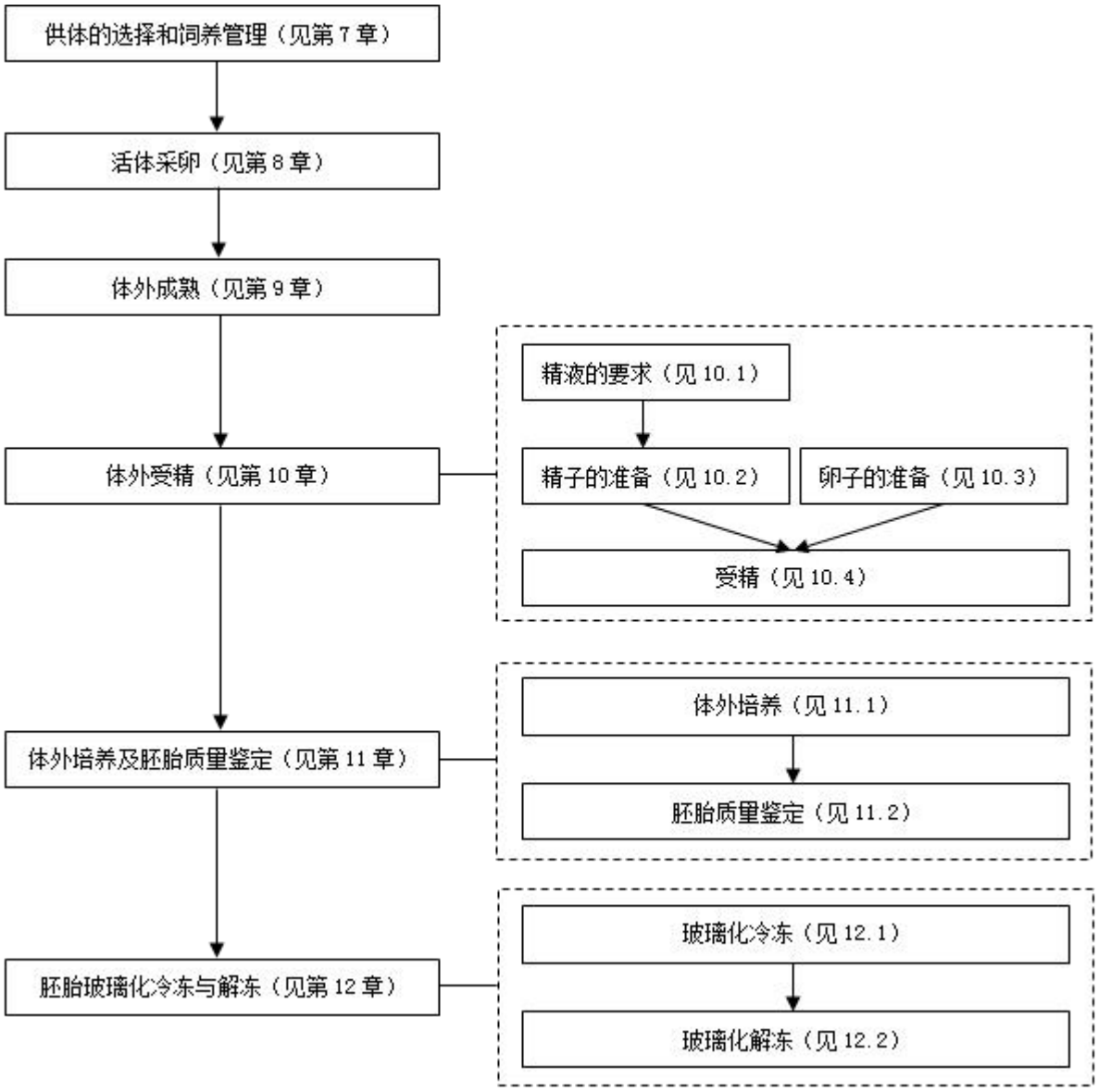

图 1　和牛活体采卵/体外受精胚胎生产技术流程图

7　供体的选择和饲养管理

7.1　供体的选择

供体应满足以下条件：

a)　符合和牛品种标准，和牛种牛评分应达到 80 分以上，和牛种牛评分标准应符合附录 B 的规定。

b)　6 月龄～10 岁。

c)　体质健康，生殖器官和繁殖机能正常，无遗传缺陷和传染性疾病。

d)　宜进行全基因组检测，计算雪花大理石纹基因组育种值，胴体重基因组育种值，眼肌基因组育种值，12 月龄体重基因组育种值，纯繁育种指数 > 1.0。

7.2 供体的饲养管理

按照 GB/T 26938 的规定执行。

7.3 供体的处理

7.3.1 非超数排卵

直接采卵，2次采集间隔时间宜大于3 d。

7.3.2 超数排卵

按照 GB/T 26938 的规定执行。

8 活体采卵

8.1 采卵前准备

保定供体，用2%利多卡因在荐椎和第一尾椎结合处进行尾椎硬膜外腔麻醉，剂量根据供体体重为每头牛2 mL～5 mL。麻醉后固定牛尾，清除直肠内宿便，清洗剂消毒阴部及外阴。

8.2 采卵过程

a) 操作人员一只手将活体采卵仪的超声波探头插入供体阴道至穹隆处，另一只手通过直肠把握将一侧卵巢隔着阴道壁紧贴超声波探头。
b) 超声波探头确定卵巢上卵泡位置。调整超声波探头与卵巢的相对位置，使卵泡位于进针线上，开启真空泵并推进穿刺针穿刺卵泡，采集卵泡液和 COCs。
c) 采用同样的方法对另一侧卵巢进行 COCs 采集。
d) 采集所有 2 mm～8 mm 卵泡后，冲洗穿刺针及采卵管，使 COCs 进入离心管。
e) 采卵过程如有血液凝固阻塞采卵针或采卵管，应将穿刺针撤出并提高负压，抽 OPU 冲卵液以疏通采卵针和采卵管。
f) 将采集的卵泡液和 COCs 转移到集卵杯过滤液体，在 38.5℃恒温台上，体视显微镜下收集 COCs，并转移到预热 38.5℃的 OPU 冲卵液中。
g) 采集完后挑选可用 COCs 进行体外成熟培养。
h) 应填写 OPU 记录表，见附录 D 中表 D.1。

8.3 分级筛选

使用 DPBS 稀释采卵液，通过细胞筛过滤，冲洗到90皿中，将其放在在体视显微镜下，分区检查，检出采集的所有卵，进行分级鉴定，选出符合培养条件的 COCs，用提前预热好的 IVM 液体洗3滴。COCs 分级的标准应符合附录 E 的规定。应填写 OPU-IVM 记录表，见附录 D 中表 D.2。

9 体外成熟

将洗净的 A 级和 B 级 COCs 放入含有成熟培养液并覆盖矿物油的四孔板中，每孔培养30枚～50枚，培养22 h～24 h。

10 体外受精

10.1 精液的要求

10.1.1 种公牛的选择

种公牛应满足以下条件：

a) 三代系谱完整，检疫合格，遗传性能稳定，生产性能优秀。
b) 宜进行全基因组测定，根据测定结果和育种目标，避免遗传缺陷纯和，近交系数宜 > 0.3；宜依据“高雪花+高雪花”强强结合原则或“高日增重+高雪花”互补原则进行生产性能的选配。

10.1.2 质量要求

10.1.2.1 常规冷冻精液质量按照 GB 4143 的规定执行。
10.1.2.2 性控冷冻精液质量按照 GB/T 31582 的规定执行。

10.1.3 贮存要求

按照 GB/T 30396 的规定执行。

10.2 精液的准备

a) 精液解冻：从液氮罐中取出一支精子在空中停留 5 s，立即放入 37℃热水解冻 45 s，用纱布擦去精子外壁上的水渍，并用酒精擦拭两端。
b) 精子洗涤：将解冻的精子两端剪开，缓慢倒进 3 ml 的洗精液中进行离心（离心力 300 G，5 min），弃上清。再加 3 ml 洗精液离心 5 min，用移液枪弃上清，留 50 μl～100 μl 液体，加等体积 IVF 液。

10.3 卵子的准备

将 COCs 在提前预热的 IVF 液体中洗涤3次后移入50 μl受精滴中，每滴放15枚 COCs。

10.4 受精

用精子密度仪测量精子密度，使用 IVF 液体调整精子浓度约为2×10^6个/ml，加入4 μl～10 μl精液到受精滴中，放回 CO_2 培养箱进行孵育16 h～20 h。应填写IVF记录表，见附录 D 中表 D.3。

11 体外培养及胚胎质量鉴定

11.1 体外培养

a) 将受精 16 h～20 h 后的受精卵从 IVF 液体中取出，置于含有 OCM 的 1.5 ml 离心管内，震荡 2 min，直至卵丘细胞基本脱落，选取胞质均匀，透明带轮廓清楚的受精卵，在 IVC1 液中洗 3 滴，放入提前预热的 IVC1 液滴中，放入三气培养箱中培养。
b) 体外培养 72 h 后，选出并丢弃未受精的卵和 2 细胞胚胎，换出 1/3 液滴的 IVC 液体，继续培育 4 细胞以上的胚胎。
c) 应填写 IVC 记录表，见附录 D 中表 D.4。

11.2 胚胎质量鉴定

按照 GB/T 25881 的规定执行。

12 胚胎玻璃化冷冻与解冻

12.1 玻璃化冷冻

12.1.1 胚胎的要求

胚胎质量应为 A 级或 B 级。

12.1.2 冷冻程序

应在室温（24℃～25℃）下，按以下操作程序冷冻胚胎：

a) 基础液中平衡胚胎 5 min～10 min。
b) 冷冻液 1 中平衡胚胎 5 min。
c) 冷冻液 2 中平衡胚胎 5 min。
d) 冷冻液 3 中平衡胚胎 35 s～45 s。
e) 装入冷冻细管，直接投入液氮。

12.1.3 冷冻胚胎的保存

按照GB/T 26938 规定执行。应填写胚胎冷冻记录表，见附录 D 中表 D.5。

12.2 玻璃化解冻

12.2.1 解冻程序

应按以下操作程序解冻胚胎：

a) 解冻液 1 中平衡胚胎 1 min，38℃。
b) 解冻液 2 中平衡胚胎 5 min，室温（24℃～25℃）。
c) 基础液中平衡胚胎 5 min，室温（24℃～25℃）。

12.2.2 记录

应填写胚胎解冻记录表，见附录 D 中表 D.6。

13 证实方法

13.1 过程记录

查验环节的记录表、照片、影像以及记录等。包括：

OPU 记录表；
OPU-IVM 记录表；
IVF 记录表；
IVC 记录表；
胚胎质量鉴定与分级的记录及照片；
胚胎冷冻和解冻记录表。

13.2 胚胎发育率

包括卵裂率和囊胚率。

a) 卵裂率按式（1）计算。

$$CLR = \frac{n_2}{n_1} \times 100 \cdots\cdots (1)$$

式中：

CLR—— 卵裂率，单位为百分率（%）；

n_1——受精时卵母细胞数，单位为个；

n_2—— 卵裂胚胎数，单位为个。

b) 囊胚率按式（2）计算。

$$BLR = \frac{n_3}{n_1} \times 100 \cdots\cdots (2)$$

式中：

BLR—— 囊胚率，单位为百分率（%）；

n_1——受精时卵母细胞数，单位为个；

n_3—— 囊胚数，单位为个。

附 录 A
（规范性）
主要仪器设备、试剂的准备

A.1 仪器设备

CO_2 培养箱、三气培养箱、高温灭菌锅、纯水机、电热鼓风干燥箱、超净台、液氮管、低速离心机、体式显微镜、恒温试管架、pH 酸度计、旋涡混合仪、超净工作台、渗透压仪、恒温平板、超声波 B 超仪器、OPU 收集管、OPU 管线、注射器、针头、移液器。

A.2 试剂

OPU 冲卵液、IVM 液体、洗精液、IVF 液体、IVC 液体、胚胎冷冻液、胚胎解冻液。

A.3 液体配方

A.3.1 IVM 液体配方见表 A.1。

表 A.1 IVM 液体配方

成分	浓度
FSH	0.01 IU/mL
LH	10.00 IU/mL
雌二醇	1.00 μg/mL
IGF	100.00 ng/mL
EGF	50.00 ng/mL
青霉素	100.00 U/mL
链霉素	100.00 μg/mL
含5%胎牛血清的TCM-199培养液	溶解定容

A.3.2 洗精液配方见表 A.2。

表 A.2 洗精液配方

成分	浓度
NaCl	112.00 mmol/L
KCl	4.02 mmol/L
$CaCl·2H_2O$	2.25 mmol/L
$MgCl·6H_2O$	0.52 mmol/L
KH_2PO_3	0.83 mmol/L
$NaHCO_3$	37.00 mmol/L
丙酮酸钠	1.25 mmol/L
咖啡因	10.00 mmol/L
BSA	4.00 mg/mL

表A.2 洗精液配方（续）

成分	浓度
青霉素	100.00 μg/ml
链霉素	100.00 μg/ml

A.3.3 IVF 液体配方见表 A.3。

表 A.3 IVF 液体配方

成分	浓度
NaCl	112.00 mmol/L
KCl	4.02 mmol/L
$CaCl·2H_2O$	2.25 mmol/L
$MgCl·6H_2O$	0.52 mmol/L
KH_2PO_3	0.83 mmol/L
$NaHCO_3$	37.00 mmol/L
丙酮酸钠	1.25 mmol/L
肝素	10.00 μg/ml
BSA	4.00 mg/mL
青霉素	100.00 U/mL
链霉素	100.00 μg/ml

A.3.4 IVC 液体配方见表 A.4。

表 A.4 IVC 液体配方

成分	浓度
NaCl	99.70 mmol/L
KCl	7.16 mmol/L
$CaCl•6H_2O$	1.71 mmol/L
$NaHCO_3$	25.07 mmol/L
$MgCl\ 6H_2O$	0.49 mmol/L
KH_2PO_4	1.19 mmol/L
丙酮酸钠	0.40 mmol/L
乳酸钠	3.30 mmol/L
胎牛血清	5.00%
必需氨基酸	1.00%
非必需氨基酸	1.00%
瘦素	100.00 U/mL

A.3.5 冷冻解冻基础液方见表 A.5。

表 A.5 基础液配方

成分	浓度
犊牛血清	20.00%
丙酮酸钠	0.30 mM
葡萄糖	3.30 mM
牛血清白蛋白	0.30%
杜氏磷酸缓冲液	溶解定容

A.3.6 胚胎冷冻液配方见表 A.6。

表 A.6 胚胎冷冻液配方

成分	浓度		
	冷冻液 1	冷冻液 2	冷冻液 3
基础液	90%	70%	45%
甘油	10%	20%	30%
乙二醇	—	10%	25%

A.3.7 胚胎解冻液配方见表 A.7。

表 A.7 胚胎解冻液配方

成分	浓度	
	解冻液 1	解冻液 2
基础液	90%	95%
半乳糖	10%	5%

A.4 培养微滴

A.4.1 体外成熟培养微滴的准备

在四孔板中制作500 μL～1000 μL的 IVM 微滴，用矿物油覆盖，放入 CO_2 培养箱中，平衡4 h以上待用。

A.4.2 体外受精微滴的准备

在四孔板中制作50 μL～100 μL的 IVF 微滴，用矿物油覆盖，放入 CO_2 培养箱中，平衡4 h以上待用。

A.4.3 体外培养培养微滴的准备

在四孔板中制作50 μL～100 μL的 IVC 微滴，用矿物油覆盖，放入 CO_2 培养箱中，平衡4 h以上待用。

附 录 B
（规范性）
和牛种牛评分标准

B.1 和牛种牛评分标准见表 B.1。

表 B.1 和牛种牛评分标准

评定项目	评定要求	满分分值	
		公牛	母牛
整体结构	品种特征明显，体尺到达品种种用要求，肉用牛体型明显，体躯紧凑，腿细，前躯发育良好，后躯稍差，公牛全身肌肉明显，毛色符合品种要求，皮肤光滑有弹性。前额中间没有长的毛发。	30	25
前驱	胸宽深，前胸突出，肩胛宽平，肌肉丰满。	15	15
后驱	臀部长宽平，大腿肌肉突出延伸。	25	25
生殖器	睾丸达到品种要求，发育正常，精液品质良好。	10	-
乳房	乳房发育正常，乳头分布均匀。	-	15
肢蹄	肢势端正，两肢间距离宽，蹄形正，体质坚实，运步正常。	20	20
合计		100	100

附 录 C
（资料性）
和牛活体采卵体外受精胚胎生产记录表

C.1 OPU 记录表见表 D.1。

表 C.1 OPU 记录表

牛号	采卵日期	上次采卵日期	卵泡数		采卵压力	捡卵数量	
			左侧	右侧		全部	可用

C.2 OPU-IVM 记录表见表 D.2。

表 C.2 OPU-IVM 记录表

采卵日期		IVM 预热时间	培养时间	成熟卵数	成熟率
总 COCs					
可用 COCs					

C.3 IVF 记录表见表 D.3。

表 C.3 IVF 记录表

IVF 预热时间	精液		
	编号	活力	浓度
受精时间	培养时间	受精卵数	受精率

C.4 IVC 记录表见表 D.4。

表 C.4 IVC 记录表

IVC 预热时间	操作时间	受精卵数	培养时间
囊胚发育情况			
囊胚率			

C.5 胚胎冷冻记录表见表 D.5。

表 C.5 胚胎冷冻记录表

冷冻日期	胚胎来源	胚胎类型	等级	数目	冻胚编号	存放位置	备注

C.6 胚胎解冻记录表见表 D.6。

表 C.6 胚胎解冻记录表

解冻日期	编号	等级	复苏	复苏率	孵化	备注

附 录 D
（规范性）
COCs 分级标准

D.1 分级标准

根据 COCs 完整性将其分为四级：

a) A 级：卵丘颗粒细胞层完整且致密，一般在四层以上，胞质均匀。
b) B 级：卵丘颗粒细胞层较少，一般为 2 层～4 层。
c) C 级：卵丘颗粒细胞层不完整，为半裸卵。
d) D 级：裸卵，退化卵，变性卵。

D.2 选择标准

应选择 A 级和 B 级的 COCs 进行体外成熟培养。