

团 体 标 准

T/CNHIA 20—2025

马冷冻精液生产技术规程

Technical regulations for the production of frozen semen in equine

2025 - 04 - 15 发布

2025 - 06 - 15 实施

目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 实验室准备	1
5 采精	2
6 精液品质检查	2
7 精液处理	2
8 精液冷冻	2
9 冻精检测	2
10 包装	3
11 贮存	3
12 运输	3
附录 A（资料性） 稀释液的配制	4
附录 B（资料性） 细管冻精的编号	5

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。

本文件由天祝县畜牧技术推广站提出。

本文件由中国马业协会归口。

本文件起草单位：天祝藏族自治县畜牧技术推广站、山东畜牧兽医职业学院、山东省马业协会、天祝藏族自治县万良走马养殖场、天祝藏族自治县多隆走马保种选育营销场。

本文件主要起草人：祁万祯、李锋红、马秀山、马立霞、张宇豪、赵珊珊、罗文学、王胜、李开辉、刘敏敏、蒲晓明、陈宗芳、马玉珍、张光斌、张永辉、李妍莲、李熙成、王占存、王占斌。

本文件为首次发布。

马冷冻精液生产技术规程

1 范围

本文件规定了马冷冻精液生产过程及对实验室准备、采精、精液检查与处理、精液冷冻、冻精检测、包装、冻精贮存及运输的技术要求。

本文件适用于马冷冻精液的生产。

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/T 5458 液氮生物容器
T/CNHIA 19 马人工授精技术规程

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

稀释液 semen diluent

保护精子延长其存活时间及增加精液容量的液体。

3.2

种公马 stallion

具有该品种的典型体型外貌，生长发育良好，身体健康，无遗传疾病，符合该品种对种公马的认定要求，并获得品种认定及登记机构的种公马证书。

4 实验室准备

4.1 一次性耗材

采精前1h将一次性无菌耗材放入38℃无菌恒温干燥箱备用。

4.2 器械消毒

采精筒（假阴道）每次使用前，应使用流动的清水冲洗干净，用洁净纱布擦干后，再用75%酒精消毒后自然晾干。

玻璃、金属器械应依次使用75%酒精消毒、生理盐水浸泡并多次冲洗后，置于烘干箱150℃高温烘干。

玻璃器皿使用前先用自来水浸泡，再用加有中性洗涤剂的温热溶液刷洗两次后冲洗干净，最后用蒸馏水冲洗2次，洗净后的玻璃器皿应光亮、内壁无水附着。洗净的玻璃器皿送入电热干燥箱，加热至160℃后恒温60min，然后温度调至38℃备用。

凡与精液、马生殖器（道）直接接触的其他器械（耗材）应进行严格消毒后使用。

4.3 仪器设备

采精前1h，恒温水浴锅水温设置为38℃；显微镜载物板温度调至38℃。

4.4 配制稀释液

稀释液的配制方法参见附录A。

4.5 实验室

采精前2h，擦拭操作台，清洁实验室地面，后用紫外线消毒灯45min。

5 采精

采精按照T/CNHIA 19中第4章和第5章确立的程序进行操作。

6 精液品质检查

精液品质检查按照T/CNHIA 19中第6章规定的要求进行操作。

7 精液处理

7.1 离心

鲜精用特大容量离心机离心浓缩，根据种公马年龄选择转速（转速随种公马年龄增加而降低），一般以600g~800g离心10min,用细管除去上清液，除去离心杯底部混有杂质的精液，保留纯精液。

7.2 精子密度

取0.1 mL过滤后的纯精液，加入2.4 mL生理盐水，混匀后，使用精液密度测定仪测定并记录。

7.3 稀释

使用精液密度测定仪测出所加稀释液总量，或计算得到所加稀释液总量，所加稀释液总量= [（原精液量*原精液密度*精子活力） / （目标冷冻密度/解冻后精子活力）] -原精液量*20%。

应逐级等温稀释，稀释过程中不应将稀释液快速倒入精液中，避免剧烈震荡。

将34℃的第一稀释液缓慢加入精液中摇匀，所加量= [（所加稀释液总量+精液量）/2] -精液量，将稀释管放入盛有34℃蒸馏水的烧杯中后再放置于4℃低温柜中降温，与此同时将第二稀释液也放入4℃低温柜中降温。

平衡2h，当降温至10℃时加入第二稀释液，所加第二稀释液的量=所加稀释液总量-所加第一稀释液的量。加入第二稀释液后，在4℃低温柜中再平衡30min以上，随后在低温柜中用分装一体机分装至细管中，分装后可进行冷冻。

7.4 编号

分装后的精液应进行编号，参见附录B。

8 精液冷冻

8.1 全自动冷冻仪操作

开启液氮罐阀门将冷冻仪降温至4℃，将摆放有冻精细管的架子迅速放入冷冻仪，盖严盖子，按预先设定好的程序自动完成冷冻过程。

8.2 冷冻曲线

冷冻的最佳温度曲线为将细管精液从4℃降至-35℃，5℃/min，保持15min，-35℃降至-196℃，60℃/min，达到冷冻状态。

8.3 液氮罐

液氮生物容器（液氮罐）应符合GB/T 5458。

8.4 收集保存

冷冻完成后，打开冷冻容器盖子，冻精按编号投入到不同提筒中。

9 冻精检测

9.1 解冻

用镊子取出冻精细管迅速浸入38℃~40℃水浴锅中并晃动，待溶解后立即取出，用吸水纸或纱布擦干水珠。剪去封口端，滴10 μL精液于血细胞计数板上进行镜检。

9.2 显微镜检查

使用显微镜检查或精子质量分析系统进行测定。解冻后，精液精子活力 ≥ 0.4 ，精子畸形率 $\leq 20\%$ ，精子顶体完整率 $\geq 80\%$ ，不合格者应废弃。

9.3 检测备案

每匹公马每批次冻精均应检测备案。

10 包装

冻精包装应在-140℃以下的环境中进行，同马同一批次包装到一起，包装好的冻精入贮存库。

11 贮存

储存冻精的液氮罐应设专人保管，每天定时检查液氮量，并做好记录，保证冻精始终浸在液氮中。液氮罐应置于阴凉通风处，每年至少清洗一次并更换新鲜液氮。包装好的冻精由一个液氮罐转移到另一液氮罐时，冻精在液氮罐外停留时间不得超过3s。取存冻精后应盖好液氮罐塞。在取放盖塞时，垂直轻拿轻放。移动液氮罐时应提握液氮罐手柄抬起罐体后再移动，不应在地上拖行。

12 运输

冻精运输应有专人专车负责，避免液氮罐发生碰撞和强烈振动，保证冻精始终浸在液氮中。

附录 A
(资料性)
稀释液的配制

A.1 蒸馏水的制备

用蒸馏器烧制，严格按照仪器的说明书进行操作。

A.2 电子天平的使用

电子天平放置在平稳的工作台上，保持清洁干燥，使用前接通电源，调整校准，称量时方托盘去皮称量。

A.3 药品的取用及保存

化学药品取用时用专用药勺，取用后将瓶口盖严，并妥善保存。

A.4 卵黄的取用

鸡蛋来源于无疫病的鸡场或农家柴鸡鸡蛋，鸡蛋新鲜完整干净，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蛋黄，用一次性注射器穿过卵黄膜抽取卵黄。

A.5 第一稀释液的配制

A.5.1 配方

配方见表A.1。

表 A.1 第一稀释液配方 (100 mL)

药品名称	剂量
葡萄糖	5 g
果糖	2 g
柠檬酸钠	0.3 g
卵黄	19 mL
M199	1 mL
双蒸蒸馏水	80 mL
青霉素	10万 IU
链霉素	10万 IU

A.5.2 配制

按第一稀释液的配方精确称取葡萄糖25 g、果糖10 g、柠檬酸钠1.5 g于400 mL水中，充分溶解后，煮沸消毒。待液体冷却至室温后加入95 mL卵黄，M199 5 mL，青霉素50万 IU，链霉素50万 IU，完成第一稀释液配制。

A.6 第二稀释液的配制

取第一稀释液95 mL，加5 mL甘油即可。

附录 B
(资料性)
细管冻精的编号

B.1 组成部分

细管冻精的标记由二十一到二十三位数、分四部分组成，排列顺序如下：

- a) 第一部分：公司代号四位数，公司名称或育种站字码代号缩写；
- b) 第二部分：品种代号二至四位数，以马匹品种为依据；
- c) 第三部分：冻精生产日期六位数，按年月日各两位数次序排列；
- d) 第四部分：公马号九位数，取该公马护照上身份号码。

B.2 编号

每两部分之间空两字节。字母代码用大写表示，数字代码用阿拉伯数字表示。标记字迹应清晰易认。

B.3 示例

WLZM CKY 220608 09176996D

第一部分：“WLZM”为天祝县万良走马养殖场代号；

第二部分：“CKY”为公马品种“岔口驿马”的品种代号；

第三部分：“220608”为生产日期“2022年6月8日”的代号；

第四部分：“09176996D”为该公马身份号码。
