ICS
点击此处添加中国标准文献分类号

团　　体　　标　　准

T/CVMA XXXXX—XXXX

兔胚胎移植技术操作规程

Operating rules of rabbit embryo transfer

征求意见稿

中国兽医协会
CVMA

XXXX－XX－XX 发布　　XXXX－XX－XX 实施

中国兽医协会　　发布

中国兽医协会
CVMA

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。

本文件由广东省医学实验动物中心提出。

本文件由中国兽医协会归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

中国兽医协会
CVMA

兔胚胎移植技术操作规程

1 范围

本文件描述了兔胚胎移植的方法。

本文件适用于兔胚胎移植的各环节。主要包括供体兔的选择和超数排卵处理、受体兔的选择和同步发情处理、冲胚、胚胎移植。

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。

标准号	标准名称
GB16548-2006	病害动物和病害动物产品生物安全处理规程
GB18596	畜禽场污染物排放标准
NY5027-2008	无公害食品 畜禽饮用水水质
NY/T388-1999	畜禽场环境质量标准
NY5132-2021	无公害食品 肉兔饲养饲料使用准则
NY/T5133-2002	无公害食品 肉兔饲养管理准则
NY5131-2002	无公害食品 肉兔饲养兽医防疫准则
NY5030-2006	无公害食品 畜禽饲养兽药使用准则
农业转基因生物安全评价管理办法（农业部令第8号）	

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 transplantation

胚胎移植技术是指将供体兔的胚胎利用技术措施移植给受体兔，以实现兔的代繁育为目的的一项辅助生殖技术。

3.2

超数排卵 Superovulation

利用促性腺激素提高供体兔同期卵泡发育数量和卵子数量的技术。

3.3

供体 Donors

提供成熟胚胎的健康母兔。

中国兽医协会 CVMA

3.4

受体 Receptor

接受（移植）胚胎的健康经产母兔。

3.5

检胚 Embryo inspection

对胚胎进行质量鉴定、分级、清洗和保存的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

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

HCG 人绒毛膜促性腺激素（Human chorionic gonadotrophin）

PMSG 孕马血清促性腺激素（Pregnant Mare Serum Gonadotropin）

5 试剂和药品

以下所用的试剂除特别注明者外均为分析纯，实验用水为双蒸水或去离子水，应符合 GB/T 6682 所规定一级水的要求。环境及设施应符合兔的生物学特性并满足其健康、福利、质量控制和生物安全等要求。

5.1 孕马血清促性腺激素：市售。

5.2 人绒毛膜促性腺激素：市售。

5.3 促性腺激素释放激素：市售。

5.4 199 培养基：干粉，市售。

5.5 冲胚液和胚胎操作液，配制方法见附录 A。

6 供体兔的选择和超数排卵

6.1 供体兔的选择

供体兔必须遗传背景明确、身体健康、发育正常，无传染性疾病。供体兔应符合品种标准。供体兔应发育至性成熟，一般选择4月龄以上母兔。

6.2 供体兔的饲养管理

供体兔应饲喂优质饲料，适当补充蛋白质、维生素、矿物质，并供给清洁的饮水，做到合理饲养，科学管理。供体兔应保持中等体膘，在采胚前后应保证良好的饲养条件，不得随意变换饲料和管理程序。

6.3 供体兔的超数排卵处理和配种

中国兽医协会 CVMA

在供体兔发情间期（外阴颜色为浅粉红色或白色）皮下注射 PMSG 150 IU，72 h 后与公兔配种或人工授精，并静脉注射 HCG 150 IU。超排药品的剂量根据不同厂家和批号可稍作调整。

7 受体兔的选择和同期发情

7.1 受体兔的选择

受体兔必须已达体成熟、身体健康、中等体膘、繁育性能良好、无传染性疾病。建议使用母性良好的经产母兔。

7.2 受体兔的饲养管理

受体兔应饲喂优质饲料，适当补充蛋白质、维生素、矿物质，并供给清洁的饮水，做到合理饲养，科学管理。受体兔在胚胎移植前应保持中等体膘。受体兔在胚胎移植术后应保证良好的饲养条件，按照母兔妊娠后的繁殖育种程序管理。

7.3 受体兔的同期发情处理

挑选处于发情期（外阴红肿，呈深红色）的受体兔静脉注射 HCG 100 IU 或肌肉注射 GnRH 15 μg。

8 繁育兔胚胎移植程序

以供体兔皮下注射PMSG的当天为第1天（见表1）。

表 1 兔胚胎移植程序表

时间点	处理项目
第 1 天	供体兔皮下注射 PMSG
第 3 天	供体兔配种，同时静脉注射 HCG；受体兔静脉注射 HCG 或肌肉注射 GnRH
第 4 天	冲胚，检卵，胚胎移植

9 冲胚

9.1 冲胚时间

以皮下注射 PMSG 为第 1 天。在第 4 天用手术法或安乐死后从输卵管回收胚胎（在人工输精或配种后 20 h~25 h 内冲卵，可冲出发育至 1 细胞期~4 细胞期的胚胎）。

9.2 手术室要求

采胚及胚胎移植要在要求在干净、光线充足、无尘的环境下进行。室内温度保持约 25 ℃。定期用百毒杀溶液等消毒剂喷雾消毒，手术前用紫外灯照射 1 h~2 h。

9.3 器械、冲胚液等的准备

9.3.1 金属手术器械应提前进行高温高压灭菌处理。

9.3.2 培养皿、注射器、纱布、缝合线和手术贴膜均采用一次性无菌用品。

中国兽医协会 CVMA

9.3.3　经过滤除菌的冲胚液提前 30 min 置于 38.5 ℃水浴预热。培育皿置于恒温热台或培养箱内待用。

9.3.4　备齐麻醉药、消毒药、抗菌素及酒精棉和碘酒棉等物品。

9.4　供体兔术前准备

供体兔术前一天晚上适量减少饮食，但避免完全禁食。

9.5　采胚方法

可选取体外冲胚法，或手术体内输卵管冲胚法。

9.5.1　体外冲胚法

供体兔安乐死后分离子宫角、输卵管和卵巢。用平针头注射器抽取5 mL预热的冲胚液。将针头从子宫角朝输卵管方向进入，穿入输卵管峡部。一人操作，一只手的手指在针头后方捏紧子宫角，另一只手推注射器。冲胚液由宫管结合部流入输卵管，液体将胚胎从输卵管伞部冲出，收集冲卵液于60 mm培养皿中。

9.5.2　手术体内输卵管冲胚

9.5.2.1　供体兔的保定和麻醉

供体兔仰放在手术保定架上，四肢固定。盐酸赛拉嗪肌肉注射诱导麻醉 0.15 mL/kg 体重，4 %~5 %异氟烷诱导麻醉，再用 1 %~2 %异氟烷维持呼吸麻醉。

9.5.2.2　手术部位及其消毒

手术部位一般选择下腹中线。用剃毛刀剃毛，然后涂以 5 %的碘酒消毒 3 次，待干后再用 75 %的酒精棉脱碘。将无菌手术贴膜贴在手术部位。

9.5.2.3　术者的准备

术者应将指甲剪短滑光，用指刷、肥皂清洗，再进行消毒。术者需穿无菌手术服，戴工作帽和口罩。

9.5.2.4　手术操作

1)组织分离和止血

在下腹部沿着腹中线手术切开腹部，切口长约为 5 cm~8 cm。作切口时应尽量避开较大血管和神经，依皮肤、筋膜、肌肉、腹膜逐层切开，切口边缘与切面要整齐，切口方向与组织走向尽量一致，切开肌肉时采用钝性分离法。

手术中出血应及时止血。对常见的毛细管出血或渗血，用纱布敷料轻压出血处即可。小血管出血可用止血钳止血，较大血管出血除用止血钳夹住暂时止血外， 必要时结扎止血。

2)引出子宫角和输卵管

切开后，在后腹部暴露子宫角、输卵管、卵巢。不可用力牵拉卵巢和输卵管。观察卵巢表面是否有排卵点。如果没有排卵点，则不冲胚。

3)引出子宫角和输卵管

其中一人将塑料插管（内径约 1.2 mm，外径约 1.7 mm，长约 50 mm）的一端由输卵管伞部开口插入约 2 cm 深（用手指固定），插管的另一端放入培养皿。然后另外一人用平针头注射器吸

中国兽医协会 CVMA

取提前 38.5 ℃预热的冲胚液 5 mL，在子宫角靠近输卵管的部位，将针头朝输卵管方向扎入，一人操作，一只手的手指在针头后方捏紧子宫角，另一只手推注射器。冲胚液由宫管结合部流入输卵管，经输卵管流至培养皿。

4)术后处理

冲卵后，将卵巢、输卵管和子宫角复位，缝合，消毒。兔术后肌注抗生素 2 d~3 d，预防感染。

10 检胚

吸取 200 μL 胚胎操作液，在 35 mm 的无菌塑料皿底部作数个规则排列的培养微滴，并用矿物油覆盖，置于 38.5 ℃恒温热台上提前加热备用。检胚操作室温应为 25 ℃~30 ℃。待检的胚胎应保持在 38.5 ℃冲胚液中，置于体式显微镜下，用口吸管或手控管检胚。将胚胎吸至不同胚胎操作液微滴中洗 3 次~5 次，然后把全部胚胎移至新的胚胎操作液微滴中培养。

11 胚胎鉴定

凡单细胞期胚胎内部未见两个极体和原核，或胚胎的卵黄未形成分裂球及细胞团，均列为未受精卵。未受精胚胎或非正常发育胚胎，不能用于胚胎移植。

12 胚胎移植

12.1 受体母兔术前准备

受体兔术前一天晚上应适量减少饮食，但避免完全禁食。

12.2 受体母兔胚胎移植手术

12.2.1 受体兔麻醉

盐酸赛拉嗪肌肉注射诱导麻醉 0.15 mL/kg 体重，4 %~5 %异氟烷诱导麻醉，再用 1 %~2 %异氟烷维持呼吸麻醉。受体兔麻醉后侧卧位置于手术台上。

12.2.2 手术部位及其消毒

手术部位下腹侧部。用剃毛刀剃毛，然后涂以 5 %的碘酒消毒 3 次，待干后再用 75 %的酒精棉脱碘。将无菌手术贴膜贴在手术部位。

12.2.3 术者的准备

术者应将指甲剪短滑光，用指刷、肥皂清洗，再进行消毒。术者需穿无菌手术服，戴工作帽和口罩。

12.2.4 手术操作

12.2.4.1 组织分离和止血

——后侧腹部开 2 cm ~3 cm 切口，逐层切开皮肤、肌肉层和腹膜，暴露输卵管和卵巢。作切口时应尽量避开较大血管和神经，依皮肤、筋膜、肌肉、腹膜逐层切开，切口边缘与切面要整齐，切口方向与组织走向尽量一致，切开肌肉时采用钝性分离法。切开后暴露输卵管和卵巢。

——手术中出血应及时止血。对常见的毛细管出血或渗血，用纱布敷料轻压出血处即可。小血管出

中国兽医协会 CVMA

血可用止血钳止血，较大血管出血除用止血钳夹住暂时止血外， 必要时结扎止血。

12.2.4.2 移植胚胎

——不可用力牵拉卵巢和输卵管。将胚胎吸入移植管。从输卵管漏斗处插入移植管，将胚胎移入输卵管，每个输卵管移植4枚~10枚。移植后，将卵巢、输卵管和子宫角复位，按常规手术逐层缝合、消毒。

12.2.4.3 分娩与护理

——术后3 d予以抗生素预防感染。母兔孕期自由采食，自由饮水。母兔妊娠期约31 d。分娩前一周移至产笼待产。

——新生仔兔由母兔正常哺乳或人工哺育。

中国兽医协会
CVMA

附　录　A
（规范性）
溶液的配制

表A1 冲胚液

组分	成分	分子量	含量 mg/L
A液	氯化钠	58.44	8000
	氯化钾	74.65	200
	磷酸氢二钠	141.96	1150
	磷酸二氢钾	136.09	200
	葡萄糖	180.16	1000
	丙酮酸钠	110.05	36
	青霉素	/	70
	链霉素	/	50
	牛血清白蛋白	/	3000
B液	氯化钙	110.99	100
C液	六水氯化镁	203.31	100

注：A液、B液、C液分别配制，溶解后再混匀。过滤除菌，4 ℃保存不超过3周。

表A2 胚胎操作液

成分	50 uL体系
丙酮酸钠	0.0033 g
L-谷氨酰胺	0.146 g
碳酸氢钠	0.11 g
199培养基	0.475 g
牛血清白蛋白	0.15 g
必需氨基酸（50×）	1000 uL
非必需氨基酸（50×）	1000 uL

注：过滤除菌，4 ℃保存不超过3周。

中国兽医协会 CVMA