



中华人民共和国国家标准

GB 4143—2022

代替 GB 4143—2008

牛 冷 冻 精 液

Frozen bovine semen

2022-12-29 发布

2024-01-01 实施

国家市场监督管理总局 发布
国家标准化管理委员会

目 次

前言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 技术要求 2

5 取样 2

 5.1 基本要求 2

 5.2 取样量 2

 5.3 取样方法 2

 5.4 样品贮存 3

6 试验方法 3

 6.1 剂量 3

 6.2 精子活力 3

 6.3 前向运动精子数 3

 6.4 精子畸形率 3

 6.5 菌落总数 3

7 检验规则 3

 7.1 组批 3

 7.2 检验类型 3

 7.3 判定规则 4

8 标志和随行文件 4

 8.1 标志 4

 8.2 随行文件 4

9 包装、贮存和运输 4

 9.1 内包装 4

 9.2 外包装 4

 9.3 贮存和运输 4

附录 A（规范性） 牛冷冻精液质量检验方法 5

 A.1 通则 5

 A.2 剂量 5

 A.3 精子活力 5

 A.4 前向运动精子数 6

 A.5 精子畸形率 7

A.6 菌落总数 8

附录 B (资料性) 牛品种代码编制 10

B.1 编制原则 10

B.2 编制方法 10

B.3 136 个牛品种代码 10

参考文献 12

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。

本文件代替 GB 4143—2008《牛冷冻精液》，与 GB 4143—2008 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了“菌落总数”的定义(见 3.3, 2008 年版的 3.4)；
- 删除了“种公牛”和“新鲜精液”的要求(见 2008 年版的 4.1、4.2)；
- 将“冻精外观”的技术要求调整为“包装”要求(见 9.1, 2008 年版的 4.3)；
- 更改了“剂量”“精子活力”“前向运动精子数”“精子畸形率”和“菌落总数”的技术要求(见第 4 章, 2008 年版的 4.4、4.5.1、4.5.2、4.5.3、4.5.4)；
- 删除了“抽样”(见 2008 年版的第 5 章、附录 A 和 B.1)，增加了“取样”内容(见第 5 章)；
- 更改了“检验类型”“判定规则”(见 7.2、7.3, 2008 年版的 6.4、第 7 章)；
- 增加了“型式检验”情况的描述(见 7.2.2)；
- 增加了“随行文件”(见 8.2)；
- 增加了“贮存”“运输”(见 9.3)。

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。

本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

- 1984 年首次发布为 GB 4143—1984, 2008 年第一次修订；
- 本次为第二次修订。

牛 冷 冻 精 液

1 范围

本文件规定了牛冷冻精液的技术要求、取样、检验规则、标志和随行文件、包装、贮存和运输,描述了牛冷冻精液质量检验的试验方法。

本文件适用于牛冷冻精液。

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,仅注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—2016 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/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定
- GB/T 14174 大口径液氮容器
- GB/T 30396—2013 牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

精子活力 sperm motility

在 37 °C 环境下前向运动精子数占精子总数的百分率。

[来源:GB 20557—2006,3.2]

3.2

精子畸形率 abnormal sperm percentage

畸形精子数占精子总数的百分率。

[来源:GB 20557—2006,3.3]

3.3

菌落总数 aerobic plate count

每剂量精液在一定条件下培养后观察到的微生物菌落总数。

3.4

冷冻精液 frozen semen

经特殊方法处理的精液超低温冷冻后在液氮中(−196 °C)长期保存。

[来源:GB 20557—2006,3.5]

3.5

前向运动精子数 number of progressively motile sperm

每剂量精液中呈前向运动精子的总数。

[来源:GB 23238—2021,3.5]

4 技术要求

牛冷冻精液应符合表 1 中的规定。

表 1 技术指标

项目	单位	指标
剂量	mL	微型 ≥ 0.19
		中型 ≥ 0.42
精子活力	%	普通牛、瘤牛 ≥ 40
		水牛、牦牛及大额牛 ≥ 35
前向运动精子数	10^4 个/剂	普通牛、瘤牛 ≥ 600
		牦牛 ≥ 800
		水牛及大额牛 $\geq 1\ 000$
精子畸形率	%	普通牛、瘤牛 ≤ 20
		水牛、牦牛及大额牛 ≤ 22
菌落总数	CFU/剂	≤ 500
注：普通牛涵盖各品种奶牛、肉牛、兼用牛和黄牛。		

5 取样

警示：取样人员应意识到取样过程可能涉及液氮(－196 ℃)冻伤的危害和危险，应采取适当的安全和防护措施。

5.1 基本要求

- 5.1.1 取样应由受过培训的人员执行。
- 5.1.2 取样原则应遵循随机性原则。每头公牛及每批次的牛冷冻精液被取样的机会均等。
- 5.1.3 取样和样品保存使用的液氮生物容器应符合 GB/T 5458、GB/T 14174 的规定。

5.2 取样量

5.2.1 交收检验

每批次抽取不少于 4 支(含复检备样)。

5.2.2 型式检验

每批次抽取不少于 15 支(含复检备样)。

5.3 取样方法

- 5.3.1 每头公牛的冷冻精液样品应是同一个批次的产品。
- 5.3.2 随机从液氮生物容器中抽取样品，样品离开液氮不应超过 5 s。

5.3.3 取样完成后应立即填写样品登记表(包括取样日期、取样地点、公牛品种、公牛号、样品生产日期或批号及取样人签字等信息)并与样品随行。

5.4 样品贮存

样品的贮存应符合 GB/T 30396—2013 的规定。

6 试验方法

6.1 剂量

按照附录 A 中 A.2 给出的方法检测。

6.2 精子活力

按照 A.3 给出的方法检测。

6.3 前向运动精子数

按照 A.4 给出的方法检测。

6.4 精子畸形率

按照 A.5 给出的方法检测。

6.5 菌落总数

按照 A.6 给出的方法检测。

7 检验规则

7.1 组批

同一头公牛、相同生产工艺、同一天采精生产的冷冻精液为一个批次。

7.2 检验类型

7.2.1 交收检验

交收检验项目为精子活力。

7.2.2 型式检验

型式检验项目为第 4 章的全部要求。冷冻精液生产正常时,每 2 个月至少进行一次型式检验。

有下列情况之一时,应进行型式检验:

- a) 生产工艺及设备有变更时;
- b) 所用生产原料有变化时;
- c) 种公牛发生疾病康复后或注射疫苗后;
- d) 停产 3 个月以上恢复生产时;
- e) 交收检验结果与型式检验结果有较大差异时;
- f) 监督管理部门提出要求时。

7.3 判定规则

7.3.1 交收检验时,样品精子活力合格,则判定该批次冷冻精液为合格;型式检验时,样品所检项目全部合格,则判定该批次冷冻精液为合格。

7.3.2 样品中任何一项目检验不符合规定的,应用备样进行复检,备样复检后仍不符合规定的,判定该批次冷冻精液为不合格。

7.3.3 各项目检测结果的极限数值判定按 GB/T 8170 中修约值比较法执行。

8 标志和随行文件

8.1 标志

应在牛冷冻精液细管管壁上及包装袋上清晰印制以下标志内容:

- a) 生产者;
- b) 公牛品种代码:代码编制见附录 B;
- c) 公牛号;
- d) 生产日期。

8.2 随行文件

随行文件应包括冷冻精液来源公牛的系谱及种用性能资料。

9 包装、贮存和运输

9.1 内包装

细管封口严密、标志清晰。

9.2 外包装

产品外包装应符合 GB/T 30396—2013 中第 4 章要求。

9.3 贮存和运输

贮存和运输应符合 GB/T 30396—2013 中第 7 章、第 8 章要求。

附 录 A
(规范性)
牛冷冻精液质量检验方法

A.1 通则

试验中除非另有规定,仅使用分析纯试剂。试验用水为新制备的去离子水或蒸馏水。试验所用的测量仪器应经过计量检定机构检定合格,并在有效期内。

A.2 剂量

A.2.1 器材

- A.2.1.1 分度吸量管:精度 0.01 mL。
- A.2.1.2 细管专用剪刀。
- A.2.1.3 细管专用推针。
- A.2.1.4 试管:5.0 mL。

A.2.2 试样制备

取 3 剂细管冷冻精液于室温自然解冻后,剪去封口端,用细管推针将全部样品推至同一个试管内。

A.2.3 试验步骤

用分度吸量管吸取全部试样,并读取试样总量。

A.2.4 试验数据处理

按式(A.1)计算剂量值,结果保留 2 位小数:

$$V = \frac{V_1}{3}$$

.....(A.1)

式中:

V ——剂量值,单位为毫升(mL);

V₁ ——3 支试样总量,单位为毫升(mL)。

A.3 精子活力

A.3.1 仪器和器材

- A.3.1.1 显微镜:配有相差物镜,20X、40X、100X。
- A.3.1.2 显微摄像系统:显微镜、摄像头、电脑及显示屏。
- A.3.1.3 显微镜恒温载物台:37 ℃±1 ℃。
- A.3.1.4 恒温水浴箱:37 ℃±1 ℃。
- A.3.1.5 试管:5.0 mL。
- A.3.1.6 移液器:量程 20 μL。
- A.3.1.7 载玻片。
- A.3.1.8 盖玻片。

A.3.2 试样制备

取 2 剂细管冷冻精液,置于 37 ℃ 水浴解冻,解冻时间微型不少于 10 s、中型不少于 15 s。将解冻后样品剪去封口端,用细管推针全部推至同一个试管内,混匀后置于 37 ℃ 水浴中恒温待用。

A.3.3 试验步骤

吸取 10 μL 试样置于载玻片上,加盖玻片,立即在 38 ℃ 恒温载物台上,用 200 倍~400 倍显微镜观察活力,也可通过显示屏观察。分别观察 2 个样片,每个样片至少观察 3 个以上视野,并应观察不同液层内的精子运动状态,给出综合评定值。

A.3.4 试验数据处理

精子活力按式(A.2)计算,结果取整数:

$$M = \frac{n_1 + n_2}{2} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

M ——精子活力,%;

n_1 ——第 1 个样片精子活力,%;

n_2 ——第 2 个样片精子活力,%。

2 个样片的精子活力在重复性条件下,测定结果的相对偏差不得超过 5%,否则应重检。

A.4 前向运动精子数

A.4.1 试剂

3.0%氯化钠溶液:称取氯化钠 3.0 g,加蒸馏水溶解并定容至 100 mL。

A.4.2 设备和器材

A.4.2.1 显微镜:配有相差物镜,20X、40X、100X。

A.4.2.2 显微摄像系统:显微镜、摄像头、电脑及显示屏。

A.4.2.3 血球计数板:25 $\times$ 16 型(汤麦式),盖玻片。

A.4.2.4 计数器。

A.4.2.5 移液器:量程 10 μL 、20 μL 、1 000 μL 。

A.4.2.6 试管:5.0 mL。

A.4.3 试样制备

解冻方法按 A.2.2 的规定。

量取 20 μL 样品注入盛有 0.98 mL 的 3.0%氯化钠溶液的试管内,混匀,使之成为 50 倍稀释试样。

A.4.4 试验步骤

应按如下步骤进行操作。

- a) 用盖玻片将血球计数板的计数室盖好,分别吸取 1 滴试样置于 2 个计数室边缘,使试样自行流入计数室,均匀充满,然后在 400 倍显微镜下观察计数,每试样观察 2 个计数室。
- b) 每个计数室按对角线方位,选择左上、左下、右上、右下 4 个及中央 1 个共 5 个中方格进行分别计数,对于方格压线精子(以头部为准)采取数上不数下、数左不数右的原则。记录计数室中 5 个中方格精子数,2 个计数室中 5 个中方格总精子数求算术平均数(s_1)。

A.4.5 试验数据处理

每剂量中前向运动精子数按式(A.3)计算,结果取整数:

$$P = s_t \times 5 \times 10 \times 1\,000 \times 50 \times V \times M \dots\dots\dots (A.3)$$

式中:

- P ——每剂量中前向运动精子数,单位为个;
- s_t ——2个计数室中5个中方格总精子数的平均值,单位为个;
- 5 ——5个中方格精子数推及25个中方格的精子数;
- 10 ——推及1 mm³ 中精子数;
- 1 000——推及1 mL 中精子数;
- 50 ——试样稀释倍数;
- V ——样品剂量值,单位为毫升(mL);
- M ——精子活力,%。

2个计数室中5个中方格的精子数,在重复性条件下,2次独立测定结果的相对偏差不得超过5%,否则应重检。

A.5 精子畸形率

A.5.1 试剂

- A.5.1.1 姬姆萨染料。
- A.5.1.2 磷酸二氢钠(NaH₂PO₄ · 2H₂O)。
- A.5.1.3 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄ · 12H₂O)。
- A.5.1.4 甲醇(CH₃OH)。
- A.5.1.5 甲醛(HCHO)。
- A.5.1.6 甘油[C₃H₅(OH)₃]。
- A.5.1.7 磷酸盐缓冲液:称取磷酸二氢钠 0.55 g、磷酸氢二钠 2.25 g,加水溶解并稀释至 100 mL。
- A.5.1.8 中性福尔马林固定液:称取磷酸二氢钠 0.55 g、磷酸氢二钠 2.25 g,用 0.9%氯化钠约 50.0 mL 溶解后,加入 8.0 mL 40%甲醛(使用前经碳酸镁中和过滤),再加 0.9% 氯化钠溶液稀释至 100 mL。
- A.5.1.9 姬姆萨原液:称取姬姆萨染料 1.0 g,量取甘油 66.0 mL、甲醇 66.0 mL。姬姆萨染料放入研钵中加少量甘油充分研磨至无颗粒为止,然后将甘油全部倒入研钵并放入恒温箱中保温继续溶解 4 h,再加甲醇充分溶解混匀,过滤后贮于棕色瓶中待用,贮存时间越久,染色效果越好。
- A.5.1.10 姬姆萨染液:量取姬姆萨原液 2.0 mL,加磷酸盐缓冲液 3.0 mL、蒸馏水 5.0 mL,现配现用。商品化的试剂按说明书配制使用。

A.5.2 设备和器材

- A.5.2.1 显微镜:配有相差物镜,20X、40X、100X。
- A.5.2.2 显微摄像系统:显微镜、摄像头、电脑及显示屏。
- A.5.2.3 电子天平:精度 0.001 g。
- A.5.2.4 血球分类计数器。
- A.5.2.5 载玻片。
- A.5.2.6 移液器:量程 20 μL。

A.5.3 试样制备

解冻方法按 A.3.2 的规定。

A.5.4 试验步骤

按如下步骤进行操作。

- a) 取试样 1 滴,滴于载玻片一端,用另一边缘光滑的载玻片与有试样的载玻片呈 35° 夹角,将试样均匀地拖布于载玻片上,自然风干,每试样制作 2 个抹片。
- b) 将已风干的抹片置于染色板上,用中性福尔马林固定液固定 15 min 后,用清水缓缓冲去固定液,自然风干。
- c) 将固定好后的抹片反扣在带有平槽的有机玻璃面上,把姬姆萨染液滴于槽和抹片之间,让其充满平槽并使抹片接触染液,1.5 h 后用清水缓缓冲去染液,晾干待检。
- d) 将制备好的抹片在 400 倍显微镜下观察精子的形态。观察范围为抹片的左、中、右 3 个区域,用血球分类计数器分别记录正常精子数和畸形精子数,每个抹片累计观察精子 200 个以上。

A.5.5 试验数据处理

精子畸形率按式(A.4)计算,结果取整数:

$$R = \frac{A_1}{A_1 + A} \times 100 \quad \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

R ——精子畸形率, %;

A_1 ——畸形精子数, 单位: 个;

A ——正常精子数, 单位: 个。

2 个抹片的畸形率在重复性条件下, 2 次独立测定结果的相对偏差不得超过 5%, 否则应重检。

A.6 菌落总数

A.6.1 试剂

A.6.1.1 牛肉浸膏。

A.6.1.2 蛋白胨。

A.6.1.3 磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)。

A.6.1.4 氯化钠($NaCl$)。

A.6.1.5 琼脂粉。

A.6.1.6 蒸馏水。

A.6.1.7 营养琼脂培养基: 取牛肉浸膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、磷酸氢二钾 1.0 g、氯化钠 5.0 g, 用蒸馏水 1 000 mL 溶解, 加琼脂粉 20 g, 加温融解。调 pH 至 7.4~7.6, 并用脱脂棉过滤, 分装于三角烧瓶中, 高压灭菌(0.1 MPa、20 min)。商品化的试剂按说明书配制使用。

A.6.2 设备和器材

A.6.2.1 恒温培养箱: 37 °C ± 1 °C。

A.6.2.2 恒温水浴锅: 46 °C ± 1 °C。

A.6.2.3 天平: 精度 0.001 g。

A.6.2.4 无菌操作台。

A.6.3 试样制备

解冻方法按 A.2.2 规定。

A.6.4 试验步骤

取 2 剂细管冷冻精液,在无菌操作台内,用酒精棉球将细管消毒后,将试样分别加入 2 个标记的灭菌培养皿内,将 15 mL~20 mL 冷却至 46 ℃ 的培养基倒入培养皿,水平晃动培养皿使精液与培养基均匀混合。待琼脂凝固后翻转培养皿,置 37 ℃ ±1 ℃ 恒温培养箱内培养 48 h 取出。观察、统计每个培养皿内菌落数,菌落计数按照 GB 4789.2—2016 中 6.3 的规定。

应设置空白对照,若空白对照内出现菌落,应重检。

A.6.5 结果计算

菌落总数按式(A.5)计算,结果取整数:

$$N = \frac{n_1 + n_2}{2}$$

.....(A.5)

式中:

- N ——样品中的菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);
- n_1 ——第一培养皿菌落数,单位为菌落形成单位(CFU);
- n_2 ——第二培养皿菌落数,单位为菌落形成单位(CFU)。

附 录 B
(资料性)
牛品种代码编制

B.1 编制原则

按照品种名称、类别,以汉语拼音字母编制牛品种代码。品种名称、类别依据国家畜禽遗传资源委员会公布的《国家畜禽遗传资源品种名录》(以下简称“名录”)。

B.2 编制方法

品种代码至少由 2 个汉语拼音大写字母组成。编制操作如下。

a) 以品种汉语名称第一、第二个字的拼音首字母组成。

示例 1: 利木赞牛品种代码为“LM”。

b) 品种名称开头带“中国”字样的,由汉语名称第一、第二、第三个字的拼音首字母组成。

示例 2: 中国西门塔尔牛品种代码为“ZGX”。

c) 按 a)、b)编码出现重码时,编制操作如下:

- 1) 当不同种(属)间出现重码时,牛种(属)排序在前的代码按 a)、b)执行,其他牛种按 a)、b)编制代码后添加该牛种(属)名称首字汉语拼音的第一个字母。若仍出现重码,再次添加该牛种(属)名称首字汉语拼音的第一个字母。牛种(属)的排序为普通牛、瘤牛、水牛、牦牛、大额牛,牛种(属)名称首字汉语拼音的第一个字母分别为 P、L、S、M、D。

示例 3: 南阳牛品种代码为“NY”,娘亚牦牛品种代码为“NYM”。

示例 4: 夏洛来牛品种代码为“XL”,西林水牛品种代码为“XLS”。

- 2) 当种内出现重码时,在“名录”中品种排序在前的代码按 a)、b)执行,其他牛按 a)、b)编制代码后添加该牛种名称首字汉语拼音的第一个字母。若仍出现重码,再次添加该牛种名称首字汉语拼音的第一个字母。

示例 5: 皖南牛品种代码为“WN”,威宁牛品种代码为“WNP”。

示例 6: 西林水牛品种代码为“XLS”,兴隆水牛品种代码为“XLSS”。

B.3 136 个牛品种代码

见表 B.1。

表 B.1 136 个牛品种代码

品种	代号	品种	代号	品种	代号	品种	代号
安格斯牛	AG	阿勒泰白头牛	AL	阿沛甲砸牛	AP	阿什旦牦牛	AS
渤海黑牛	BH	滨湖水牛	BHS	比利时蓝牛	BL	槟榔江水牛	BLS
巴山牛	BS	巴州牦牛	BZ	柴达木牛	CD	川南山地牛	CN
昌台牦牛	CT	查吾拉牦牛	CW	大别山牛	DB	邓川牛	DC
德昌水牛	DCS	滇东南水牛	DD	德国黄牛	DG	德宏水牛	DH
短角牛	DJ	东流水牛	DL	独龙牛	DLD	迪庆牛	DQ
大通牦牛	DT	滇中牛	DZ	地中海水牛	DZS	峨边花牛	EB
恩施山地水牛	ES	福安水牛	FA	涪陵水牛	FL	复州牛	FZ
富钟水牛	FZS	广丰牛	GF	关岭牛	GL	甘南牦牛	GN
甘孜藏牛	GZ	贵州白水牛	GZS	贵州水牛	GZSS	海福特牛	HF
环湖牦牛	HH	和牛	HN	荷斯坦牛	HS	哈萨克牛	HSP
华西牛	HX	海子水牛	HZ	吉安牛	JA	江城黄牛	JC
金川牦牛	JCM	江淮水牛	JH	江汉水牛	JHS	锦江牛	JJ
九龙牦牛	JL	晋南牛	JN	冀南牛	JNP	娟姗牛	JS
郟县红牛	JX	隆林牛	LL	利木赞牛	LM	黎平牛	LP
雷琼牛	LQ	凉山牛	LS	类乌齐牦牛	LW	鲁西牛	LX
辽育白牛	LY	蒙古牛	MG	摩拉水牛	ML	木里牦牛	MLM
闽南牛	MN	蒙山牛	MS	麦洼牦牛	MW	南德文牛	ND
南丹牛	NDP	尼里-拉菲水牛	NL	挪威红牛	NW	南阳牛	NY
娘亚牦牛	NYM	皮埃蒙特牛	PA	平陆山地牛	PL	婆罗门牛	PLL
帕里牦牛	PLM	帕米尔牦牛	PM	平武牛	PW	鄱阳湖水牛	PY
秦川牛	QC	青海高原牦牛	QH	日喀则驼峰牛	RK	瑞士褐牛	RS
斯布牦牛	SB	三河牛	SH	上海水牛	SHS	三江牛	SJ
陕南水牛	SN	蜀宣花牛	SX	太行牛	TH	台湾牛	TW
天祝白牦牛	TZ	务川黑牛	WC	皖东牛	WD	温岭高峰牛	WL
巫陵牛	WLP	皖南牛	WN	威宁牛	WNP	文山牛	WS
涠洲牛	WZ	温州水牛	WZS	雪多牦牛	XD	信丰山地水牛	XF
新疆褐牛	XJ	峡江水牛	XJS	夏洛来牛	XL	西林水牛	XLS
兴隆水牛	XLSS	西门塔尔牛	XM	夏南牛	XN	盱眙山区水牛	XY
信阳水牛	XYS	徐州牛	XZ	西藏牛	XZP	西藏高山牦牛	XZM
延边牛	YB	宜宾水牛	YBS	延黄牛	YH	盐津水牛	YJ
夷陵牛	YL	云岭牛	YLP	云南高峰牛	YN	玉树牦牛	YS
枣北牛	ZB	中甸牦牛	ZD	中国草原红牛	ZGC	中国荷斯坦牛	ZGH
中国西门塔尔牛	ZGX	樟木牛	ZM	舟山牛	ZS	昭通牛	ZT

参 考 文 献

- [1] GB 20557—2006 山羊冷冻精液
 - [2] GB 23238—2021 种猪常温精液
 - [3] 国家畜禽遗传资源品种名录
-