

团 体 标 准

XX-XXXX

家禽遗传资源保护技术规程 鸡卵巢

Code of practice for poultry genetic resource conservation—
chicken ovary
(公开征求意见稿)

XXXX-XX-XX 发布

XXXX-XX-XX 实施

中国畜牧业协会发布

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。

本文件由中国畜牧业协会提出并归口。

本文件起草单位：中国农业科学院北京畜牧兽医研究所、全国畜牧总站、江苏省家禽科学研究所、扬州大学、中国科学院理化技术研究所、黑龙江八一农垦大学、北京市畜牧总站、广东温氏南方家禽育种有限公司、广西参皇养殖集团有限公司。

本文件主要起草人：孙研研、杜洪峰、金晟琳、李云雷、袁经纬、韩威、李世军、赵小丽、杨宇泽、刘胜军、葛采月、韩昕彤、徐振强、杨福剑、陈国宏、陈继兰。

家禽遗传资源保护技术规程 鸡卵巢

1 范围

本文件确立了应用鸡卵巢进行家禽遗传资源保护的技术流程，规定了卵巢供体的选择、卵巢的玻璃化冷冻、冷冻卵巢的贮存、冷冻卵巢的使用、档案管理等技术要求。

本文件适用于鸡卵巢用于家禽遗传资源保护。

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

GB/T 14174 大口径液氮容器

GB/T 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 37864 生物样本库质量和能力通用要求

GB/T 40454 家禽孵化良好生产规范

NY/T 3445 畜禽养殖场档案规范

T/CAAA 138 初生雏鸡性别鉴定技术规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

玻璃化冷冻 vitrification

在细胞、组织等生物样本的低温保存过程中，使用高浓度的冷冻保护剂溶液，并配合极高的降温速率，使样本及其周围溶液从液态直接转变为非晶态的、无冰晶的玻璃状固态的一种冷冻技术。

3.2

原位移植 orthotopic transplantation

将供体移植物植入受体原有解剖位置以恢复生理功能的移植技术。

3.3

遗传资源重建 genetic resource reconstruction

通过冷冻保存家禽的遗传材料，在需要时将这些材料复苏并复原成活体。

4 技术流程

应用鸡卵巢进行家禽遗传资源保护的技术流程包括卵巢供体的选择、卵巢的玻璃化冷冻、冷冻卵巢的贮存、冷冻卵巢的使用。应用鸡卵巢进行家禽遗传资源保护的技术流程见图1。

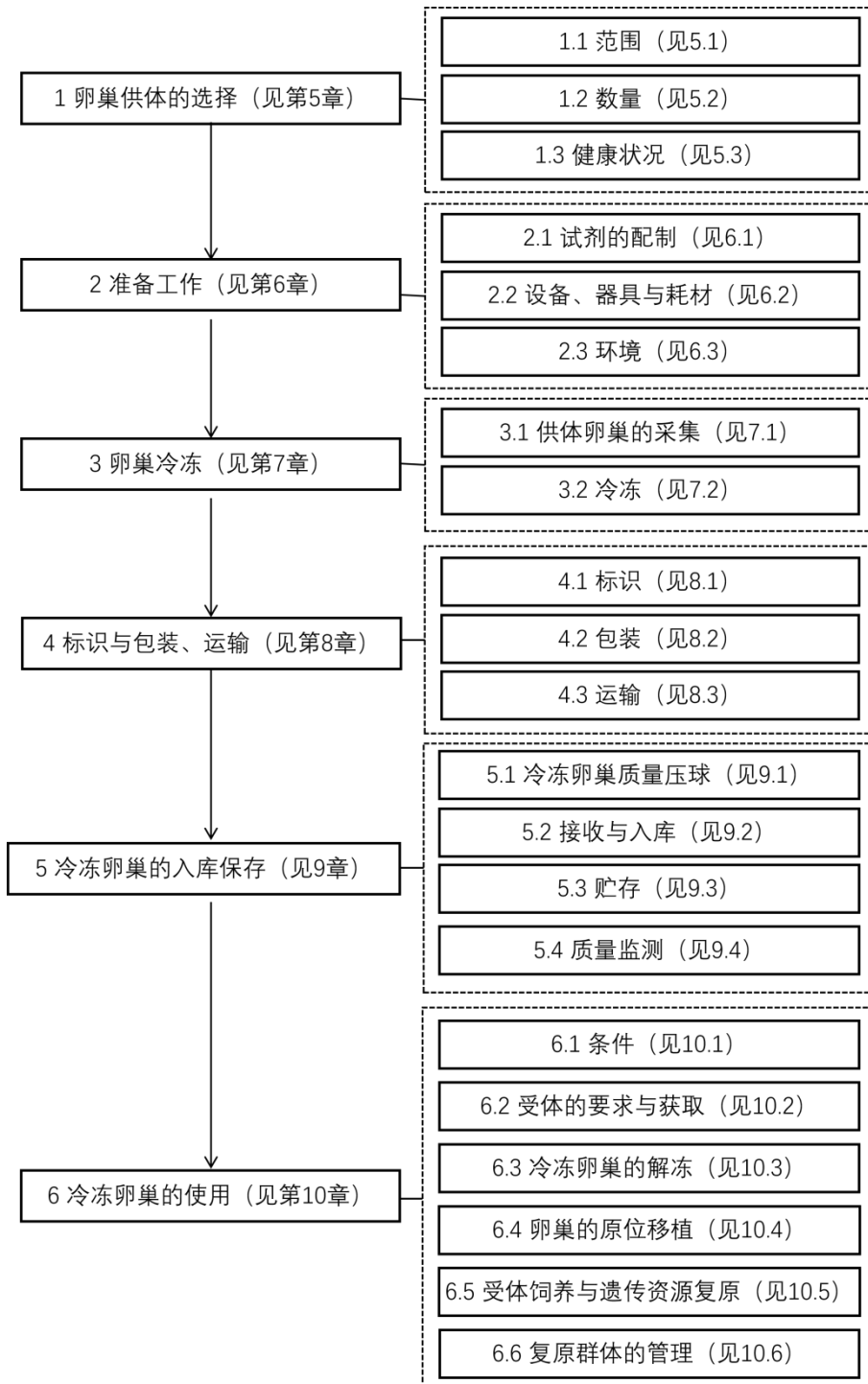


图1 应用鸡卵巢进行家禽遗传资源保护的技术流程

5 卵巢供体的选择

5.1 范围

- 5.1.1 《国家畜禽遗传资源品种名录》中所列品种或配套系。
- 5.1.2 具有特殊表型变异的品系，如多趾或匍匐性状品系等突变群体。
- 5.1.3 培育的近交系和特定性状的专门选育品系。

5.1.4 商业化纯系。

5.2 数量

5.2.1 每个家禽遗传资源卵巢应采集于30个以上家系。如果家系数量不足30个，则卵巢采集于全部家系。每个家系应保存1个以上母雏卵巢。

5.2.2 如果没有家系记录，则卵巢采集于30只以上无直接血缘关系的母雏。

5.3 健康状况

选择出雏后 24 h 以内的健康母雏作为供体，用于孵化供体的种蛋来源种群的健康状态应良好，符合《种用动物健康标准》。

6 准备工作

6.1 试剂的配制

6.1.1 平衡溶液：20%胎牛血清的 DPBS 溶液。

6.1.2 完全培养基：20%胎牛血清的 DMEM 溶液。

6.1.3 冷冻保护液 1：20%胎牛血清，7.5%二甲基亚砷和 7.5%乙二醇的 DPBS 溶液。

6.1.4 冷冻保护液 2：15%二甲基亚砷，15%乙二醇和 0.5 M 蔗糖的 DPBS 溶液。

6.1.5 解冻液 1：20%胎牛血清和 1 M 蔗糖的 DPBS 溶液，用 0.2 μm 过滤器过滤除菌。

6.1.6 解冻液 2：20%胎牛血清和 0.5 M 蔗糖的 DPBS 溶液，用 0.2 μm 过滤器过滤除菌。

6.1.7 解冻液 3：20%胎牛血清和 0.25 M 蔗糖的 DPBS 溶液，用 0.2 μm 过滤器过滤除菌。

6.1.8 麻醉剂：舒泰 50 加生理盐水稀释至 5 mg/mL。

6.1.9 所有试剂应现用现配。

6.2 设备、器具与耗材

6.2.1 设备：超净工作台、4°C冰箱、-20°C冰箱、高压灭菌锅、液氮生物容器、孵化器、体式显微镜、电动剃毛刀、手术加热板、育雏箱、细胞计数仪、剪刀、镊子、水浴锅或者金属浴等。

6.2.2 耗材：针灸针、冻存管、缝合针、缝合线、手术巾等。应为无菌包装或经高压灭菌处理。

6.2.3 器具：眼科剪、镊子等。应经高压灭菌处理。

6.2.4 设备的使用和管理应符合 GB/T 37864 有关规定。

6.2.5 生物安全要求应符合 GB/T 19489 有关规定。

6.3 环境

6.3.1 卵巢的冷冻、解冻和原位移植操作环境的空气洁净度应不低于 ISO 7 级。

7 卵巢冷冻

7.1 供体卵巢的采集

按照如下步骤进行供体卵巢的采集：

- 将出雏后 24 h 以内的健康母雏断颈处死，打开供体腹腔，暴露卵巢位置；
- 用眼科剪沿卵巢基底部剪下整个卵巢，在 4°C 预冷的 DPBS 中洗涤去除血液；
- 体视镜下去除结缔组织与血块，分成 2 - 3 块 1 mm³ 左右大小的组织块。

7.2 冷冻

按照如下步骤进行卵巢的玻璃化冷冻：

- a) 将卵巢组织块置于 4℃平衡溶液中平衡 15 min - 20 min;
- b) 将卵巢组织块穿在针灸针上，间隔 0.5 cm 左右；
- c) 将针灸针浸入室温的冷冻保护液 1 中 10 min；
- d) 将针灸针浸入室温的冷冻保护液 2 中 2 min；
- e) 将针灸针放入液氮预冷的冻过的冻存管中，投入液氮。每个冻存管只保存同一个个体来源的卵巢组织。

8 标识与包装、运输

8.1 标识

应在冷冻卵巢制备前做好冻存管标识，在冻存管壁上清楚标记遗传资源代号、家系号或者个体号（如有）、制备单位和制备日期。

8.2 包装

应在液氮等-140℃以下环境中进行。冻存管使用冻存盒包装，冻存盒标识内容应涵盖冻存管内容。

8.3 运输

冷冻卵巢运输应始终处于液氮环境中。液氮容器应轻装轻卸，避免倾斜、碰撞和强烈震动。容器外明显位置应标注“向上”和“小心轻放”等标志。

9 冷冻卵巢的入库保存

9.1 冷冻卵巢质量要求

9.1.1 解冻的冷冻卵巢细胞活率应不低于 80%。

9.2 接收与入库

9.2.1 生物样本库接收人员应对送达的冷冻卵巢进行检查，核对数量、标识信息，并检查包装是否完好。

9.2.2 冷冻卵巢在入库时应分配唯一标识码，并与贮存容器和位置信息关联。

9.3 贮存

9.3.1 贮存环境和要求

冷冻卵巢包装袋应浸没于液氮生物容器的液氮中。冷冻卵巢由一个液氮生物容器转移到另一液氮生物容器时，在液氮生物容器外停留时间不得超过 3 s。取存冷冻卵巢后要及时盖好液氮生物容器塞。液氮生物容器贮存环境应阴凉、干燥、清洁和通风良好。

9.3.2 容器

应符合 GB/T 5458 和 GB/T 14174 的要求。

9.4 质量监测

9.4.1 每五年一次随机抽取每个遗传资源或每个批次 1 管库存冷冻卵巢样本进行质量监测。

9.4.2 监测项目为细胞活率。

9.4.3 按照附录 A 的方法检测冷冻卵巢解冻后的细胞活率。

9.4.4 质量应符合 9.1.1 的要求。

10 冷冻卵巢的使用

10.1 条件

10.1.1 通过原位移植用于鸡遗传资源群体遗传多样性的恢复以及灭绝遗传资源重建。

10.1.2 应按照保存库的管理办法进行申请和审批，审批通过后分配审批号，并将相关材料归档保存。

10.2 受体的要求与获取

10.2.1 受体宜选择产蛋量较高、体型适中、对手术耐受性强的品种。健康状况的要求同 5.3。

10.2.2 收集合格种蛋，标识后按照 GB/T 40454 进行孵化，按照 T/CAAA 138 进行性别鉴定，选择孵化 24 h 以内的母雏作为受体。

10.3 冷冻卵巢的解冻

按照如下步骤进行冷冻卵巢的解冻：

- a) 将冻存管从液氮中取出，将载有卵巢组织块的针灸针迅速完全浸入 38.5℃预热的解冻液 1 中 2 min；
- b) 将针灸针浸入 3 mL 38.5℃预热的解冻液 2 中 2 min；
- c) 将针灸针浸入 3 mL 38.5℃预热的解冻液 3 中 1 min；
- d) 将解冻完全的卵巢从针灸针上取下，浸入 4℃ 预冷的 DPBS 中待用。

10.4 卵巢的原位移植

按照如下步骤进行冷冻卵巢的解冻：

- a) 称量受体体重，腿部肌肉注射适量麻醉剂使其完全麻醉；
- b) 使受体仰卧在手术加热板上，剃除左侧腹部绒毛，用 75%酒精清洗皮肤表面，碘伏棉签擦拭拟开口位置；
- c) 用剪刀自左侧肋骨下方向脐部作 1.5 cm ~ 2.0 cm 切口，依次切开皮肤、双层肌肉，打开腹膜，暴露腹腔；
- d) 轻轻拉出卵黄囊，灼烧结扎卵黄囊与肠连接部位，剪去卵黄囊；
- e) 整理腹腔内脏，留出腹腔左侧手术视野，暴露卵巢；
- f) 用剪刀或尖镊多次少量去除 80%受体卵巢组织；
- g) 将两块解冻卵巢贴放在受体原卵巢部位，用背侧气囊覆盖，再将内脏覆盖并整理恢复原位；
- h) 腹膜与肌肉层一同连续缝合，皮肤间断缝合，缝合处皮肤周围涂抹红霉素软膏；
- i) 受体鸡转移至育雏箱观察至麻醉苏醒。

10.5 受体饲养与遗传资源复原

10.5.1 受体按照该品种的标准饲养方法进行饲养。

10.5.2 受体稳定产蛋后，使用供体品种精液进行人工输精，收集种蛋，按照 GB/T 40454 进行孵化。

10.5.3 出雏后根据雏鸡羽色等外观以及采用微卫星标记或 SNP 位点等分子标记进行亲缘关系鉴定，判定出雏个体为供体与受体的杂交后代还是供体纯种后代。供体纯种后代即为复原群体。

10.6 复原群体的管理

复原群体应作为该遗传资源的核心群进行长期维持和管理，应符合GB/T 45207的要求。

11 档案记录与管理

11.1 冷冻卵巢的制备、入库和使用等全过程应进行档案记录，相关表格参见附录 B。

11.2 纸质档案应存储和保存于指定区域，电子档案存储设施应有阻止未经授权的访问和病毒防护的程序。

11.3 信息记录应形成文件分类归档保存，每项档案内容记载的信息应连续、完整、真实。

11.4 应有专人保管档案，档案的审核、借阅、保密和销毁应符合 NY/T 3445 的有关规定。

附录 A (资料性)

解冻卵巢组织细胞活率的检测

A.1 卵巢解冻

冷冻卵巢按照 8.3 解冻。

A.2 组织消化与细胞悬液的制备

将解冻的卵巢组织块剪碎，加 400 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热 0.25% 胰酶-EDTA，37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min；用移液器吹打，显微镜下观察，当细胞分散变圆后，加入 800 μL 37 $^{\circ}\text{C}$ 预热的完全培养基终止消化，制成细胞悬液。

A.3 染色与测定

将 0.4% 台盼蓝染料与细胞悬液以 1:4 的体积混合均匀，1 min 内吸取 20 μL 混合液加入到细胞计数板中，在显微镜下计数活细胞数和死细胞数，其中活细胞为明亮、无色、有折光性的圆形细胞，死细胞被台盼蓝染料染为蓝色细胞。细胞活率按公式 (1) 计算。也可以将细胞计数板放入细胞计数仪直接测定细胞活率。

$$A = \frac{N_1}{N_1 + N_2} \times 100 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

A ——细胞活率，单位为百分号 (%)；

N_1 ——活细胞数；

N_2 ——死细胞数。

附录 B

(资料性)

鸡卵巢用于家禽遗传资源保护主要相关记录表示例

A.1 鸡冷冻卵巢制备记录表示例见表 A.1。

表 A.1 鸡冷冻卵巢制备记录表示例

日期	品种	来源地	雏鸡只数/只	预计生产管数/管	实际生产管数/管	制作人员	解冻卵巢细胞活力/%	质检人员	质检日期

A.2 鸡冷冻卵巢使用记录表示例见表 A.2。

表 A.2 鸡冷冻卵巢使用记录表示例

日期	品种	卵巢标识	领用人员	领用数量	审批号	使用目的	质检情况	质检人员	使用方式	使用结果

参 考 文 献

- [1] 《国家畜禽遗传资源品种名录》 畜资委办[2025]18 号
 - [2] 《种用动物健康标准》 中华人民共和国农业农村部公告 第574号
-