

牛超数排卵与胚胎移植

Protocol for Bovine Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET)

吴德国^{1,*}, 庞云渭², 朱化彬²

¹ 中国科学院遗传与发育研究所, 北京 100101

² 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所, 北京, 100193

*通讯作者邮箱: mdgwu@genetics.ac.cn; zhuhuabin@caas.cn

引用格式: 吴德国, 庞云渭, 朱化彬 (2022). 牛超数排卵与胚胎移植. *Bio-101* e1010962. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010962.

How to cite: Wu, D. G., Pang, Y. W. and Zhu, H. B. (2022). Protocol for Bovine Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET). *Bio-101* e1010962. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010962. (in Chinese)

摘要: 超数排卵是生产牛体内胚胎的重要技术环节, 其原理是利用外源生殖激素按照一定的程序处理供体, 使其卵巢上多个卵泡发育、成熟并排卵, 发情配种后 6-7 天利用非手术方法将胚胎从供体子宫角中冲洗出来, 从而获得可用的体内胚胎。如果要获得胚胎的后代, 则需要将胚胎移植到受体子宫内使之继续发育并产犊。

关键词: 超数排卵, 胚胎生产, 胚胎移植

材料与试剂

1. 供体

供体应遗传特性优良、健康状况良好、繁殖机能旺盛、无传染性疾病和生殖器官疾病。

2. 超数排卵药品 (试剂)

超排常用药品包括:

- (1) 促卵泡素 (Follicle-stimulating hormone, FSH) (图 1)
- (2) 前列腺素 (Prostaglandin F_{2α}, PGF_{2α}) (图 1)
- (3) 孕酮埋植栓 (Controlled Internal Drug Release, CIDR) (图 2)

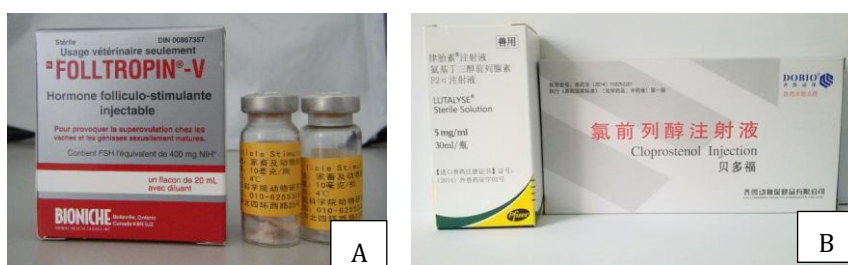


图 1. 超排常用的 FSH 和 $PGF_{2\alpha}$ (示例). A: 两种 FSH 制剂; B: 两种 $PGF_{2\alpha}$ 制剂



图 2. 超排常用 CIDR (示例)

仪器设备

1. 采胚器械

采集胚胎器械包括采卵管 (含钢芯)、扩宫棒和粘液棒。

a. 采卵管

牛常用采卵管见图 3。

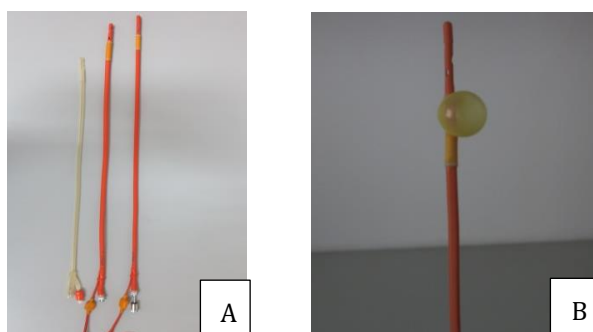


图 3. 采卵管. A: 不同质材的采卵管; B: 采卵管 (示气囊)

b. 扩宫棒和粘液棒

牛常用扩宫棒和粘液棒见图 4。



图 4. 粘液棒和扩宫棒

2. 捡胚器械

捡胚器械包括胚胎漏斗、体视显微镜、加热台、塑料培养皿和捡胚吸管等。

a. 胚胎漏斗

常用牛胚胎过滤漏斗见图 5。

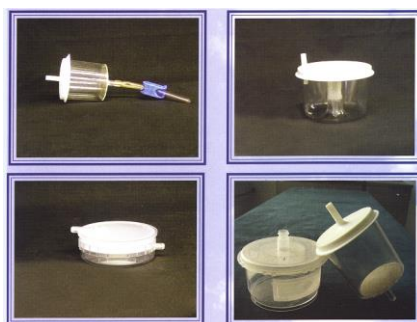


图 5. 胚胎漏斗

b. 体视显微镜和加热台

常用体视显微镜和加热台见图 6。

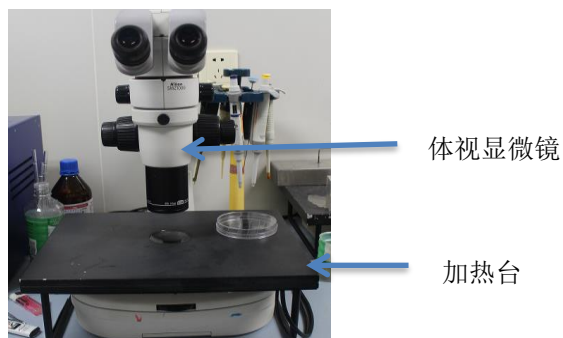


图 6. 体视显微镜和加热台

3. 冷冻器械

牛胚胎冷冻保存常采用慢速冷冻方法，冷冻仪器见图 7。



图 7. 不同型号的胚胎冷冻仪器

4. 胚胎移植器械

牛胚胎移植器械包括胚胎移植枪、硬外套管和软外套管等（见图 8）。

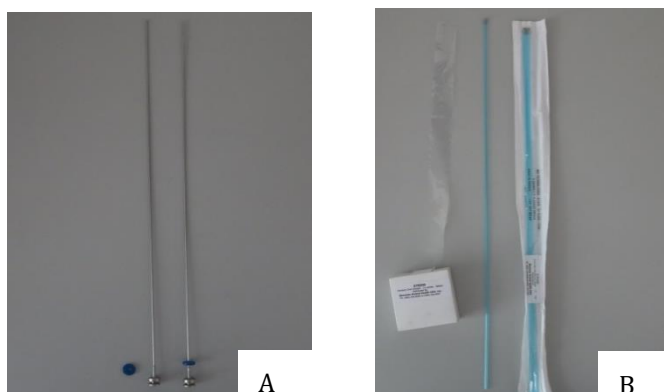


图 8. 胚胎移植枪、硬外套和塑料软外套（管）。A: 移植枪；B: 硬外套和软外套（管）

实验步骤

一、超数排卵

1. 超排激素与剂量

超排使用的生殖激素包括 FSH、PGF_{2α} 和孕酮。供体在超排时注射外源生殖激素的适宜剂量因激素产品和供体的不同而不同。不同厂家生产的 FSH 由于其效价和单位可能不同，因而注射剂量也就不同。同时，不同体重和年龄的供体（如青年牛和成年牛），超排使用的 FSH 剂量也应有区别。

表 1 以目前超数排卵生产牛体内胚胎最常用的两种 FSH 和 PG 为例，给出了青年和成年供体超排使用的 FSH 和 PG 参考剂量。

表 1. 超排时 FSH 和 PG 适宜剂量

激素种类（商品名）	生产厂家	剂量	
		青年供体	成年供体
FSH	中科院动物所	7.5~8.0mg/头	8~8.5 mg/头
FOLLTROPIN-V	贝尔尼奇公司	260~300 mg/头	360~400 mg/头
氯前列腺素	齐鲁动物保健品有限公司	0.4 mg~0.6 mg /头/次	
律胎素	硕腾动物保健品公司	25 mg/头/次	

2. 超排方法

供体超排时血液中需要维持一定浓度的外源促性腺激素才能持续刺激卵巢一定数量的卵泡发育、成熟和排卵，而 FSH 在动物体内的半衰期约为 5 个小时。为了维持供体血液中 FSH 的浓度，需要间隔 12 小时左右注射一定剂量的 FSH。因此，目前牛超排最常用的 FSH 注射方法是“连续 4 天递减注射法”，即每天间隔 12 小时左右注射 2 次，连续注射 4 天。表 2 以 FOLLTROPIN-V 和氯前列腺素为例，给出了成年供体埋植 CIDR 超排中注射 FSH 和 PG 的时间和剂量（表 2）。

表 2. 牛超数排卵方案（示例）单位：剂量/头

处理天数 时间 \ 剂量	第 0 天	第 5 天	第 6 天	第 7 天	第 8 天	第 9 天	第 10 天	第 16 天
上午 8: 00	埋植 CIDR	FSH: 70 mg	FSH: 60 mg	FSH: 40 mg PG: 0.6 mg	FSH: 20 mg	观察发情	第二次 AI	冲胚
下午 20: 00	——	FSH: 70 mg	FSH: 60 mg	FSH: 40 mg PG: 0.4 mg 撤栓	FSH: 20 mg	第一次 AI	——	——

3. 发情观察与配种

正常情况下，埋植 CIDR 超排的供体应在处理后的第 9 天应发情。供体发情以接受爬跨为发情特征（见图 9），发情当天记为 0 天。发情母牛利用人工授精（artificial insemination, AI）方式配种 2 次，第一次人工授精时间为发情后 10~12h，输精 2 支冷冻细管精液。间隔 10~12h 第二次人工授精，输精 1 支冷冻细管精液。



图 9. 发情的母牛（接受爬跨者）

二、胚胎采集

1. 胚胎采集时间

供体发情后第 7 天（发情当天为 0 天）。

2. 胚胎采集方法

“非手术采卵法”采集牛胚胎，即通过直肠把握，将冲卵管通过子宫颈放到子宫角一定的位置并气囊固定，然后用一定量的冲卵液反复冲洗子宫，从而把胚胎冲出供体子宫角的方法。牛胚胎采集，又简称采胚、冲胚、冲卵等。

3. 胚胎采集过程

胚胎采集过程包括供体的保定麻醉与消毒、检查卵巢、插入采卵管、冲洗子宫角和回收液体、捡卵和胚胎质量鉴定等过程。

（1）供体保定、麻醉与消毒

将供体保定在保定栏内，肌肉注射 1 ml 静松灵全身麻醉，或者 2%利多卡因 5~7 ml 硬膜外麻醉（见图 10）。清除直肠内宿粪，清水清洗母牛外阴部和后躯，75%酒精棉球消毒外阴部（见图 11）。

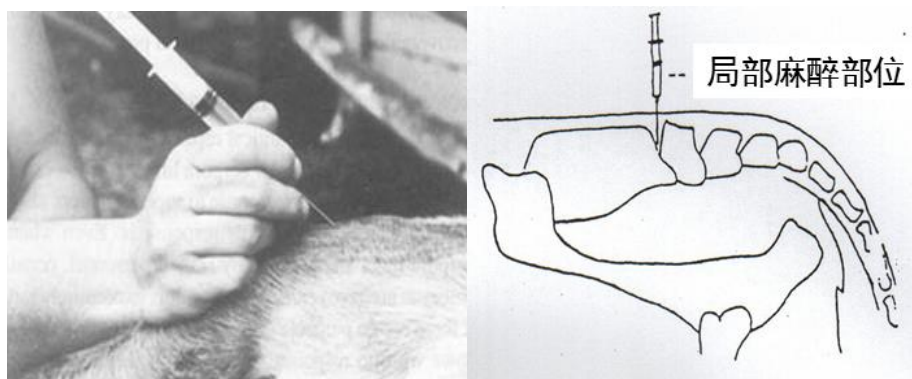


图 10. 硬膜外麻醉部位（局部麻醉）



图 11. 清洗和消毒外阴

（2）检查黄体

直肠触诊（或 B 超）检查超排供体卵巢上黄体 and 卵泡情况，记录两侧卵巢上的黄体 and 卵泡数量（见图 12）。

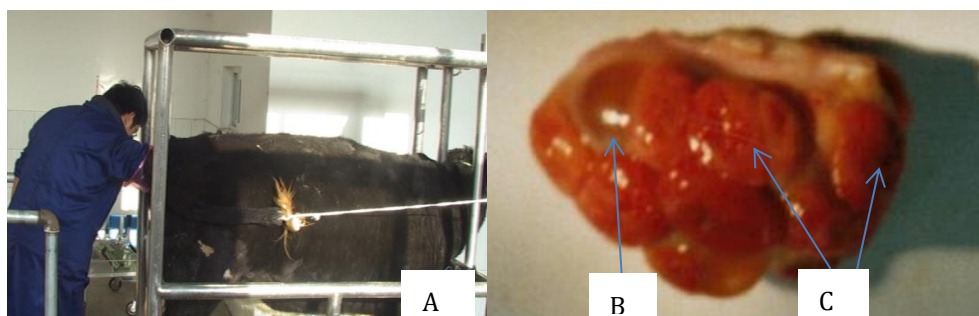


图 12. 检查卵巢上黄体 and 卵泡

A: 直肠检查卵巢情况; B: 超排后卵巢上的卵泡; C: 超排后卵巢上的黄体

(3) 吸取粘液

用消毒的黏液棒吸除子宫颈口（内）的黏液。如果是青年，则还应用消毒的扩张棒扩张子宫颈（见图 13）。



图 13. 扩宫棒扩张子宫颈

(4) 插入采卵管

采卵管插入阴道内，依次通过子宫颈口、子宫体，进入一侧子宫角至大弯处（前端）（见图 14）。



图 14. 插入采卵管

采卵管到达子宫角合适位置后，用 20ml 注射器向采卵管气囊充气（青年牛 10~15 ml，成年牛 15~20 ml）固定采卵管，最后拔出钢芯（见图 15）。



图 15. 退出钢芯和气囊充气过程示例图

（4）注入与回收冲卵液

可选用三通管法（封闭式）或注射器法（敞开式）注入和回收冲胚液（胚胎）。

a. 三通管法回收冲胚液（胚胎）步骤如下：

- 1) 三通管一端连接冲胚管，输入管连接注射器，输出管连接胚胎漏斗（侧漏式）；
- 2) 夹住输出管，用 50 mL 注射器吸取 30 mL~40 mL 冲胚液注入子宫角；
- 3) 夹住输入管，松开输出管，使子宫角内的冲卵液回流到胚胎漏斗内；
- 4) 反复冲洗 4~5 次，冲胚液适宜用量为 150 mL~200 mL。

b. 注射器法（敞开式）回收冲胚液（胚胎）步骤如下：

- 1) 注用 50 mL 注射器吸取 30 mL~40 mL 冲胚液；
- 2) 通过冲胚管向子宫角注入冲胚液，并回收到注射器内；
- 3) 反复冲洗 4~5 次，冲胚液适宜用量为 150 mL~200 mL；
- 4) 捡胚室内将注射器内回收的冲胚液注射到胚胎漏斗内。

本试验采用注射器法（敞开式）回收冲胚液（胚胎），具体操作见图 16。用 50 ml 注射器吸入 15ml~25ml 冲卵液（经产牛每次冲液注入量可增加至 30~40ml），通过采卵管注入子宫角，然后回收冲卵液至注射器内。反复以上注入-回收冲卵液操作 4~5 次。每侧子宫角约需用 150ml~200 ml 冲卵液。

一侧子宫角采集结束后，再将采卵管插入另一侧子宫角，重复上述操作过程。



图 16. 注射器法（敞开式）回收冲胚液操作

A: 注入冲卵液; B: 回收冲卵液; C: 反复冲洗 4~5 次;

D: 采卵管和气囊在子宫角位置（示意图）

4. 捡胚与胚胎质量鉴定

（1）回收液处理

将注射器内回收的冲胚液注入侧壁滤膜为 $75\mu\text{m}$ 孔径的胚胎漏斗内，过滤掉多余的液体（见图 17），并用冲胚液反复冲洗漏斗侧壁滤膜，防胚胎沾附在滤膜壁上，胚胎漏斗内剩余 100mL 左右的液体，然后捡卵。

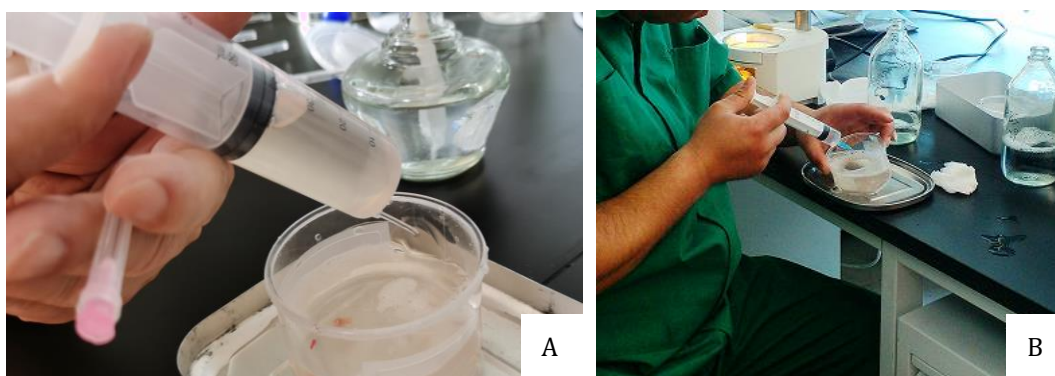


图 17. 过滤冲卵液

A: 回收的冲卵液注入胚胎漏斗; B: 反复冲洗胚胎漏斗滤膜 3-5 次

(2) 捡卵

将胚胎漏斗放在体视显微镜下进行捡胚。观察到胚胎后，用前端孔径为 300-400 μm 的胚胎吸管吸出胚胎（见图 18），移入培养皿内中胚胎保存液小滴内。胚胎保存液为 10%胎牛血清的 PBS 液。

检查胚胎漏斗 2~3 遍后，将一头供体的所有胚胎用保存液洗涤 2~3 遍后移入含有保存液的培养皿中（见图 18）。

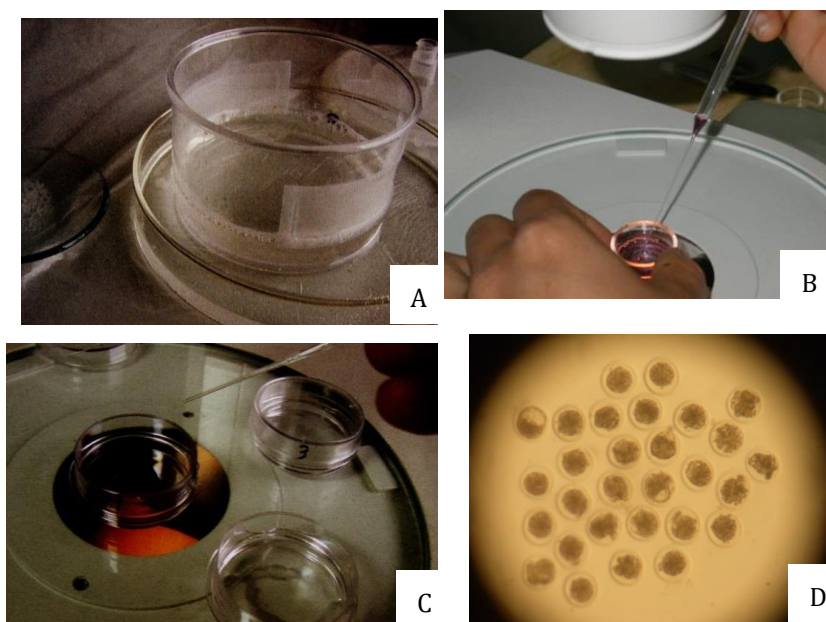


图 18. 捡卵

A:胚胎漏斗中捡卵; B: 捡出的胚胎移入培养皿内; C: 清洗胚胎; D: 一头供体的胚胎

(3) 胚胎质量鉴定

①胚胎不同发育阶段及特征

供体发情后 6-7 天的胚胎，大多为桑椹胚或囊胚。不同时间对应的胚胎发育阶段见图 19，不同阶段胚胎特征见表 3。

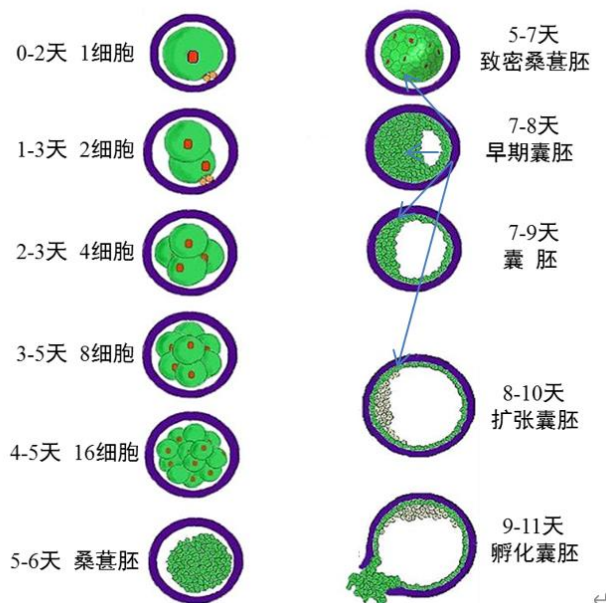


图 19.不同时间牛胚胎发育阶段模式图

表 3. 不同发育阶段胚胎及其特征

发育阶段	发育阶段 数字代码	英文及其缩写	特征
桑椹胚	3	M, morula	卵裂球隐约可见，细胞团几乎占满卵黄周隙
致密桑椹胚	4	CM, compacted morula	卵裂球进一步分裂变小，看不清卵裂球界线，细胞团收缩至占卵黄周隙的 60-70%
早期囊胚	5	EB, early blastocyst	细胞团一侧出现较透亮的囊胚腔，难以分清内细胞团和滋养层细胞，细胞团占卵黄周隙 70-80%
囊胚	6	BL, blastocyst	囊腔明显增大，内细胞团与滋养层细胞可以分清，滋养层细胞分离，细胞充满卵黄周隙
扩张囊胚	7	EXB, expanded blastocyst	囊胚腔充分扩张，体积增至 1.2-1.5 倍，透明带变薄，相当于原厚度的 1/3
孵化囊胚	8	HB, hatched blastocyste	透明带破裂，扩张胚胎细胞团孵出透明带外

②胚胎质量鉴定

目前主要采用形态学鉴定胚胎的质量，胚胎质量分为 A 级、B 级、C 级和 D 级四级

以及未受精卵。胚胎质量分级标准及形态见表 4 和图 20-24。

表 4. 胚胎质量判定标准

级别	胚胎情况	评定标准
A 级 (图 7-20)	胚胎发育完好，可用于鲜胚移植或冷冻保存。	胚胎发育阶段与时间相符。胚胎形态完整，胚胎细胞团轮廓清晰，呈球形，分裂球大小均匀，细胞界限清晰，结构紧凑，色调和明暗程度适中，无游离细胞。
B 级 (图 7-20)	胚胎发育尚好，可用于鲜胚移植或冷冻保存。	胚胎发育阶段与时间基本相符。胚胎细胞团轮廓清晰，色调和细胞结构良好，可见一些游离细胞或变性细胞（10%~15%）
C 级 (图 7-21)	胚胎发育一般，可用于鲜胚移植，但不能进行冷冻保存	胚胎细胞团轮廓不清晰，色调发暗，结构较松散，游离及变性细胞较多，结构好的胚胎团仅占 30-40%。
D 级 (图 7-22)	胚胎发育停止或退化，不可用。	发育迟缓，细胞团破碎，变形细胞比例超过 60%。
未受精卵	未受精卵，不可用	未受精卵

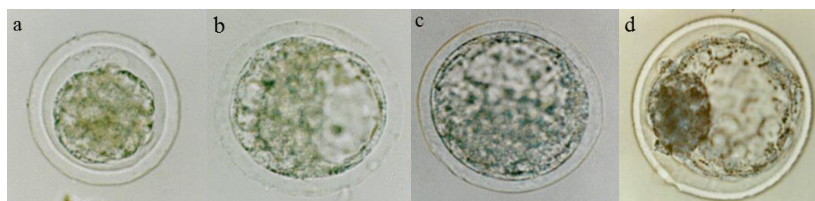


图 20. 母牛受精后 7 天 A 级胚胎

a: 致密桑葚胚; b: 早期囊胚; c: 囊胚; d: 扩张囊胚

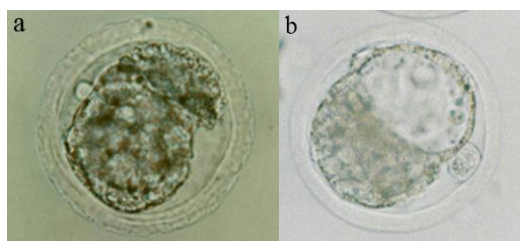


图 21. 母牛受精后 7 天 B 级胚胎

a: 致密桑葚胚; b: 早期囊胚; c: 扩张囊胚

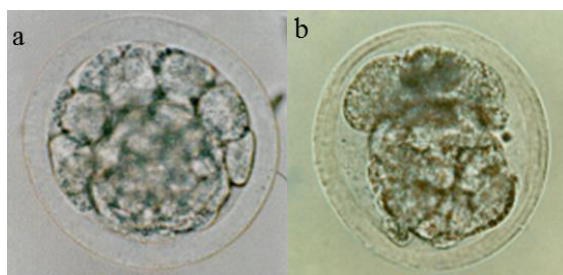


图 22. 母牛受精后 7 天的 C 级胚胎

a: 桑葚胚; b: 致密桑葚胚

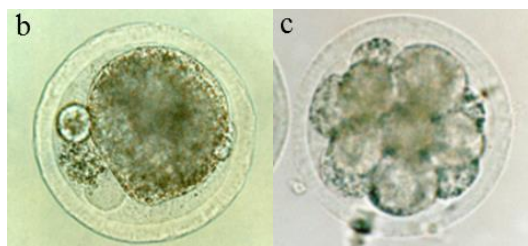


图 23. 母牛受精后 7 天 D 级胚胎

a: 未受精; b: 1 细胞退化; c: 16 细胞退化

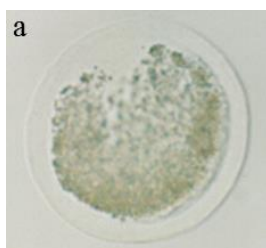


图 24. 母牛受精后 7 天的未受精

a: 未受精

三、胚胎冷冻

常采用慢速法冷冻保存牛胚胎。冷冻保护液(抗冻液)可选择 10%甘油的 20%血清 DPBS 液或者 10%乙二醇+0.10M 蔗糖的 20%血清 DPBS 液。

下面以 10%乙二醇+0.1M 蔗糖的 20%血清 DPBS 为冷冻保护液, 介绍慢速冷冻牛胚胎的操作过程。冷冻操作过程如下:

1. 平衡

将 A 或 B 级胚胎用保存液清洗 3~5 次, 用冷冻保护液洗涤 1 次, 移入冷冻液中平衡 10 min;

2. 装管

冷冻胚胎细管用 0.25 ml 塑料细管，按“5 段液体法”将胚胎装入胚胎细管内（每支细管装 1 枚胚胎），即：

棉塞（约 2 cm）—冷冻液（约 2 cm）—气泡（约 0.5 cm）—冷冻液(约 2 cm)—气泡（约 0.5 cm）—冷冻液（含胚胎）（约 2.5 cm）—气泡（约 0.5 cm）—冷冻液(约 2cm)—气泡（约 0.5 cm）—冷冻液(约 1 cm)—细管塞，见图 25。

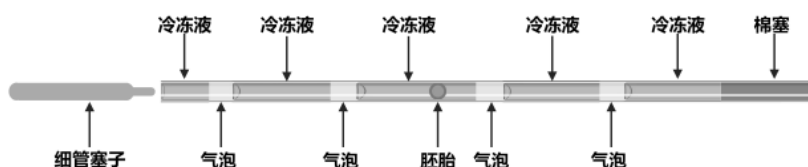


图 25. 胚胎冷冻装细管方法

3. 封口标记

加热封口或塑料塞封口，并使用永久性标记笔注明供体品种、牛号、胚胎发育阶段与级别、日期等信息。图 26 为塑料塞子封口标识示例。

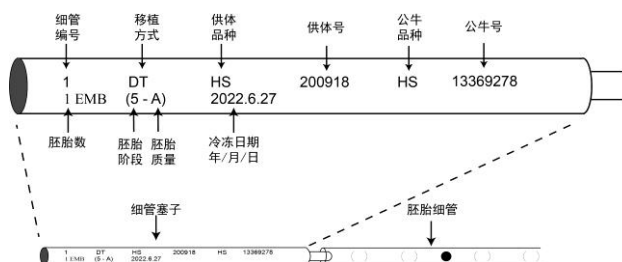


图 26. 胚胎细管（塞子）标识示例

1—细管号；1 EMB—细管内 1 枚胚胎；DT—直接移植；5-A—“5”胚胎发育阶段，为早期囊胚；
“A”胚胎质量，为 A 级胚胎；HS—供体和公牛代号，图示为荷斯坦品种代码；
200189—供体号；13369278—公牛号；

4. 冷冻过程

（1）放入胚胎细管

将胚胎细管放入预先冷却至-6 °C 冷冻仪的冷冻槽中，平衡 5~10 min，见图 27。

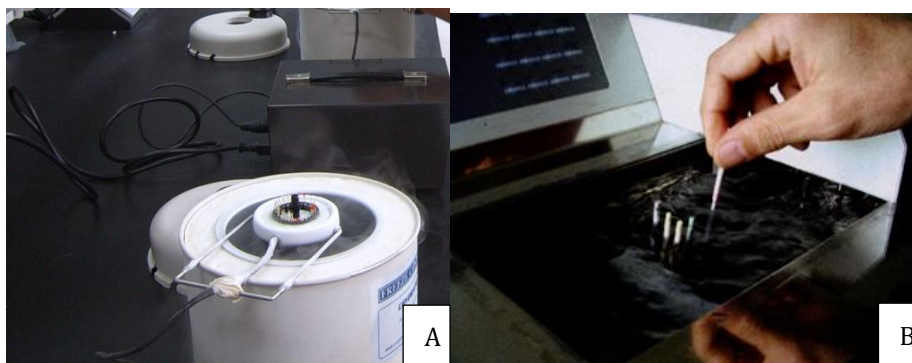


图 27. 细管装入胚胎冷冻仪

A:液氮作为冷冻介质的胚胎冷冻仪；B:酒精作为冷冻介质的胚胎冷冻仪

(2) 植冰将胚胎细管稍微提起，用在液氮中预冷的镊子（或棉签）端夹住含胚胎冷冻液的细管（远离胚胎端）1~2 秒，人工植冰（诱发结晶），然后平衡 5~10 min，见图 28。

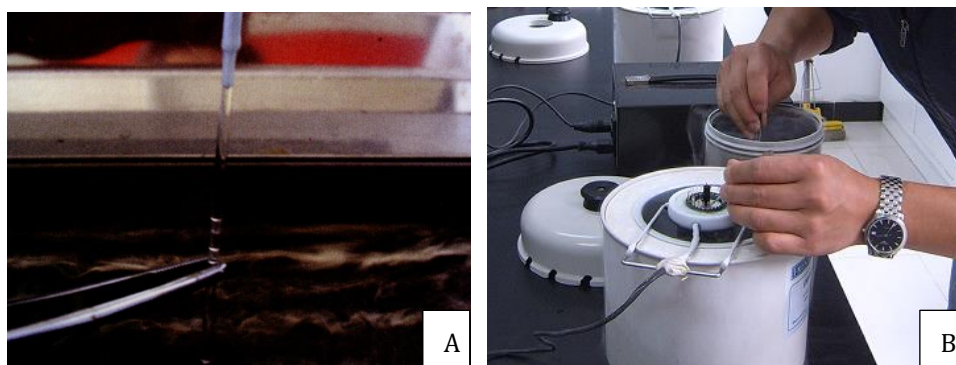


图 28. 植 冰

A:酒精冷冻介质胚胎冷冻仪的诱发结晶。 B: 液氮冷冻介质胚胎冷冻仪的诱发结晶。

(3) 降温以 0.3~0.5 °C/min 的速率降温降至-32~-36 °C，并平衡 10 min。

(4) 投入液氮用镊子夹住胚胎细管并取出，迅速将胚胎细管插入液氮中快速降温，并装入指形管内保存（见图 29）。

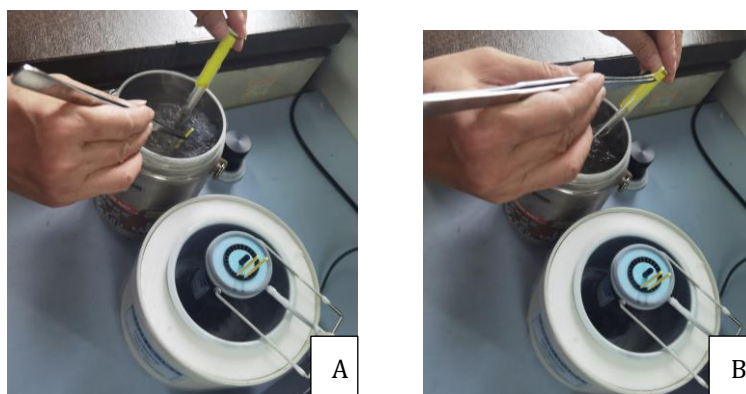


图 29. 胚胎细管插入液氮

A: 胚胎细管投入液氮; B: 胚胎细管装入指形管

(5) 保存冷冻后的胚胎细管装入指形管内，并固定在铝夹上，标记后可放入液氮罐内长期保存（见图 30）。保存胚胎细管的指形管标识可参见图 31。

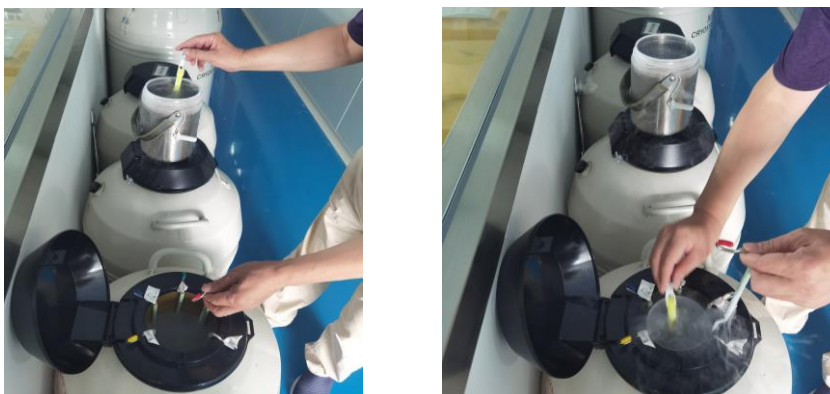


图 30. 胚胎细管液氮罐中冷冻保存

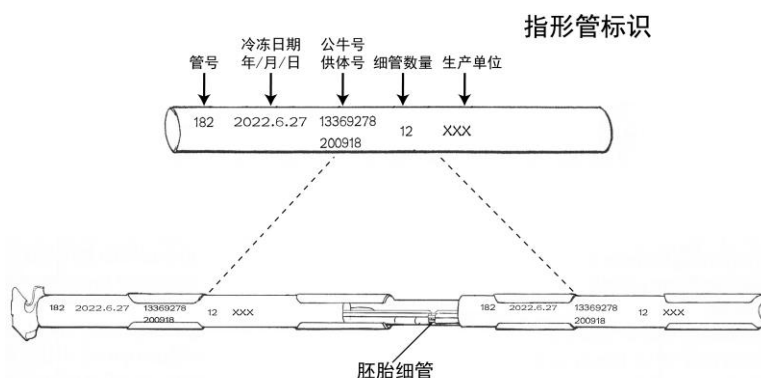


图 31. 指形管标识示例

标记示例中的相关字符含义如下：182—细管号；2022.6.27—冷冻日期；13369278—公牛号；200918—供体号；12—胚胎细管；XXX—胚胎生产单位。

结果与分析

一、受体选择与饲养管理

1. 受体选择

胚胎移植受体应满足以下条件：（1）青年牛或经产牛，有 2 次及以上正常发情周期；（2）体质健康，生殖器官和繁殖机能正常；（3）膘情适中，体型相对较大；

2. 受体饲养管理

受体饲养管理应满足以下条件：（1）受体应编号并相对集中饲养；（2）胚胎移植前 2~4 周应补饲一定量的精饲料；（3）移植前 2 周宜补充维生素 A、维生素 D、维生素 E，剂量参照产品说明；（4）胚胎移植前、后 3~4 周不应注射疫苗。

二、受体同期发情

受体同期发情可选择肌肉注 PG 法或阴道埋植孕酮缓释栓（CIDR）法。

1. 肌肉注射 PG 法

肌肉注射 PG 法可分为 1 次注射法和 2 次注射法：

（1）1 次注射 PG 法：在发情周期的任意一天注射 PG，注射后 24 h~96 h 观察发情。

（2）2 次注射 PG 法：在发情周期的任意一天注射 PG，间隔 11 d~14 d 第二次注射 PG，注射后 24 h~96 h 观察发情。

2. 阴道埋植孕酮缓释栓法

在发情周期的任意一天阴道埋置 CIDR（埋植当天为 0 d），第 7 d 早、晚两次注射 PG，第 7 d 晚上或第 8 d 早上撤除 CIDR，撤除 CIDR 后 12h~48 h 观察发情并记录。CIDR 埋植过程见图 32。



图 32. 埋植CIDR过程

A: 消毒埋植枪; B: 装入CIDR; C: 消毒母牛外阴; D: 插入移植枪 (含CIDR); E: 推出CIDR; F: 完成埋植

三、胚胎移植过程

1. 受体保定与麻醉

将发情后第 7 天 (发情当天记为 0 天) 受体固定在保定栏或颈枷内, 静松灵 (1 ml) 全身麻醉或者 2%利多卡因 (5~7 ml) 硬膜外麻醉。

2. 检查黄体

直肠触诊检查受体两侧卵巢上黄体 and 卵泡情况, 判断黄体大小、质地。选择黄体的

标准为：直径大小为 1.0~1.5 cm，质地少硬而具有弹性，黄体基部充实，突出卵巢表面，有明显排卵点（“排卵窝”）者最佳（图 33）。

记录受体卵巢和黄体情况，用记号笔在受体后驱标记出黄体侧，便于移植时确定胚胎移植到的子宫角。

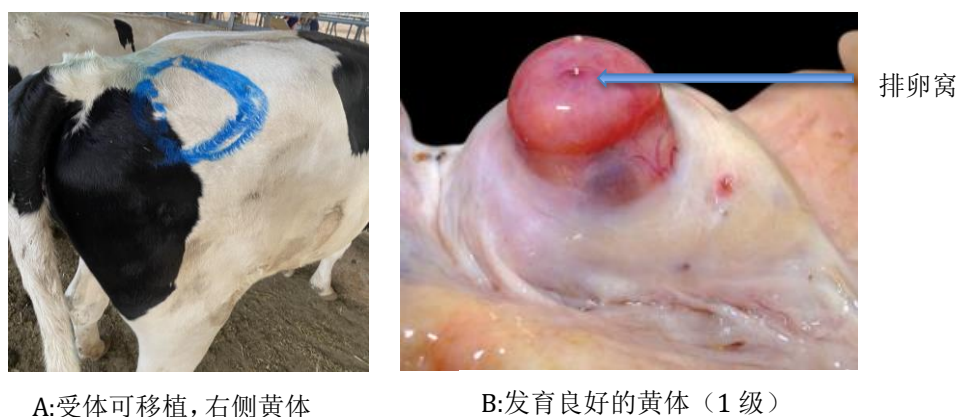


图 33. 受体与黄体

3. 胚胎准备

（1）新鲜胚胎的准备

如果有合适的受体，供体采集的体内胚胎可以直接移植。新鲜胚胎装入 0.25 ml 细管方法见图 34，即“五段液体装管法”：棉塞—保存液—空气—保存液—空气—含有胚胎的保存液—空气—保存液—空气—保存液。

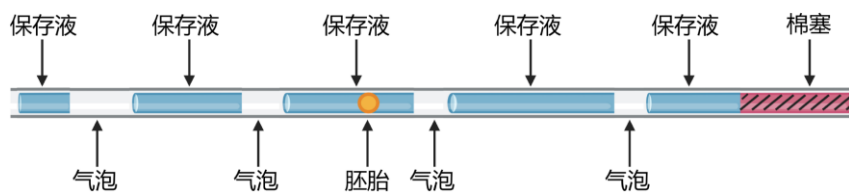


图 34. 移植胚胎细管装管方法（示意图）

（2）冷冻胚胎的准备

如果移植冷冻保存的胚胎，移植前需要将冷冻胚胎解冻。不同冷冻方法冷冻的胚胎解冻方法不同。例如，10%甘油冷冻液冷冻的胚胎解冻时需要分步脱除冷冻保护剂

甘油，然后重新用保存液装入胚胎细管用于移植。而 10%乙二醇冷冻液冷冻的胚胎，解冻后可直接移植。

下面以 10%乙二醇冷冻液冷冻的胚胎为例，叙述冷冻胚胎的解冻过程。

① 空气中解冻

将需要解冻的胚胎细管从液氮罐中取出，在空气中停留 3~5 s（见图 34，A）。

② 水浴中解冻

将细管插入 27~28°C 水浴中，停留 30 s~40 s 后取出（见图 35，B）；



图 35. 胚胎解冻过程

A:空气中解冻;

B:水浴中解冻

4. 移植胚胎过程

胚胎移植过程如下：

（1）胚胎细管装入移植枪

将需要移植的胚胎细管装入胚胎移植枪，并在移植枪外套上塑料硬外套管和软外套管（图 35）。

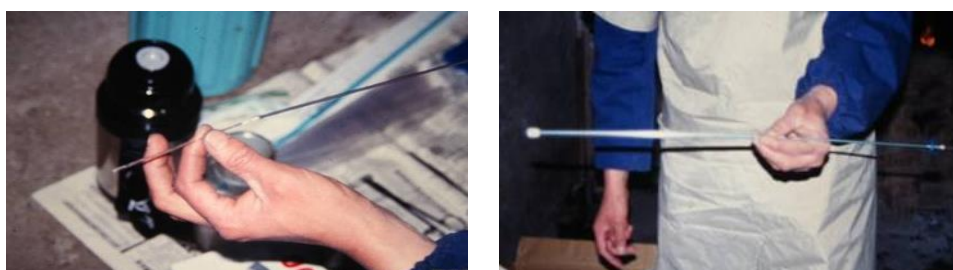


图 36. 胚胎细管装入移植枪

（2）麻醉与消毒

检查合格受体，清除直肠内粪便，硬膜外麻醉，可用清水、消毒毛巾或消毒卫生纸擦拭外阴部消毒。

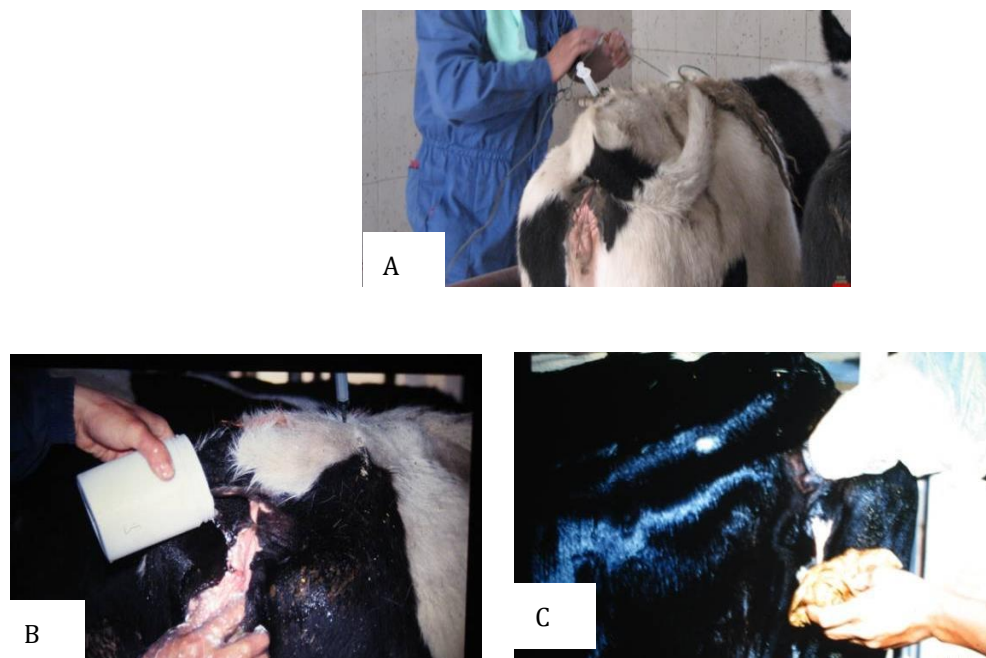
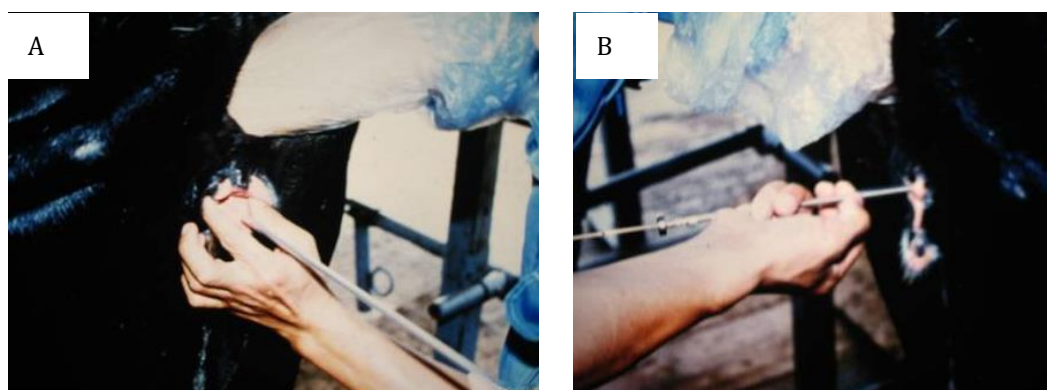


图 37. 受体麻醉与消毒

A:硬膜外麻醉；B: 清水清洗外阴；C: 消毒外阴（0.1%高锰酸钾水）

（3）移植胚胎

移植人员将装有胚胎细管的移植枪通过阴门依次经过子宫颈外口、子宫颈体，进入黄体侧子宫角，移植枪前端到达子宫角前端合适位置后，用力推动移植枪钢芯（见图 38），将胚胎推出到移植部位。缓慢抽出移植枪，胚胎移植完成。



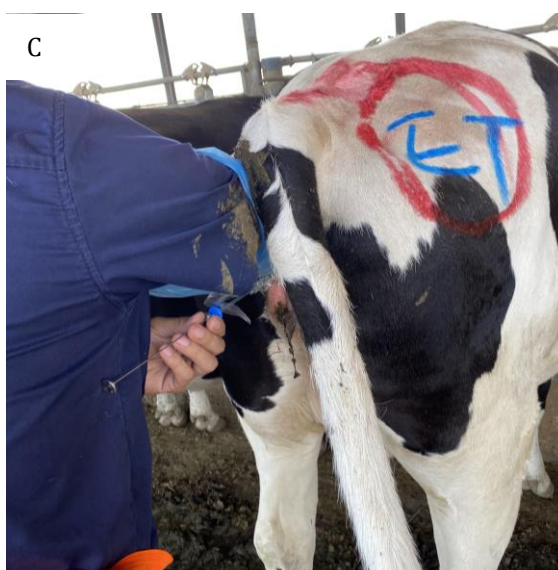


图 38 胚胎移植过程

A:移植枪通过阴门；B: 移植枪通过子宫颈；C: 推出胚胎

(4) 妊娠检查

胚胎移植受体至少应 2 次妊娠检查，具体时间取决于妊娠检查的方法。如果采用早孕蛋白方法（血检），则两次检测时间可分别在胚胎移植后第 21 天（发情后 28）和 53 天（发情后 60）；如果用 B 超妊娠检查方法，则应分别在胚胎移植后的 25~28 天（发情后 32 天~35 天）和 53 天（发情后 60）。

附录

[附录一](#)

[附录二](#)