



中华人民共和国国家标准

GB/T 31581—2015

牛性控冷冻精液生产规程

Code of practice on production of bovine frozen sexed-semen

2015-05-15 发布

2015-10-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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这些专利的责任。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会(SAC/TC 274)归口。

本标准起草单位：农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(北京)、内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司、北京奶牛中心、中国农业大学、全国畜牧总站、农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(南京)。

本标准主要起草人：张晓霞、李喜和、周文忠、刘海良、孙飞舟、张胜利、陆汉希、杨清峰、武玉波、钱松晋、张海涛、刘玉、赵鹏、王建国、胡树香、张勇、胡志刚。

牛性控冷冻精液生产操作规程

1 范围

本标准规定了牛性控冷冻精液生产的器械清洗和消毒、稀释液配制、采精、精液处理、精子分离、冷冻、解冻、检验、包装、贮存及运输。

本标准适用于采用流式细胞分离技术生产牛性控冷冻精液。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 4143 牛冷冻精液

GB/T 5458 液氮生物容器

GB/T 31582 牛性控冷冻精液

NY/T 1234 牛冷冻精液生产操作规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

精子分离 sperm sorting

根据 X 精子和 Y 精子 DNA 含量的差异,利用流式细胞分离方法将 X 精子和 Y 精子分离开。

3.2

性控冷冻精液 frozen sexed-semen

分离后富含 X 精子或 Y 精子、经超低温冷冻后在液氮中长期保存的精液。

4 采精用品清洗和消毒

按照 NY/T 1234 的规定执行。

5 溶液配制与灭菌

5.1 溶液配制

5.1.1 稀释液

稀释液配制见附录 A 中 A.1。

5.1.2 分离机缓冲液 Tris-sheath

分离机缓冲液 Tris-sheath 的配制见 A.2。

5.1.3 荧光染色液和食品红染色液

荧光染色液和食品红染色液配制见 A.3。

5.1.4 精子染色液

精子染色液的配制见 A.4。

5.1.5 精子收集液

精子收集液配制见 A.5。

5.2 溶液灭菌

溶液在使用前进行高压蒸汽灭菌(120 kPa,15 min),对于不能高压灭菌的溶液使用 0.22 μm 过滤器进行过滤除菌。

6 主要仪器设备

流式细胞仪、精液分装机、细管印字机、程序冷冻仪、荧光显微镜、离心机、精子密度仪。

7 采精

按照 NY/T 1234 的规定执行。

8 精液处理

精液处理方法按照 NY/T 1234 的规定执行,精液分离前应添加抗生素并在 18 $^{\circ}\text{C}$ ~20 $^{\circ}\text{C}$ 的环境下保存,储存时间不超过 16 h。

9 精子分离

9.1 分离环境

精子分离实验室应保持洁净,室温控制在 18 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$,无振动源。

9.2 分离前处理

根据所采原精密度,按比例进行染色。

示例:对 4 亿个精子进行染色,用染色原液稀释到 2 亿个/mL,加入 15 μL ~30 μL Hoechst 33342 荧光染色液放入 5 mL 分离专用试管,混匀后放入 34 $^{\circ}\text{C}$ 水浴,加盖避光温育 45 min。再加入 2 mL 含 4% 卵黄的食品红染色液,最后制成精子分离样品。

9.3 分离

按照分离机操作规程分离。

10 分离精液冷冻

10.1 稀释平衡

分离后的精液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下平衡 90 min 后同温 $1\ 750g$ 离心 5 min, 去除上清液。然后用 20% 卵黄 Tris-A 液稀释收集后的分离精液, 使精子密度 $\geq 2\ 000$ 万个/mL。之后添加等量的含 12% 甘油的 Tris-B 液, 平衡 20 min。用 1 : 1 的 Tris-A 液、Tris-B 液将最终精子密度调整为 $\geq 1\ 000$ 万个/mL。

10.2 分装

平衡后的精液在 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下灌装、封口、印字, 在细管上打印生产单位代号、品种、牛号、生产日期或批号(见附录 B)、性控标记等信息。

10.3 冷冻、包装

在 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下将分装后的细管按照棉塞同一方向码放在冷冻架上, 然后移入冷冻仪中, 冷冻的初冻温度调节至 $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$, 控制降温过程, 在 20 min 到达 $-120\text{ }^{\circ}\text{C}$ 后投入液氮中。冷冻结束后进行包装, 包装应在 $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下进行。保存性控冷冻精液的液氮生物容器应符合 GB/T 5458 的规定。

11 入库前检查

性控冷冻精液产品的质量应由专职的质量检验员负责检测, 每批性控冷冻精液入库前应进行常规检验, 方法见 GB/T 31582。检验合格后方可入库。

12 贮存、运输

按照 NY/T 1234 的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)

牛性控冷冻精液生产相关溶液配制

A.1 溶液配制

试剂纯度应达到分析纯。



A.1.1 Tris-A 工作液

取 Trizma Base 35.32 g、柠檬酸 17.21 g、D-果糖 12.65 g 溶于 750 mL 双蒸水,搅拌 30 min,再加入双蒸水至 1 000 mL。溶液 pH 调到 6.8,然后用 0.22 μm 的过滤器过滤除菌,5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 14 d。

A.1.2 20%卵黄 Tris-A 液

取 Tris-A 工作液 199 mL,添加 51 mL 卵黄液,搅拌 15 min,5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 静置 12 h,去除沉淀,吸出表层卵脂后,在 18 500g 的条件下离心。然后用 0.22 μm 的过滤器过滤除菌,加入抗生素,5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7 d。

A.1.3 Tris-B 工作液

取 Trizma Base 35.746 g、柠檬酸 19.980 g、D-果糖 14.712 g 溶于 750 mL 双蒸水,搅拌 30 min,再加入双蒸水至 1 000 mL。溶液 pH 调到 6.8,然后用 0.22 μm 的过滤器过滤除菌,5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 14 d。

A.1.4 12%甘油 Tris-B 液

先用 Tris-B 工作液配制 23%(体积分数)卵黄液,搅拌 15 min 后置 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下 12 h 析出沉淀。静置后吸出表层卵脂,并在 18 500g 的条件下进一步离心沉淀。然后用 0.22 μm 的过滤器过滤除菌。再加入甘油使甘油终浓度达到 12%(体积分数)。溶液 pH 调到 6.8,加入抗生素,在 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7 d。

A.2 分离机缓冲液 Tris-sheath 配制

配制 20 L Tris-sheath 工作液:取 Trizma Base 477.6 g、柠檬酸 232.6 g、D-果糖 171.0 g 溶于 3.0 L 双蒸水中搅拌 30 min,并加盐酸把 pH 调到 6.8,然后添加抗生素用 0.22 μm 的过滤器过滤灭菌,再加双蒸水至 20.0 L 容量,调节 pH 至 6.8,渗透压 290 mOsm $\pm$ 10 mOsm。在 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 14 d。

A.3 荧光染色液和食品红染色液配制

A.3.1 0.5%荧光染色液

将 10 mg 荧光染料 Hoechst 33342 定容于 2 mL 双蒸水中,在 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存,有效期 90 d。

A.3.2 5%食品红染色液

将 0.5 g 食品红染料定溶于 10 mL 双蒸水中,0.22 μm 过滤除菌,在 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下避光保存。有效期为 90 d。

A.4 精子染色液配制

A.4.1 精子染色原液

100 mL 精子染色原液:依次称取 HEPES 0.925 g、氯化镁($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)0.008 g、氯化钠(NaCl)0.551 8 g、氯化钾(KCl)0.022 4 g、磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)0.004 g、碳酸氢钠(NaHCO_3)0.084 g、丙酮酸钠 0.022 g、葡萄糖 0.09 g、乳酸钠 0.361 mL、BSA 0.3 g,溶于 100 mL 双蒸水中,调整 pH 至 7.4,加入 0.25 mL 庆大霉素(10 mg/mL),0.22 μm 过滤灭菌后,在 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期为 7 d~10 d。

A.4.2 含 4%卵黄的食品红染色液

A.4.1 中 100 mL 精子染色原液,加入 0.261 mL 食品红染色液,形成食品红染色液。取 96 mL 食品红染色液添加 4 mL 卵黄,搅拌后在 5 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 12 h。去除卵黄颗粒沉淀,18 500g 离心 30 min,调整 pH 至 5.5,然后加入 0.25 mL 庆大霉素(10 mg/mL),经过 0.22 μm 过滤灭菌,在 5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,使用期限为 14 d。

A.5 精子收集液配制

取 20%卵黄 Tris-A 液 100 mL,加入 16 mL 双蒸水,充分摇匀。5 $^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 保存,有效期 7 d。

附录 B
(规范性附录)

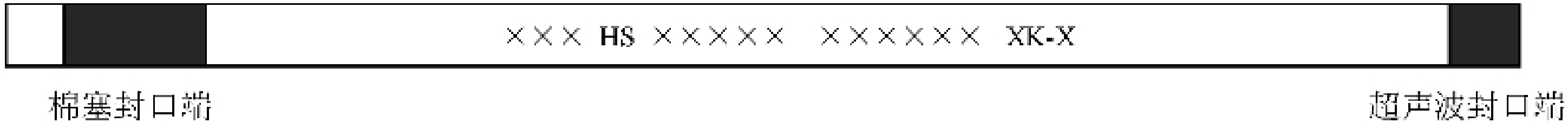
细管性控冷冻精液标记方法

细管性控冷冻精液标记由 20 个字符、5 个部分组成，每部分之间空开 2 个字符位置，排列顺序如下：

第一部分	第二部分	第三部分	第四部分	第五部分
生产单位代号	品种代号	公牛注册号	生产日期	性控标记
三个字符	二个字符	五个字符	六个字符	四个字符

第一部分公牛站代号以农业部公布的公牛站代号为准(参照 NY/T 1234 标准执行)；第二部分品种代号以 GB 4143 为依据；第三部分公牛号取该牛身份证号码的后五位数；第四部分冻精生产日期六位数按年、月、日次序排列，年、月、日各占二位数；第五部分性控标记：性控或 XK，X 为雌性，Y 为雄性。每部分之间间隔 2 个字符位置。标记的字迹应清晰易认。

示例：



×××为生产单位代号，HS 为荷斯坦公牛的品种代号，×××××为该公牛身份证号码的后五位数，××××××为 20××年××月××日的生产日期，XK-X 代表性控 X 精子。