

团体标准《猪冷冻精液生产操作规程》
编制说明（征求意见稿）

标准起草组

2024 年 10 月

目 录

一、 制定标准的任务来源	3
二、 制定标准制定的背景、目的和意义	3
三、 标准起草过程、基本原则及编写依据	4
(一) 标准起草主要过程	4
(二) 遵循的基本原则	6
(三) 主要编写依据	6
四、 标准设置的主要技术内容及其依据	6
(一) 封面	6
(二) 前言	6
(三) 范围	7
(四) 规范性引用文件	7
(五) 术语和定义	8
(六) 基本要求	9
(七) 猪冷冻精液生产	11
(八) 品质检查	12
(九) 精液冷冻	12
(十) 解冻检测与储存	13
(十一) 冷冻质量要求	14
(十二) 生产记录	14
(十三) 运输	14
(十四) 附录 A	15
(十五) 附录 B	16
(十六) 附录 C	17
(十七) 附录 D	18
五、 与国内同类标准技术内容的对比及创新情况	22
(一) 与国内同类标准的比较	22
(二) 主要技术创新点	23
六、 与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系	23
七、 重大分歧意见的处理经过和依据	23
八、 涉及专利的有关说明	23
九、 贯彻标准的要求和措施建议	23

团体标准《猪冷冻精液生产操作规程》编制说明

（征求意见稿）

一、制定标准的任务来源

根据陕西饲料协会《关于印发 2024 年团体标准立项的通知》，由西北农林科技大学等单位承担团体标准《猪冷冻精液生产操作规程》制定工作。

标准制定任务下达后，成立了以高磊为首席专家的标准起草组，主要成员包括：胡建宏、张毅、褚瑰燕、王佳伦、杨公社、贾永宏、陈辉、张曼、李智、杨晓茹。

标准起草单位包括：西北农林科技大学、山西荷澜育种有限公司、陕西省畜牧技术推广总站、陕西省畜牧产业试验示范中心、大荔县畜牧发展中心。

二、制定标准制定的背景、目的和意义

猪冷冻精液技术是指将猪的精液通过特殊处理后，利用液氮等超低温冷源，将精液冷冻处理并保存在超低温的液氮（ -196°C ）中，使精子在冷冻状态下代谢几乎停止，生命保持相对静止状态。当温度回升后，精子能够复苏并保持受精能力。因此，该技术在优良基因保存、生物安全保障、成本控制、战略储备和基因改良等方面具有显著价值，推动了养猪业的现代化和高效化发展。

猪冷冻精液的制作过程包括精液收集、处理、稀释、冷冻等多个步骤，每个步骤都需要精确的操作和控制，操作不当可能会导致精子细胞受损，影响产品质量。因此，编制猪冷冻精液生产操作规程工作势在必行。一方面，制定猪冷冻精液生产操作规程可以确保精液的质量和安全性，有利于提高养殖场的生产效率，还能确保猪群遗传资源的稳定和优质；其次，通过制定和实施严格的标准，可以引导和推动猪精液冷冻技术的研究和发展，鼓励使用更先进的冷冻技术和设备，促进技术的进步和创新，从而提高精液的保存期限和品质；最后，制定猪冷冻精液生产操作规程有助于规范市场秩序和保护消费者权益。通过统一的标准，可以确保市场上销售的猪冷冻精液产品符合一定的质量要求，避免不合格产品流入市场，保护养殖户和消费者的利益。同时，猪冷冻精液生产操作规程的制定和实施也有助于提升整个行业的形象和信誉，促进行业的健康发展；另一方面，为政府监管产品质量安全提供科学的技术依据，确保猪冷冻精液技术的规范化、标准化和高效化，促进养猪业的可持续发展。

三、标准起草过程、基本原则及编写依据

（一）标准起草主要过程

第一阶段 2024 年 6 月，成立标准起草组。由牵头单位联合 4 家单位，召开《猪冷冻精液生产操作规程》团体标准

编制启动会议，成立标准起草组，制定标准起草工作计划，明确各自工作内容和职责，落实人员与分工。

第二阶段是 2024 年 7 月，搜集相关文献技术资料“我国猪精液冷冻保存技术的现状及对策”、“猪冷冻精液对养猪业的影响”、“猪冷冻精液在养猪业中的应用”等。查询相关标准《标准化法》、《产品质量法》、《中华人民共和国畜牧法》、GB/T 4143-2022《牛冷冻精液》、GB/T 5458-2012《液氮生物容器》、GB/T 23238-2021《种猪常温精液》、GB/T 25172-2020《猪常温精液生产与保存技术规范》、GB/T 30396-2013《牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输》、NY/T 1234-2018《牛冷冻精液生产操作规程》、NY/T 2077-2011《种公猪站建设技术规范》、DB41/T 2371-2022《猪冷冻精液生产技术规范》等，初步确立标准考察技术指标。

第三阶段是 2024 年 8 月，召开标准编制会议，研讨确定标准的整体框架及主体内容，对标准的关键性或存在争议性的内容进行了初步探讨。

第四阶段 2024 年 9 月，专家及技术人员调研小组赴山西荷澜育种有限公司开展关键技术问题调研，及时梳理总结调研情况，标准起草组在调研基础上编制形成工作组讨论稿。

第五阶段 2024 年 10 月，形成征求意见稿，进行定向意见征集，对收集到的意见召开技术讨论会，经多次修改和完

善，修改完善标准稿和编制说明。

（二）遵循的基本原则

1. 符合《中华人民共和国畜牧法》及相关的法律法规要求。

2. 结合我省实际情况，并参考国内相关产品标准。

3. 充分考虑标准的实用性、先进性和权威性。

（三）主要编写依据

1. 按照 GB/T1.1-2020《标准化工作导则第1部分：标准化文件的结构和起草规则》、GB/T20001.10-2015《标准编写规则第10部分：产品标准》。

2. 有关国家、行业和企业技术标准和文献资料。

四、标准设置的主要技术内容及其依据

（一）封面

标准封面中，标准名称“猪冷冻精液生产操作规程”对应的英文为“Operating procedures for frozen pig semen production”，按照 GB/T 1.1-2020 给出封面的规则编写。

（二）前言

按照 GB/T 1.1-2020 给出前言的规则编写。

标准内容：

前 言

本标准的附录都是标准的附录。

本标准由山西荷澜育种有限公司与西北农林科技大学提出。

本标准起草单位:山西荷澜育种有限公司、西北农林科技大学

本标准主要起草人:高磊、王佳伦、丁荣荣、杨公社、李智、沙钺铭、王佳宇

(三) 范围

为便于标准的理解与实施,本标准在范围一章中明确规定:猪冷冻精液生产与保存的基本要求和技术要求。包括精液采集、稀释液配制、品质检查、精液冷冻、解冻品质检测、冻精包装、储存及运输等内容。

标准内容:

1 范围

本文件规定了猪冷冻精液生产与保存的基本要求和技术要求。包括精液采集、稀释液配制、品质检查、精液冷冻、解冻品质检测、冻精包装、储存及运输等内容。

本文件适用于猪冷冻精液生产。

(四) 规范性引用文件

本标准引用《牛冷冻精液》GB/T 4143-2022 作为猪精液冷冻保存技术中术语和定义,引用《液氮生物容器》GB/T 5458-2012 作为液氮罐的选用标准,引用《种猪常温精液》GB/T 23238-2021 作为猪精液品质检查方法,引用《猪常温精液生产与保存技术规范》GB/T 25172-2020 作为种公猪和原精液品质的基本要求,引用《牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输》GB/T30396-2013 作为猪冷冻精液包装、标签、贮存和运输方法,引用《牛冷冻精液生产操作规程》NY/T 1234-2018 作为试验器具消毒和蛋黄获取方法,引用《种公

猪站建设技术规范》NY/T 2077-2011 作为试验操作环境要求，引用《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为猪冷冻精液生产的参考方法，并按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则，将标准文本中出现过的标准列为本部分的内容，使标准更简洁、更能现行有效的相关标准相配套、相协调。

标准内容:

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 4143-2022 牛冷冻精液

GB/T 5458-2012 液氮生物容器

GB/T 23238-2021 种猪常温精液

GB/T 25172-2020 猪常温精液生产与保存技术规范

GB/T 30396-2013 牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输

NY/T 1234-2018 牛冷冻精液生产操作规程

NY/T 2077-2011 种公猪站建设技术规范

DB41/T 2371-2022 猪冷冻精液生产技术规范

（五）术语和定义

依据《牛冷冻精液》GB/T 4143-2022 和《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 对猪冷冻精液生产中种公猪、采精器、采精、采精量、精子密度、精子活力、畸形率、菌落总数、细管和冷冻精液等术语和定义做了注释。

标准内容:

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 种公猪 (breeding boars)

体型外貌和性能质量符合种用标准要求的公猪。

3.2 采精器 (semen collection instrument)

模拟母猪阴道环境条件的采精工具。由外壳、内胎、漏斗、集精管等组成。

3.3 采精 (semen collection)

用人工模拟且有自然交配感的工具,以获得公猪精液的方法。

3.4 采精量 (volume per ejaculate)

公猪一次采精时排出的精液量。

3.5 精子密度 (sperm concentration)

单位体积精液中的精子数。单位为亿个每毫升 ($\times 10^8$ cells/mL)。

3.6 精子活力 (sperm motility)

在 37 °C 环境下前进运动精子占总精子数的百分率。

3.7 畸形率 (malformation rate)

在 37 °C 环境下畸形精子占总精子数的百分比。

3.8 菌落总数 (aerobic plate count)

每剂量精液在一定条件下培养后观察到的微生物菌落总数。

3.9 细管 (straw)

用于分装精液的聚乙烯复合材料的塑料管。

3.10 冷冻精液 (frozen semen)

经特殊方法处理经超低温冷冻并可在液氮中 (-196 °C) 长期保存的精液, 简称冻精。

(六) 基本要求

依据《猪常温精液生产与保存技术规范》GB/T 25172-2020 作为种公猪和原精液品质的基本要求,《种公猪

站建设技术规范》NY/T 2077-2011 作为试验操作环境要求，以及《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为仪器与设备要求。依据《牛冷冻精液生产操作规程》NY/T 1234-2018 中附录 A 内容作为器具消毒操作的要求。

标准内容:

4 基本要求

种公猪

种公猪来源于取得省级《种畜禽生产经营许可证》的原种猪场，具有三代以上完整系谱和性能测定记录，遗传评估优良、健康无病符合种用要求。从国外引种需符合国家有关规定。

成年公猪宜每周采精二次至三次，青年公猪宜每周一次至二次。

4.2 原精液

原精液外观要求呈乳白色，颜色均匀一致。气味略带腥味，无异味。采精量要求大于等于 100 mL，精子活力大于等于 70%，密度大于等于 1 亿个每毫升，精子畸形率小于等于 20%。

4.3 操作环境

采精室要求使用面积不小于 12 平方米，有控温、控湿、通风换气和消毒设施设备，采精架牢固、可升降；室内应配置防护栏，地面防滑，与采精准备室相通；与精液生产室之间应有精液传递窗。

精液生产室要求使用面积不小于 20 平方米，有控温、控湿、通风换气和消毒设施设备，窗户有窗帘。配备更衣间。

精液质量检测室要求使用面积不小于 10 平方米，有控温、控湿、通风换气和消毒设施设备，窗户有窗帘。

4.4 仪器与设备

4.4.1 仪器设备的配置应满足附录 A 的要求。

4.4.2 仪器设备运行正常，定期进行维护保养。

4.4.3 计量仪器(电子天平、恒温箱等)、超纯水仪、恒温热台、高压锅等应定期校准与维护保养。

4.4.4 用品、器具等应按照 NY/T 1234-2018 附录 A 中的规定进行清洗和消毒：

a) 玻璃器皿首次使用需要使用自来水冲洗后放入 5%稀盐酸中浸泡 12 小时，取出后立即用自来水冲洗；再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，按操作说明书进行干燥、消毒、灭菌后待用。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，后续步骤同上。

b) 采精器首次使用或使用后，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。

c) 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。

d) 纱布清洗干净经高压灭菌后待用。

e) 其它器具，如：金属镊子、止血钳、药匙、胶塞和吸管胶头等，使用 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 分钟。

（七）猪冷冻精液生产

依据《牛冷冻精液生产规程》NY/T 1234-2018 作为蛋黄获取方法，稀释液配制的注意事项参考《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 中的要求。

标准内容：

5 猪冷冻精液生产

配制稀释液用水应为新鲜无菌的蒸馏水、重蒸水或超纯水。稀释液所用化学试剂应为分析纯以上级别，所用卵黄应来源于无特定病原体鸡场的新鲜鸡蛋，配制方法见附录 A。稀释液配制需现用现配，化学试剂需精确称量（精确至万分位），配制稀释液灭菌容器需要进行标记，配制完成后需在瓶上标记日期、名称、保存时间等。

使用商品试剂盒应严格按照使用说明书的要求操作。

（八）品质检查

猪冷冻精液的品质检查方法依据《种猪常温精液》GB/T 23238-2021。

标准内容:

6 品质检查

精液品质检查按照附录 D 中的规定执行。

（九）精液冷冻

依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为猪精液稀释、平衡与冷冻的方法，《牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输》GB/T 30396-2013 作为猪冷冻精液分装和标签方法。

标准内容:

7 精液冷冻

7.1 预稀释及平衡

经过质量评估合格的精液，用等温预热且与精液温度一致的预稀释液（配制见附录 B）按照 1:1~1:1.2 比例稀释，稀释后的精液于室温（25 °C）静置 1 小时，转入 17 °C 恒温冰箱，平衡 2~3 小时。

7.2 精液预处理后离心

称量离心瓶重 w_0 (g)，将离心瓶预冷至 17 °C，然后将 17 °C 平衡好的精液装入离心瓶进行离心（17 °C 条件下，800×g 离心 10 分钟），弃上清液，称重 w_1 (g)。

7.3 精液处理后进行 4 °C 平衡

用 17 °C 预冷的冷藏保护液（Ⅰ液）（配制见附录 B）重悬精子，重悬后将离心瓶置于盛有 17 °C 水的 500 mL 烧杯中，于 4 °C 冰箱或低温操作柜中缓慢降温至 4~5 °C（2.5~3 小时）。按 2:1 加入冷冻保护液（Ⅱ液）（配制见附录 B）混匀，在 4 °C 下继续平衡 0.5~1 小

时,然后在低温操作柜中进行灌装。计算 I 液和 II 液所需体积的方法见附录 C。

7.4 冷冻

7.4.1 程序冷冻

在灌装的同时开启程序冷冻仪,选定冷冻曲线,待冷冻仪温度稳定在初始温度(4~5 °C)后,迅速将摆放好细管的托架放入冷冻室中,启动冷冻程序。待冷冻曲线走完后,将托架迅速取出放入装有液氮的泡沫箱中,液氮深度至少浸没所有细管。

7.4.2 熏蒸冷冻

将液氮倒入深度 50 厘米以上的专用冷冻箱预冷 10 分钟,保持冷冻支架上的细管在液氮面之上 3 厘米,盖上冷冻箱盖子熏蒸冷冻 10 分钟,最后将冷冻样品浸入液氮中。

7.4.3 分装

将细管支架升到液氮面上 1~2 厘米,然后将细管冻精装入拇指管(每管 12 支),再将拇指管装入纱布袋(每袋 6 管),在纱布袋或拇指管上标记或贴上打印好的标签。

(十) 解冻检测与储存

依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为猪冷冻精液的解冻方法。《牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输》GB/T30396-2013 作为猪冷冻精液包装和储存方法。

标准内容:

8 解冻检测与储存

8.1 冻后抽检

每份原精液制作的细管冻精至少抽取 3 支进行检测。细管从液氮罐中取出后在空气中停留 2~3 秒,迅速置于 50 °C 水浴中解冻 16 秒,擦干表面水分后,将精液移入 5 mL 离心管中,用预热到 37 °C 的解冻稀释液(配制见附录 B)作 10 倍稀释。在 37 °C 水浴中维持 10~15 分钟,然后在显微镜下检测解冻后精子活力,如活力合格,即可将冻精转入液氮罐中长期保存。

8.2 包装

外包装上标明生产场、品种、种公猪号、生产日期和支数等。

8.3 储存

细管冷冻精液应浸没于液氮生物容器的液氮中。冷冻精液由一个液氮生物容器转移到另一液氮生物容器时,在液氮生物容器外停留时间不得超过 3s。取存冷冻精液后要及时盖好液氮生物容器塞。

储存室应阴凉、干燥、清洁和通风良好。

（十一）冷冻质量要求

本部分依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为冷冻精液质量的要求。

标准内容:

9 冷冻质量要求

9.1 精子活力

所制作冻精的精子活力应大于等于 40%。

9.2 精子畸形率

所制作冻精的精子畸形率应小于等于 20%。

9.2 菌落总数

所制作的冻精解冻后的菌落总数应小于等于 1000 个菌落形成单位每毫升（CFU/mL）。

（十二）生产记录

本部分依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 中猪冻精生产记录表的样式作为参考。

标准内容:

10 生产记录

做好猪冻精生产相应记录, 参见附录 E。

（十三）运输

本部分依据《牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输》

GB/T30396-2013 作为猪冷冻精液产品运输的方法。

标准内容:

11 运输

应在液氮生物容器罐体外明显位置标上“向上”“小心轻放”等储运图示标志;液氮生物容器应轻装轻卸,不得倾斜、横倒、碰撞和强烈振动,确保冷冻精液始终浸泡在液氮中;液氮生物容器应有专人负责,移动时应提握液氮生物容器手柄抬起罐体后移动。

(十四) 附录 A

本部分依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 中猪冷冻精液生产仪器设备表作为试验仪器设备的参考。

标准内容:

附录 A
(资料性)
猪冷冻精液生产仪器设备表

猪冷冻精液生产仪器设备见表 A.1。

表 A.1 猪冷冻精液生产仪器设备表

名称	规格及用途
采精架(假台猪)	采精用,可升降、调角度
防滑垫	环保橡胶,不含滑石粉添加剂(采精室地面防滑)
恒温水浴锅	数显式控温,控温精度±1℃
电热恒温培养箱	数显温度、可控温度 34℃±1℃
磁力搅拌器	可恒温、调速
电子精密台称	精液、稀释粉称重
电子天平	0~300 g±0.01 g,化学试剂称量
pH 计	0.0~14.0±0.1,测定精液、稀释液的 pH 值
血球计数板	测定精液中精子数量
超纯水仪	稀释液用水
离心机	单孔 200 mL~750 mL

液氮容器(不同型号)	贮存液氮, 精液冷冻和保存
微量移液器	50 uL~100 uL
微量移液器	100 uL~1000 uL
温度计	温度测量, 0~60 °C
精液冷冻程控仪	细管精液冷冻, 控温范围 30 °C~180 °C
采精保温杯	600 mL
量筒	500 mL、1000 mL, 量取液体
三角烧杯	50 mL、100 mL、250 mL、500 mL
细管精液分装机	封装细管精液
精子密度测定仪	精液中精子密度的测定, 亿/mL
精子质量分析系统	40X~600X; 有相差镜头, 观测精子数、活力和畸形率
显微镜恒温台(板)	数显温度, 加热恒温提高精子活体观察的准确性
低温平衡柜	稀释后的精液平衡, 细管精液封装

(十五) 附录 B

本部分依据《牛冷冻精液生产规程》NY/T 1234-2018 作为蛋黄获取方法, 依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为冷冻保护液中甘油和 OEP 试剂的添加比例, 但对预稀释液和 I 液(冷藏保护液)的主要成分进行了调整: 一, 预稀释液配制方法调整为使用猪精液常温保存商品稀释液, 按说明书配制; 二, 冷藏保护液的主要成分调整为乳糖和蛋黄。调整后的配制方法具有操作简便、冷冻精液质量高等特点, 利于减少操作误差, 便于实现猪冷冻精液生产标准化, 提升产品质量。

标准内容:

附录 B
(资料性)
冻精生产相关稀释液配制

B.1 预稀释液

推荐使用猪精液常温保存商品稀释液,按说明书配制。

B.2 I 液(冷藏保护液)

主要成分:乳糖、蛋黄。

按照以下比例配制冷藏保护液:称量 11 g 乳糖加入 100 mL 纯水中,使用容量瓶定容,配制成 11% (w/v) 的乳糖溶液。将 25 mL 蛋黄加入到 100 mL 乳糖溶液中,使蛋黄最终比例达到 20%,使用磁力搅拌器混匀,3500×g 条件下离心 30 分钟,抽取上清,为冷藏液,使用前置于恒温箱内 17 °C 保存。

按照 NY/T 1234-2018 中 5.2 的方法抽取蛋黄: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。

B.3 II 液(冷冻保护液)

主要成分:乳糖、蛋黄、OEP、甘油。

按照以下比例配制冷冻保护液:取 89.5 mL I 液置于 250 mL 烧杯中,用移液器抽取 9 mL 甘油和 1.5 mL OEP 加至其中,混匀,为冷冻液,置 4°C 备用。

B.4 解冻液

推荐使用猪精液常温保存商品稀释液,按说明书配制。

(十六) 附录 C

本部分依据《猪冷冻精液生产技术规范》DB41/T 2371-2022 作为精液离心与稀释的方法。

标准内容:

附录 C (资料性) 精液离心与稀释

C.1 精液离心

C.1.1 离心前应准确称量离心管净重 (g)，做好标记。

C.1.2 降、恒温后精液在 17 °C 环境条件下 800×g 离心 10 min,弃上清, 称重。

精子体积按式 (C. 1) 计算:

$$(v_0 = (w_1 - w_0)/1.04) \dots\dots\dots (C. 1)$$

式中:

v_0 ——浓缩后精子体积, 单位为 mL;

w_1 ——离心瓶加精子重, 单位为 g;

w_0 ——离心瓶重, 单位为 g;

1.04 ——浓缩后精液比重估计值。

C.2 稀释

C.2.1 采集鲜精后检测鲜精密度 p_0 , 稀释后精液密度 $p_1=p_0/\text{稀释倍数}$ 。

C.2.2 稀释后精子 17 °C 平衡后, 取体积为 $v_{17^\circ\text{C}}$ 的样品离心, 去上清, 加入 I 液体积 v_1 , 4 °C 平衡。此时精液密度为 p_2 。

C.2.3 平衡后 2:1 加入 II 液, II 液体积为 v_2 。此时精液密度为 p_3 , 即最终密度 $p_3 = \frac{2}{3} p_2$ 。

C.2.4 精液冷冻前体积, 即加入 I 液和 II 液后精液总体积 $v_3=v_0+v_1+v_2$ 。

C.2.5 精液最终密度 p_3 由生产需求而定。 p_3 推荐密度为 5 亿个/mL, 即 p_2 为 7.5 亿个/mL。

I 液、II 液的添加体积分别按式 (C. 2. 1、C. 2. 2) 计算:

$$v_1 = \frac{v_{17^\circ\text{C}} \times p_1}{p_2} - v_0 \dots\dots\dots (C. 2. 1)$$

$$v_2 = \frac{1}{2} (v_0 + v_1) \dots\dots\dots (C. 2. 2)$$

式中:

p_1 ——鲜精稀释后的密度, 单位为亿个/mL;

$v_{17^\circ\text{C}}$ ——17 °C 平衡后, 取样至离心瓶中的样品体积, 单位为 mL;

p_2 ——加入 I 液后样品密度, 由最终密度推算得出, 单位为亿个/mL;

v_0 ——浓缩后精子体积, 单位为 mL;

v_1 ——加入 I 液的体积, 单位为 mL;

v_2 ——加入 II 液的体积, 单位为 mL。

(十七) 附录 D

本部分依据《种猪常温精液》GB/T 23238-2021 作为猪

冷冻精液的品质检查方法，主要包括精子活力、精子畸形和细菌数的检测方法。

标准内容:

附录 D (规范性) 猪冷冻精液质量检测方法

通则

试验中除非另有规定，仅使用分析纯试剂。试验用水为新制备的去离子水或蒸馏水。试验所用的测量仪器应经过计量检定机构检定合格，并在有效期内。

D.2 精子活力

D.2.1 仪器设备与耗材

D.2.1.1 精子质量分析仪:由相差显微镜、显示器和专用分析软件等组成。相差显微镜至少应配有 10 倍、20 倍的物镜镜头。专用分析软件的主要技术参数应为 VCL 不小于 $5\text{ }\mu\text{m/s}$ 、VSL 不小于 $5\text{ }\mu\text{m/s}$ 、 $\text{STR}=\text{VSL}/\text{VAP}$ 不小于 25%。精子质量分析仪可读取并显示多个视野的平均值。

注 1:VCL 为精子曲线运动速度。

注 2:VSL 为精子直线运动速度。

注 3:VAP 为精子平均运动速度。

注 4:STR 为精子直线运动速度与平均运动速度的比值。

D.2.1.2 恒温载物台: $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

D.2.1.3 恒温箱: $17\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

D.2.1.4 移液器:量程小于等于 $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

D.2.1.5 专用定容玻片:腔室高度 $20\text{ }\mu\text{m}\pm 2\text{ }\mu\text{m}$ 。

D.2.2 试验步骤

a) 开启精子质量分析仪预热至少 5 分钟，安装恒温载物台（带有恒温载物台的一体化仪器不需要此步骤），开启恒温载物台电源开关，设置温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

b) 检查物镜是否转换到相差显微镜镜头，必要时应按照说明书进行物镜校准并转换光圈

模式，以达到最佳备用状态；调节显微镜光源至适宜的亮度，将低倍物镜正对载物台的通光孔，调节物镜与恒温载物台之间的最佳距离，观察视野明亮程度，通过调节聚光器，直至视野光线最佳。

- c) 将专用定容玻片置于恒温载物台上预热，预热时间应大于 1 分钟。
- d) 从恒温箱中取出待检样品，在 18~25 °C 室温条件下轻摇 2~3 分钟。若样品包装为袋装，则将空精液瓶置于恒温箱 30 分钟以上，再将袋装精液转移至精液瓶中，置于恒温箱中，待检。
- e) 保持精液瓶与视线水平，使其倾斜约 45°，将移液器的吸头伸入液面下 15 mm~20 mm 处，避开凝结絮状物，吸取 3 μL~5 μL 样品，滴于专用定容玻片进样口处，让其自行流入腔室，待检（样点 1）；用同样方法吸取 3 μL~5 μL 样品，滴于专用定容玻片另一腔室的进样口处，待检（样点 2）。
- f) 点样后预热 1~3 分钟，在 200 倍条件下，按照操作要求在 3 分钟内完成样点 1 和样点 2 的检测。
- g) 每个样点至少读取 3 个视野的数据，记录每个样点的平均值。

D.2.3 试验数据处理

精子活力按式（D.2）进行计算：

$$M = \frac{M_1 + M_2}{2}$$

..... (D.2)

- 式中：
- M —— 精子活力，%；
 - M₁ —— 仪器给出的样品平行样样点 1 检测活力的平均值，%；
 - M₂ —— 仪器给出的样品平行样样点 2 检测活力的平均值，%。

计算结果保留至小数点后 1 位。若两个样点计算结果相对偏差大于 5%，则应重检。

D.3 精子畸形率

伊红苯胺黑染色法是一种常用的精子活体染色方法，其操作过程相对简单，不需要复杂的设备或技术要求，实验操作更加便捷。

D.3.1 试剂或材料

- D.3.1.1 水：三级水。
- D.3.1.2 伊红 Y 染色液：将 0.67 g 伊红 Y 和 0.9 g 氯化钠溶于 100 mL 纯水中。

D.3.1.3 伊红苯胺黑染色液:将 10 g 苯胺黑加入 100 mL 伊红 Y 染色液中, 加热至沸腾, 然后冷却至室温, 用滤纸过滤, 储存于黑色密封玻璃瓶中。商品化试剂伊红苯胺黑染色液按说明书配制或使用。

D.3.2 试验步骤

按如下步骤进行检测:

- a) 按照 D.2 d) ~e) 规定的方法吸取 30 μL 样品和 10 μL 伊红苯胺黑染色液, 放入离心管中, 轻摇混匀, 制成精液、伊红苯胺黑染色液的混合液, 放置 30~60 秒;
- b) 用移液器吸取 10 μL 精液、伊红苯胺黑染色液的混合液, 滴于载玻片一端, 用另一边光滑的载玻片与有样品的载玻片呈约 35°夹角, 先浸润与样品接触的边缘向另一侧缓慢推动, 将样品均匀地涂抹在载玻片上, 自然风干 (约 5 分钟), 每样品制作 2 个抹片;
- c) 将染片置于 400 倍下观察, 观察顺序为从左到右, 从上到下。根据观察到的精子形态, 判定正常精子和畸形精子, 且一边观察, 一边用计数器计数, 累计观察约 200 个精子, 分别记录精子总数和畸形精子总数, 拍照保存该样品的图片。

D.3.3 精子形态判定

精子形态判定	精子形态
正常精子	头部呈椭圆形, 中部和尾部自然延伸
畸形精子	头部:大头、小头、梨形头、圆头、双头等; 尾部:原生质滴、断尾、卷尾、双尾、异常弯曲等

D.3.4 试验数据处理

畸形率按式 (D.3) 进行计算:

$$A_i = \frac{A}{A_0} \times 100 \dots\dots\dots (D.3)$$

式中:

- A_i —— 畸形率, %;
- A₀ —— 观察精子总数, 单位为个;
- A —— 观察畸形精子总数, 单位为个。

用两个平行样的平均值表述样品检测结果, 计算结果保留至小数点后 1 位。若两个平行样计算结果之间的绝对差值大于 5%, 则应重检。

D.4 细菌数

D.4.1 试剂或材料

D.4.1.1 牛肉浸膏、蛋白胨、磷酸氢二钾（ $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ ）、氯化钠（NaCl）、琼脂粉和蒸馏水。

D.4.1.2 营养琼脂培养基：取牛肉浸膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、磷酸氢二钾 1.0 g、氯化钠 5.0 g，用蒸馏水 1000 mL 溶解，加琼脂粉 20 g，加温融解。调 pH 至 7.4~7.6，并用脱脂棉过滤，分装于三角烧瓶中，高压灭菌（0.1 MPa、20 分钟）。商品化的试剂按说明书配制使用。

D.4.2 设备和器材

D.4.2.1 恒温培养箱： $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

D.4.2.2 恒温水浴锅： $46\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

D.4.2.3 天平：精度 0.001 g。

D.4.2.4 无菌操作台。

D.4.3 试验步骤

取 2 剂细管冷冻精液，在无菌操作台内，用酒精棉球将细管消毒后，将试样分别加入 2 个标记的灭菌培养皿内，将 15 mL~20 mL 冷却至 $46\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的培养基倒入培养皿，水平晃动培养皿使精液与培养基均匀混合。待琼脂凝固后翻转培养皿，置 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱内培养 48 小时取出。观察、统计每个培养皿内菌落数。应设置空白对照，若空白对照内出现菌落，应复检。

D.4.4 试验数据处理

菌落总数按式（D.4）进行计算，结果取整数：

$$N = \frac{n_1 + n_2}{2} \dots\dots\dots (D.4)$$

N —— 样品中的菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

n_1 —— 第一培养皿菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）；

n_2 —— 第二培养皿菌落数，单位为菌落形成单位（CFU）。

五、与国内同类标准技术内容的对比及创新情况

（一）与国内同类标准的比较

本标准与国内同类标准的比较情况见附表 1。

（二）主要技术创新点

1、对预稀释液和 I 液（冷藏保护液）配方的主要成分进行了改进。改进后的配制方法具有操作简便、冷冻精液质量高等特点，利于减少操作误差，便于实现猪冷冻精液生产标准化，提升产品质量。

2、设置了详细的精液离心与稀释的计算方法。依据不同的生产情况，可通过本标准设置的计算方法快速得出精液冷藏保护液（I 液）和冷冻保护液（II 液）的添加量，利于猪冷冻精液生产标准化，切实保障产品质量。

六、与有关的现行法律法规和强制性国家标准的关系

本标准符合《标准化法》、《产品质量法》、《中华人民共和国畜牧法》和《中华人民共和国畜禽遗传资源进出境和对外合作研究利用审批办法》等现行法律法规，与现行法律法规要求一致。本标准为推荐性团体标准

七、重大分歧意见的处理经过和依据

本标准制定过程中无重大分歧意见。

八、涉及专利的有关说明

本标准制定过程中无涉及专利。

九、贯彻标准的要求和措施建议

建议该标准颁布实施后，在团体内及时宣传贯彻，规范猪冷冻精液的生产和使用，确保产品质量安全和养殖业健康

发展。团体以外的单位也可以推广使用。

十、其他应当说明的事项

本标准没有需要说明其他事项。

附表 1: 本标准与国内同类标准的比较情况。

附表1 本标准与国内同类标准的比较情况

原精质量要求						
	外观	气味	采精量 / mL	活力 / %	密度/ (10 ⁸ 个/mL)	畸形率 / %
本标准	乳白色 均匀一致	略腥 无异味	≥ 100	≥ 70	≥ 1	≤ 20
DB43/T 2472-2022 (湖南省) 猪冷冻精液	/	/	/	/	/	/
DB41/T 2371-2022 (河南省) 猪冷冻精液生产技术规范	乳白色 均匀一致	略腥 无异味	≥ 100	≥ 70	≥ 1	/
DB62/T 4474-2021 (甘肃省) 猪冷冻精液生产操作规程	乳白	/	/	≥ 80	≥ 2	/
DB13/T 2633-2017 (河北省) 猪冷冻精液	灰白/乳白	/	/	≥ 74	≥ 2	≤ 5
DB36/T 1367-2020 (江西省) 猪冷冻精液生产操作规程	淡乳白/灰白 均匀一致 无杂质	略腥 无异味	/	≥ 70	≥ 1	≤ 15
猪精液冷冻方法						

	程序冷冻	熏蒸冷冻
本标准	在灌装的同时开启程序冷冻仪，选定冷冻曲线，待冷冻仪温度稳定在初始温度（4~5℃）后，迅速将摆放好细管的托架放入冷冻室中，启动冷冻程序。待冷冻曲线走完后，将托架迅速取出放入装有液氮的泡沫箱中，液氮深度至少浸没所有细管。	将液氮倒入深度 50 厘米以上的专用冷冻箱预冷 10 分钟，保持冷冻支架上的细管在液氮面之上 3 厘米，盖上冷冻箱盖子熏蒸冷冻 10 分钟，最后将冷冻样品浸入液氮中。
DB43/T 2472-2022（湖南省） 猪冷冻精液	/	/
DB41/T 2371-2022（河南省） 猪冷冻精液生产技术规范	在灌装的同时开启程序冷冻仪，选定冷冻曲线，待冷冻仪温度稳定在初始温度：（4℃~5℃）后，迅速将摆放好细管的托架放入冷冻室中，启动冷冻程序。待冷冻曲线走完后，将托架迅速取出放入装有液氮的泡沫箱中，液氮深度至少浸没所有细管	将液氮倒入深度 50 cm 以上的专用冷冻箱预冷 10 min，保持冷冻支架上的细管在液氮面之上 2 cm，熏蒸冷冻 8 min，最后将冷冻样品浸入液氮中
DB62/T 4474-2021（甘肃省） 猪冷冻精液生产技术规程	/	在冷冻槽中注入液氮，将平衡后的细管精液置于冷冻架上放入冷冻槽中，距离液氮面 7 cm，保持冷冻温度在-100℃~-120℃；熏蒸冷冻 8 min,取出放入液氮中
DB13/T 2633-2017（河北省）	/	/

猪冷冻精液		
DB36/T 1367-2020（江西省） 猪冷冻精液生产技术操作规程	在程控冷冻仪的冷冻柜里，设置每分钟下降 30℃的速度填充液氮至-196℃	将液氮倒入深度 50 cm 以上的专用冷冻箱预冷 10 min，保持冷冻支架高于液氮面 2 cm、熏蒸冷冻 8 min
猪冷冻精液抽检与解冻方法		
本标准	每份原精液制作的细管冻精至少抽取 3 支进行检测。细管从液氮罐中取出后在空气中停留 2~3 秒，迅速置于 50℃水浴中解冻 16 秒，擦干表面水分后，将精液移入 5 mL 离心管中，用预热到 37℃的解冻稀释液作 10 倍稀释。在 37℃水浴中维持 10~15 分钟，然后在显微镜下检测解冻后精子活力，如活力合格，即可将冻精转入液氮罐中长期保存。	
DB43/T 2472-2022（湖南省） 猪冷冻精液	取 1 支细管冷冻精液置于 50℃恒温水浴中解冻 15 s，与稀释液混合后，抽精液约 10 μL 置于预热到 38℃的载玻片上加盖玻片，用精子质量分析系统（CASA）检测分析，也可用 200 X 显微镜观察活力，每样片观察 3 个视野，并应观察不同液层内的精子运动状态，进行全面评定。检验有效时限为解冻后 2 min~10 min	
DB41/T 2371-2022（河南省） 猪冷冻精液生产技术规范	每份原精液制作的细管冻精至少抽取 3 支进行检测。细管从液氮罐中取出后在空气中停留 2 s~3 s，迅速置于 50℃水浴中解冻 16 s，擦干表面水分后，将精液移入 5 mL 离心管中，用预热到 37℃的解冻稀释液作 10 倍稀释。在 37℃水浴中维持 10 min~15 min，然后在显微镜下检测解冻后精子活力，如活力合格，即可将冻精转入液氮罐中长期保存	
DB62/T 4474-2021（甘肃省） 猪冷冻精液生产规程	将冷冻精液置于 36℃ ± 1℃水浴中，解冻时间 15 s~20 s	

DB13/T 2633-2017（河北省） 猪冷冻精液	三支细管分别直接置于 50℃恒温水浴中解冻 16 s，解冻三支混合精液后，取精液约 50 μL 置于载玻片上加盖玻片，立即放在载物台上，温度保持 37℃，用 200 X~400 X 显微镜观察活力，也可通过电视显微装置在荧光屏上观察活力。每样片观察 3 个视野，并应观察不同液层内的精子运动状态，进行全面评定。检验有效时限为解冻后 5 min ~ 60 min				
DB36/T 1367-2020（江西省） 猪冷冻精液生产技术操作规程	解冻液预热至 26℃。从液氮罐中快速取出 2 支 ~3 支细管精液，放至 38℃水浴锅中 15 s 或 50℃水浴锅中 7 s 解冻。剪开细管精液封口端，挤入数滴精液至 1 mL 解冻液中，搅匀，回温到 37℃，静置 20 min				
解冻后精液质量要求					
	直线运动精子数	细菌数	活力 / %	密度/（10 ⁸ 个/mL）	畸形率 / %
本标准	/	≤ 1000 CFU/mL	≥ 40	/	≤ 20
DB43/T 2472-2022（湖南省） 猪冷冻精液	≥ 0.6 × 10 ⁸ 个/剂 （0.5 mL 剂型）	≤ 500 CFU/mL （0.5 mL 剂型）	≥ 60	/	≤ 20
DB41/T 2371-2022（河南省） 猪冷冻精液生产技术规范	/	≤ 1600 个/mL	≥ 40	/	≤ 20
DB62/T 4474-2021（甘肃省） 猪冷冻精液生产规程	/	/	≥ 60	/	/
DB13/T 2633-2017（河北省） 猪冷冻精液	> 1.8 亿个	≤ 800 个	≥ 60	/	≤ 20

DB36/T 1367-2020（江西省） 猪冷冻精液生产技术操作规程	/	≤ 800 CFU/mL	≥ 30	$\geq 4 \times 10^8$ 个/mL	≤ 18
--	---	-------------------	-----------	---------------------------	-----------