

NY

中华人民共和国农业行业标准

NY/T XXXXX—XXXX

鸡冷冻精液生产技术规范

Technical specification for chicken frozen semen production

公开征求意见稿

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

中华人民共和国农业农村部

发布

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工作规则》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。

本文件由中华人民共和国农业农村部种业管理司提出。

本文件由全国畜牧业标准化技术委员会（SAC/TC 274）归口。

本文件起草单位：XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX、XXXX。

本文件主要起草人：XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX、XXX。

鸡冷冻精液生产技术规范

1 范围

本文件规定了鸡冷冻精液生产的准备工作、精液采集与品质检测、精液平衡与冷冻保护、精液灌装与码放、精液冷冻、冻精质量评定、冻精的标识与包装、冻精的贮存与运输和记录的要求。

本文件适用于鸡冻精生产。

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 25172 猪常温精液生产与保存技术规范
GB/T 30396 牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输
GB/T 40454 家禽孵化良好生产规范
NY/T 823 家禽生产性能名词术语和度量计算方法
NY/T 1234 牛冷冻精液生产技术规程
NY/T 3458 种鸡人工授精技术规程
NY/T 4047 家禽精液品质检测方法

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

冷冻精液 frozen semen

冻精

经特定方法处理后，在液氮（-196℃）中可长期保存受精能力的精液。

3.2

平衡 equilibrium

稀释后的精液放置在特定环境条件下静置一段时间，使得精子内外液体在温度、水分、冷冻保护剂、电解质、渗透压和酸碱度等方面达到一种稳定状态的过程。

3.3

细管 straw

由聚乙烯复合材料制成，容积为0.25 mL或0.50 mL，分装精液用于冻精生产的塑料管。

[来源：NY/T 1234-2018，3.5，有修改]

3.4

贮精管 goblet

一端封闭另一端开口的用于贮存细管冻精的柱形器材。

[来源：GB/T 30396-2013，3.5，有修改]

3.5

精子密度 sperm concentration

单位体积精液中的精子数。

注：单位为 10^8 个/mL。

[来源：GB/T 25172-2020，3.4，有修改]

3.6

精子活力 sperm motility

在 37°C 环境下前向运动精子数占总精子数的百分率。

[来源：GB 4143-2022，3.1，有修改]

4 准备工作

4.1 主要设备、器具与耗材

4.1.1 主要设备、器具与耗材的准备见附录 A。

4.1.2 鸡精液接触的所有用具的使用遵循等温原则，进行预热或者预冷。

4.1.3 计量器具（如温度计、电子天平、量筒、移液器）、金属浴/水浴装置、显微镜恒温载物台等应按照规定时间进行检定或校准。

4.1.4 器具与耗材的清洗和消毒操作应按照 NY/T 1234 和 NY/T 3458 的规定执行。

4.2 精液稀释液和冷冻保护液

4.2.1 按照附录 B 配制、保存稀释液和冷冻保护液。

4.2.2 使用时遵循等温原则，进行预热或者预冷。

4.3 公鸡挑选与采精训练

按照 NY/T 3458 的方法进行公鸡挑选和采精训练。

4.4 操作环境

4.4.1 应避免污染。

4.4.2 冻精制作室环境温度宜为 3°C ~ 5°C；如不满足，可在室温条件下在 3°C ~ 5°C 的冰箱或者低温柜中进行鸡冻精制作。

5 精液采集

5.1 采精前准备

5.1.1 准备洁净无菌的离心管和精液稀释液，预热至 37°C 左右。

5.2 采精

5.2.1 按照 NY/T 3458 的方法采集精液到离心管中。

6 精液品质检测

6.1 检测项目

感观、精液量、精子密度和精子活力。

6.2 检测方法

按照 NY/T 4047 的方法进行检测。

6.3 原精液品质要求

应符合表 1 的规定，其中任何一项不符合要求的则废弃。

表 1 原精液品质要求

项目	指标
感官	呈乳白色，无血液、羽毛、粪便、尿酸盐或炎性分泌物
精液量/mL	≥ 0.2
精子密度/(10^8 个/mL)	≥ 20
精子活力/%	≥ 60

7 稀释与第一次平衡

7.1 精液采集后应立刻进行稀释，精液与精液稀释液的温差不得超过 1°C ，应根据精液温度调节稀释液温度，不得反向操作。

7.2 将与精液等体积的稀释液缓慢加入精液中，轻轻混匀，在 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 环境下平衡 20 min ~ 30 min。

8 冷冻保护液的添加与第二次平衡

8.1 将与稀释精液等体积的 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 预冷的冷冻保护液缓慢加入稀释精液中，轻轻混匀，在 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 环境下平衡 10 min ~ 15 min。

9 精液灌装与码放

9.1 灌装

9.1.1 人工灌装

握住细管棉塞端，细管另一端插入待灌装精液中，用注射器等连接棉塞端吸取精液进入细管，在细管中间段留 1.0 cm 左右空气柱，宜采用封口粉封口。或通过移液器直接吸取精液从细管封口端进行灌装，在封口端留约 1.0 cm 左右空气柱，宜采用热熔、超声波等封口。封口前应擦干细管外壁残留液体。

9.1.2 机械全自动/半自动灌装

使用机械全自动或半自动细管精液灌装机灌装时，按仪器说明书进行操作。

9.2 码放

将细管方向一致、均匀码放于细管码架上， $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ 暂存。

10 精液冷冻

10.1 程序冷冻仪法

按仪器说明书进行操作，将码放好的细管置于已预冷至 4°C 的程序冷冻仪冷冻室内，采用以下冷冻程序进行冷冻： $12^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率从 4°C 下降到 -44°C （降温时间约 4 min），再以 $40^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率从 -44°C 下降到 -120°C （降温时间约 2 min）。冷冻程序结束后将细管立即浸入液氮中。

10.2 液氮熏蒸法

10.2.1 提前 10 min 以上将液氮倒入用于熏蒸细管的泡沫箱、不锈钢箱等容器，液氮深度宜为 3 cm ~ 4 cm。

10.2.2 将码放好的细管置于液氮面之上 3 cm ~ 5 cm，盖上容器盖，静置 5 min 后将细管迅速浸入液氮中。

11 冻精质量评定

11.1 冻精解冻

- 11.1.1 将细管冻精从液氮中取出，迅速浸没在 3℃～5℃水浴中，解冻 2 min～3 min 至冻精完全融化。
- 11.1.2 取出细管，擦干表面水珠，剪去封口端，用细管推针从棉塞端将精液推至试管或离心管内，3℃～5℃暂存。

11.2 质量检测

11.2.1 检测项目

剂量、感官、精子密度、精子活力、受精率和受精蛋孵化率。

11.2.2 检测方法

按照 NY/T 4047 的方法检测解冻精液剂量、感官、精子密度和精子活力。按照附录 C 检测受精率和受精蛋孵化率。

11.2.3 解冻精液质量要求

解冻精液质量应符合表 2 要求。

表 2 解冻精液质量要求

项目	指标
剂量	0.50 mL 细管：≥ 0.45 mL；0.25 mL 细管：≥ 0.18 mL
感官	呈乳白色，无血液、羽毛、粪便、尿酸盐或炎性分泌物
精子密度/(10 ⁸ 个/mL)	≥ 5
精子活力/%	≥ 30
受精率/%	≥ 40
受精蛋孵化率/%	≥ 80

12 标识与包装

12.1 细管与细管标识

细管封口严密，细管的管壁上应标识品种及来源、制作日期和制作单位等信息，字迹应清晰易认。

12.2 包装与包装标识

细管先用贮精管分装，再用灭菌纱布袋或其他器皿包装，其上标识品种及来源、制作日期和制作单位等信息，字迹应清晰易认。

13 贮存与运输

应符合GB/T 30396—2013中第7章、第8章要求。

14 记录

详细记录冻精的制作日期、制作人员、品种及来源、精液采集、原精液品质检测、制作冻精数量和解冻精液质量等信息。

附录 A

(资料性)

鸡冻精生产需要的主要设备、器具与耗材

A.1 鸡冻精生产需要的主要设备见表 A.1。

表A.1 鸡冻精生产需要的主要设备

名 称	规格或主要技术参数	用 途
显微镜或计算机辅助精子分析仪	配有恒温载物台和相差物镜（20×和 40×）	检测精子活力、精子密度等精液品质
精子密度仪	—	测定原精液、解冻精液的精子密度
细管精液分装机	全自动/半自动	细管精液灌装
程序冷冻仪	温度控制范围 40℃～-150℃，降温速率范围 0.5℃/min～40℃/min	精液冷冻
低温离心机	控温精度±1℃	冻精解冻后离心移除甘油
恒温水浴锅或金属浴	控温精度±1℃	等温精液与稀释液
渗透压测定仪	0 mOsm/kg～2000 mOsm/kg	测定精液稀释液和冷冻保护液基础液渗透压
高压灭菌锅	工作蒸汽 120 kPa	消毒相关器具和耗材
pH 计	测量范围 0.1～14.0，精度±0.1	测定精液、稀释液的 pH 值
恒温干燥箱	室温+5℃～250℃，波动度 ≤±2℃	预热器皿和消毒用品
冰箱	冷藏室 3℃～5℃，冷冻室-20℃	冻精制作时提供低温环境和保存稀释液
低温柜	可控温在 3℃～5℃	冻精制作时提供低温环境
电子天平	量程 0 g～200 g，精度 0.001 g	称量化学试剂
液相或气相液氮罐	大口径	贮存冻精
磁力搅拌器	恒温、可调速	稀释液、冷冻保护液等配制时混匀

A.2 鸡冻精生产需要的主要器具见表 A.2。

表A.2 鸡冻精生产需要的主要器具

名 称	规格（技术参数）	用 途
微量移液器	0 μL～10 μL、0 μL～20 μL、0 μL～1000 μL	吸取精液和试剂等
细管精液码架和搓板	—	细管码放
血球计数板	—	检测精子密度
保温箱（桶）	—	暂存和运输稀释后的精液
温度计	量程 0℃～50℃	温度测定
输精枪或输精胶头滴管	鸡输精专用	输精
镊子	—	液氮中操作细管等

剪刀	—	解冻后剪细管封口端
计时器	—	平衡过程等的计时

A.3 鸡冻精生产需要的主要耗材见表 A.3。

表A.3 鸡冻精生产需要的主要耗材

名 称	规格（技术参数）	用 途
离心管	玻璃或塑料制，无菌	盛装精液
细管	0.25 mL 或 0.50 mL，管体厚薄均匀一致，在常温至超低温（-196℃）环境下不变形、不破裂	分装用于冷冻的精液
贮精管	管体厚薄均匀一致，在常温至超低温（-196℃）环境下不变形、不破裂	分装细管
细管推针	耐高温消毒	将细管中解冻精液推出
纱布袋或其他容器	耐受液氮低温	包装贮精管
棉线	—	联结纱布袋
液氮	—	精液冷冻与冻精保存
封口粉	—	细管封口
载玻片	26 mm × 76 mm	检测精子活力
血盖片	20 mm × 26 mm × 0.5 mm	检测精子密度
盖玻片	22 mm × 22 mm	检测精子活力
记号笔	—	标识离心管、纱布袋等

附录 B

(规范性)

稀释液、冷冻保护液的配制与保存

B.1 稀释液配方

稀释液配方（100 mL）：葡萄糖0.60 g、L-谷氨酸钠1.52 g、柠檬酸钾0.13 g、乙酸镁0.08 g、N，N-双（2-羟乙基）-2-氨基乙磺酸3.05 g。

B.2 稀释液配制方法

准确称取配方中试剂，加80 mL左右双蒸馏水或超纯净水，用磁力搅拌器搅拌使其充分溶解。用1 M ~ 3 M氢氧化钠调节pH至7.0 ~ 7.4，定容至100 mL。检测渗透压应为340 mOsm/kg ~ 390 mOsm/kg。高压蒸汽灭菌（120 kPa，15 min）。

B.3 冷冻保护液配方

冷冻保护液基础液配方（100 mL）：葡萄糖0.80 g、L-谷氨酸钠1.92 g、乙酸镁0.08 g、乙酸钾0.50 g、聚乙烯吡咯烷酮0.30 g。

冷冻保护液配方（100 mL）：冷冻保护液基础液88 mL，甘油12 mL。

B.4 冷冻保护液配制方法

准确称取冷冻保护液基础液配方中试剂，加80 mL左右双蒸馏水或超纯净水，用磁力搅拌器搅拌使其充分溶解，用1 M ~ 3 M氢氧化钠调节pH至7.0 ~ 7.4，定容至100 mL。检测渗透压应为340 mOsm/kg ~ 390 mOsm/kg。高压蒸汽灭菌（120 kPa，15 min）。量取冷冻保护液基础液88 mL加甘油12 mL，用磁力搅拌器搅拌使其充分混匀。现用现配。

B.5 稀释液和冷冻保护液的保存

盛装稀释液和冷冻保护液基础液的容器应作明显标识，在3°C ~ 5°C或-20°C以下保存。3°C ~ 5°C保存不应超过24 h，-20°C保存解冻的稀释液和冷冻保护液基础液不应二次冷冻。

注：所有化学试剂为分析纯以上。临用前，每100 mL稀释液和冷冻保护液添加青霉素、链霉素各10万IU。

附录 C

(规范性)

鸡冻精受精率和孵化率检测

C.1 冻精的解冻和甘油移除

冻精按照9.1解冻。依次加入原解冻冻精体积0.04倍, 0.09倍, 0.17倍, 0.30倍, 0.62倍和0.79倍的3℃~5℃预冷稀释液(配方见B.1), 每次加入后轻轻混匀, 间隔2 min。将稀释后的精液以600 g 在3℃~5℃低温离心机离心10 min。用移液器移除含有甘油的上清液, 保留精子沉淀。

C.2 精液稀释

向上述精子沉淀中加入适量3℃~5℃预冷的稀释液, 轻轻混匀, 3℃~5℃暂存。

C.3 人工输精

每只母鸡输精量为0.1 mL~0.2 mL, 含有前向运动精子数 1×10^7 个左右, 输精深度为距离泄殖腔3 cm~4 cm。前2次每天输精一次, 随后每隔3 d~4 d输精一次, 总输精次数宜为4次~5次。其他应按照NY/T 3458-2019第7章的要求执行。

C.4 种蛋收集与受精率和受精蛋孵化率检测

第一次输精24 h后开始收集种蛋, 最后一次输精4 d后停止收集种蛋。收集的种蛋按照GB/T 40454进行孵化。按照NY/T 823的方法检测受精率和受精蛋孵化率。

参 考 文 献

- [1] GB 4143—2022 牛冷冻精液
-