

DB 1509

乌兰察布市地方标准

DB 1509/T 0001—2023

奶绵羊冷冻精液生产技术规程

Technical regulations for the production of dairy sheep frozen seme

地方标准信息服务平台

2023 - 12 - 08 发布

2024 - 01 - 08 实施

乌兰察布市市场监督管理局 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。

本文件由乌兰察布市农牧局提出。

本文件由乌兰察布市农牧局提归口。

本文件起草单位：乌兰察布市畜牧工作站、内蒙古大学、蒙天然牧业科技发展有限公司、乌兰察布市市场监督管理局、内蒙古丰东知盈牧业科技有限公司、察右中旗市场监督管理局。

本文件主要起草人：张立果、张立、王申元、苏小虎、魏润元、李光鹏、寇慧娟、朱怡静、郑重、刘建宁、于涛、刘权、苏广华、杨磊、萨仁格勒、杨柳、闫鑫鹏、侯仕农、王景龙、郝佳惠、刘信、贾俊欣、米布农、郑少华、张莉、窦英杰、赵跃芳。

地方标准信息服务平台

奶绵羊冷冻精液生产技术规程

1 范围

本文件规定了奶绵羊冷冻精液生产的基本要求、精液处理、精液冷冻、标志、包装、运输、贮存。本文件适用于奶绵羊冷冻精液生产。

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 4789.2 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 5458 液氮生物容器

GB 20557 山羊冷冻精液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

奶绵羊 dairy sheep

以产奶为主的绵羊。

3.2

精子活力 sperm motility

在显微镜恒温载物台38℃环境下直线前进运动精子占总精子数的百分率。

3.3

精子畸形率 abnormal sperm percentage

畸形精子占总精子数的百分率。

3.4

细菌数 bacteria count

每剂量精液经培养后观察到的细菌菌落数。

3.5

顶体完整性 acrosome integrity

顶体完整的精子占总精子数的百分率。

3.6

质膜完整性 plasma membrane integrity

质膜完整的精子占总精子数的百分率。

3.7

冷冻精液 frozen semen

经特殊方法处理超低温冷冻后在液氮中（-196℃）保存的精液。

4 精液采集

4.1 种公羊选择

具有种用价值、系谱完整、体质健康、无遗传病，不应有已发布的动物防疫法中所明确的二级疫病中的任何一种疾病。

4.2 采集精液

4.2.1 台羊

选择性格温顺、四肢健康的发情母羊作为台羊，将台羊后驱清理干净。

4.2.2 种公羊处理

采精前剪短包皮周围长毛，清洗消毒包皮。

4.2.3 采精器

假阴道、集精杯提前灭菌消毒。安装采精器，保证采精器结实不漏水。采精时在采精器分层中注入适量40℃~45℃的水。吹气使其外口呈三角形，假阴道上端均匀涂抹凡士林。

4.2.4 精液采集

采精时，工作人员半蹲于台羊的左侧后方，右手握住假阴道，并与地面成约45°。当公羊稳定爬跨时，利用假阴道迅速采集精液并将其置于38℃水浴锅中，记录采精量。

4.3 新鲜精液评估

采集精液符合以下评估标准方可进行稀释、冷冻：

- a) 色泽呈乳白色或浅黄色，肉眼可见云雾状运动；
- b) 精子活力 $\geq 65\%$ ；
- c) 精子密度 $\geq 2 \times 10^9$ 个/mL；
- d) 精子畸形率 $\leq 15\%$ 。

5 稀释液配制

5.1 仪器

烧杯、量筒、磁力搅拌器、天平。

5.2 化学试剂

所有化学试剂（化学纯以上）：Tris、柠檬酸、果糖、M199、大豆卵磷脂、青霉素、链霉素、甘油、超纯水。

5.3 稀释液配方

A液：Tris 2.71 g、柠檬酸1.4g、果糖1g、M199 2 mL、大豆卵磷脂1 g、青霉素10000 IU、链霉素10 g，加超纯水至100 mL。

B液：取A液90 mL，甘油10 mL。

6 精液稀释

6.1 稀释密度

稀释密度大于等于 1.2×10^8 个/mL。

6.2 精液稀释

- 6.2.1 将稀释液在 38 °C 水浴锅中预热 30 min，通过测定鲜精密度和采精量，计算出稀释后总体积；
- 6.2.2 选用合适容积的器皿用 A 液先对其进行 1: 1（鲜精: A 液）稀释；静置 10 min 后 1: 4 稀释（鲜精: A 液）；静置 10 min 后 1: 8（鲜精: A 液）稀释，静置 10 min；
- 6.2.3 加 A 液至总体积的一半；
- 6.2.4 将稀释后的精液封口并放于含有 38 °C 水的烧杯中，
- 6.2.5 将其放置 4 °C 冰箱中平衡 2 h 后加稀释液 B 液至总体积，置于 4 °C 冰箱中平衡 1 h。

6.3 细管精液的分装、标识

用无菌 0.25 mL 细管分装，两端封口应严密，管内无气泡。细管横向标识顺序从左到右依次为：羊号、生产日期。

7 精液冷冻

7.1 冷冻设备

制作冻精的设备为适用 0.25 mL 细管的程控冷冻仪。

7.2 冷冻程序及操作步骤

- 7.2.1 按照程控冷冻仪的操作步骤对精液进行冷冻。冷冻程序为：4 °C ~ -10 °C（降温速率 5 °C/min）；-10 °C ~ -100 °C（降温速率 60 °C/min）；-100 °C ~ -140 °C（降温速率 20 °C/min）。
- 7.2.2 精液冷冻前 30 min，将液氮阀和排气阀打开以平衡液氮罐和冷冻箱内的压力，待冷冻箱内温度降至 4 °C 时，维持 30 s；
- 7.2.3 打开冷冻箱盖，将放有细管精液的托架放入冷冻箱内，关闭冷冻箱盖进行精液冷冻；
- 7.2.4 当温度下降至 -140 °C 时冷冻结束，保持 30 s 后取出分装。

7.3 冻精包装和贮存

细管置入液氮并分装冻存，同时留样检测冻精质量。

细管冻精用专用的塑料管包装，每管 25 支，再将塑料管装入纱布袋，纱布袋系紧口，确保细管不掉。贮存冻精的低温容器应符合 GB/T 5458 的要求；及时补充液氮，每年补充液氮；取放冻精时，冻精离开液氮不应超过 10 s。

8 精液解冻

水浴锅 38 °C ~ 40 °C 预热 30 min 以上，待水浴锅温度稳定后，迅速从贮存罐中取出预留冻精，在空气中放置 15 s ~ 20 s，然后放入 38 °C ~ 40 °C 水浴锅中 15 s ~ 20 s 并轻轻摇晃；取出细管用无菌吸水纸擦拭干净。

9 冻精质量检测

9.1 细管外观

细管无裂痕，两端封口严密，标识清晰。

9.2 冻精解冻后的要求

- 9.2.1 活力 $\geq 35\%$ ，应符合 GB 20557 的要求。
- 9.2.2 精子畸形率 $\leq 25\%$ ，应符合 GB 20557 的要求。
- 9.2.3 细菌数 ≤ 800 个/0.25 mL，检测方法见 GB 4789.2
- 9.2.4 顶体完整性 $\geq 45\%$ ，检测方法见附录 A。
- 9.2.5 质膜完整性 $\geq 35\%$ ，检测方法见附录 B。

地方标准信息服务平台

附录 A

(资料性)

奶绵羊冷冻精液精子顶体完整性检测方法

A.1 器材、试剂

荧光显微镜、烘片机、多聚赖氨酸粘附性的载玻片、PBS、4%多聚甲醛、FITC-PSA、DAPI、甘油。

A.2 操作步骤

A.2.1 冻精准备

解冻3管冷精于1.5 mL离心管中，加入1 mL洗精液并混匀；1500 rpm离心5 min，弃上清，留约20 μ L。

A.2.2 固定

加入适量的PBS重悬精子沉淀，并向其中加入4%多聚甲醛对精子进行固定，固定约30 min。

A.2.3 洗涤

向精液中加入PBS 1 mL，1500 rpm离心5 min洗涤2次以除去精浆，多聚甲醛等，洗涤后加入1 mL PBS重悬精子沉淀。

A.2.4 涂片染色

取10 μ L精液均匀涂于多聚赖氨酸粘附性的载玻片上，并将其放于烘片机上干燥；加10 μ L FITC-PSA对精子进行避光染色15 min；用超纯水缓慢洗涤玻片并干燥；加5 μ L DAPI染色液避光染色5 min。

A.2.5 洗涤干燥

用超纯水缓慢洗涤玻片，放烘片机上干燥，并用PBS与甘油的混合物封片。

A.2.6 镜检

荧光显微镜下观察，共计数至少200个精子来统计冻后精子顶体完整性，若精子头部均染成明亮的绿色荧光且均匀即顶体完整（AI）；已发生顶体反应（AR）的精子仅在赤道带出现荧光染色，或者头部无绿色荧光。

A.2.7 计算

所检冻精的顶体完整率按照公式A.1计算：

$$C=CI/S\times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

C ——顶体完整率，%；

CI ——顶体完整，单位为个；

S ——总精子数，单位为个。

附录 B
(资料性)

奶绵羊冷冻精液质膜完整性检测方法

B.1 器材、试剂

荧光显微镜、恒温水浴锅、洗精液、低渗溶液、PBS。

B.2 操作步骤

B.2.1 冻精准备

B.2.2 低渗溶液处理

吸取200 μL精液加到1 mL低渗溶液中。放入恒温水浴锅里38 ℃，30 min。

B.2.3 封片

取10 μL精液滴到载玻片上并盖上盖玻片。

B.2.4 镜检

自然干燥后在显微镜下观察，每个视野观察200个以上的精子。

B.2.5 计算

质膜完整率按照公式B.1计算：

$$D=D1/S \times 100 \dots\dots\dots (B.1)$$

式中：

D——质膜完整率，%；

D1——质膜完整精子，单位为个；

S——精子总数，单位为个。

标准信息服务平台