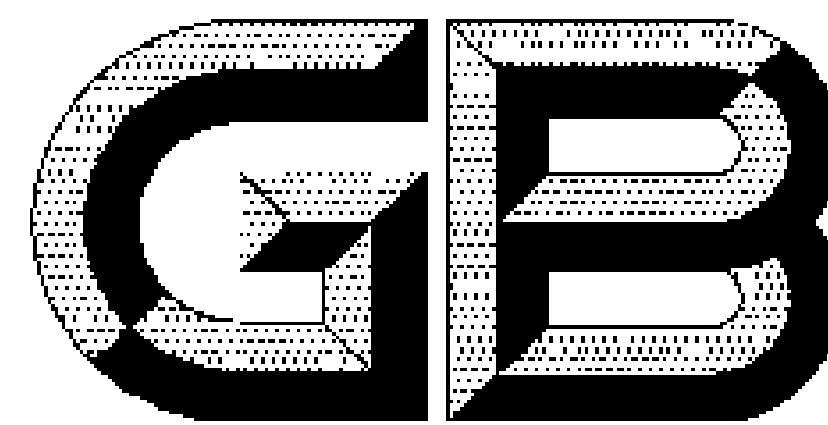




中华人民共和国国家标准

GB 20557—2006

山羊冷冻精液

Frozen semen of goat

2006-09-04 发布

2006-12-01 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

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 要求 1

4.1 种公羊 1

4.2 新鲜精液 2

4.3 冻精外观 2

4.4 冻精解冻后的要求 2

5 抽样 2

5.1 抽样检验方案 2

5.2 抽取样本 2

6 试验方法 2

6.1 外观 2

6.2 解冻后冻精 2

6.3 检验分类 2

6.4 检验项目 3

7 判定规则 3

7.1 常规检验 3

7.2 型式检验 3

7.3 抽样检验对群体质量水平的判定 3

8 标志、包装、运输、贮存 3

8.1 标志 3

8.2 包装 3

8.3 运输 3

8.4 贮存 3

附录 A（规范性附录） 山羊冷冻精液质量检验方法 4

A.1 导言 4

A.2 冻精解冻 4

A.2.1 器材、溶液 4

A.2.2 方法 4

A.3 精子活力检查 4

A.3.1 器材、溶液 4

A.3.2 方法 4

A.3.3 计算 4

A.4 前进运动精子数的检查 4

A.4.1 器材、溶液 4

A.4.2 方法 5

A.4.3 计算 5

A.5 精子畸形率的检查 5

A. 5.1	器材、溶液	5
A. 5.2	方法	5
A. 6	细菌数的检查	6
A. 6.1	器材、溶液	6
A. 6.2	培养基	6
A. 6.3	操作步骤	6
A. 6.4	菌落计数方法	7
A. 6.5	平板菌落数的计算	7
附录 B (规范性附录)	山羊冷冻精液质量监督抽样检验程序	8
B. 1	导言	8
B. 2	质量监督抽样检验程序	8
B. 2.1	监督总体	8
B. 2.2	确定质量特性	8
B. 2.3	监督质量水平	8
B. 2.4	监督检验等级	8
B. 2.5	检索监督抽样方案	8
B. 2.6	抽取样本	8
B. 2.7	检验样本	8
B. 2.8	判断监督总体是否通过	8
B. 2.9	应用实例	8
附录 C (资料性附录)	山羊冷冻精液制作程序和使用	9
C. 1	采精	9
C. 2	稀释液配制	9
C. 2.1	所有器具应洁净并消毒灭菌	9
C. 2.2	化学试剂	9
C. 2.3	稀释液	9
C. 3	精液稀释与分装	9
C. 3.1	一次稀释法	9
C. 3.2	二次稀释法	9
C. 3.3	细管精液的分装	9
C. 4	降温、平衡	9
C. 4.1	降温	9
C. 4.2	平衡	10
C. 5	精液冷冻	10
C. 5.1	冷冻用具	10
C. 5.2	细管冻精	10
C. 5.3	颗粒冻精	10
C. 5.4	液氮	10
C. 6	精液解冻	10
C. 7	输精	10
C. 7.1	开腔器输精法	10
C. 7.2	注意事项	10

前 言

本标准的第 4 章是强制性的,其余是推荐性的。

本标准的附录 A、附录 B 是规范性附录,附录 C 是资料性附录。

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(南京)、农业部全国畜牧兽医总站。

本标准主要起草人:金穗华、陆汉希、王志刚、黄文佳、赵文魁。

本标准委托农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(南京)负责解释。



山羊冷冻精液

1 范围

本标准规定了山羊冷冻精液的命名、种公羊和新鲜精液与冷冻精液技术要求、抽样、试验方法、判定规则和标志、包装、运输、贮存。

本标准适用于山羊冷冻精液(以下简称“冻精”)。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版,均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 2828.1—2003 计数抽样检验程序 第1部分:按接受质量限(AQL)检索的逐批检验抽样计划(ISO 2859-1:1999, IDT)

GB/T 4789.2—2003 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 5458 液氮生物容器

GB/T 15239—1994 孤立批计数抽样检验程序及抽样表

GB/T 15482—1995 产品质量监督小总体计数一次抽样检验程序及抽样表

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

前进运动精子数 progressive motility

每剂量精液中呈前进运动精子数。

3.2

精子活力 sperm motility

在37℃环境下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

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℃)长期保存。

4 要求

4.1 种公羊

应具有种用价值,体质健康,无遗传病,不允许有已发布的动物防疫法中所明确的两类疫病中的任何一种疾病。

4.2 新鲜精液

色泽乳白色或淡黄色。精子活力 $\geq 65\%$,精子密度 $\geq 6 \times 10^8$ 个/mL,精子畸形率 $\leq 15\%$ 。

4.3 冻精外观

4.3.1 细管

细管无裂痕,两端封口严密,印制的标志清晰。

4.3.2 颗粒

颗粒大小均匀,表面光滑。

4.4 冻精解冻后的要求

4.4.1 活力

活力 $\geq 30\%$ 。

4.4.2 前进运动精子数

前进运动精子数 $\geq 3 \times 10^7$ 个。

4.4.3 精子畸形率

精子畸形率 $\leq 20\%$ 。

4.4.4 细菌数

细菌数 ≤ 800 个。

5 抽样

5.1 抽样检验方案

5.1.1 生产方抽样检验

生产方和使用方为质量保证概率把关,按照 GB/T 15239—1994 中的第 5 章,采用 $LQ=8$,模式 A 抽样方案检索一次抽样方案确定抽检公羊(冻精)的样本量。

5.1.2 质量监督抽样检验

质量监督抽样检验按照 GB/T 15482—1995 中的第 5 章,该群体公羊(冻精)为一监督总体,采用 $D_0=10$,用第二检验等级抽样方案确定抽检公羊(冻精)的样本量,其抽样检验程序见附录 B。

5.1.3 复检和仲裁检验

复检根据原抽样方案确定,仲裁需抽样按照 5.1.2 规定方案和 7.3.2 的判定规则。

5.2 抽取样本

抽取样本见附录 B.2.6。

6 试验方法

6.1 外观

用目测法,其结果应符合 4.3 的规定。

6.2 解冻后冻精

解冻方法及精子活力、前进运动精子数、精子畸形率、细菌数的检验按附录 A 规定的方法,其结果应分别符合 4.4 中的规定。

6.3 检验分类

6.3.1 常规检验

冻精产品的单项检验,是型式检验中的一部分,主要是在每生产批入库前和销售出站前的检验。

6.3.2 型式检验

冻精产品全项目检验,是评定产品质量是否符合标准,在生产方抽样检验、质量监督抽样检验和复检、仲裁检验时所选定的检验。

6.4 检验项目

检验项目和检验周期见表 1。

表 1 检验项目、周期

检验类型	检验项目	要求中章、条	试验方法中章、条	检验周期
常规检验	外观、解冻后活力	4.3、4.4.1	6.1、6.2	每生产批入库、出站。
型式检验	外观、解冻后活力、呈前进运动精子数、畸形率、细菌数	4.3 4.4.1~4.4.4	6.2	生产方为质量保证每两个月为一抽检周期,在周期内进行一次抽检该群公羊(冻精)质量水平。 质量监督检验可为不定期。

7 判定规则

7.1 常规检验

样品所检验项目中任何一项不合格,则判为不合格。

7.2 型式检验

样品所检验项目中任何一项不合格,则判为不合格。

7.3 抽样检验对群体质量水平的判定

7.3.1 生产抽样检验的判定

引用 GB/T 2828.1—2003 第 3 章中 Ac——接受数,Re——拒收数, d ——不合格品数。

通过对抽取样本检验按 GB/T 15239—1994 中 5.11 的规定,当 $d \leq Ac$,则判可接收,当 $d \geq Re$ 则判不可接收。

7.3.2 质量监督抽样的判定

通过对抽取样本检验按 GB/T 15482—1995 中 5.9 的规定,当 $d < r$ (不通过判定数),则判为可通过,当 $d \geq r$,则判为不可通过,见附录 B.2.8。

8 标志、包装、运输、贮存

8.1 标志

8.1.1 品种

种公羊的品种可用代号。代号为该品种第一、第二个汉字的汉语拼音大写字母。

示例:波尔羊的品种代号“BE”。

8.1.2 内容

细管冻精应在管壁(或包装袋)上印制以下内容并且印制标志要清楚。

- a) 生产站名;
- b) 公羊品种;
- c) 公羊号;
- d) 生产日期。

8.2 包装

细管冻精用专用的塑料管 25 支包装,颗粒冻精用灭菌纱布袋,每一包装量颗粒不得超过 100 粒。

8.3 运输

冻精运输过程中应有专人负责,贮存容器不得横倒及碰撞和强烈振动,保证冻精始终浸在液氮中。

8.4 贮存

贮存冻精的低温容器应符合 GB/T 5458 规定;专人负责及时补充液氮,冻精应浸在液氮中;每只公羊的冻精单独贮存;贮存冻精的容器每年清洗、消毒应不少于一次并更换新鲜液氮;取放冻精时,冻精离开液氮的时间不得超过 10 s。



附 录 A
(规范性附录)
山羊冷冻精液质量检验方法

A.1 导言

本附录规定了通用的山羊冷冻精液质量检验方法,其中引用了 GB/T 4789.2。

A.2 冻精解冻

A.2.1 器材、溶液

恒温水浴箱、5.0 mL 试管、1.0 mL 吸管、镊子、2.9%柠檬酸钠溶液。

A.2.2 方法

A.2.2.1 细管

直接置于 37℃水浴中解冻。

A.2.2.2 颗粒

冻精置预先预热至 38℃的内有 1.0 mL 2.9%柠檬酸钠溶液的试管中,水浴解冻,适当摇动,使冻精溶化。

A.3 精子活力检查

A.3.1 器材、溶液

显微镜或显微电视装置、载玻片或精液性状板、盖玻片(18 mm×18 mm)、显微镜保温箱或恒温装置、细管剪、50 μL 移液器。

A.3.2 方法

用 50 μL 移液器取解冻后精液 50 μL(微升)置于载玻片上,加盖玻片后立即在 200~400 倍显微镜下观察活力,环境温度或载物台温度保持 38℃;也可通过显微电视装置在荧光屏上观察活力。每样品观察 3 个视野,注意不同液层内的精子运动状态,进行全面评定。

A.3.3 计算

精子活力按式(A.1)计算:

$$M = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{3} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

- M——精子活力;
- n_1 ——第一视野活力;
- n_2 ——第二视野活力;
- n_3 ——第三视野活力。

A.4 前进运动精子数的检查

A.4.1 器材、溶液

血球计数板、血色素管、2 mL 吸管、小试管、计数器、显微镜或显微电视装置、滴管、3.0%氯化钠溶液。

A.4.2 方法

A.4.2.1 稀释精液制备

A.4.2.1.1 颗粒

用血色素管准确吸取 10 μL 解冻精液,注入盛有 1.99 mL 的 3.0%氯化钠溶液的试管内,混匀,使之成为 200 倍稀释的稀释精液。

A.4.2.1.2 细管

用血色素管准确吸取 10 μL 干解冻精液,注入盛有 0.99 mL 的 3.0%氯化钠溶液的试管内,混匀,使之成为 100 倍稀释的稀释精液。

A.4.2.2 计数

将血球计数板用血盖片将计数室盖好,用小吸管吸取一滴稀释精液于血盖片边缘,使精液自行流入计数室,均匀充满不能有气泡或厚度过大,然后在显微镜下或电视荧光屏上观察计数。每样品观察上下两个计数室,取平均值,如两个计数室计数结果误差超过 5%,则应重检。

A.4.3 计算

- a) 每剂量中精子数=5 个中方格中的精子数×5(即计数室 25 个中方格的总精子数)×10(1 mm³ 内的精子数)×1 000(每毫升精液的精子数)×200(颗粒稀释倍数)或 100(细管稀释倍数)×剂量值。

上式可简化为:

每剂量中精子数=5 个中方格精子数×1 000 万(颗粒)或 500 万(细管)×剂量值

- b) 每剂量中呈前进运动精子数按式(A.2)计算:

$$c = s \times M \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

- c——每剂量中前进运动精子数,单位为个;
s——每剂量中精子数,单位为个;
M——活力,%。

A.5 精子畸形率的检查

A.5.1 器材、溶液

显微镜、载玻片、血球分类计数器、小吸管、蒸馏水、姬姆萨染料、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醛、甲醇、甘油。所用试剂为分析纯。

A.5.2 方法

A.5.2.1 溶液配制

A.5.2.1.1 磷酸盐缓冲液

磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	0.55 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.25 g
双蒸馏水定容至 100 mL	

A.5.2.1.2 中性福尔马林固定液

40%甲醛 HCHO(使用前每 100 mL 甲醛用 10.0 g 碳酸镁饱和后过滤)	8.0 mL
磷酸二氢钠(NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O)	0.55 g
磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O)	2.25 g

用 0.89%氯化钠约 50.0 mL 溶解后加入 8.0 mL 中和后的甲醛,再加 0.89%氯化钠溶液定容至 100.0 mL。

A.5.2.1.3 姬姆萨原液

姬姆萨染料	1.0 g
-------	-------

甘油 [C ₃ H ₅ (OH) ₃]	66.0 mL
甲醇(CH ₃ OH)	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.5.2.1.4 姬姆萨染液

姬姆萨原液	2.0 mL
磷酸盐缓冲液	3.0 mL
蒸馏水	5.0 mL
现配现用。	

A.5.2.2 制片染色

A.5.2.2.1 抹片

取解冻后精液一滴滴于载玻片一端,用另一边缘光滑的载玻片与有样品的载玻片呈 35°夹角,将样品均匀地拖布于载玻片上,自然风干(约 5 min)。

A.5.2.2.2 固定

在已风干的抹片上滴上 1.0 mL~2.0 mL 中性福尔马林固定液,固定 15 min 后用清水缓缓冲去固定液,吹干或自然风干。每样品制作两个抹片。

A.5.2.2.3 染色

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,染色 1.5 h 后用清水缓缓冲去染液,晾干待检。

A.5.2.3 镜检

将制备好的抹片在显微镜(1 000 倍油镜)下观察。每个抹片观察 200 个以上的精子(分左、右两个区),取两片的平均值,两片的变异系数不得大于 20%,若超过应重新制片。

A.5.2.4 计算

精子畸形率按式(A.3)计算:

$$A = \frac{A_1}{s} \times 100$$

.....(A.3)

式中:

A——精子畸形率,%;

A₁——畸形精子数,单位为个;

s——精子总数,单位为个。

A.6 细菌数的检查

A.6.1 器材、溶液

培养箱、超净化工作台、三角烧瓶、烧杯、量筒、玻棒、天平、羊角匙、高压蒸汽灭菌锅(或微波炉)、培养皿、水浴箱、pH 试纸(pH5.5~9.0)、棉花、牛皮纸、记号笔、麻绳、纱布、放大镜、蒸馏水、营养琼脂培养基。

A.6.2 培养基

营养琼脂培养基:按 GB/T 4789.2—2003 中 5.1 规定。

A.6.3 操作步骤

A.6.3.1 样品的制备及培养

A.6.3.1.1 颗粒

以无菌操作,将所检样品一粒直接放于灭菌平皿内,自然解冻后待用。同一样品制两个平皿。

A.6.3.1.2 细管

以无菌操作,用酒精棉球擦抹解冻后的细管外壁,剪掉超声波封口端,一支精液直接注入一个灭菌平皿内。同一样品制两个平皿。

A.6.3.1.3 平皿

样品移入平皿后,应及时将凉至 46℃ 营养琼脂培养基(可放置于 46℃ ± 1℃ 水浴保温)注入平皿约 15 mL,并转动平皿与精液样品混合均匀,同时将营养琼脂培养基倾入另一灭菌平皿内作空白对照。

A.6.3.1.4 培养

待琼脂培养基凝固后,翻转平皿,置 36℃ ± 1℃ 恒温箱内培养 48 h ± 2 h。

A.6.4 菌落计数方法

做平板菌落计数时,可用肉眼观察,必要时用放大镜检查,以防遗漏。在记下各平板菌落数后,求出同一样品两个平板的平均菌落数。

A.6.5 平板菌落数的计算

所检样品的细菌菌落数按式(A.4)计算:

$$B = \frac{n_1 + n_2}{2} \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

B ——细菌数,单位为个;

n_1 ——第一平皿菌落数,单位为个;

n_2 ——第二平皿菌落数,单位为个。



附录 B

(规范性附录)

山羊冷冻精液质量监督抽样检验程序

B.1 引言

本附录给出了通用的山羊冷冻精液质量监督抽样检验程序,对这样的特定对象产品,通过质量监督抽样检验对在群山羊(冻精)产品质量水平评价。

B.2 质量监督抽样检验程序

B.2.1 监督总体

已投产的一群山羊(冻精);每只山羊一生产批的冻精为每一单位产品。

B.2.2 确定质量特性

每只山羊(冻精)质量要求应符合本标准中 4.3~4.4 的规定。

B.2.3 监督质量水平

规定监督质量水平 $D_0=10$ 。

B.2.4 监督检验等级

给出第二检验等级。

B.2.5 检索监督抽样方案

在 GB/T 15482—1995 表 2 中,由监督总体量所在的列和规定的监督质量水平所在的行的相交处,读出监督抽样方案。若相交处是箭头,则沿着箭头方向,读出箭头所指的第一个抽样方案。监督总体量介于两数值之间时,应使用其中数值较大者确定的方案。

B.2.6 抽取样本

样本应在监督总体(一群投产山羊)中随机抽取,按照检索监督抽样方案已知抽检山羊的样本(只)数,并在群体中山羊按号顺序排列,随机确定样品山羊,并分别在各样品山羊冻精贮存罐中取出一生产批中冻精。

B.2.7 检验样本

按照规定的检验项目,对样本中每只山羊冻精样品检验,并统计所检样本中的不合格品数。

B.2.8 判断监督总体是否通过

根据监督质量水平和监督检验等级确定监督抽样方案,按 GB/T 15482—1995 中 5.9 的规定检验结果在样本中不合格品数 $d \geq r$,则判该群山羊(冻精)为不通过;样本中不合格品数 $d < r$,则判该群山羊(冻精)通过。

B.2.9 应用实例

质量监督抽查需要评价某种羊场一群投产(生产冻精)的 50 只山羊冻精质量,监督质量水平 $D_0=10$,用第二监督检验等级,由 GB/T 15482—1995 表 2 查得监督抽样方案为 $n=2, r=2$,该群种山羊中应抽检样本是 2 只山羊(冻精),按样本数在群体中随机确定 2 只样品山羊并在其冻精贮存罐中取出一生产批中冻精,按规定的项目检验,若样本中不合格品数 d 不小于不通过判定数 r ,即 $d \geq r$,则判该群山羊(冻精)不通过;如果样本中不合格品数 d 小于不通过判定数 r ,即 $d < r$,则判该群山羊(冻精)通过。

附录 C

(资料性附录)

山羊冷冻精液制作程序和使用

C.1 采精

采精前洗净公羊下腹部,并用灭菌生理盐水冲洗包皮内腔,进入采精场地对公羊给予充分的性准备时间并空爬 1 次~2 次,采精频率每星期 4 次~5 次,成年公羊每次可连采两回,但间隔时间要在 0.5 h 以上。

C.2 稀释液配制

C.2.1 所有器具应洁净并消毒灭菌

C.2.2 化学试剂

所用化学试剂(化学纯以上):柠檬酸三钠、果糖、蔗糖、乳糖、甘油,鸡蛋用健康鸡场的新鲜鸡蛋,双蒸水。

C.2.3 稀释液

C.2.3.1 绵羊用稀释液

细管 一液:柠檬酸钠 3.0 g、葡萄糖 3.0 g 加蒸馏水至 100.0 mL,卵黄 25.0 mL。

二液:取一液 88.0 mL,甘油 12.0 mL。

颗粒 11%乳糖液 75.0 mL,卵黄 20.0 mL,甘油 5.0 mL。

C.2.3.2 山羊用稀释液

基础液:柠檬酸钠 1.5 g、葡萄糖 3.0 g、乳糖 5.0 g 加蒸馏水至 100.0 mL,消毒待用。

取消毒后的基础液 75.0 mL,卵黄 20.0 mL,甘油 5.0 mL。

所有稀释液每 100.0 mL 中添加青霉素、链霉素各 10 万单位,现配现用。

C.3 精液稀释与分装

C.3.1 一次稀释法

将需加的稀释液一次加完。

C.3.2 二次稀释法

将所加稀释液分为两次添加,首先加入不含甘油的一液,加至稀释总量的一半,降温、平衡后再加足含有甘油的二液。

添加与精液等温的稀释液时应缓缓加入。

C.3.3 细管精液的分装

C.3.3.1 细管为无毒、耐低温的专用塑料管。

C.3.3.2 平衡前在室温下或平衡后在 3℃~5℃ 环境下均可分装,管内需留一定的空隙。

C.3.3.3 分装后两端封口应严密。

C.3.3.4 微型分装管的精液量 ≥ 0.18 mL,中型管 ≥ 0.40 mL。

C.4 降温、平衡

C.4.1 降温

精液稀释后经 1 h 左右逐步降温至 3℃~5℃。

C.4.2 平衡

时间为 3 h ~4 h。

C.5 精液冷冻

C.5.1 冷冻用具

需洁净后消毒。

C.5.2 细管冻精

用铜网或细管架熏蒸。

C.5.3 颗粒冻精

用铜网或氟板滴冻,剂量 0.1 mL±0.01 mL。

C.5.4 液氮

作为冷源,热平衡温度为-80℃~-110℃,细管熏蒸 8 min、颗粒熏蒸 2 min 后浸入液氮。

C.6 精液解冻

解冻液及解冻方法参照 A.1 规定进行。

C.7 输精

C.7.1 开腔器输精法

要求慢插、适深、轻注、缓出。

C.7.2 注意事项

应注意输精过程中的卫生要求。