

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 1234—2018
代替 NY/T 1234—2006

牛冷冻精液生产操作规程

Technical code of practice for bovine frozen semen production

2018-12-19 发布

2019-06-01 实施



中华人民共和国农业农村部 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 NY/T 1234—2006《牛冷冻精液生产技术规程》。与 NY/T 1234—2006 相比,除编辑性修改外主要技术变化如下:

- 修改了标准英文名称;
- 调整了部分术语和定义;
- 修改了器械设备准备,增加了对仪器设备的要求;
- 修改了稀释液配制,增加了稀释液配方、抗生素使用方法等内容;
- 修改了采精,进一步优化了采精方法;
- 修改了精液处理,采用了称重法测量精液、精液添加抗生素等方法;
- 修改了精液冷冻,删除了运用大口径液氮罐和自制的冷冻箱冷冻精液的方法;
- 删除了原标准“11 冻精包装”“12 冻精储存”“13 冻精运输”。按照 GB/T 30396《牛冷冻精液包装、标签、储存和运输》的规定执行。
- 修改了附录 A,新标准附录 A 是器具清洗和消毒;
- 修改了附录 B,增加了稀释液配方二和配方三,新标准附录 B 是稀释液配制;
- 修改了附录 C,新标准附录 C 是牛冷冻精液生产抗生素添加指南;
- 新标准附录 D 是原标准附录 A 的内容,增加了细管上所印标识的字体、字号、粗细、位置等规定;
- 新标准附录 E 是原标准附录 B 的内容,修改了公牛站代号,添加了新增的种公牛站;
- 增加了附录 F,精液生产记录表。

本标准由农业农村部畜牧兽医局提出

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:南京农业大学、全国畜牧总站、农业农村部种质资源检测中心、农业农村部科技发展中心、农业农村部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(北京)。

本标准主要起草人:陆汉希、孙飞舟、王根林、刘丑生、李姣、刘鹏程、黄文佳、李慧、王振云、张晓霞。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:

- NY/T 1234—2006。

牛冷冻精液生产技术规程

1 范围

本标准规定了牛冷冻精液生产的基本要求、稀释液配制、采精、精液处理、精液冷冻、冻精活力检查、冻精包装、标签、储存及记录。

本标准适用于牛冷冻精液生产。

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 30396 牛冷冻精液包装、标签、储存和运输

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

采精器 semen collection instrument

模拟母牛阴道环境条件的采精工具。由外壳、内胎、漏斗、集精管等组成。

3.2

采精 semen collection

用人工模拟且有自然交配感的工具,以获得公牛精液的方法。

3.3

采精量 volume per ejaculate

公牛一次采精时排出的精液量。

3.4

精子密度 sperm concentration

每单位体积精液中的精子数目。单位为亿个/mL。

3.5

细管 straw

用于分装精液的聚乙烯复合材料的塑料管。

3.6

细管冷冻精液 straw frozen semen

细管装入精液经液氮冷冻所形成的产品,简称“细管精液”或“冻精”。

4 基本要求

4.1 仪器设备

4.1.1 仪器设备的配置应满足牛冷冻精液生产的要求。

4.1.2 仪器设备运行正常,定期进行维护保养。

4.1.3 计量器械(如温度计、天平、量筒、移液器)、恒温箱、水浴箱、显微镜恒温载物台的压力容器等应

按照规定时间进行检定或校准。

4.1.4 仪器设备由操作人员按照相关使用说明书进行操作。

4.2 器具清洗和消毒

所用器具应保持使用前后的清洁卫生,不同材质的器具应采用不同的清洗和消毒方法见附录 A。

5 稀释液配制

5.1 要求

所有化学试剂为化学纯以上;使用来源于非疫区无疫病鸡场的新鲜鸡蛋;稀释液溶剂为双重蒸馏水或超纯水。稀释液配方参见附录 B。

5.2 卵黄的取用

鸡蛋使用前先用温水洗净,再用 75%酒精棉球对蛋壳表面进行消毒,待酒精挥发尽后用蛋清分离器取出完整的卵黄后用灭菌的注射器穿过卵黄膜抽取卵黄;也可在鸡蛋腰正中线处敲开一裂纹,将鸡蛋一分两半,2 个蛋壳交替倾倒,除去蛋清,然后将卵黄倒在灭菌纸(卫生纸、滤纸)上滚动,除去卵黄膜上残留的蛋清后将卵黄挤入洁净的烧杯中待用。

5.3 方法

准确称量化学试剂,加超纯水定容、溶解、灭菌,取一定量的溶液加入卵黄和抗生素搅拌均匀后待用,盛装稀释液的容器应做明显标记。以配制配方二第一液(参见附录 B)为例。

示例:

准确称取柠檬酸钠 2.9 g,倒入 100 mL 的量筒内,加超纯水 50 mL 左右,用玻棒搅拌,溶解后定容至 100 mL,混匀后过滤于三角烧瓶或盐水瓶中,扎好(塞紧)瓶口,置 62℃~65℃水浴锅中 30 min 以上。取冷却后的 2.9%柠檬酸钠 80 mL、卵黄 20 mL、适量的抗生素,加入三角烧瓶中,用磁力搅拌器搅拌均匀后即可使用,或放入 3℃~5℃的冰箱内待用,但放置时间不得超过 24 h。

注:使用商品化的专用稀释液,按使用说明添加卵黄、超纯水或双重蒸馏水配成稀释液。

6 采精

6.1 采精场所应保持安静,地面防滑并保持清洁卫生,有护栏等安全保护设施。

6.2 台牛应选择健壮、性情温顺、无疫病的母牛或公牛,体表、外阴、臀部应确保清洁卫生,并保定于牢固的采精架内。

6.3 种公牛体表应清洁卫生,刷创外阴,阴毛过长时应适度修剪。包皮确需冲洗的,冲洗干净 30 min 后才可进行采精操作。

6.4 将采精用具有规则地摆放在操作台上,采精器润滑剂(凡士林与液体石蜡 1:1),每次用前用水浴煮沸消毒后置于 62℃~65℃水浴锅内待用。

注:可使用商品化的专用润滑剂。

6.5 采精器用 75%的酒精棉球擦拭消毒,无消毒剂残留后注入 38℃左右温水约 500 mL,并用消毒纱布将采精器口包裹好,放置于 44℃~46℃的恒温箱内。采精前将采精器从恒温箱中取出,集精管可套一个装有 35℃温水的平底塑料瓶,套上保护套,从活塞孔打气使采精器口呈三角形状,内胎的前 2/3 均匀涂擦适量润滑剂。青年公牛用光面内胎的采精器,成年公牛可用纹状面内胎的采精器。采精时,采精器内温度控制在 38℃~40℃之间,根据季节和不同的牛,温度可做适当调整,最高不得超过 43℃。

6.6 公牛靠近台牛时,应采取控制措施,不让公牛立即爬跨,使其充分排泄副性腺后进行 2 次~3 次空爬,等待 3 min~5 min 后采精,空爬时不使阴茎触及台牛。性欲不强的公牛采取观摩、引诱、被爬跨和更换台牛、地点等措施。

6.7 采精员手持采精器站在公牛侧后方,当公牛阴茎伸出爬跨时,迅速向前托着公牛包皮,采精器口斜

向下方,双手配合将阴茎引入采精器口内,公牛往前一冲完成采精动作。采精器紧随公牛阴茎移动,当阴茎缩回后立即将采精器口斜向上方,打开活塞,取下集精管,迅速从传递窗口送至精液处理室。安装好的采精器只能使用一次,不得重复使用。

6.8 公牛每周一般采精 2 次,视年龄、身体状况增减次数,每次可连续采精 2 回(间隔时间 30 min 以上),采精充分(集精管内泡沫丰富,精液量大且稠密)的公牛不宜连续采精 2 回。

6.9 采精结束后应及时清扫冲洗干净场地。

7 精液处理

7.1 准备

凡是接触精液的器皿均应放在 32℃~37℃ 恒温箱中,稀释液放在 32℃~35℃ 恒温水浴箱中备用。盛装稀释精液的稀释瓶应做明显标记。

7.2 外观检查

主要观察精液的色泽、气味及是否有脓性分泌物或血液等异物。正常情况下,精液为乳白色或微黄,略有腥味。

7.3 采精量测定

7.3.1 称重

将盛有精液的集精管置于天平上称重(精确到 0.1 g),集精管重量(精确到 0.1 g)应预先称取。精液量按式(1)计算。

$$L = (M - P) / 1.04 \quad (1)$$

式中:

L ——精液量,单位为毫升(mL);

M ——装有精液的集精管重量,单位为克(g);

P ——集精管重量,单位为克(g)。

7.3.2 目测

直接读取集精管上刻度(精确到 0.1 mL),但集精管需经计量部门校准合格的才可使用。

7.4 精子密度测定

使用精子密度测定仪器进行测定。

7.5 精子活力评定

取精液和稀释精液 5 μ L~10 μ L 于载玻片上,加盖盖玻片或血盖片后在 37℃ 恒温装置的相差显微镜上评定活力,用百分率或相应数值表示,例如 80% 或 0.8。

7.6 精液评价及处理

外观正常、密度大于等于 6×10^8 个/mL、活力大于等于 65%、畸形率小于等于 15% 的精液进行后续处理,可加入一定量的复合抗生素(进行性控冷冻精液生产的必须添加),参见附录 C。

7.7 稀释、灌装、平衡、标识

7.7.1 稀释液量确定

根据精液的密度、活力、采精量等确定应加稀释液量。

7.7.2 一种稀释液法

取一个已盛有 30 mL 稀释液经 34℃ 水浴预先加温的稀释瓶,对精液进行稀释并混匀,在 34℃ 水浴中暂存 10 min 后加稀释液至最终稀释量。再按如下方法之一操作:

- a) 先灌装后平衡。放置 10 min 后,即可在 20℃ 以下常温实验室操作台上进行精液的灌装、封口和标识。灌装后的细管放入不透明的塑料盒内,每盒以盛放 300 支为宜。把塑料盒放入 3℃~5℃ 低温柜中平衡 3 h~4 h,评定活力。

- b) 先平衡后灌装。加完稀释液后,用水杯盛适量的 34℃ 水,把稀释瓶放入后送 3℃~5℃ 低温柜内降温平衡。2 h 后水杯中加冰块,促使其快速降温至 3℃~5℃ (细管亦应降至 3℃~5℃),评定活力。在低温柜中进行细管灌装、封口和标识。

7.7.3 两种稀释液法

把精液倒入 34℃ 预先加温的稀释瓶中,用 5 mL 34℃ 的第一液加入集精管,摇晃数下;然后倒入稀释瓶中,剩余的第一液缓慢地加入稀释瓶中,摇匀,评定活力。第一液量的计算见式(2)。用水杯盛适量的 34℃ 水,把稀释瓶放入后送 3℃~5℃ 低温柜内降温平衡。与此同时,把第二液一并放入低温柜。2 h 后水杯中加冰块,促使其快速降温至 3℃~5℃ 时加入第二液,第二液量的计算见式(3)。加入第二液摇匀后再平衡 0.5 h 以上,评定活力。在低温柜中进行细管灌装、封口和标识。

$$Y = [(Q + J) / 2] - J \dots\dots\dots (2)$$

式中:

Y——第一液量,单位为毫升(mL);

Q——应加稀释液量,单位为毫升(mL);

J——精液量,单位为毫升(mL)。

$$R = Q - Y \dots\dots\dots (3)$$

式中:

R——第二液量,单位为毫升(mL)。

7.7.4 细管标识

细管上所印字迹应清晰易认,信息齐全。标识见附录 D,全国种公牛站统一编码见附录 E。

8 精液冷冻

8.1 上架

灌装、封口、标识后的细管上架码放时,应注意细管摆放的方向,棉塞封口端靠近操作者,超声波封口端远离操作者。放入程控冷冻仪时亦应如此放置。用区分棒做好不同牛号细管间的识别工作。

8.2 冷冻

采用程控冷冻仪冷冻精液,程控冷冻仪与低温平衡柜应尽量靠近,设置好最佳冷冻程序,严格按照程控冷冻仪的操作程序进行冷冻。

8.3 收集

冷冻完成后,打开程控冷冻仪盖子,冻精按牛号投入盛满液氮的不同提筒或专用的塑料杯中,细管的超声波封口端在上并迅速浸泡在液氮中。

9 冻精活力检查

冷冻后的精液可在任一时间进行解冻。解冻时,一头牛取 2 支冻精迅速浸泡入 37℃ 水中并晃动。待细管内冻精溶解后取出,擦干水珠,剪去细管的超声波封口端,用专用推针把精液挤入一小试管内。取解冻精液进行活力检查,操作方法见 7.5。检查合格的冻精作为初检合格品妥善储存。

10 冻精包装、标签、储存

可按照 GB/T 30396 的规定执行。

11 记录

做好冷冻精液生产相应记录,参见附录 F。

附 录 A
(规范性附录)
器具清洗和消毒

A.1 玻璃器皿

A.1.1 首次使用的玻璃器皿用自来水冲洗后放入 5%稀盐酸中浸泡 12 h,取出后立即用自来水冲洗;再用手工或超声波清洗器在加有洗涤剂的温热水中进行刷拭;然后,用自来水冲洗干净;最后,用蒸馏水冲洗,直至器皿光亮、无水滴附着为止。洗净的玻璃器皿用锡箔纸封口后送入消毒灭菌设备(如电热干燥箱、消毒柜、红外线灭菌柜等)内,按操作说明书进行干燥、消毒、灭菌后待用。

A.1.2 使用过的玻璃器皿用自来水冲洗;遇有污物或油垢不易清洗的器皿,放入重铬酸钾洗液中浸泡数小时,取出后立即用自来水冲洗,后续步骤同 A.1.1。

A.2 采精器

首次使用或使用后的采精器,用水冲去表面污物后在加有洗涤剂的温热水中用长毛刷刷洗,然后用水冲洗干净,再用蒸馏水逐个冲洗。将洗净的采精器堆放在架子上,其上覆盖两层清洁纱布,晾干后用长柄镊子夹 75%酒精棉球由内向外旋转彻底消毒内胎和三角漏斗,待酒精挥发后备用。如发现内胎漏气、漏水或皱折,应及时更换或整理。

A.3 载玻片、血盖片

载玻片、血盖片使用后立即浸泡于水中,洗净后用柔软的布擦拭干净备用。

A.4 纱布

清洗干净经高压灭菌后待用。

A.5 其他器具

金属镊子、止血钳、药匙、胶塞和吸管胶头等用 75%酒精擦拭消毒,待酒精挥发尽后方能使用。细管、冷冻架使用前用紫外线消毒 30 min。

附录 B
(资料性附录)
稀释液配方

B.1 配方一

第一液:蒸馏水 100 mL、柠檬酸钠 2.97 g、卵黄 10 mL。

第二液:取第一液 47.75 mL,加入果糖 2.5 g、甘油 7 mL。

B.2 配方二

第一液:2.9%柠檬酸钠 80 mL、卵黄 20 mL。

第二液:2.9%柠檬酸钠和 2.5%果糖溶液 70 mL、卵黄 20 mL、甘油 10 mL。

B.3 配方三

第一液的基础液:Tris Base 35.32 g、柠檬酸 17.21 g、D-果糖 12.65 g,定容至 1 000 mL。

第一液:取基础液 199 mL、卵黄 51 mL。

第二液的基础液:Tris Base 35.746 g、柠檬酸 19.980 g、D-果糖 14.712 g,定容至 1 000 mL。

第二液:先用基础液配制 23%(V/V)卵黄液,再加入甘油,使甘油终浓度达到 12%(V/V)。

注:上述 3 种稀释液,每 100 mL 加青霉素、链霉素各 5 万 IU~5 万 IU,或参见附录 C 添加复合抗生素。

附 录 C
(资料性附录)
复合抗生素使用指南

C.1 复合抗生素的配制

C.1.1 庆大霉素(Gentamicin)母液

准确称取庆大霉素 1.0 g 完全溶解于 10 mL 的 2.9% 的柠檬酸钠(或 0.9% 氯化钠)溶液中,使最终浓度为 100 mg/mL。

C.1.2 泰乐菌素(Tylosin)母液

准确称取泰乐菌素 0.19 g 完全溶解于 10 mL 的 2.9% 的柠檬酸钠(或 0.9% 氯化钠)溶液中,使最终浓度为 19.0 mg/mL。

C.1.3 大观-林可霉素(spectinomycin-lincomycin)母液

准确称取大观霉素 1 g 和林可霉素 0.5 g 完全溶解于 10 mL 的 2.9% 的柠檬酸钠(或 0.9% 氯化钠)溶液中,使大观霉素最终浓度为 100 mg/mL、林可霉素为 50 mg/mL。

C.1.4 上述 3 种母液的浓度可依据抗生素的效价作适当调整。根据生产需要确定母液的配制量,母液可分装到 2 mL 离心管内,并在管壁上标明名称和配制日期。母液 5℃ 以下冷藏的有效期约 8 d;—4℃ 以下冷冻的有效期约 6 个月,使用时需解冻、升温至 32℃~35℃。

C.1.5 复合抗生素按照泰乐菌素母液、大观-林可霉素母液和庆大霉素母液 3:3:4 比例混匀,现配现用。

C.1.6 示例:

泰乐菌素母液	6 mL
大观-林可霉素母液	6 mL
庆大霉素母液	8 mL

C.2 复合抗生素的使用

C.2.1 每毫升精液添加 20 μ L 复合抗生素。精液与抗生素应颠倒混合,32℃~35℃ 水浴 5 min,再与稀释液混合。也可使用精液专用复合抗生素,按照生产厂家提供的使用说明添加。

C.2.2 每毫升稀释液添加 10 μ L 复合抗生素,添加入复合抗生素的稀释液应充分搅拌,使二者混合均匀后待用。也可使用稀释液专用复合抗生素,按照生产厂家提供的使用说明添加。

附 录 D

(规范性附录)

细管冷冻精液标识方法

细管冷冻精液标记由 16 位数 4 部分组成,排列顺序如下:

第一部分	第二部分	第三部分	第四部分
公牛站代号 3 位数	品种代号 2 位数	冻精生产日期 6 位数	公牛号 5 位数

第一部分公牛站代号以全国畜牧总站公布的公牛站代号为准(见附录 E);第二部分品种代号以 GB 4143 为依据;第三部分冻精生产日期 6 位数按年月日次序排列,年月日各占 2 位数字,年度的后 2 位数组成年的 2 位数,月、日不够 2 位的,月、日前分别加“0”补充为 2 位数。第四部分公牛号取该牛身份证号码的后 5 位数。部分与部分之间空一个汉字(2 个字节),第二部分用汉语拼音大写字母表示。标记的字迹必须清晰易认。

标记示例:



312 为上海市肉牛育种中心有限公司代号,ND 为南德文公牛的品种代号,110325 为 2011 年 3 月 25 日的生产日期代号,08002 为该公牛身份证号码 3122008002 的后 5 位数。

字号尽量大些,字体力求美观大方,字体和字号可采用喷码机出厂时默认的设置,但要加粗。也可采用字体为宋体,字号小五号加粗,字间距 2 个字节的组合。细管印字时尽量把信息往超声波封口端对齐,牛号最右端一个字符应与超声波封口端空泡的最左端平齐。

附 录 E
(规范性附录)
全国种公牛站统一编码

全国种公牛站统一编码见表 E. 1。

表 E. 1 全国种公牛站统一编码表

序号	种公牛站全称	代号
1	北京首农畜牧发展有限公司奶牛中心	111
2	天津市奶牛发展中心	121
3	河北省品元畜禽育种有限公司	131
4	秦皇岛全农精牛繁育有限公司	132
5	亚达艾格威(唐山)畜牧有限公司	133
6	山西鑫源良种繁育有限公司	141
7	内蒙古天和荷斯坦牧业有限责任公司	151
8	通辽市京缘种牛繁育有限责任公司	152
9	海拉尔市农牧场管理局家畜繁育指导站	153
10	赤峰赛奥牧业技术服务有限公司	154
11	内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司	155
12	辽宁省牧经种牛繁育中心有限公司	211
13	大连金弘基种畜有限公司	212
14	长春新牧科技有限公司	221
15	白城市翔牧肉奶牛中心	222
16	延边畜牧开发集团有限公司	223
17	四平市兴牛牧业服务有限公司	224
18	黑龙江省博瑞遗传有限公司	231
19	大庆市银螺乳业有限公司	232
20	龙江元盛食品有限公司雪牛分公司	233
21	上海奶牛育种中心有限公司	311
22	上海市肉牛育种中心有限公司	312
23	徐州恒泰牧业发展公司	321
24	南京利农奶牛育种有限公司	322
25	安徽天达畜牧科技有限责任公司	341
26	江西省天添畜禽育种有限公司	361
27	山东省种公牛站有限责任公司	371
28	山东奥克斯生物技术有限公司	373
29	先马士畜牧(山东)有限公司	374
30	河南省鼎元种牛育种有限公司	411
31	许昌市夏昌种畜禽有限公司	412
32	南阳昌盛牛业有限公司	413
33	洛阳市洛瑞牧业有限公司	414

表 E. 1 (续)

序号	种公牛站全称	代号
34	武汉兴牧生物科技有限公司	421
35	湖南光大牧业科技有限公司	431
36	广西壮族自治区畜禽品种改良站	451
37	成都汇丰动物育种有限公司	511
38	云南恒翔家畜良种科技有限责任公司	531
39	大理五福畜禽良种有限责任公司	532
40	西藏自治区当雄县牦牛冻精站	541
41	陕西秦申金牛育种有限公司	611
42	甘肃省家畜繁育中心	621
43	青海省家畜改良中心	631
44	宁夏四正种牛育种有限公司	641
45	新疆天山畜牧生物工程股份有限公司	651

附 录 F
(资料性附录)
精液生产记录表

精液生产记录见表 F.1。

表 F.1 精液生产记录表

日期	牛号	每次采精量 mL		总采 精量 mL	采精 人	精液 颜色	精液 活力	精子 密度亿 个/mL	检查 人	稀释 液量	稀释 后 活力	预计 生产 支数	平衡 后 活力	平衡 时间	平衡 温度	冷冻 后 活力	冷冻 数量	冷冻 操作员	备注
		一次	二次																

中 华 人 民 共 和 国
农 业 行 业 标 准
牛 冷 冻 精 液 生 产 技 术 规 程
NY/T 1234—2018

* * *

中 国 农 业 出 版 社 出 版
(北京市朝阳区麦子店街 18 号楼)
(邮政编码:100125 网址:www.ccap.com.cn)

北 京 印 刷 一 厂 印 刷

新 华 书 店 北 京 发 行 所 发 行 各 地 新 华 书 店 经 销

* * *

开 本 880mm×1230mm 1/16 印 张 1 字 数 20 千 字

2019 年 4 月 第 1 版 2019 年 4 月 北 京 第 1 次 印 刷

书 号: 16109·4750

定 价: 24.00 元



NY/T 1234—2018

版 权 专 有 侵 权 必 究

举 报 电 话: (010) 59194261