

T/SHAAV

团 体 标 准

T/SHAAV 032—2025

猪冷冻精液生产技术规范

Technical specification for production of frozen boar semen

2025 - 08 - 13 发布

2025 - 08 - 13 实施

上海市畜牧兽医学会 发 布

目 次

前 言 II

1 范围 3

2 规范性引用文件 3

3 术语和定义 3

4 精液准备 3

5 精液冷冻 4

6 质量与检验 4

7 标志、标签和随行文件 5

附 录 A （资料性） 7

附 录 B （资料性） 表 B 主要仪器和用品 8

附 录 C （资料性） 稀释液配方 9

附 录 D （资料性） 程控冷冻仪降温程序 11

附 录 E （资料性） 精子顶体完整性检测 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。

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。

本文件由上海市畜牧兽医学会提出并归口。

本文件起草单位：上海市农业科学院、上海祥欣畜禽有限公司、上海市动物疫病预防控制中心、上海市嘉定区动物疫病预防控制中心和上海沙乌头农业科技有限公司。

本文件主要起草人：张树山、张德福、戴建军、吴彩凤、孙玲伟、高骏、徐皆欢、何孟纤、韩雪峻、李步社、姜红菊、张和军、宋团伟、张文刚、吴昊旻、甘叶青和凡中坤。

本文件首批承诺执行单位名单：上海市农业科学院畜牧兽医研究所、上海祥欣畜禽有限公司、上海沙乌头农业科技有限公司、山西猪巴巴种猪有限公司和榆林尔乐畜牧科技有限公司。

猪冷冻精液生产技术规范

1 范围

本文件规定了猪冷冻精液（简称“猪冻精”）生产的基本要求、冻精质量要求、实验方法、标志、随行文件、包装、贮存和运输要求。

本文件适用猪冻精生产。

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 2828.11 计数抽样检验程序 第11部分：小总体声称质量水平的评定程序

GB/T 2828.2 计数抽样检验程序 第2部分：按极限质量LQ检索的孤立批检验抽样方案

GB/T 5458 液氮生物容器

GB 23238 种猪常温精液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

猪冷冻精液 frozen boar semen

简称“猪冻精”，对种公猪原精添加保护成份、降温和冷冻后置于液氮中（-196 ℃）长期保存。

3.2

精子活力 sperm progressive motility

在37 ℃环境下前向运动精子占总精子数的百分率。

3.3

精子浓度 sperm concentration

每毫升精液中的精子数量。

3.4

精子畸形率 abnormal sperm percentage

异常精子数占总精子数的百分率。

3.5

顶体完整率 acrosome integrity rate

顶体完整的精子数占总精子数的百分率。

4 精液准备

猪精液采集和稀释等参照GB 23238中规定。

4.1 精液质量要求

公猪精液应符合表1规定。原精质量检测登记表（见附录A）。

表 1 精液质量要求

项目	内容
外观	呈乳白色，均匀一致
气味	略带腥味，无异味
精子活力/%	≥80
精子浓度/（10 ⁶ 个/mL）	≥1
精子畸形率/%	≤18

4.2 精液质量检测

公猪精液质量检测参照GB 23238。

5 精液冷冻

整个操作过程使用仪器、器皿见附录 B。

5.1 精液预处理

将稀释猪精液置于 17℃恒温箱运抵实验室、检测精液品质和温度后，采用水浴法使精液降温到 17℃，在 1 h~2 h 内完成。前一天采集、稀释并在 17℃条件下保存的精液，检测质量合格即可进行离心操作。

降温至 17℃的猪精液离心（17℃，2300 r/min，20 min~10 min）、弃掉精清，根据细管冻精精子浓度计算、加入适量等温冷冻稀释液 I 液、混匀，移至水浴中继续降温至 4℃（约 2 h）。

$$V_1 = (\rho_0 \times V_0 \times M) / (2 \times \rho) \dots\dots\dots (1)$$

式中：

- V_0 ——精液运抵实验室后的体积，单位为毫升（mL）；
- ρ_0 ——精液运抵实验室后的精子浓度，单位为亿/毫升（10⁸/mL）；
- M ——精液运抵实验室后的活力，单位为%；
- V_1 ——精液添加I（1）液后的体积，单位为毫升（mL）；
- ρ ——冻精的终浓度。

在低温操作柜（4℃~5℃，可使用加控温装置的冰柜）中用冷冻稀释液 II 液（4℃）作 1:1 稀释、混匀。

用细管灌装、封口和打印等专门化设备等进行细管打印、精液定量灌装和封口等操作；将冷冻细管固定在冷冻料架上。

冷冻稀释液可使用包括但不限于附录 C。

5.2 冷冻

快速将冷冻料架移至程控冷冻仪（初始温度 4℃）内，依照附录 D 中推荐程序开始冷冻。或采用泡沫箱液氮熏蒸的方法，冷冻料架距液氮面约 2~3 cm、加盖熏蒸 8~15 min。冷冻结束后，快速将冷冻细管移至液氮中。

6 质量与检验

6.1 质量要求

猪细管冻精质量应符合表 2 的规定。

表 2 猪细管冻精（0.5 mL）质量要求

内容	内容
外观	细管无裂痕、两端封口严密、所印字迹应清晰易认、信息齐全。
剂量/mL	≥0.45
精子活力/%	≥45
精子浓度/（10 ⁸ 个/mL）	10
精子畸形率/%	≤20
顶体完整率/%	≥60

6.2 实验方法

取样按照GB/T 2828.2和GB 23238进行。提前将解冻液置于37℃水浴。将冻精细管迅速放入50±1℃水中轻轻摆动，解冻时间为12~16 s。取出、擦干水迹、剪去封口端，使用推针将精液移至解冻液中、水浴15~20 min后检测活力。

6.2.1 外观和剂量

细管冻精外观用目测法观察评定，剂量按照GB 23238规定的方法进行。

6.2.2 解冻后精液质量

精子活力、精子畸形率测定按照GB 23238规定的方法进行。
精子顶体完整率按照附录 E规定的方法执行。

6.3 检验规则

6.3.1 检验分类

- 6.3.1.1 常规检验：对猪冷冻精液单指标检验，是生产批入库前和销售前的检验。
- 6.3.1.2 型式检验：对猪冷冻精液全部指标检验，是生产方抽样检验、仲裁和质量监督抽样检验时选定项的检验。
- 6.3.1.3 检验项目：检验项目和检验周期见表 3。

表 3 检验类型、项目和要求等

检验类型	检验项目	要求	检验周期
常规检验	冻精细管外观、精子活力	表 2	每批生产入库前和销售前
型式检验	外观、剂量、精子活力	表 2	每半年一次

6.3.2 判定

按照GB 23238进行。

7 标志、标签和随行文件

7.1 标志

冷冻精液细管外壁应清楚标明生产方和品种代码、个体号和生产日期等。猪品种代码以畜禽遗传资源鉴定及审定部门公布的为准。

7.2 标签

标注猪品种代码、个体号、细管数量、包装日期、生产者名称和使用说明等。

标签信息可包括生产单位商标或徽标，及可追溯的其他信息。推荐使用二维码信息。

7.3 随行文件

随行文件应符合现行法律和法规，包括猪系谱、检疫证明、冻精检验合格证明和生产经营许可证等。

8 包装、贮存和运输

8.1 包装

细管冻精包装应在液氮中进行。将冷冻细管分类装入贮精管，包装后的冷冻细管棉塞端应朝向贮精管的底部，不应倒置。再用灭菌布袋将装有冻精细管的贮精管包装起来，一个布袋应装一个个体，每一包装量不应超过100支。

8.2 贮存

存放冻精的低温容器质量应符合GB/T 5458规定，使用前经过清洗后加入液氮，冻精细管浸泡在液氮中。在由一个容器转移至另一容器时，间隔时间不应超过3 s。

8.3 运输

贮存容器周围添加缓冲包装。

附录 A

(资料性)

表 A 猪冻精生产记录卡

[illegible]

附 录 B
(资料性)
表 B 主要仪器和用品

名称	规格 (技术参数)	用途
精液质量分析系统	自动温控平台、相差物镜和滤波照明	用于精子运动性能分析、精子畸形率检测
精子浓度仪	直接显示精子浓度, 测量范围: 0×10^9 个/L $\sim 2 \times 10^9$ 个/L	测定精子浓度。
细管打印机		细管上打印相关信息。
精液分装机、封口机		用于精液细管的装管、封口。
程控冷冻仪	能在 $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的降温速度将箱体内温度精准降至 $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$	依据冷冻程序精确控制降温速度。
低温操作柜	控温范围为 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -20\text{ }^{\circ}\text{C}$	为精液灌装、打印和封口等操作提供低温条件。
电子天平	量程 (g): 200; 可读性 (g): 0.0001	称量化学试剂。
电子秤	量程 (g): 3000; 可读性 (g): 0.1	称量精液和稀释液等。
pH 计	测量范围 0.0 ~ 14.0 , 精度 ± 0.1	测定精液和稀释液的 pH。
恒温箱	$4\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 17\text{ }^{\circ}\text{C}$, 精度 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$	用于精液降温平衡。
烘箱	室温 $+5\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 250\text{ }^{\circ}\text{C}$, 波动度 $< \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$	烘干器皿。
恒温水浴锅	双孔或四孔; 功率: 1500 W; 控温范围: 室温 $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$, 精度: $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$	使精液与稀释液等温、精液解冻等。
恒温磁力搅拌器	$0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 99\text{ }^{\circ}\text{C}$	稀释液搅拌、加热。
纯水制备仪	出水量: 10 L/h, 水质: 0.055 s, 细菌 $< 10\text{ cfu/mL}$ (带选配紫外灯系统)	制备配制溶液用水。
微量移液器	$10\text{ }\mu\text{L} \sim 100\text{ }\mu\text{L}$	精液取样。
微量移液器	$100\text{ }\mu\text{L} \sim 1000\text{ }\mu\text{L}$	精液取样或稀释。
温度计	$0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$	测量溶液温度。
精子密度仪	$250 \times 10^6/\text{mL} \sim 800 \times 10^6/\text{mL}$	测量猪精液中精子浓度。
冷冻细管	0.5 mL	精液保存载体。
液氮罐	30 L $\sim 120\text{ L}$	细管冻精储存。

附 录 C
(资料性)
稀释液配方

C.1 冷冻基础液（推荐）

内容如表C.1所示。

表 C.1 冷冻基础液

成分	配方 A	配方 B	配方 C	配方 D
葡萄糖/g	1.1		2.1	
果糖/g		1.1		
β -乳糖/g			3.0	10.61
柠檬酸钠/g			0.31	
柠檬酸/g	1.48	1.48		
三（羟甲基）氨基甲烷 /g	2.42	2.42		
L-甘氨酸/g			0.8	
青霉素/（IU）	1×10^5			
硫酸链霉素/（IU）	1×10^5			
加双蒸水定容至 100 mL。				

C.2 冷冻稀释液Ⅰ液（推荐）

表 C.2 冷冻稀释液Ⅰ液

成分	添加量
冷冻基础液/（mL）	80
卵黄/（mL）	20
青霉素/（IU）	1×10^5
硫酸链霉素/（IU）	1×10^5
注：充分搅拌 20 min 以上，4℃保存备用。	

C.3 冷冻稀释液Ⅱ液（推荐）

表 C.3 冷冻稀释液Ⅱ液

成分	添加量
冷冻稀释液Ⅰ液/（mL）	94.5
甘油/（mL）	4
氨基钠十二烷基硫酸酯/（mL）	1.5
注：充分搅拌 20 min 以上，4℃保存备用。	

C.4 解冻液（推荐）

表 C.4 解冻液

成分	添加量
葡萄糖/g	3.7
乙二胺四乙酸/g	0.125
柠檬酸钠/g	0.6
碳酸氢钠/g	0.125
氯化钾/g	0.075
青霉素/（IU）	1×10^5
硫酸链霉素/（IU）	1×10^5
加双蒸水定容至 100 mL, 充分搅拌 20 min 以上, 4℃保存备用。	

附 录 D
(资料性)
程控冷冻仪降温程序

表 D 程控冷冻仪降温程序

序号	程序 A		程序 C	
	温度范围	降温速率或时间	温度范围	降温速率或时间
1	4 °C~-5 °C	6 °C/min	4 °C~-5 °C	6 °C/min
2	-5 °C~-80 °C	40 °C/min	-5 °C~-80 °C	40 °C/min
3	-80 °C	30 s	-80 °C	30 s
4	-80 °C~-145 °C	60 °C/min	-80 °C~-150 °C	70 °C/min
冷冻程序结束后冷冻细管直接投入液氮。				

附 录 E
(资料性)
精子顶体完整性检测

E 精子顶体完整性检测:

E.1 主要器材:

荧光显微镜、移液器、载玻片、盖玻片、无色指甲油封片和计数器等。

E.2 溶液配制:

FITC-PNA 液: FITC-PNA 溶于磷酸盐缓冲液 (PBS) 液中, 100 $\mu\text{g/mL}$ 。

固定液 (90 %甘油): 甘油和PBS液按体积比9:1混合。

E.3 操作步骤:

a) 将解冻精液 (0.5 mL) 加至 4 mL 3 % PVP 液 (聚乙烯吡咯烷酮) 液面上, 离心 (2300 r/min、3 min, 室温)、弃上清, 重复 1 次;

b) 用 PBS (37 $^{\circ}\text{C}$) 重悬调整浓度至 $1\sim 2\times 10^6$ 个精子/mL, 取 20 μL 涂片、空气干燥;

c) 滴加 10 $\mu\text{L}\sim 20\ \mu\text{L}$ FITC-PNA 液至载玻片并使染液均匀分布、置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗、潮湿环境静置 20 min; 将载玻片插入 PBS 液中浸洗 2 次, 移至室温条件、黑暗环境空气干燥 30 min;

d) 滴加 10 μL 固定液、加盖盖玻片、无色指甲油封片, 400 $\times$ 荧光显微镜下观察并计数。

e) 在激发波长480 nm、发射波长530 nm紫外光激发下可区分出四种不同类型的精子: ① 顶体完整精子, 顶体顶部发强光且边缘规则光滑; ② 顶体部分破坏精子, 顶体前区杂乱发光且边缘不规则; ③ 顶体前帽缺失的精子, 仅在赤道区有荧光; ④ 顶体完全破坏精子, 无荧光。每次计算至少200个精子。