

DB45

广西壮族自治区地方标准

DB 45/T 1682—2018

水牛胚胎质量检测技术规程

Detection procedures for quality evaluation in embryos of water buffalo

地方标准信息服务平台

2018 - 03 - 25 发布

2018 - 04 - 25 实施

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 抽样和胚胎保存	1
5 检测环境	2
6 检测方法	2
7 评定结果	3
附录 A（规范性附录） 试剂、耗材和设备	4
附录 B（规范性附录） 冷冻胚胎解冻方法	6
附录 C（规范性附录） 胚胎图片示例	7

地方标准信息服务平台

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由广西壮族自治区水产畜牧兽医局提出。

本标准由广西畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位：广西壮族自治区水牛研究所。

本标准主要起草人：郑海英、尚江华、杨春艳、黄加祥、郑威、梁贤威、鄢胜飞、李孟琪、于农淇、张秀芳、黄芬香。

地方标准信息服务平台

水牛胚胎质量检测技术规程

1 范围

本标准规定了水牛胚胎质量检测术语与定义、抽样和胚胎保存、检测环境、检测方法与评定结果技术规程。

本标准适用于水牛体内或体外来源的新鲜胚胎和冷冻胚胎的质量检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是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/T 5458 液氮生物容器

GB/T 18088 出入境动物检疫采样

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

超低温保存 cryopreservation

经特殊方法处理的胚胎放置在 -196°C 的超低温中，使其新陈代谢暂时停止，从而将胚胎进行长期保存的一种方法。

3.2

胚胎解冻 embryo thawing

将冷冻保存的胚胎按一定的程序和方法在空气和水浴中解冻，并脱除冷冻保护剂，使胚胎恢复正常的形态和新陈代谢的过程。

3.3

胚胎体外培养 embryo in vitro culture

在模拟体内子宫环境和条件下，胚胎在体外继续发育的过程。

4 抽样和胚胎保存

4.1 抽样

应符合GB/T 18088的要求。

4.2 胚胎保存

胚胎应保存在 $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的液氮容器中，容器应符合GB/T 5458的规定。取放胚胎时，在空气中暴露时间不能超过10 s。胚胎保存期间，要定期检查容器中液氮消耗情况，适时补充液氮，确保保存胚胎的细管在液氮液面以下。

4.3 信息记录

抽样时，应详细记录保存胚胎细管上标记的完整信息。

5 检测环境

洁净无菌环境。

6 检测方法

6.1 系谱资料

待检胚胎应有完整的系谱资料(适用于体内胚胎和体外胚胎)。

6.2 标识

保存胚胎的细管应有明确的标记，标记内容应包括品种、公母牛编号、胚胎数量、胚胎发育阶段、胚胎质量级别、生产日期、生产单位等，标记上的字迹清晰、完整、准确，并做好存放记录。

6.3 试剂、耗材和设备

参见附录A。

6.4 胚胎质量检测方法

6.4.1 胚胎的形态学检测

借助于体视显微镜对胚胎的发育阶段和状况进行形态学观察。

6.4.2 胚胎的体外发育能力评判

将胚胎置于 $38\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 39\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $5\%\text{ CO}_2$ 和 100% 最大饱和湿度的环境下培养，并于开始培养后24h和48h分别观察胚胎的存活和发育情况。冷冻胚胎应按照程序要求进行解冻后检测，胚胎解冻程序参见附录B。

6.5 胚胎质量检测内容

6.5.1 胚胎发育阶段

6.5.1.1 桑椹胚

受精后第4 d~5 d的胚胎，能观察到球状的细胞团，分裂球间隙不明显，占据透明带内腔的 $50\%\sim 60\%$ 。

6.5.1.2 致密桑椹胚

受精后第5 d~6 d的胚胎，细胞团变小，卵裂球之间界限难以分辨，细胞团与透明带之间空隙明显增大，占透明带内腔的60%~70%。

6.5.1.3 早期囊胚

受精后第6 d~7 d的胚胎，内细胞团的一部分出现囊胚腔，但难以分清内细胞团和滋养层，细胞团占透明带内腔的70%~80%。

6.5.1.4 囊胚

受精后第6 d~8 d的胚胎，内细胞团和滋养层界限清晰，囊胚腔明显，细胞充满透明带内腔。

6.5.1.5 扩张囊胚

受精后第7 d~9 d的胚胎，体积增至原来的1.2~1.5倍，与透明带之间无空隙，囊胚腔明显扩大，透明带变薄。

6.5.1.6 孵化囊胚

囊胚腔继续扩大，透明带破裂，胚泡从透明带中脱出。

6.5.2 胚胎质量分级

正常发育胚胎透明带完整，形态规则，色调均匀一致，透明度适中。根据形态学及发育程度划分胚胎质量，分为A、B、C、D四个等级（参考图片参见附录C）：

- A级：胚胎的发育阶段与预期的发育阶段一致。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，胚胎细胞团呈均匀对称的球形，透明带光滑完整，厚度适中，不规则的细胞相对较少，变性细胞比例少于10%；
- B级：胚胎的发育阶段与预期的发育阶段基本一致。胚胎形态较完整，轮廓清晰，色调及细胞密度良好，透明带光滑完整，厚度适中，存在一定数量大小和形状不规则的细胞或细胞团，有一定数量细胞的颜色明暗不一、密度不均匀，变性细胞比例为10%~20%；
- C级：胚胎的发育阶段与预期的发育阶段不一致。胚胎形态不完整，轮廓不清晰，色调发暗，结构较松散，游离的细胞较多，变性细胞比例为20%~40%；
- D级：胚胎的发育阶段与预期的发育阶段不一致，包括退化的胚胎、未受精卵或1-细胞胚胎及16-细胞胚胎以下的受精卵。内细胞团有较多碎片、轮廓不清晰、结构松散，变性细胞比例高于40%，为不可用胚胎。

6.6 评定要求

每次评定应安排2名经胚胎生物技术培训的技术人员进行检测，独立评定，得出综合评定结果。若一次评定结果未能达成一致，则另安排技术人员2名进行二次评定，并综合两次评定结果，协商后进行胚胎定级。评定结果应准确记录，资料存档备查。

7 评定结果

××胚胎的发育阶段为××；级别为××；在38℃~39℃、5%CO₂和100%最大饱和湿度的CO₂培养箱中培养24 h(或48 h)，胚胎由××阶段发育到××阶段。

附录 A
(规范性附录)
试剂、耗材和设备

A.1 主要试剂及要求

A.1.1 试剂名称

碳酸氢钠 (NaHCO_3)、乙二醇 ($(\text{CH}_2\text{OH})_2$, EG)、蔗糖、甘油、HEPES、肝素、TCM 199、PBS (磷酸缓冲盐溶液)、胎牛血清 (FBS)、牛血清白蛋白 (BSA)。

A.1.2 试剂要求

所用的试剂除特殊规定外,均为分析纯及其以上纯度的化学试剂,符合组织细胞培养要求。TCM 199、胎牛血清等为推荐选用胚胎培养测试的产品。

A.1.3 胚胎体外培养液

推荐使用TCM 199 (含25 mM HEPES和0.26 mM NaHCO_3) +10% FBS。

A.1.4 血清的灭活处理

新购的胎牛血清,已注明灭活处理的,用 0.45 μm 滤器过滤灭菌后,可以直接使用;未注明灭活处理的,需 56 $^\circ\text{C}$ 水浴灭活 30 min,用 0.45 μm 滤器过滤灭菌后使用。血清经灭活及过滤灭菌后,分装并于-20 $^\circ\text{C}$ 或-80 $^\circ\text{C}$ 超低温冰箱中长期保存备用。

A.2 主要耗材

A.2.1 玻璃培养皿: 20 mm。

A.2.2 塑料培养皿: 35 mm、60 mm。

A.2.3 滤器: 0.22 μm 、0.45 μm 。

A.2.4 移液器 (2 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL)。

A.2.5 移液器盒 (2 μL , 20 μL , 200 μL , 1000 μL)。

A.2.6 0.25 mL塑料胚胎麦管。

A.2.7 胚胎吸管。

A.2.8 玻璃细管: 5 mm。

A.2.9 透明硅胶软管。

A.2.10 脱脂棉。

A.2.11 纱布。

A.2.12 封口膜。

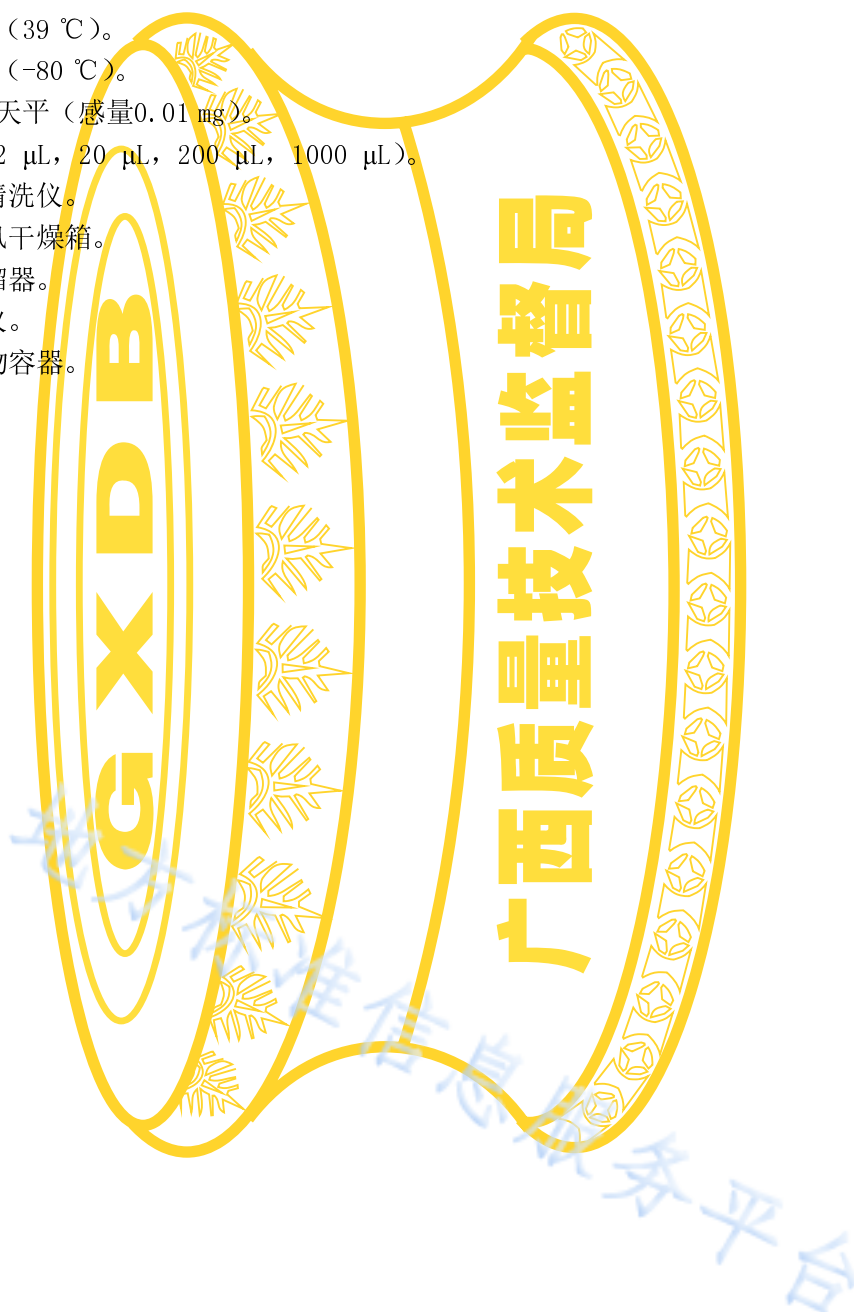
A.2.13 标签纸。

A.2.14 记号笔。

A.2.15 一次性乳胶或PE手套。

A.3 主要设备

- A.3.1 体视显微镜(20×)。
- A.3.2 CO₂培养箱(38℃~39℃、5% CO₂和100%最大饱和湿度)。
- A.3.3 冰箱或冰柜(-20℃~4℃)。
- A.3.4 高压灭菌器。
- A.3.5 超净工作台。
- A.3.6 恒温热台(39℃)。
- A.3.7 低温冰箱(-80℃)。
- A.3.8 电子分析天平(感量0.01 mg)。
- A.3.9 移液器(2 μL, 20 μL, 200 μL, 1000 μL)。
- A.3.10 超声波清洗仪。
- A.3.11 电热鼓风干燥箱。
- A.3.12 双重蒸馏器。
- A.3.13 超纯水仪。
- A.3.14 液氮生物容器。
- A.3.15 酒精灯。



附 录 B
(规范性附录)
冷冻胚胎解冻方法

B.1 甘油冷冻胚胎的解冻

B.1.1 解冻液的配制

分别配制含6%、3%和0%甘油的0.1 mol/L蔗糖PBS胚胎解冻液，用0.22 μm滤器过滤。

B.1.2 胚胎解冻

从液氮罐中取出装有胚胎的细管，室温下空气浴10 s后置于35℃~37℃水浴中，浸浴至胚胎冷冻细管内液体彻底融化。

B.1.3 脱除甘油

用75%酒精消毒卫生棉球擦干细管，剪去封口端，将胚胎推入培养皿中；将胚胎依次移入含6%、3%和0%甘油的0.1 mol/L蔗糖胚胎PBS解冻液中，各停留5 min；最后用胚胎体外培养液清洗3次，即可进行镜检。

B.2 乙二醇冷冻胚胎解冻

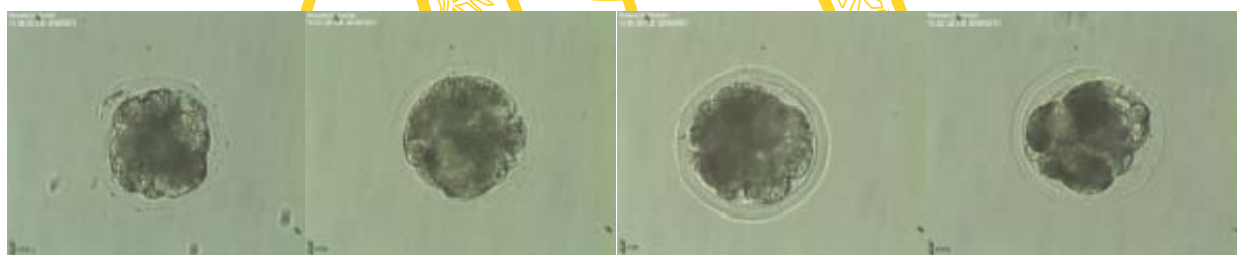
将胚胎细管空气浴10 s后置于35℃~37℃水浴中，浸浴至胚胎冷冻细管内液体彻底融化，用经灭菌消毒过的卫生纸擦干细管，剪去封口端，将胚胎推入培养皿，用胚胎体外培养液清洗3次，镜检。

地方标准信息服务平台

附录 C
(规范性附录)
胚胎图片示例

C.1 桑椹胚胚胎质量示例

见图C.1。



图C.1 A级

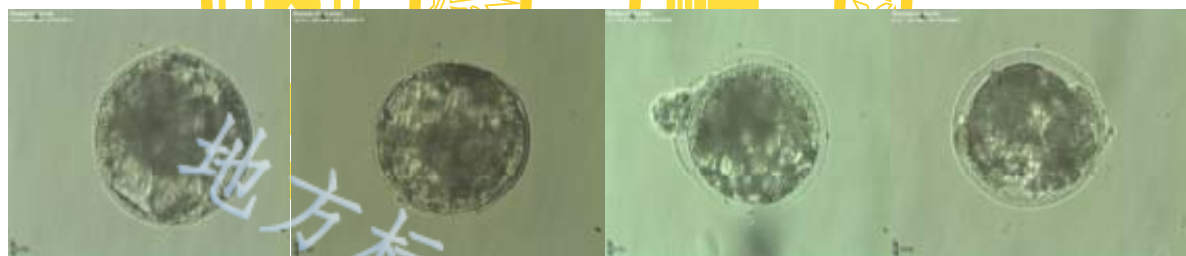
B级

C级

D级

C.2 囊胚胚胎质量示例

见图C.2。



图C.2 A级

B级

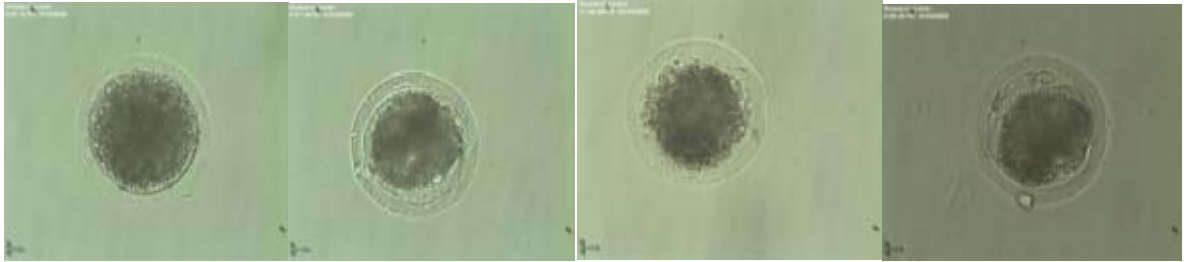
C级

D级

C.3 不可用胚胎示例

C.3.1 未受精卵

见图C.3。



图C.3 未受精卵

C.3.2 变异胚胎

见图C.4。



图C.4 变异胚胎

地方标准信息服务平台

地方标准信息服务平台

中华人民共和国广西地方标准

水牛胚胎质量检测技术规程

DB45/T 1682—2018

广西壮族自治区质量技术监督局统一印刷

版权专有 侵权必究