

广西壮族自治区地方标准

DB 45/T XXXX—XXXX

水牛胚胎分割技术操作规程

Operating code of practice for embryo bisection in buffalo

（征求意见稿）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 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 试剂、耗材、设备、工作液的配方及配制和实验室要求 ..... 2

    4.1 试剂、耗材和设备 ..... 2

    4.2 工作液的配方及配制 ..... 2

    4.3 实验室要求 ..... 2

5 分割前胚胎采集和评定 ..... 2

    5.1 胚胎采集 ..... 2

    5.2 胚胎发育阶段和质量等级评定 ..... 2

6 分割前准备 ..... 2

    6.1 显微分割 ..... 2

    6.2 徒手分割 ..... 3

    6.3 胚胎分割液滴制备 ..... 3

7 胚胎分割操作 ..... 3

    7.1 显微分割 ..... 3

    7.2 徒手分割 ..... 3

8 分割后胚胎培育 ..... 3

9 操作档案 ..... 4

附 录 A （规范性） 试剂 耗材和设备..... 5

    A.1 主要试剂及要求 ..... 5

    A.2 主要耗材 ..... 5

    A.3 主要设备 ..... 5

附 录 B （规范性） 工作液的配方及配制..... 7

    B.1 胚胎分割液 ..... 7

    B.2 完整胚胎和二分裂体外培养液 ..... 7

    B.3 玻璃化冷冻平衡液和冻存液 ..... 7

    B.4 玻璃化冷冻解冻液 ..... 7

## 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。

本文件由广西农业农村厅提出。

本文件由广西畜牧业标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：广西壮族自治区水牛研究所。

本文件主要起草人：郑海英、尚江华、杨春艳、黄加祥、郑 威、罗 华。

# 水牛胚胎分割技术操作规程

## 1 范围

本文件界定了水牛胚胎分割技术涉及的术语和定义,确立了水牛胚胎分割技术的程序,规定了试剂、耗材、设备、工作液的配方及配制和实验室要求、分割前胚胎采集和评定、分割前准备、胚胎分割操作、分割后胚胎培养等方面的操作指示,描述了操作过程信息的追溯方法。

本文件适用于体内来源新鲜胚胎和冷冻胚胎、体外受精生产的新鲜胚胎和冷冻胚胎。

## 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 5458 液氮生物容器
- DB45/T 1682 水牛胚胎质量检测技术规程
- DB45/T 1951 水牛胚胎冷冻保存技术操作规程
- NY/T 826 绵羊胚胎移植技术规程

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1

**胚胎分割** *embryo bisection*

借助显微操作技术或徒手操作方法切割早期胚胎成二、四等多等份,再移植给受体母畜,从而获得同卵双胞胎或多胎的生物学新技术。

### 3.2

**体内胚胎** *in vivo embryos*

通过激素促进母畜超数排卵,再采用自然交配或人工授精,从母畜的输卵管或子宫角内回收发育到一定时期的早期胚胎。

[来源: DB45/T 1951-2019, 3.2]

### 3.3

**体外受精** *in vitro fertilization, IVF*

模拟体内环境使哺乳动物的精子和卵子在体外人工控制的环境中完成受精过程的技术。

[来源: DB45/T 1951-2019, 3.4]

### 3.4

**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。

[来源: DB45/T 1682-2018, 3.2]

## 4 试剂、耗材、设备、工作液的配方及配制和实验室要求

### 4.1 试剂、耗材和设备

所用试剂、耗材和设备及其要求见附录A。

### 4.2 工作液的配方及配制

所需液体的配方及其配制详见附录B。

### 4.3 实验室要求

工作区应设置准备室、缓冲间、无菌间、胚胎和细胞保存室等。其中，缓冲间面积应不小于3 m<sup>2</sup>，应安置更衣柜和紫外灯，紫外灯强度应不低于1.5 W/m<sup>3</sup>。紫外灯管距地面不应超过2.5 m，每次照射时间为20 min~30 min。无菌室的无菌等级最低标准应达到万级，操作区应达到百级。

## 5 分割前胚胎采集和评定

### 5.1 胚胎采集

#### 5.1.1 体内胚胎

借助体视显微镜挑选从母畜的输卵管或子宫角内回收发育到受精后第5 d的水牛桑椹胚和发育到受精后第6 d~8 d的囊胚用于分割。

#### 5.1.2 体外受精胚胎

收集由卵巢或活体采卵获取的水牛卵母细胞，经体外成熟、体外授精及早期胚胎的体外培养。在受精后的第5 d~8 d（受精当天计为0 d），借助体视显微镜挑选桑椹胚（第5 d）和囊胚（第6 d~8 d）备分割。

#### 5.1.3 冷冻胚胎

从液氮内取出冷冻细管，空气浴3 s，将带有胚胎的一端放入微滴内轻轻晃动，在体视显微镜下见胚胎脱出后，将胚胎取出用解冻液清洗2~3次，放入解冻液内停留5 min，再用胚胎培养液清洗2~3次，转入颗粒细胞单层微滴内培养复苏，重新形成囊胚腔为存活的胚胎备分割使用。

### 5.2 胚胎发育阶段和质量等级评定

上述胚胎发育阶段划分和胚胎分级评定应符合DB45/T 1682的规定。分割前胚胎的质量应达到B级（含B级）以上。

## 6 分割前准备

### 6.1 显微分割

检查和调整显微操作装置，将玻璃针细度为10 μm或金属分割刀及外径约为120 μm的固定吸管安装于显微操作仪上。

## 6.2 徒手分割

将金属分割刀提前用高压灭菌锅高温121℃消毒20 min，检查和调试好体视显微镜，然后将已灭菌的金属分割刀放入100 mm的无菌塑料平皿中备用。

## 6.3 胚胎分割液滴制备

将配制好的分割液从4℃冰箱取出，在直径为100 mm的无菌塑料平皿中制作6~8个100 μL大小的分割液滴，做好标记后，在液滴上覆盖石蜡油，以石蜡油没过液滴为宜。再将已制备分割液滴的平皿放培养箱中孵育平衡15 min~30 min。

## 7 胚胎分割操作

### 7.1 显微分割

#### 7.1.1 桑椹胚

用分割液洗涤桑椹胚2~3次后，移入无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的PBS液中预处理20 min去致密化。然后将桑椹胚单独放入分割液滴，置于倒置显微镜（200倍）下，用显微固定吸管固定住桑椹胚，从吸附点对面用显微分割刀逐渐由上向下切割桑椹胚，将桑椹胚与透明带一分为二，形成一对半胚。

#### 7.1.2 囊胚

用分割液洗涤囊胚2~3次后，将囊胚单独放入分割液滴，置于倒置显微镜（200倍）下，用显微固定吸管固定住囊胚，从吸附点对面用显微分割刀逐渐由上向下切割囊胚，将囊胚的内细胞团一分为二，形成一对半胚。

### 7.2 徒手分割

#### 7.2.1 桑椹胚

7.2.1.1 用分割液洗涤桑椹胚2~3次，移入无Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>的PBS液中预处理20 min去致密化。

7.2.1.2 将桑椹胚移入分割液滴中，每个液滴放入1枚桑椹胚。

7.2.1.3 借助体视显微镜，先在分割液滴的底部用分割刀轻轻划2条直线以固定住桑椹胚，然后用一只手固定塑料平皿在显微镜的视野下，用另一只手的拇指和食指夹住分割刀，中指头做支架。

7.2.1.4 将分割刀伸入液滴，将桑椹胚拨到划痕上，再将分割刀移至桑椹胚正上方，并缓缓下移抵住桑椹胚，与下部的划痕将桑椹胚固定。

7.2.1.5 用分割刀压住桑椹胚正中部垂直向下切割，将桑椹胚与透明带一份为二，形成一对半胚。

#### 7.2.2 囊胚

囊胚的分割方法与桑椹胚的相似，无需去致密化处理，直接在所需的分割液中，对准囊胚内细胞团正中部，将囊胚的内细胞团平均地一分为二，形成一对半胚。

## 8 分割后胚胎培养

8.1 将分割后的成对半胚轻轻地从分割液滴中移出，用提前平衡好的培养液洗2~3次，转移到颗粒细胞单层微滴内，在(39±0.2)℃、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中培养，记录胚胎发育情况。

8.2 体外培养 1 h~3 h 检查胚胎分割成功数。桑椹胚以发育到扩展囊胚为准，囊胚以发育至孵化囊胚为准，可直接用于胚胎移植或胚胎冷冻保存。

## 9 操作档案

档案记录内容包括胚胎采集、胚胎质量等级评定情况、胚胎分割记录及分割后胚胎发育情况等，档案记录应保存3年以上。

附 录 A  
(规范性)  
试剂 耗材和设备

A.1 主要试剂及要求

A.1.1 试剂名称

不含钙镁磷酸盐缓冲液（无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  PBS）、蔗糖、TCM 199、碳酸氢钠（ $\text{NaHCO}_3$ ）、HEPES、胎牛血清（FBS）、石蜡油（Mineral oil）、乙二醇（ $(\text{CH}_2\text{OH})_2$ , EG）、二甲基亚砜（DMSO）、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，符合细胞培养要求。TCM 199和FBS等推荐选用胚胎培养测试的产品。

A.1.3 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  $\mu\text{m}$ 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  $\mu\text{m}$ 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

如下：

- 塑料培养皿：35 mm、100 mm；
- 滤器：0.22  $\mu\text{m}$ 、0.45  $\mu\text{m}$ ；
- 移液器（2  $\mu\text{L}$ ，20  $\mu\text{L}$ ，200  $\mu\text{L}$ ，1000  $\mu\text{L}$ ）；
- 移液器盒（2  $\mu\text{L}$ ，20  $\mu\text{L}$ ，200  $\mu\text{L}$ ，1000  $\mu\text{L}$ ）；
- 0.25 mL 塑料胚胎麦管；
- 胚胎吸管；
- 5 mm 玻璃细管；
- 透明硅胶软管；
- 脱脂棉；
- 纱布；
- 封口膜；
- 标签纸；
- 记号笔；
- 一次性乳胶或 PE 手套；
- 20 mm 玻璃培养皿。

A.3 主要设备

如下：

- 体视显微镜（20 $\times$ ）；
- 配显微操作仪的倒置显微镜；
- 毛细玻璃管；



- 显微分割刀；
- CO<sub>2</sub>培养箱(38℃~39℃、5% CO<sub>2</sub>和100%最大饱和湿度)；
- 冰箱或冰柜(4℃~-20℃)；
- 高压灭菌器；
- 超净工作台；
- 恒温热台(39℃)；
- 低温冰箱(-80℃)；
- 电子分析天平(至少精确到0.01 mg)；
- 移液器(2 μL, 20 μL, 200 μL, 1000 μL)；
- 超声波清洗仪；
- 电热鼓风干燥箱；
- 双重蒸馏器；
- 超纯水仪；
- 液氮生物容器；
- 酒精灯。

附 录 B  
(规范性)  
工作液的配方及配制

B.1 胚胎分割液

PBS (无 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ ) + 0.2 M 蔗糖

B.2 完整胚胎和二分裂体外培养液

配方为TCM 199+25 mM HEPES+0.26 mM  $\text{NaHCO}_3$ +10% FBS。

B.3 玻璃化冷冻平衡液和冻存液

B.3.1 平衡液配方

B.3.1.1 配方为 TCM199+10%FBS+20%EG+5%DMSO。

B.3.1.2 采用 TCM199 添加 10%FBS 作为基础液。取 7.5 mL 基础液加入 2 mL DMSO (二甲基亚砷) 和 0.5 mL 的 EG (乙二醇), 用枪头或者吸管吹吸充分混匀, 再用 0.22  $\mu\text{m}$  的微孔滤膜滤器过滤入无菌容器内, 置于冰箱冷藏保存。

B.3.2 冻存液配方

B.3.2.1 配方为 TCM199+10%FBS+20%EG+20%DMSO+0.05 M 蔗糖。

B.3.2.2 采用 TCM199 添加 10%FBS 作为基础液。取 6 mL 基础液加入 2 mL DMSO (二甲基亚砷) 和 2 mL 的 EG (乙二醇), 称取 1.7115 g 的蔗糖加入混合液, 用枪头或者吸管吹吸使蔗糖溶解并充分混匀, 再用 0.22  $\mu\text{m}$  滤器过滤入无菌容器内, 置于冰箱冷藏保存。

B.4 玻璃化冷冻解冻液

B.4.1 配方为TCM199+10%FBS+0.05 M蔗糖。

B.4.2 采用TCM199添加10%FBS作为基础液。取10 mL基础液加入1.7115 g蔗糖, 用枪头或者吸管吹吸使蔗糖溶解并充分混匀, 再用0.22  $\mu\text{m}$ 滤器过滤入无菌容器内, 置于冰箱冷藏保存。