

广西壮族自治区地方标准

DB 45/T XXXX—XXXX

奶水牛活体采卵操作技术规程

Operating technical code of practice for ovum pick-up of dairy 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 供体水牛的选择和饲养 1

 4.1 供体水牛的选择 1

 4.2 供体水牛的饲养 1

5 采卵频率 2

6 采卵前准备 2

 6.1 仪器设备 2

 6.2 药品和试剂 2

 6.3 供体水牛的准备 2

 6.4 采卵器械调试 3

 6.5 采卵人员准备 3

7 采卵操作 3

8 采卵后操作 3

9 操作档案 3

附 录 A （规范性） 采集卵母细胞资料记录表 4

 A.1 活体采卵可视卵泡情况记录 4

 A.2 活体采卵实验室回收卵母细胞情况记录 4

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。

本文件由广西壮族自治区农业农村厅提出、归口并宣贯。

本文件起草单位：广西壮族自治区水牛研究所、广西皇氏赛尔生物技术有限公司。

本文件主要起草人：覃广胜、黄荣春、谭正准、黄 健、李 辉、韦亮源、陈明棠、黄加祥、钟华配、李兆和、杨春艳、郑海英、尚江华。

奶水牛活体采卵操作技术规程

1 范围

本文件界定了奶水牛活体采卵涉及的术语和定义，规定了供体牛的选择和饲养、采卵频率、采卵前准备、采卵操作、采卵后操作、采集卵母细胞资料记录等方面的操作指示，描述了操作过程信息的追溯方法。

本规程适用于奶水牛的活体采卵技术的规范化操作。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

活体采卵 ovum pick-up

卵母细胞的活体采集技术（简称活体采卵）是借助超声波或内窥镜观察，直接从活体母牛卵巢上抽取卵母细胞的技术，通过体外受精技术进行体外成熟培养，可生产大量系谱明确的胚胎。

3.2

供体水牛 donor buffalo

提供卵母细胞的母水牛称为供体（良种）。

4 供体水牛的选择和饲养

4.1 供体水牛的选择

选择年龄在2.5~10岁之间、品种优良、生产性能好、遗传稳定、谱系清楚，且生殖器官发育正常，尤其是卵巢饱满富有弹性，周长半径约2cm以上，卵巢韧带够长，无阴道炎、子宫内膜炎、卵巢囊肿等疾病，体质健壮、繁殖机能正常，无遗传和传染性疾病的母水牛。

4.2 供体水牛的饲养

4.2.1 供体水牛饲养在相对固定栏舍内，密度适中，环境卫生好。

4.2.2 活体采卵前5周，加强饲养管理，在饲料中添加多维（包括维生素A、D、E）和微量元素，剂量参见产品说明。

4.2.3 饮水清洁卫生。

4.2.4 采卵前2周，避免疫苗注射和转群应激。

5 采卵频率

处于空怀期或怀孕后1~3月内的奶水牛，每周采卵2次，中间间隔3d。同一批牛连续采卵最好不超过3个月。

6 采卵前准备

6.1 仪器设备

B型超声波显像仪、7.5 MHz/5.0 MHz 扇形阴道扫描探头、18G 采卵针（针长 60 cm，管长 120 cm）、真空泵、恒温槽、50 mL 卵泡液收集管、保定架、器械车、长臂手套、绑牛尾巴绳、毛巾、镊子、酒精棉球、碘酊棉球等。

6.2 药品和试剂

- 6.2.1 消毒液：0.1%新洁尔灭。
- 6.2.2 润滑液：凡士林、液体石蜡。
- 6.2.3 超数排卵药物：促卵泡生成素。
- 6.2.4 促黄体溶解：氯前列醇。
- 6.2.5 麻醉药：普鲁卡因、静松灵、鹿眠宁等。
- 6.2.6 苏醒药：鹿醒宁。
- 6.2.7 采卵液：磷酸盐缓冲液(DPBS)+3%胎牛血清+100 μ g/mL 青霉素+60mg/mL 链霉素+10 IU/mL 肝素。

6.3 供体水牛的准备

- 6.3.1 将供体水牛固定到保定架内。
- 6.3.2 根据供体水牛个体差异、应激敏感程度选择是否麻醉，麻醉方式有局部麻醉和全身麻醉两种。
- 6.3.3 在母水牛受应激反应小，但进行活体采卵时，臀部容易左右摆动，且爱甩动尾巴，直肠强直收缩，影响卵母细胞取出的情况下采用局部麻醉，宜选择3%普鲁卡因荐尾间隙硬膜外传导麻醉，具体步骤为：
 - a) 先将尾下拉活动，尾根背侧出现小凹陷处即荐尾间隙；
 - b) 用5%碘酊棉球对荐尾间隙进行局部消毒，再用75%酒精脱碘；
 - c) 抽取3%普鲁卡因剂量2 mL~3 mL，视牛身材体况而定；荐尾间隙硬膜外局部传导麻醉选用灭菌9#长针，注射器可选用5 mL或10 mL一次性注射器；
 - d) 先用针头对准荐尾间隙，找好下针位置穿刺，针头与尾部呈直角，刺到硬膜外腔内；
 - e) 将针管接到针头上，先回抽注射器芯，观察有无回血，无回血时将麻醉剂慢慢推入；
 - f) 判断麻醉效果是否有效，以牛尾部完全松弛、肛门及会阴部轻触不收缩为准。
- 6.3.4 在母水牛性情狂躁，受应激反应过大，极为不配合，或经过局麻仍无法进行操作的情况下采用全身麻醉，宜选择肌肉注射5%静松灵小剂量镇静，具体步骤为：
 - a) 调好注射器，根据个体差异、敏感程度选择适宜剂量，抽取5%静松灵0.3 mL~1.0 mL；
 - b) 先在牛只颈侧或臀部消毒注射部位，取下针头后，准确迅速地刺向预定部位；
 - c) 待牛安静后，接上注射器，将药液推入，再次消毒；
 - d) 用药后8min~10min出现药物作用，15min内表现药物主要作用，动物安静，肌肉轻度松弛，行动缓慢，舌拉出口腔外还能回缩，口腔湿润，少量流涎，反射迟钝，绝大多数能站立，人

可接近并接受触摸，痛觉减弱，个别牛只也能自行卧地，胸卧，头颈前伸下垂，卧地 10 min 左右又自行起立，维持时间 1 h~2 h。

6.4 采卵器械调试

6.4.1 将 B 型超声波仪装至器械车上，推至保定架后方，接通电源（220 V），调好真空泵汞柱压力 40 mmHg~50 mmHg。

6.4.2 把预先分装好的采卵液（每头母牛 30 mL~50 mL）和 1 个空的 50 mL 卵泡液收集管放入（38±0.5）℃恒温装置中。

6.4.3 将采卵针及连接胶管从消毒包中取出，采卵针安放于探头上的枪套卡槽内，胶管的另一端连接收集管，然后用采卵液通洗待用。

6.5 采卵人员准备

采卵技术人员要磨平指甲，带上长臂手套，涂上润滑油。

7 采卵操作

7.1 掏净供体牛直肠中的粪便，先用自来水洗干净后躯和外阴部，再用 0.1%新洁尔灭消毒，最后用干净的毛巾擦干。

7.2 操作者右手伸入直肠固定右侧卵巢。

7.3 左手将安装有采卵针的探头慢慢插入阴道，直抵阴道穹隆，把探头放在穹隆的右侧。

7.4 右手将卵巢牵引紧贴在探头前端，这时 B 型超声波仪的监视器上显示出卵巢图像，前后左右翻转卵巢，确定卵泡数，调整卵巢和探头位置，使卵泡位于穿刺导引线上。

7.5 当卵泡清晰位于穿刺导引线上时，操作者向前推动探头上的采卵针穿刺卵泡，并同时用脚踏开关启动真空泵，一般采用 40 mm~50 mm 汞柱压力，从监视器上可观察到被抽吸卵泡的图像缩小，形态变得不规则，直至卵泡液被抽取干净后，卵泡图像消失，退出采卵针。

7.6 用含有肝素的 PBS 液冲洗采卵针及导管，卵泡液和冲洗液一同放入收集管。

7.7 对右侧卵巢上 2 mm 以上卵泡进行穿刺。

7.8 换另一侧卵巢用同样方法进行卵泡穿刺抽吸卵泡液。

7.9 在抽吸卵泡过程中，每抽吸 1~2 个卵泡，用抽卵泡液冲洗 1 次采卵针及连接胶管，防止血液凝固在其中，影响继续穿刺和回收的卵母细胞。

7.10 一头供体牛采卵结束后，尽快将卵泡液收集管送入实验室进行检卵和分级。

8 采卵后操作

采卵结束，将牛放出保定架，对全身麻醉后的牛注射与静松灵同等剂量的鹿醒宁，并做好环境清洁卫生。

9 操作档案

档案记录内容包括可视卵泡情况、活体采卵实验室回收卵母细胞情况等，采集卵母细胞资料记录内容见附录 A。档案保存 3 年以上。

附 录 A
(规范性)
采集卵母细胞资料记录表

A.1 活体采卵可视卵泡情况记录

在活体超声波引导穿刺采卵时需记录可视卵泡情况，记录表格见下表A.1。

表 A.1 活体采卵可视卵泡情况记录表

日期：

牛号	卵巢	大	中	小	备注

A.2 活体采卵实验室回收卵母细胞情况记录

实验室回收卵母细胞，需将检卵和分级情况记录，记录表格见下表A.2。

表 A.2 活体采卵实验室回收卵母细胞情况记录表

日期：

室外温度：_____℃

牛号 (品种)	活采批次	操作者	卵泡数	回收卵母细胞											
				≥3层		2层		1层		裸卵		网状		空带	小计
				好	差	好	差	好	差	好	差	好	差		
合计															