

团 体 标 准

T/CVMA 229—2025

兔胚胎移植技术操作规程

Operation procedures of rabbit embryo transfer technology

2025 - 3 - 18 发布

2025 - 3 - 18 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。

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：广东省医学实验动物中心、五邑大学。

本文件主要起草人：陈傍柱、黎桂玲、谭巧燕、刘科、严家荣、饶子亮、楼彩霞、黎雄才、黄小红、赵伟健、谢素丽、郑佳琳、宁东杰、吴贤生、黄甘泉、杨嘉俊、刘天平、顾为望、邝少松、王刚。

中国兽医协会
CVMA

兔胚胎移植技术操作规程

1 范围

本文件规定了兔胚胎移植的方法，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、捡胚、胚胎鉴定、胚胎移植。

本文件适用于兔胚胎移植的各环节，以及稀有兔种、基因工程兔等种类的保存。

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/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法
GB 14922 实验动物 微生物、寄生虫学等级及监测
GB 14923 实验动物 遗传质量控制
GB 14924.1 实验动物 配合饲料通用质量标准
GB/T 14924.2 实验动物 配合饲料卫生标准
GB 14924.3 实验动物 配合饲料营养成分
GB 14925 实验动物 环境及设施
GB 18596 畜禽养殖业污染物排放标准
GB/T 39760-2021 实验动物 安乐死指南
NY/T 388 畜禽场环境质量标准
NY 5027 无公害食品 畜禽饮用水水质
NY 5131 无公害食品 肉兔饲养兽医防疫准则
NY/T 5133 无公害食品 肉兔饲养管理准则

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

兔胚胎移植 rabbit embryo transplantation

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辅助生殖技术。

3.2

兔超数排卵 rabbit 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

供体兔 donor rabbit
提供成熟胚胎的健康母兔。

3.4

受体兔 receptor rabbit
接受（移植）胚胎的健康经产母兔。

3.5

检胚 embryo assessment

对胚胎进行质量鉴定、分级、清洗和保存的过程。

注：通常包括使用显微镜观察胚胎的形态、结构完整性、细胞数目等特征，以确定胚胎用于移植的适宜性。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

FSH：卵泡刺激素（Follicle stimulating hormone）

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 主要试剂、药品和设备、材料

5.1 试剂和药品

5.1.1 除非另有说明，所用试剂均为分析纯，试验用水符合 GB/T 6682 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。

5.1.2 孕马血清促性腺激素：市售。

5.1.3 人绒毛膜促性腺激素：市售。

5.1.4 促性腺激素释放激素：市售。

5.1.5 卵泡刺激素：市售。

5.1.6 199 培养基干粉：市售。

5.1.7 矿物油：市售。

5.1.8 麻醉剂、消毒剂、抗菌药：市售。

5.1.9 冲胚液和胚胎操作液，配制方法见附录 A。

5.2 设备与材料

所需设备和材料见附录 B。

6 兔胚胎移植程序

有两种常用方案可选择，即PMSG超数排卵方案和FSH超数排卵方案，分别见表1和表2。

表1 兔胚胎移植程序表（PMSG超数排卵方案）

时间点	处理项目
0 h （第 1 天下午）	供体兔皮下注射 PMSG 150 IU
72 h （第 4 天下午）	供体兔配种，同时静脉注射 HCG 150 IU； 受体兔静脉注射 HCG 100 IU，或肌肉注射 GnRH 15 μg
90 h ~ 92 h （第 5 天上午）	冲胚，检卵，胚胎移植

表2 兔胚胎移植程序表（FSH超数排卵方案）

时间点	处理项目
0 h （第 1 天下午）	供体兔肌肉注射 FSH 50 IU
12 h （第 2 天上午）	供体兔肌肉注射 FSH 50 IU
24 h （第 2 天下午）	供体兔肌肉注射 FSH 50 IU
48 h （第 3 天上午）	供体兔肌肉注射 FSH 50 IU
60 h （第 3 天下午）	供体兔肌肉注射 FSH 50 IU
72 h （第 4 天上午）	供体兔肌肉注射 FSH 50 IU
84 h （第 4 天下午）	供体兔配种，同时静脉注射 HCG 150 IU； 受体兔静脉注射 HCG 100 IU，或肌肉注射 GnRH 15 μg
104 h ~ 106 h （第 5 天上午）	冲胚，检卵，胚胎移植

7 供体兔的选择和超数排卵

7.1 供体兔的选择

供体兔的选择遗传背景明确，符合GB 14923所规定对兔的要求，外观健康、发育正常，微生物与寄生虫的质量控制符合GB 14922对兔的要求。供体兔应发育至性成熟，一般选择4月龄以上母兔。

7.2 供体兔的饲养管理

供体兔饲喂合格饲料，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。其饲料质量按GB 14924.1所规定的要求，饲料卫生按GB/T 14924.2所规定的要求，饲料营养按GB 14924.3所规定的要求，饮水按NY 5027所规定的要求，兔养殖环境质量按NY/T 388所规定的要求，兔实验环境则按GB 14925所规定的要求，饲养管理按NY/T 5133所规定的要求，动物微生物质量监测安装按GB 14922所规定的要求，兽医防疫按照NY 5131所规定的要求，粪便污物和尸体处理符合GB18596所规定的要求。供体兔在采胚前后应保证良好的饲养条件，不应随意变换饲料和管理程序。

7.3 供体兔的超数排卵处理和配种

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。或每隔12 h肌肉注射FSH 50 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。

8 受体兔的选择和同期发情

8.1 受体兔的选择

受体兔的选择同7.1，发育应到达性成熟阶段。建议使用母性良好的经产母兔。

8.2 受体兔的饲养管理

受体兔的饲养管理同7.2。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。

8.3 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 μ g。

9 冲胚

9.1 冲胚时间

以皮下注射PMSG为第1天（0 h）。在注射PMSG 70 h ~ 72 h后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

采胚及胚胎移植应在干净、光线充足、无尘的环境下进行。室内温度保持约25 $^{\circ}$ C。定期用新洁尔灭等温和型消毒剂喷雾消毒，手术前用紫外灯照射0.5 h ~ 1 h。

9.3 器械、冲胚液等准备

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。

9.3.3 经过滤除菌的冲胚液提前 30 min ~ 60 min 置于 38.5 $^{\circ}$ C水浴预热。培养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

按照GB/T 39760-2021对供体兔安乐死，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，收集冲胚液于60 mm培养皿中。培养皿及时置于38.5 $^{\circ}$ C的恒温热台或培养箱。

10 检胚

吸取适量胚胎操作液，在60 mm培养皿底部作数个规则排列的培养微滴（120 μ L/滴），并用矿物油完全覆盖每个微滴，置于38.5 $^{\circ}$ C恒温热台上提前加热备用。检胚操作室温应为25 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C。待检的胚胎保持在38.5 $^{\circ}$ C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，每转移一个胚胎操作液微滴计为洗一次，然后把全部胚胎移至新的胚胎操作液微滴中，置于38.5℃恒温热台上0.5 h ~ 2 h。

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

受体母兔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

盐酸赛拉嗪等麻醉剂进行诱导麻醉，剂量为 0.15 mL/kg，接着用 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。麻醉过程中应时刻注意母兔呼吸是否正常。

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。对常见的毛细血管出血或渗血，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。

12.2.4.2 移植胚胎

无菌吸取细胞培养上清液放入 5 mL 灭菌离心管中。不可用力牵拉卵巢和输卵管。将经培养后的胚胎（1 细胞期 ~ 4 细胞期）吸入移植管。从输卵管漏斗处插入移植管，使用无损伤的镊子辅助移植管，插入输卵管更深的位置，最好为输卵管第 2 个 ~ 3 个弯曲之后，将胚胎移入输卵管。通常双侧输卵管均移植，每侧输卵管移植胚胎 4 枚 ~ 10 枚（经显微注射后的胚胎，可增加至每侧移植 30 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 胚胎移植术后

术后3 d予以抗生素预防感染。母兔术后自由采食，自由饮水。术后13 d左右可通过B超判断或其他可靠手段诊断母兔是否移植后受孕。

中国兽医协会
CVMA

附 录 A
(资料性)
溶液配制

A. 1 冲胚液的配制

冲胚液的组成及配制见表A.1。

表A.1 冲胚液的组成及配制

组分	成分	称量
A液	氯化钠	8000 mg
	氯化钾	200 mg
	磷酸氢二钠	1150 mg
	磷酸二氢钾	200 mg
	葡萄糖	1000 mg
	丙酮酸钠	36 mg
	青霉素	70 mg
	链霉素	50 mg
	牛血清白蛋白	3000 mg
B液	氯化钙	100 mg
C液	六水氯化镁	100 mg

注：A液、B液、C液分别用蒸馏水配制700 mL、100 mL、100 mL，充分溶解后再混匀，加蒸馏水定容至1000 mL总体积。过滤除菌，4℃保存不超过3周。

A. 2 胚胎操作液的配制

胚胎操作液的组成及配制见表A.2。

表A.2 胚胎操作液的组成及配制

成分	50 mL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培养基干粉	0.475 g
牛血清白蛋白	0.15 g
必需氨基酸（50×）	1000 μL
非必需氨基酸（50×）	1000 μL

注：各成分加入蒸馏水充分溶解，定容至总体积50 mL，过滤除菌，4℃保存不超过3周。

附 录 B
(规范性)
所需设备和材料

兔胚胎移植技术所需设备和材料见表B.1。

表B.1 兔胚胎移植技术所需设备和材料一览表

序号	设备和材料名称
1	恒温热台
2	体视显微镜
3	二氧化碳培养箱
4	恒温水浴锅
5	手术台
6	手术灯
7	常规手术器械
8	不同规格移液器
9	培养皿
10	胚胎移植管
11	注射器
12	捡卵吸控管
13	毛细玻璃针
14	酒精灯