

羊胚胎生产与移植实验操作

Protocol for Embryo Production and Embryo Transfer (MOET)

吴德国*

中国科学院遗传与发育研究所，北京 100101

*通讯作者邮箱: mdgwu@genetics.ac.cn

引用格式：吴德国 (2022). 羊胚胎生产与移植实验操作. *Bio-101* e1010963. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010963.

How to cite: Wu, D. G. (2022). Protocol for Embryo Production and Embryo Transfer (MOET). *Bio-101* e1010963. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010963. (in Chinese)

材料与试剂

药品

1. FSH（图 1 和 2）、LH、PG（供体、受体同期发情处理）PMSG、孕酮



图 1. 超排用 FSH 商品 1



图 2. 超排用 FSH 商品 2

2. PBS（或冲卵液，图 3）、培养液、HOLDING 液（图 4）



图 3. 冲卵液



图 4. 胚胎操作液

3. 胚胎冷冻液（图 5）



图 5. 胚胎冷冻液

4. 牛血清白蛋白(或者灭活羊血清)
5. CIDR（图 6）、孕酮海绵栓（图 7）



图 6. 羊用阴道栓 (CIDR)



图 7. 孕酮海绵栓

6. 无水酒精、2%碘酊
7. 新洁尔灭、生理盐水
8. 青霉素(80 万单位/支)、 链霉素(80 万单位/支)
9. 蒸馏水、五蒸水
10. 肥皂
11. 麻醉药/解药, 2%静松灵
12. 维生素 A/D/E

器材

1. 手术台

剃须刀及刀片、、剪毛剪、直剪、手术刀柄、手术刀片 (21#)、止血钳、巾帕钳、持针器、镊子、肠钳 (带孔胶管)、缝合针 (半弯 12×65、3/8 圆 12×48) 缝合线、解剖盘 (大、小) 缝合器 (图 8)



图 8. 缝合器

2. 羊用阴道栓放置枪（图 9）



图 9. 羊用阴道栓放置枪

3. 采卵管、套针、移植器、胚胎吸管或者微量进样器、吸头
4. 脱脂棉、脱脂纱布、胶布、创布、止血纱布、面巾纸、毛巾
5. 头皮针（8#或 9#、尖端磨钝）或曲别针
6. 乳胶管 16#—20#针头、Φ8 mm 玻璃管
7. 一次性注射器：1 ml、5 ml、20 ml
8. Φ120 mm 表面皿、疫苗瓶盖、沙片、细菌滤器（0.25 μ）、微量取液器、
9. 广口瓶、烧杯（1000 ml, 100 ml）、玻璃棒
10. 喷壶（喷消毒液用）
11. 棕色和白色广口瓶
12. 直径 90 mm 培养皿，四孔培养皿，Φ35 mm 培养皿
13. 冲胚、移植记录表格

仪器设备

1. 恒温台

2. 显微镜
3. 恒温水浴锅
4. 烘箱
5. 高压灭菌器
6. 腹腔镜（图 10）



图 10. 腹腔镜冲胚和移植

7. 胚胎冷冻程序降温仪（图 11）

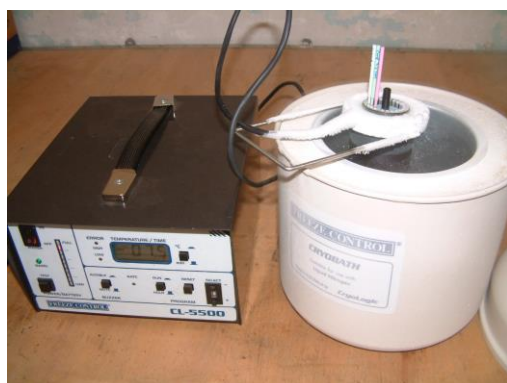


图 11. 胚胎冷冻程序降温仪

实验步骤

一、供受体羊的选择

1. 供体羊选择品种优良，生产性能好。

遗传性稳定，谱系清楚，符合该品种的一切特性。体质健壮，繁殖机能正常，性欲旺盛，无遗传病、传染性疾病和生殖道疾病。年龄在 2.5-6 岁为宜 (也有早期超排的)，产羔 60 天以上。与之交配的种公羊要求：谱系清楚，检疫合格，遗传性稳定，生产性能优良，符合本品种特征，精液品质良好。

2. 受体羊选择体质健康，拥有正常的发情周期，无繁殖机能疾病，经检疫无传染病，膘情七成以上。处于最佳繁殖年龄 (2-5 岁)，经产羊应在分娩后 90 天以上，产羔性能和哺乳性能良好，无流产史。经观察至少有两个以上正常发情周期的母羊，屡配不孕者不能做受体。

二、胚胎移植前的营养调节等准备工作

1. 一般认为，供受体羊的营养状况对胚胎移植的成功率影响较大，种母羊和受体羊应加强营养并且应适当给予运动，供体羊在体重增加时，超排效果好一些，受体羊在增重阶段移植胚胎受胎率高一些。
2. 移植前 6-8 周左右，开始给供受体羊适当补饲精料，种母羊、受体羊精料喂量应 0.2 至 0.5 千克，干草应自由采食并给予充足饮水。同时，如果起步营养状况差的话，可考虑每只受体羊肌注一定量的亚硒酸钠、VE 和 VA.D，补充微量元素和维生素。保证一定的日增重。
3. 每日应对种母羊和受体羊只进行不少于 2 小时的自由运动或强制性运动但要禁止粗暴驱赶羊只。
4. 在放栓之前注射疫苗或驱虫药，进入超排程序后禁止注射疫苗。(询问当地兽医)
5. 所有供、受体羊都应打上耳号并尽快开始记录发情情况。所有羊应立即公母分群、断奶，并做好记录。
6. 羊群大小适中，统一编制和打耳号，耳号应清楚易见。
7. 羊舍清洁、通风、干燥、温度适宜、环境稳定无应激反应。

三、超数排卵与同期发情

表 1. 羊鲜胚生产和移植程序

顺序	供体操作	受体操 排	备注
第 1 天	放 CIDR 或自然发情	放海棉 栓	
第 11 天 上午	2 ml FSH		FSH 的注射时间为 7: 00 和 19: 00; 肌肉注射, 左右臀部各一次
第 11 天 下午	2 ml FSH		
第 12 天 上午	1.5 ml FSH		
第 12 天 下午	1.5 ml FSH		
第 13 天 上午	0.5 ml FSH		
第 13 天 下午	0.5 ml FSH 取出 CIDR	取出海 棉栓	
第 14 天 上午	发情后配种或 AI, AI 剂量是普 通输精量的 2-3 倍	试情	发情时间以母羊稳定接受跨的时间为 准, 精确到小时
第 14 天 下午	配种或 AI 共 3 次, 间隔 12 小时	试情	
第 21 天	冲胚	移植	

说明:

1. 严格按以上时间执行, 并保证操作是卫生、无菌;
2. 取出的 CIDR 用洗洁精水冲洗干净, 晾干后装入塑料袋备用 (可重复用 2 次);
3. 供受体放入 CIDR 和海绵栓后, 注意观察, 发现有掉落应及时补上。
4. 个别羊放栓后有阴道感染流脓现象, 取出阴栓, 用青连霉素冲洗后再放入干净的栓。
5. 抽取海棉栓时, 应小心慢取, 不应遗留任何碎片于阴道。

6. FSH 剂量还因考虑季节、日照、营养、供体羊的年龄等。

如果供体是自然发情，程序如下：

日期	供体处理	备注
0	发情	
15	上下午注射 FSH	
16	上下午注射 FSH	
17	上下午注射 FSH，上午 1.6 ml PG	
18	上下午注射 FSH	

其它操作和剂量同上。

四、配种与人工授精

1. 种公羊前期应补充精料饲养，并进行采精和配种调教。
2. 种公羊与种母羊合理的比例以 1: 3-4 为宜；受体羊的准备应为超排种母羊数量的 12 倍，即种母羊：受体羊为 1: 12。如果是 AI，建议至少第一次是本交（在发情开始后 12 小时）。

五、受体准备和试情

1. 市场上买回的受体羊必须是空怀的，如果不能确认是否怀孕，应尽快注射氯前列烯醇（或前列腺素，或叫 PG）。用量为：经产羊 1.0 毫升，初产羊 0.8 毫升。注射后 24 小时起，观察流产情况；记录流产羊号，胎儿大小等情况。连续观察 3 天。
2. 试情公羊带试情布或结扎放进羊群试情，观察记录稳定接受爬跨的母羊号码，也可用公羊身上带染料的方法自动标记发情母羊，应特别注意发情日刚天亮的那段时间。

六、取卵、检胚与分级

1. 羊胚胎的采集：试情和配种，手术前 24 h 饥饿不断水处理，手术取卵前，对手术区域进行剃毛清洁。手术前做好麻醉和保定工作，注意手术者和手术部位的消毒，观察并记录卵巢状况和排卵点数。
2. 输卵管采集胚胎：收集的胚胎是 2-8 细胞期胚胎，冲胚的部位是输卵管喇叭口，输

- 卵管中一头插入大小合适的塑料管，另一头用导管针冲洗，每侧冲液 10-20 ml。
3. 子宫中收集的胚胎为桑椹胚和囊胚。
 - 3.1 冲胚胎液体使用前 2 h 放 38 °C 水浴锅中预热。
 - 3.2 采卵管放置合适的位置，打气封闭子宫一端后，用套针从另外一端注入冲卵液，反复多次，液体冲出来后，引流到无菌器皿中，转移到实验室，在体式显微镜下观察，检出羊胚胎，放置于预热好的 holding 液的 35 mm 皿中，在新鲜 Holding 液中清洗 3 遍胚胎，至此胚胎的收集工作就完成了。
 - 3.3 冲胚和检胚过程要快速准确，减少温度和渗透压对胚胎产生的影响。检胚时除了移动平皿更换不同视野外，注意调节焦距，在立体空间内寻找胚胎。
 4. 胚胎的判断和分级如表 2, 主要评价依据是细胞团机构关系和应该到达的发育阶段。

表 2. 胚胎的判断和分级

1 级胚胎	胚胎形态完整，处于正常的发育阶段，外形匀称，胚胎呈球形；分裂球细胞大小均匀，结构紧凑，透明度适中，没有或只有少量游离细胞。
2 级胚胎	发育稍迟缓，有少量游离细胞 (少于 20%)，细胞团完整，胚胎仍呈球形，细胞之间结合紧密。
3 级胚胎	发育迟缓 1-2 天，卵裂球大小不均匀，透明度变化明显 (太暗或太明)，胚胎游离细胞较多 (大于 20%，小于 50%)，细胞联结不够紧密，但胚胎仍呈球形，有明显的细胞团结构。
4 级胚胎	发育迟缓 (2 天以上)；细胞团破碎；细胞死亡退化。

七、胚胎移植

羊胚胎移植受体与供体羊进行同期发情处理。

1. 手术前对羊进行 24 h 饥饿和 10 h 断水处理，以便于手术。收集的羊胚胎经 holding 液洗 5-6 遍，等待移植。胚胎移植部位分为输卵管移植和子宫角移植，即 2-8 细胞期的胚胎选择输卵管移植，桑椹胚和囊胚选择子宫角移植。
2. 受体羊固定，手术部位消毒、麻醉和镇痛，腹腔镜辅助（图 10）或直接用手术取出子宫或子宫角，用大小合适的针头扎孔后，用连接 1 ml 注射器的胚胎移植

器注入胚胎（图 11）。胚胎装管待用的吸入方式为：大量液体，气泡，含胚胎液，气泡和液体的“五段方式”。



图 11. 羊子宫角胚胎移植

3. 移植后伤口缝合消毒，受体羊注射苏醒和镇痛剂，同时注射一定量的抗菌素三天。需要的话注射孕酮保胎。
4. 注意观察和记录受体羊群发情情况，需要时可以超声波孕检一次。

八、影响胚胎移植技术成功率因素

1. 供受体羊的营养健康状况和羊场管理水平
2. 胚胎质量和胚胎退化问题
3. 无菌操作和移植水平
4. 受体羊术后管理
5. 国产激素与进口激素
6. 操作室温度、湿度和洁净度

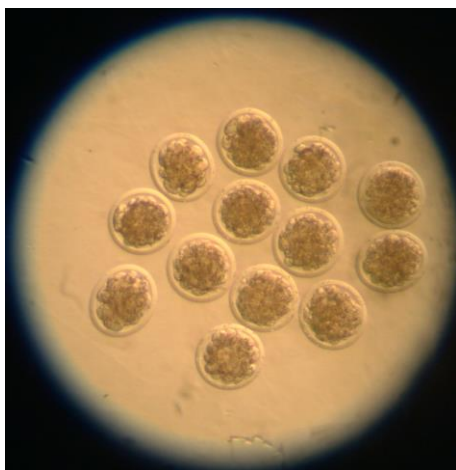


图 12. 绵羊胚胎 (day 6, 晚桑)



图 13. 山羊胚胎 (day 7, 扩张囊胚)

九、精液和胚胎的冷冻解冻，胚胎实验操作

1. 精子冻存

采精操作步骤：

1.1 假阴道的安装和消毒

- 1) 每次使用前后清洗、消毒外壳、内胎、集精杯，检查是否有破损、裂缝或砂眼。
- 2) 将内胎放入外壳内，使两端露出的内胎相等，并翻转于外壳上，用橡皮圈固定两端内胎。
- 3) 再次用 70%酒精擦拭内胎进行消毒，然后用灭菌的 0.9% NaCl 溶液充分冲洗内胎，清除残留酒精。
- 4) 将灭菌的集精杯安装于假阴道一端的开口上，并加上固定套和固定圈。

- 5) 在假阴道外壳的注水孔中注入 50~55 °C 的热水，注水量约为假阴道内、外胎之间容积的 1/2~1/3 为宜，根据采精室的环境温度，控制假阴道的采精温度在 40~42 °C，切勿过高或过低。
- 6) 用灭菌的玻璃棒蘸已灭菌的凡士林涂于假阴道内胎上。涂的深度约为假阴道全长的 2/5~1/2，涂润滑剂的量不宜过多，防止流入精液内。
- 7) 在外壳的活塞上吹入适当的空气，使假阴道内的压力适宜。

1.2 台畜的准备

用发情的母羊作台畜，采精时保定在自制的采精架中，消毒纱布遮盖台畜阴道。

1.3 采精

- 1) 左手持假阴道站立于台畜臀部右侧处距离约一步。
- 2) 当公羊爬跨时，通过拨动阴茎基部，将阴茎导向假阴道，当公羊阴茎插入阴道内的同时后躯突然向前耸身，即表示射精。
- 3) 射精后，随着公羊跳下的动作取下假阴道，并立即使假阴道集精杯向下直立，打开活塞，放出夹层中的空气和部分温水，以使精液流入集精杯内。
- 4) 取下集精杯，并盖上盖子，放入保温桶内，立即送实验室进行精液的处理。
- 5) 假阴道、集精杯等用具洗涤、消毒、保存，以备下次使用。

1.4 精液处理和冷冻保存

- 1) 新采集的精液在 30~35 °C 环境中，用显微镜检查精子活力和密度。也可以直接用精液活力检测仪评估精液的品质，确定冷冻稀释的比例。活力小于 0.6 的精液不冷冻。
- 2) 用不含甘油的稀释液进行精液第一次稀释，在 35 °C 温箱中放置 30 分钟后，然后测定稀释后的各项指标。用含甘油的稀释液进行第二次精液稀释。用 0.5 ml 冷冻细管分装稀释后的精液，并做好标记或打印编号。在 4 °C 冰箱中平衡 2 小时。
- 3) 将平衡好的精液细管放在液氮蒸汽上方 10-20 mm，熏蒸大约 15 分钟，然后投入液氮中。按照设定好的摆放规则，将冻精细观放入液氮罐设定好的位置。

1.5 精液解冻

从液氮中取出冷冻细管，在空气中停留 10 秒，立即放入 40 °C 水浴中大约 1 分钟，然后进行各指标的检查，备用。

2. 胚胎冻存

目前大体有两种胚胎冷冻保存的方法，即程序化冷冻法和玻璃化冷冻法。

2.1 程序化冷冻法是指利用程序降温仪（图 11），控制冷冻保护剂内的胚胎缓慢有序的脱水降温，同时尽量减少细胞内的冰晶数量，最后投入液氮保存。

2.2 玻璃化冷冻则是在室温下操作，不需要特定的降温设备，简单快捷通过梯度冷冻保护剂脱去胚胎细胞内水分，然后快速投入液氮。利用冷冻保护剂使胚胎迅速降温过程中形成玻璃状态而不产生冰晶。

2.3 程序冷冻一般用 10%甘油 PBS 液作为冷冻液，也可以直接用商业化的 10%的甘油冷冻保护剂（图 5）。冷冻前，胚胎分别在 3%、6%的冷冻液中平衡 3-5 分钟。将装有胚胎的细管塞上打印好编号信息的细管塞，直接放入冷冻仪的酒精冷冻槽内，以 -1 °C /分钟的速度降至 -6 °C，停 5 分钟后植冰，再停留 5 分钟，以 0.3 °C /分钟的速度降至 -36 °C，再以 0.1 °C /分钟的速度降至 -38 °C，直接放入液氮容器指定位置，长期保存。

2.4 解冻：根据房间温湿度，胚胎从液氮中取出，在空气中停 3-5 秒，然后投入 38 °C 水浴，完全融化后取出，擦干。去除细管塞，剪去另外一头的棉塞，将含胚胎的液体倒入 35 mm 平皿，检出胚胎，分别在 6%、3%的冷冻液中平衡 3-5 分钟，移至新鲜的胚胎保存液备用。注意操作房间的温湿度，所以液体使用前都已预先温度平衡。

3. 体外授精

羊卵母细胞的体外授精

配制 percoll 梯度分层液分离精液 (用 M199 配置 90%和 45%的 percoll 梯度分层液)，3000 rpm 离心 15 min，收集活精子。在洗涤精子的同时，将每滴 15~20 个成熟卵母细胞放入 90 µl 受精液中，加入洗涤后的精子，精子浓度为 1×10^7 个/ml，放入 CO₂ 培养箱中培养。培养条件为 38.5 °C、5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养。

4. 受精卵注射

4.1 受精卵超速离心

精卵共培养 16~18 h 后或是 (羊配种或输精后 24-30 h)，将受精卵在 0.2% 透明质酸酶中洗涤，用细的玻璃管反复吹吸，去除颗粒细胞。收集受精卵于含 500 μ l M199 液的离心管中，12,000 r/min 离心 5 min，使黑色脂滴甩到一边从而使受精卵原核清晰可见，部分受精卵作为对照组直接放于 M16 液培养液中培养。

4.2 受精卵的原核显微注射

高速离心后选择有原核的受精卵细胞放入显微注射操作液 M2+7.5 μ g/ml 细胞松弛素 B 中，上覆盖石蜡油。用虹吸法将 DNA 装入注射针，用固定针固定原核卵，找到雄原核，慢慢推动注射器注入 DNA，此时可见受精卵雄原核有一定程度膨大，每次注射 15~20 个卵。将注射后的卵移入 M16 培养液，放入 CO₂ 培养箱培养。培养条件为 38.5 °C、5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养。体外发育培养分别于 2 d 和 7 d 在相差显微镜下统计卵裂率和囊胚发育率。

5. 体细胞克隆羊

5.1 供核羊的细胞准备 (成纤维细胞) (图 14)

耳部表面羊毛剪干净，用 75% 酒精洗涤灭菌，剪 0.5 cm² 的一小块耳缘组织，置于 D-PBS 中带回实验室。将耳组织剪碎成约 1 mm² 大小的组织块，用吸管将剪碎组织块移入培养瓶中，均匀平铺于培养瓶底部。将培养瓶倒置，放到 38.5 °C 培养箱内 2 h，使组织块牢固地贴附于培养瓶的底面，然后将培养瓶翻转，加入含 20% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液，在培养箱中继续培养，每隔两天更换新鲜培养液。待贴壁生长的细胞汇合度到达 85% 以上时，用 PBS 缓冲液将剩余组织块冲洗掉，再用 0.25% 的胰蛋白酶消化贴壁细胞，一部分继续传代培养，一部分冻存。传代至 3-5 代时作为核移植供体细胞。

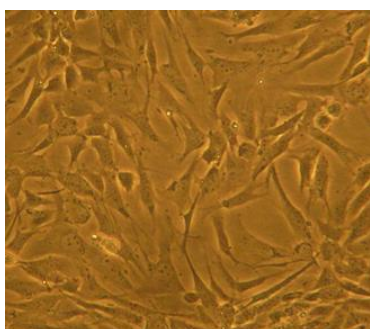


图 14. 长到 80% 成纤维细胞

在进行核移植前 5 d, 细胞复苏后接种到 4 孔板中, 培养 2-3 d 后, 待细胞密度大于在 80% 时用含 0.5% 胎牛血清的培养液饥饿 1-3 d, 而后用 0.25% 的胰酶消化至单个细胞用于核移植。

5.2 细胞核移植 (图 15)

L R H 注射后, 27 h 左右取卵。手术暴露输卵管, 用预热的 1-2% 血清的 PBS 缓冲液冲洗输卵管后收集卵母细胞。体式镜下检卵。用 0.2% 的透明脂肪酶 (hyaluronidase) 去除附着的颗粒细胞, 而后用 M16 培养液洗 4-5 次, 置 M16 方杯中培养于 37.5 °C、5%CO₂ 的培养箱中。所有的超排羊卵母细胞收集结束后将卵母细胞置于操作液 (M2+7.5 µg/ml CB 细胞松弛素) 中, 在微分干涉相差显微镜下, 借助 Lietz 操作仪, 用去核针将第 1 极体附近的包含有中期染色体的少量细胞质吸出。将制备的单个供核细胞与去核的卵球同置于 M2 悬滴内, 用移核针经去核卵球原切口处将单个供核细胞移入至卵周隙内, 并与卵细胞膜接触。



图 15. 正在细胞核移植

5.3 细胞核移植胚胎的电融合 (图 16)

将细胞核移植胚胎移入融合液 (含 0.3 mM 甘露醇、0.05 mM 氯化钙、0.1 mM 硫酸镁、0.5% BSA 的溶液) 内, 置于两电极之间。通过 2-3 次 1.25 kV/cm, 20 µs 的直流电脉冲进行融合。融合好的胚胎为重构胚。

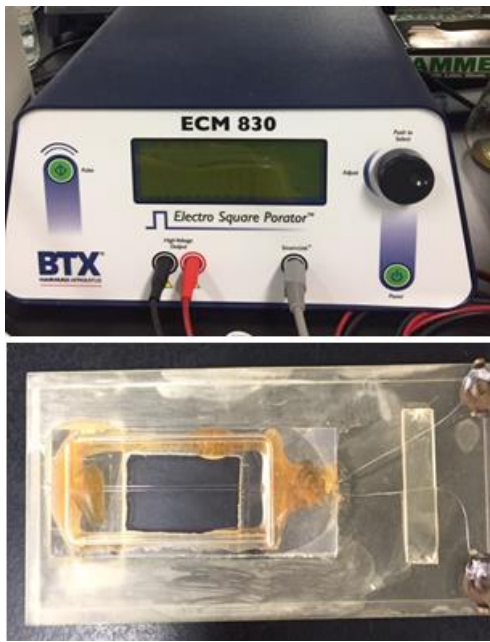


图 16. 融合仪和融合槽

5.4 重构胚胎的激活和体外发育培养

将重构胚胎于 M16 中培养 5 h 后, 在含 5 mM 离子霉素 (ionomycin)、7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CB 的 M16 液中处理 5 min, 再在含 7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CB 和 2mM 6-二甲基氨基嘌呤 (6-DMAP) 的 M16 液中处理 5 h 后移到矿物油覆盖的 M16 培养液中培养。选择本地山羊作为胚胎移植的受体。在重构胚激活约 20 h 后, 将处于 1-至 2-细胞期的重构胚胎通过手术法移入同步发情受体山羊的输卵管内, 每只受体羊移植 8-10 枚胚胎。