

T/SHAAV

团 体 标 准

T/SHAAV 027—2024

猪胚胎生产、冷冻与移植技术规程

Technical codes of practice for porcine embryo production, cryopreservation and transfer

2024 - 11 - 01 发布

2024 - 11 - 01 实施

上海市畜牧兽医学会 发 布

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 供体与受体 1

5 胚胎生产 2

6 胚胎冷冻 2

7 胚胎移植..... 4

附录A （资料性） 生猪重大或重要动物疫病控制要求..... 5

附录B （资料性） 试剂配方..... 6

附录C （资料性） 手术冲胚与胚胎回收..... 8

附录D （资料性） 冲胚检胚记录表..... 10

附录E （资料性） 冷冻胚胎制作记录表..... 11

附录F （资料性） 胚胎移植..... 12

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。

本文件由上海市畜牧兽医学会提出并归口。

本文件起草单位：上海市农业科学院、上海市动物疫病预防控制中心、重庆市畜牧科学院。

本文件主要起草人：徐皆欢、戴建军、章伟建、潘红梅、何孟纤、吴彩凤、陆雪林、张德福、张亮、吴昊旻、张树山、龙熙、孙玲伟、邢磊、高骏。

本文件首批承诺执行单位：上海市农业科学院、上海市动物疫病预防控制中心、重庆市畜牧科学院。

猪胚胎生产、冷冻与移植技术规程

1 范围

本文件规定了猪胚胎的供体与受体、胚胎生产、胚胎冷冻与胚胎移植的技术要求。
本文件适用于猪胚胎生产、冷冻、移植与检验入库。

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 13078 饲料卫生标准

GB/T 17824.2 规模猪场生产技术规程

NY/T 65 猪饲养标准

NY/T 636 猪人工授精技术规程

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

将体内、外生产的猪早期合格胚胎移植到与其生殖生理状态相同或相近的母猪子宫或输卵管内，以生产后代的技术。

3.2

供体 donor

提供胚胎的母猪个体。

3.3

受体 receptor

子宫或输卵管被植入胚胎的母猪个体。

3.4

冷冻液 vitrification solution

冷冻时保护胚胎的溶液。

3.5

解冻液 thawing solution

解冻时保护胚胎的溶液。

4 供体与受体

4.1 供体要求

- 4.1.1 应为成年母猪，符合品种特性与特征，系谱清楚。
- 4.1.2 应具有较高的生产性能，后备母猪应有最近连续两次正常发情记录，经产母猪应有良好的繁殖记录，死胎或弱胎少。
- 4.1.3 已作为供体的母猪，间隔60 d左右可重复使用，若再次超数排卵反应差，则不宜再作为供体。
- 4.1.4 无遗传性疾病，重大或重要动物疫病控制要求见附录A。

4.2 受体要求

- 4.2.1 应为自然发情或经同期发情处理的成年母猪。
- 4.2.2 经产受体应有良好的繁殖记录，以2胎次~6胎次最佳，死胎或弱胎少，断奶后发情表现明显。
- 4.2.3 符合重大或重要动物疫病控制要求。
- 4.2.4 受体的生殖生理状态应和胚胎发育时期相对应，二者相差不宜超过12 h。

4.3 饲养管理

- 4.3.1 供体与受体的饲料营养水平应符合NY/T 65的规定。
- 4.3.2 供体与受体的饲料卫生指标应符合GB 13078的规定。
- 4.2.3 猪群管理应符合GB/T 17824.2的规定。

5 胚胎生产

5.1 同期发情

同期发情方法如下：

- a) 供体每日固定时间口服烯丙孕素，剂量为15 mg/头~20 mg/头，连续口服14 d~18 d。
- b) 最后一次口服烯丙孕素后42 h，肌肉注射孕马血清促性腺激素，剂量为800单位/头~1000单位/头。
- c) 注射孕马血清促性腺激素后80 h，肌肉注射促性腺激素释放激素，剂量为100 µg/头~200 µg/头。

5.2 配种

- 5.2.1 供体出现静立反射或注射促性腺激素释放激素后24 h，通过自然交配或人工授精予以配种。
- 5.2.2 人工授精按NY/T 636的规定执行。

5.3 胚胎回收

- 5.3.1 应通过手术法冲胚或屠宰并完整取出子宫与卵巢后进行冲胚。
- 5.3.2 冲胚液的配制方法见附录B.1，手术冲胚和胚胎回收方法见附录C.1与附录C.2。
- 5.3.3 应对回收得到的胚胎进行分类与分级，胚胎分类标准见附录C.3，胚胎分级标准见附录C.4。
- 5.3.4 胚胎回收过程应做记录，冲胚检胚记录表见附录D。

6 胚胎冷冻

6.1 胚胎冷冻

6.1.1 试剂的配制

冷冻液I、冷冻液II、解冻液I、解冻液II与胚胎培养液北卡罗来纳州立大学-23培养基（North Carolina State University-23 media, NCSU23）配方见附录B。

6.1.2 胚胎分类与分级

应是A级或B级的桑葚胚和囊胚。

6.1.3 剂型

冷冻载杆，每支1枚~5枚胚胎。

6.1.5 方法

胚胎冷冻方法如下：

- a) 提前2 h调节室温至25℃~30℃。冷冻液I、冷冻液II预热至38.5℃。
- b) 将源于同一供体且分类与分级相同的1枚~5枚胚胎移入一个100 μL冷冻液I小滴中处理3 min。
- c) 将冷冻液I中的胚胎移入一个30 μL冷冻液II小滴中处理15 s。
- d) 将胚胎迅速装载至冷冻载杆上并吸除多余溶液，然后直接投入到液氮中。

6.2 标志

6.2.1 细管套管

冷冻胚胎细管套管上用汉语拼音首字母、符号、数字和英文缩略词标明猪品种、供体母猪号、配种公猪号、胚胎发育阶段、胚胎等级、胚胎数量、胚胎冷冻日期等详细资料，如“MS♀111×MS♂888 CM-A×3 20230102（即梅山猪♀111×梅山猪♂888 桑葚胚A级3枚 2023年1月2日）”。

6.2.2 纱布袋

装有冷冻胚胎的纱布袋上用汉语拼音首字母、英文缩略词和数字标明猪品种、供体母猪号、配种公猪号、胚胎发育阶段、胚胎等级、胚胎数量及胚胎冷冻日期等详细资料。同一供体不同时期、不同等级的胚胎信息应分别标注清楚。

6.3 随行文件

随行文件应包括种猪系谱、供体三代以内系谱、生产性能测定数据、疫病检测报告或相关证明材料、冷冻胚胎制作记录表等。冷冻胚胎制作记录表见附录E。

6.4 包装、贮存和运输

6.4.1 包装

- 6.4.1.1 包装应在液氮中进行。
- 6.4.1.2 冷冻载杆插入外套管，然后装入细管套管中，装载胚胎的一端应位于细管套管内侧。
- 6.4.1.3 供体来源相同，但胚胎时期与等级不同的多支冷冻载杆应分开装入多个细管套管。
- 6.4.1.4 相同供体来源胚胎的细管套管装入一个纱布袋长期保存。

6.4.2 贮存

冷冻胚胎应贮存于装有液氮的容器。在由一个容器转移至另一容器时，间隔时间不得超过3 s。

6.4.3 运输

应有专人负责，液氮罐不可横放、叠放或倒置，不得碰撞或剧烈震动，保证冷冻胚胎始终浸在液氮中。装车运输时应在车厢板上安装防震胶垫。

6.5 胚胎解冻

胚胎解冻方法如下：

- a) 提前2 h调节室温至25℃~30℃；解冻液I、解冻液II、胚胎培养液NCSU23预热至38.5℃。
- b) 将冷冻载杆含有胚胎的一端浸入100 μL解冻液I中，使胚胎脱离载杆。
- c) 将胚胎转入新的100 μL解冻液I中平衡5 min，转入100 μL解冻液II中平衡5 min，转入500 μL NCSU23中平衡10 min，以充分洗去冷冻保护剂。
- d) 解冻后的胚胎置于覆盖有矿物油的500 μL NCSU23小滴中培养，进行质量检测或等待胚胎移植，培养条件为38.5℃、5% CO₂和饱和湿度。

6.6 质量检测

6.6.1 抽样数量

随机抽取总样本量的2%进行质量检测。

6.6.2 方法

冷冻胚胎解冻后于覆盖有石蜡油的NCSU23小滴中继续培养4 h~24 h，培养条件为38.5℃、5% CO₂和饱和湿度。

6.6.3 指标

胚胎继续发育率达50%以上。

7 胚胎移植

胚胎移植方法参照附录F。

附 录 A
(资料性)
生猪重大或重要动物疫病控制要求

A.1 表A.1给出了生猪重大或重要动物疫病控制要求。

表 A.1 生猪重大或重要动物疫病控制要求

畜禽种类	疫病种类	控制要求
生猪	非洲猪瘟	病原学及其病毒抗体检测阴性
	口蹄疫	病原学检测阴性
	猪瘟	病原学检测阴性
	猪伪狂犬病	病原学及其病毒抗体检测阴性
	猪繁殖与呼吸综合征	病原学及其病毒抗体检测阴性

附 录 B
(资料性)
试剂配方

B.1 表 B.1 给出了冲胚液配方（推荐）。

表 B.1 冲胚液配方（推荐）

成分	浓度	添加量
NaCl	136.87 mM	8.00 g/L
KCl	2.68 mM	0.20 g/L
CaCl ₂	0.90 mM	0.10 g/L
KH ₂ PO ₄	1.47 mM	0.20 g/L
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.49 mM	0.10 g/L
Na ₂ HPO ₄	8.09 mM	1.15 g/L
丙酮酸钠	0.33 mM	0.036 g/L
葡萄糖	5.50 mM	1.00 g/L
胎牛血清	2.00%	20.00 mL/L
青霉素		100.00 IU/mL
链霉素		100.00 µg/mL
双蒸水		980.00 mL/L

B.2 表 B.2 给出了 NCSU23 配方（推荐）。

表 B.2 NCSU23 配方（推荐）

成份	添加量 (g/100 mL)	成份	添加量 (g/100 mL)
NaCl	0.6354	KCl	0.0356
CaCl ₂	0.0187	KH ₂ PO ₄	0.0162
Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	0.0293	NaHCO ₃	0.2106
Glucose	0.1000	Glutamine	0.0146
Taurine	0.0876	Hypotaurine	0.0546
BSA	0.4000	Penicillin G	0.0075
Streptomycin	0.0050	Phenol Red	0.0010

B.3 给出了冷冻液配方（推荐）。

冷冻液I：TCM-199中添加20%胎牛血清、7.5%二甲基亚砷和7.5%乙二醇。

冷冻液II：TCM-199中添加20%胎牛血清、17%二甲基亚砷、17%乙二醇和0.4 M蔗糖。

B.4 给出了解冻液配方（推荐）。

解冻液I：TCM-199中添加20%胎牛血清和0.13 M蔗糖。

解冻液II：TCM-199中添加20%胎牛血清和0.075 M蔗糖。

附 录 C
(资料性)
手术冲胚与胚胎回收

C.1 手术冲胚

C.1.1 时间

以第一次配种记为0 d, 第6 d~7 d手术冲胚。

C.1.2 器械和冲胚液的准备

C.1.2.1 按腹腔外科手术准备手术用器械, 包括手术刀、止血钳、手术镊、创巾创布、缝针等, 并进行高压灭菌。

C.1.2.2 灭菌后的冲胚管用无菌PBS冲洗2次~3次后备用, 无菌冲胚液于37°C水浴中备用。

C.1.2.3 准备好必要的麻醉剂、消毒剂、酒精棉和注射器等。

C.1.3 猪的保定和麻醉

供体猪需保定确实。麻醉建议采用丙泊酚或2.5%戊巴比妥钠静脉注射, 或使用氯胺酮+异氟烷呼吸麻醉的方法。手术部位采用盐酸普鲁卡因局部麻醉。麻醉后将猪保定在手术台(头低尾高), 并派专人进行维持麻醉, 直至手术结束。

C.1.4 术者的准备

术者应剪短指甲, 用指刷和肥皂清洗手及手臂, 注意刷洗指缝。术者穿戴完手术服、手术帽和口罩后, 用0.1%的新洁尔灭浸洗手臂5 min, 再用75%酒精棉球擦拭。消毒完毕后, 要保持拱手姿势, 避免与其它未经消毒的物品接触, 一旦接触, 应重新消毒。

C.1.5 手术冲胚

术式如下:

- a) 以倒数第1、2对乳头为中心部位, 皮肤消毒。
- b) 盖上创巾, 暴露手术部位。
- c) 在猪倒数第1、2对乳头之间沿腹中线切开皮肤, 缓慢分离脂肪、肌肉、腹膜和腹脂等。
- d) 暴露一侧子宫角, 并沿子宫角、输卵管牵引出该侧卵巢, 观察排卵点情况。
- e) 从子宫角距尖端1/2~2/3部位朝子宫角方向插入猪用冲胚管并固定, 用注射器吸取50 mL冲胚液, 以平角钝头针从宫管结合部子宫角尖进针, 注入冲胚液及少许空气, 并从进针处往前驱赶冲胚液, 将冲胚液收集于50 mL带盖离心管内。
- f) 撤出冲胚管, 子宫上小创口用一针内翻缝合。
- g) 以相同方法冲洗另一侧子宫角。
- h) 使用加温的生理盐水冲洗子宫, 子宫复位, 缝合肌肉、脂肪和皮肤。
- i) 注射抗生素, 预防术后感染。

C.2 胚胎回收

胚胎回收方法如下:

- a) 回收的冲胚液在38.5°C水浴中静置15 min~20 min使胚胎沉淀。
- b) 用吸液管吸取试管底部4 mL~5 mL溶液于培养皿中, 置于实体显微镜下检查。
- c) 将胚胎全部检出, 放入覆盖有矿物油且在38.5°C的CO₂培养箱预平衡过的NCSU23液滴中待用。

C.3 胚胎分类

C.3.1 在100倍~200倍实体显微镜下观察胚胎的形态、色调、分裂球的大小、均匀度、囊胚腔形态、细胞与透明带的间隙等。

C.3.2 凡胞质未形成分裂球及细胞团的，均列入未受精卵。

C.3.3 6 d~7 d胚胎应为致密桑椹胚（compacted morula, CM）、早期囊胚（early blastocyst, EB）、扩张囊胚（expanded blastocyst, EXB）和孵化囊胚（hatching blastocyst, HB）阶段，可用于胚胎冷冻保存和胚胎移植。

C.4 胚胎分级

C.4.1 A级：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，无附着的细胞和液泡。

C.4.2 B级：轮廓清晰，色调及细胞密度良好，可见到一些附着的细胞和液泡，变性细胞约占10%~30%。

C.4.3 C级：轮廓不清晰，色调发暗，结构较松散，游离的细胞或液泡较多，变性细胞达30%~50%。

C.4.4 胚胎的等级划分还应考虑到受精卵的发育程度。

C.4.5 凡未在上述发育阶段的受精卵及变性细胞超过50%的胚胎不作分级。

附 录 D
(资料性)
冲胚检胚记录表

D.1 表 D.1 给出了冲胚检胚记录表。

表 D.1 冲胚检胚记录表

供体号	母猪：	公猪：		
输精或配种日期				
冲胚日期				
超排情况	黄体数：左侧：		右侧：	
	退化黄体数：			
	卵泡数：左侧：		右侧：	
	其他：			
冲胚与检胚情况	共检得胚胎 枚			
鲜胚质量评定				
可用胚胎	A 级	B 级	C 级	总计
数量				
不可用胚胎	2~8 细胞	退化	未受精	总计
数量				
冲胚员：			检胚员：	

附 录 E
(资料性)
冷冻胚胎制作记录表

E.1 表 E.1 给出了冷冻胚胎制作记录表。

表 E.1 冷冻胚胎制作记录表

供体号：				品种：			
冲胚结束时间：				冷冻时间：			
冷冻方法：				冷冻剂：			
胚胎冷冻保存情况							
细管号	数量	胚胎发育阶段	级别	小筒号	提漏号	储存罐号	备注
操作员：							

附录 F
(资料性)
胚胎移植

F.1 同期发情

受体母猪同期发情方法同5.1。

F.2 胚胎移植

F.2.1 器械的准备

器械的准备同C.1.2。

F.2.2 猪的保定和麻醉

猪的保定和麻醉同C.1.3。

F.2.3 术者的准备

术者的准备同C.1.4。

F.2.4 手术移植

术式如下：

- a) 以倒数第1、2对乳头为中心部位，皮肤消毒，盖上创巾，暴露手术部位。
 - b) 沿腹中线切开皮肤，缓慢分离脂肪、肌肉、腹膜和腹脂等。
 - c) 用手指探测子宫，并沿子宫角、输卵管取出该侧卵巢，观察排卵状况，并将胚胎移入排卵点良好的一侧子宫角内。
 - d) 将新鲜或解冻后的胚胎吸入胚胎移植管内备用。
 - e) 使用细的针头在靠近卵巢1/3的子宫角部位扎一小孔。
 - f) 将胚胎移植管沿小孔插入子宫内3 cm~4 cm，将胚胎移入子宫。
 - g) 涂抹止血敏并确认无出血点后还纳入腹腔，分别缝合腹膜腹脂、肌肉、脂肪和皮肤，碘酊消毒
 - h) 术后受体母猪单栏饲养1周~2周，并连续3 d使用头孢类抗生素消炎，做好术后护理，并注意观察。
-