



中华人民共和国国家标准

GB 4143—2008
代替 GB/T 4143—1984

牛 冷 冻 精 液

Frozen bovine semen

2008-06-27 发布

2009-01-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

目 次

前言	V
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 要求	1
4.1 种公牛	1
4.2 新鲜精液	2
4.3 冻精外观	2
4.4 剂型、剂量	2
4.5 每剂量冻精解冻后	2
4.5.1 精子活力	2
4.5.2 前进运动精子数	2
4.5.3 精子畸形率	2
4.5.4 细菌数	2
5 抽样	2
5.1 抽样检验方案	2
5.1.1 生产方抽样检验	2
5.1.2 质量监督抽样检验	2
5.1.3 复检和仲裁抽样检验	2
5.2 抽样方法	2
6 试验方法	2
6.1 外观	2
6.2 剂量	2
6.3 解冻后每剂量精液	2
6.4 检验分类	2
6.4.1 常规检验	2
6.4.2 型式检验	2
6.5 检验项目	3
6.5.1 常规检验	3
6.5.2 型式检验	3
7 判定规则	3
7.1 常规检验	3
7.2 型式检验	3
7.3 抽样检验对群体质量水平的评定	3
7.3.1 生产方抽样检验	3
7.3.2 质量监督抽样检验	3
8 标志、包装	3
8.1 标志	3

8.1.1 品种	3
8.1.2 内容	3
8.2 包装	3
附录 A(规范性附录) 群体公牛冻精质量监督抽样检验程序	4
A.1 导言	4
A.2 质量监督抽样检验程序	4
A.2.1 确定监督总体	4
A.2.2 确定冻精产品的质量特性	4
A.2.3 不合格品的分类	4
A.2.4 规定监督质量水平	4
A.2.5 规定监督检验等级	4
A.2.6 检索监督抽样方案	4
A.2.7 抽取样本	4
A.2.8 检验样本	4
A.2.9 判断监督总体该群体公牛(冻精)是否可通过	4
A.2.10 应用实例	4
A.2.11 监督抽样方案的通过概率与检验功效	4
附录 B(规范性附录) 牛冷冻精液质量检验方法	5
B.1 抽样	5
B.1.1 样品的收集	5
B.1.2 抽样方案	5
B.1.2.1 生产方抽样检验	5
B.1.2.2 质量监督抽样检验	5
B.1.2.3 抽样方法	5
B.1.2.4 全部取样	5
B.1.3 取样方法	5
B.1.4 样品的保存	5
B.2 剂量检查	5
B.2.1 主要器材	5
B.2.2 检查方法	5
B.2.3 计算	5
B.3 精子活力检查	6
B.3.1 主要器材	6
B.3.2 检查方法	6
B.3.3 计算	6
B.4 每剂量前进运动精子数检查	6
B.4.1 主要器材	6
B.4.2 检查方法	6
B.4.3 计算	6
B.5 精子畸形率的检查	6
B.5.1 主要器材	6
B.5.2 试剂配制	7
B.5.3 制片、染色、镜检、计算	7

B.6 细菌数的检查	8
B.6.1 主要器材	8
B.6.2 培养基的配制	8
B.6.3 检查方法	8
B.6.4 计算	8
附录 C(规范性附录) 种公牛的品种代号	9
C.1 导言	9
C.2 原则和方法	9
C.3 种公牛品种代号	9

前 言

本标准中第 4 章是强制性的,其余为推荐性。

本标准与 GB/T 4143—1984 相比主要变化如下:

- 增加了适用对象(1984 年版的引言;本版的第 1 章第 2 段);
- 增加了规范性引用文件(见第 2 章);
- 增加了术语和定义,并有中、英文对照(见第 3 章);
- 增加了抽样(见第 5 章);
- 增加了试验方法(见第 6 章);
- 增加了判定规则(见第 7 章);
- 修改了规格与质量(1984 年版的第 1 章;本版的第 4 章);
- 修改了检查方法(1984 年版的第 3 章;本版的附录 B);
- 修改了种公牛品种代号(1984 年版的 5.2.2;本版的附录 C);
- 删除了牛冷冻精液的制作程序和使用方法(1984 年版的第 2 章和第 4 章);
- 增加了规范性附录“群体公牛冻精质量监督抽样检验程序”(见 5.1.2 和附录 A);
- 增加引用了 GB/T 15239—1994《孤立批计数抽样检验程序及抽样表》,对于其中 A_c ——合格判定数, R_e ——不合格判定数的表述,现引用 GB/T 2828.1—2003《计数抽样检验程序 第 1 部分:按接收质量限(AQL)检索的逐批检验抽样计划》中的表述, A_c ——接收数, R_e ——拒收数, d ——样本中的不合格数(见 5.1.1 和 7.3.1)。

本标准的附录 A、附录 B 和附录 C 均为规范性附录。

本标准由中华人民共和国农业部提出。

本标准由全国畜牧业标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(南京)、全国畜牧兽医总站、农业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:金穗华、徐桂芳、陆汉希、张晓霞、刘长春、黄文佳、刘桂霞。

本标准委托农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(南京)负责解释。

牛 冷 冻 精 液

1 范围

本标准规定了牛冷冻精液的命名、技术要求、抽样、试验方法、判定规则和标志及包装。

本标准适用于各品种牛的冷冻精液产品,以下简称冻精。

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 2828.1—2003 计数抽样检验程序 第1部分:按接收质量限(AQL)检索的逐批检验抽样计划(ISO 2859-1:1999, IDT)

GB/T 4789.2—2003 食品卫生微生物学检验 菌落总数测定

GB/T 5458—1997 液氮生物容器

GB/T 15239—1994 孤立批计数抽样检验程序及抽样表

GB/T 15482—1995 产品质量监督小总体计数一次抽样检验程序及抽样表

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

前进运动精子数 progressive motility

每剂量精液中呈前进运动的精子数。

3.2

精子活力 sperm motility

在 37℃ 环境下前进运动精子占总精子数的百分率。

3.3

精子畸形率 abnormal sperm percentage

畸形精子占总精子数的百分率。

3.4

细菌数 bacteria count

每剂量精液经培养后观察到的细菌菌落数。

3.5

冷冻精液 frozen semen

经特殊方法处理的精液超低温冷冻后在液氮中(−196℃)长期保存。

4 要求

4.1 种公牛

应具有种用价值,外貌评价为特等或一等,体质健康,无遗传病,不允许有已发布的动物防疫法中所明确的二类疫病中的任何一种病。

4.2 新鲜精液

色泽乳白色或淡黄色。精子活力 $\geq 65\%$,精子密度 $\geq 6 \times 10^8$ 个/mL,精子畸形率 $\leq 15\%$ 。

4.3 冻精外观

细管无裂痕,两端封口严密。

4.4 剂型、剂量

细管冻精:微型 ≥ 0.18 mL;中型 ≥ 0.40 mL。

4.5 每剂量冻精解冻后

4.5.1 精子活力

$\geq 35\%$ (即 ≥ 0.35),水牛 $\geq 30\%$ (即 ≥ 0.30)。

4.5.2 前进运动精子数

≥ 800 万个,水牛 $\geq 1\,000$ 万个。

4.5.3 精子畸形率

$\leq 18\%$,水牛 $\leq 20\%$ 。

4.5.4 细菌数

≤ 800 个。

5 抽样

5.1 抽样检验方案

5.1.1 生产方抽样检验

生产方和使用方为质量保证概率把关,按照 GB/T 15239—1994 中的第 5 章,采用 LQ=8.0、模式 A 抽样方案检索一次抽样方案,确定抽样公牛样本量。

5.1.2 质量监督抽样检验

质量监督抽样检验按照 GB/T 15482—1995 中的第 5 章,该群体公牛为一监督总体,采用 $D_0=10$,选用第二检验等级的抽样方案,确定抽检公牛的样本量,抽样检验程序见附录 A。

5.1.3 复检和仲裁抽样检验

复检可根据原抽样方案确定,仲裁需抽检按照 5.1.2 规定的方案和 7.3.2 评定。

5.2 抽样方法

抽样方法见 B.1.2.3 和 B.1.3。

6 试验方法

6.1 外观

用目测法,其结果应符合 4.3 的规定。

6.2 剂量

检验按第 B.2 章的方法,其结果应符合 4.4 的规定。

6.3 解冻后每剂量精液

解冻方法及精子活力、前进运动精子数、精子畸形率、细菌数的检验按照第 B.3 章~第 B.6 章规定的方法,其结果应分别符合 4.5.1、4.5.2、4.5.3、4.5.4 的规定。

6.4 检验分类

6.4.1 常规检验

对冻精的单项目检验是型式检验的一部分,主要是在生产批入库前和销出站时的检验。

6.4.2 型式检验

对冻精全部项目检验,评定产品质量是否全面符合标准,也是在生产方抽样检验、仲裁和质量监督抽样检验时选定项的检验。

6.5 检验项目

6.5.1 常规检验

本标准中 4.3 和 4.5.1 规定。

6.5.2 型式检验

本标准中 4.3~4.5 规定。

7 判定规则

7.1 常规检验

样品中任何一项目检验未达到本标准中要求的规定,则判为不合格。

7.2 型式检验

样品中任何一项目检验未达到本标准中要求的规定,则判为不合格。

7.3 抽样检验对群体质量水平的评定

7.3.1 生产方抽样检验

引用 GB/T 2828.1—2003 第 3 章中 A_c ——接收数, R_e ——拒收数, d ——不合格品数。

生产方抽样检验按照 GB/T 15239—1994 中 5.11 的规定,通过对样本检验,若样本中不合格品数 $d \leq A_c$,则判可接收,样本中不合格品数 $d \geq R_e$,则判不可接收。

7.3.2 质量监督抽样检验

按照 GB/T 15482—1995 中的规定,在样本中 $d < r$ (不通过判定数),则判为可通过; $d \geq r$,则判为不可通过。群体公牛冻精质量监督抽样检验程序见附录 A。

8 标志、包装

8.1 标志

8.1.1 品种

种公牛的品种以代号表示,具体遵照附录 C 的规定。

8.1.2 内容

细管冻精应在管壁(或包装袋)上印制以下内容,并且印制标识要清楚:

- a) 生产站名;
- b) 公牛品种;
- c) 公牛号;
- d) 生产日期或批次。

8.2 包装

料管或灭菌纱布袋,每一包装量不得超过 100 份。

附录 A

(规范性附录)

群体公牛冻精质量监督抽样检验程序

A.1 引言

本附录给出牛冷冻精液质量监督抽样检验程序,对此特定对象产品,在质量监督时通过抽样检验是对在群公牛冻精质量评价。

A.2 质量监督抽样检验程序

A.2.1 确定监督总体

所确定的监督总体是一群公牛,监督总体中的产品是该群体中公牛(冻精),每头公牛一个生产批的冻精为每一单位产品。

A.2.2 确定冻精产品的质量特性

冻精产品的质量应符合 4.4~4.5 的规定。

A.2.3 不合格品的分类

按照标准规定对冻精不合格品不区分类别。

A.2.4 规定监督质量水平

按照 5.1.2 规定监督质量水平 $D_0 = 10$ 。

A.2.5 规定监督检验等级

监督检验等级越高,检验的功效越高,本标准选定第二检验等级。

A.2.6 检索监督抽样方案

在 GB/T 15482—1995 表 2 中由监督总体量 N 所在列和规定的监督质量水平 D_0 所在行的相交处读出监督抽样方案,若相交处为箭头,则沿箭头方向,读出第一个抽样方案。当监督总体量介于某两数之间时,应使用其中较大者确定抽样方案。

A.2.7 抽取样本

根据公牛样本量按 4.2.3 和 B.1.5 抽取公牛冻精样品。

A.2.8 检验样本

按照 4.4~4.5 中的检验项目和附录 B 规定的检验方法及样品合格与否判别准则,逐一检验样本中的每一个样品,并统计被检样本中的不合格品数。

A.2.9 判断监督总体该群体公牛(冻精)是否可通过

根据监督质量水平和监督检验等级确定监督抽样方案后,按 GB/T 15482—1995 中 5.9 的规定检验样本结果在样本中不合格品数 d 不小于不通过判定数 r ,即 $d \geq r$,则判该监督总体为不可通过;样本中不合格品数 d 小于不通过判定数 r ,即 $d < r$,则判该监督总体为可通过。

A.2.10 应用实例

质量监督抽样检验评价有一群 50 头公牛(冻精)产品,用监督质量水平 $D_0 = 10$ 、第二监督检验等级的抽样方案,在表 2 中 $N = 50$ 的列和 $D_0 = 5$ 的行查得所需抽样方案为 $n = 4, r = 2$ 。从监督总体(该群公牛)中随机抽取 4 头公牛(冻精)样品检验,若其中不合格公牛(冻精)的数小于 2,即 $d < r$,则判该群体公牛(冻精)可通过;若其中不合格公牛(冻精)的数不小于 2,即 $d \geq r$,则判该群体公牛(冻精)不通过。

A.2.11 监督抽样方案的通过概率与检验功效

对监督抽样方案的通过概率与检验功效按照 GB/T 15482—1995 中的第 6 章执行。

附 录 B
(规范性附录)
牛冷冻精液质量检验方法

本附录给出了通用的牛冷冻精液质量检验方法。

B.1 抽样

B.1.1 样品的收集

抽样:从受检单位精液贮存容器中按规定随机抽取样品。

送样:生产、使用单位将抽取的样品送至检验机构。

B.1.2 抽样方案

B.1.2.1 生产方抽样检验

按本标准 5.1.1 确定样本数。

B.1.2.2 质量监督抽样检验

按本标准 5.1.2 确定样本数。

B.1.2.3 抽样方法

按牛号顺序排列,由抽样人员现场按样本头数随机确定各样品公牛。

B.1.2.4 全部取样

对已投产的每头公牛取样。

B.1.3 取样方法

对确定取样的公牛,从其冻精贮存容器中随机抽取一个包装量(不得少于 25 份)的冻精。

B.1.4 样品的保存

存放冷冻精液的低温容器质量应符合 GB/T 5458—1997 规定,使用前经过清洗后加入新鲜液氮,样品浸在液氮中。取冻样品时在空中暴露时间不得超过 10 s。由专人保管样品,样品不允许脱离液氮,抽样登记单与样品瓶、样品包装、标记应保持一致。

B.2 剂量检查

B.2.1 主要器材

小试管、剪刀。

B.2.2 检查方法

取三支细管冻精自然解冻后剪去两端,把精液倒入一小试管内,用 1.0 mL 吸管准确吸取精液,并检测其精液量。

B.2.3 计算

三支冻精的剂量平均数为样品的剂量,按式(B.1)计算:

$$Q = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{3} \quad \dots\dots\dots (B.1)$$

式中:

Q——剂量值,单位为毫升(mL);

n_1 ——第一支样品剂量,单位为毫升(mL);

n_2 ——第二支样品剂量,单位为毫升(mL);

n_3 ——第三支样品剂量,单位为毫升(mL)。

B.3 精子活力检查

B.3.1 主要器材

显微镜或电视显微装置、恒温水浴箱、5.0 mL 试管、载玻片或精液性状板、盖玻片(18×18)、显微镜保温箱或恒温装置、滴管。

B.3.2 检查方法

三支细管分别直接置于 37 ℃ 水浴中解冻,取解冻三支混合后精液约 50 μL 置于载玻片上加盖玻片,立即在载物台温度保持 38 ℃ 的情况下用 200 倍~400 倍显微镜观察活力,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。

B.3.3 计算

三个视野活力评价值的平均数按式(B.2)计算:

$$M = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{3} \dots\dots\dots (B.2)$$

式中:

M ——活力;

n_1 ——第一视野活力;

n_2 ——第二视野活力;

n_3 ——第三视野活力。

B.4 每剂量前进运动精子数检查

B.4.1 主要器材

血球计数板、血色素管、1 mL 吸管、小试管、计数器、显微镜或电视显微装置、滴管、3.0%氯化钠溶液。

B.4.2 检查方法

细管精液用血色素管准确吸取 20 μL 解冻精液(也可使用第 B.2 章已检查后的样品),注入盛有 0.98 mL 的 3.0%氯化钠溶液的试管内,混匀,使之成为 50 倍稀释的稀释精液。将备好的血球计数板用血盖片将计数室盖好,用小吸管吸取一滴稀释精液于血盖片边缘,使精液自行流入计数室,均匀充满,不允许有气泡或厚度过大,然后在显微镜下或电视荧光屏上观察计数。

B.4.3 计算

- a) 每剂量中精子数=5 个中方格中的精子数×5(即计数室 25 个中方格的总精子数)×10(1 mm³ 内的精子数)×1 000(每毫升精液的精子数)×50(细管稀释倍数)×剂量值

上式可简化为:

每剂量中精子数=5 个中方格精子数×250 万(细管)×剂量值

- b) 每样品观察上下两个计数室,取平均值,如两个计数室计数结果误差超过 5%,则应重检。

- c) 每剂量中呈前进运动精子数按式(B.3)计算:

$$c = s \times m \dots\dots\dots (B.3)$$

式中:

c ——每剂量中前进运动精子数,单位为个;

s ——每剂量中精子数,单位为个;

m ——活力,%。

B.5 精子畸形率的检查

B.5.1 主要器材

显微镜、载玻片、血球分类计数器、小吸管、蒸馏水、姬姆萨染料、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、甲醛、甲

醇、甘油,所用试剂为分析纯。

B.5.2 试剂配制

a) 磷酸盐缓冲液

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.55 g

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.25 g

双蒸馏水定容至 100 mL。

b) 中性福尔马林固定液

40%甲醛 HCHO (使用前经碳酸镁中和过滤) 8.0 mL

磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 0.55 g

磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 2.25 g

用 0.89%氯化钠约 50.0 mL 溶解后加入 8.0 mL 中和后的甲醛,再加 0.89%氯化钠溶液定容至 100.0 mL。

c) 姬姆萨原液

姬姆萨染料 1.0 g

甘油 [$\text{C}_3\text{H}_5(\text{OH})_3$] 66.0 mL

甲醇(CH_3OH) 66.0 mL

姬姆萨染料放入研钵中加少量甘油充分研磨至无颗粒为止,然后将甘油全部倒入并放入恒温箱中保温继续溶解 4 h,再加甲醇充分溶解混匀,过滤后贮于棕色瓶中待用,贮存时间越久染色效果越好。

d) 姬姆萨染液

姬姆萨原液 2.0 mL

磷酸盐缓冲液 3.0 mL

蒸馏水 5.0 mL

现配现用。

B.5.3 制片、染色、镜检、计算

精液解冻见 B.3,允许同时使用精子活力检查解冻的样品。

a) 抹片:取解冻后精液一滴滴于载玻片一端,用另一边缘光滑的载玻片与有样品的载玻片呈 35° 夹角,将样品均匀地拖布于载玻片上,自然风干(约 5 min),每样品制作两个抹片。

b) 固定:在已风干的抹片上滴上 1.0 mL~2.0 mL 中性福尔马林固定液,固定 15 min 后用清水缓缓冲去固定液,吹干或自然风干。

c) 染色:将固定好后的抹片反扣在带有平槽的有机玻璃面上,把姬姆萨染液滴于槽和抹片之间,让其充满平槽并使抹片接触染液,染色 1.5 h 后用清水缓缓冲去染液,晾干待检。

d) 镜检:将制备好的抹片在显微镜(400 倍~600 倍)下观察,每个抹片观察 200 个以上的精子(分左、右两个区),取两片的平均值,两片的变异系数不得大于 20%,若超过应重新制片。

e) 精子畸形率按式(B.4)计算:

$$A = \frac{A_1}{S} \times 100 \quad \dots\dots\dots(\text{B.4})$$

式中:

A——精子畸形率,%;

A_1 ——畸形精子数,单位为个;

S——精子总数,单位为个。

B.6 细菌数的检查

B.6.1 主要器材

培养箱、超净化工作台、三角烧瓶、烧杯、量筒、玻棒、天平、牛角匙、高压蒸汽灭菌锅(或微波炉)、培养皿、水浴箱、pH 试纸(pH5.5~9.0)、棉花、牛皮纸、记号笔、棉绳、纱布、放大镜、牛肉浸膏、蛋白胨、磷酸氢二钾、氯化钠、琼脂粉、1 mol/L 氢氧化钠、1 mol/L 盐酸、蒸馏水。

B.6.2 培养基的配制

普通琼脂的制作:

牛肉浸膏

5.0 g

蛋白胨

10.0 g

磷酸氢二钾($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)

1.0 g

氯化钠(NaCl)

5.0 g

用蒸馏水 1 000 mL 溶解后加琼脂粉 20 g, 加温融解。

矫正 pH 至 7.4~7.6 并用脱脂棉过滤, 分装于三角烧瓶中经高压灭菌(0.1 MPa, 20 min)。

也可使用营养琼脂培养基, 其质量应符合 GB/T 4789.2—2008。

B.6.3 检查方法

灭菌平皿事先标号。细管冻精 37℃ 水浴解冻, 用酒精棉球消毒以无菌操作, 一支直接注于一个灭菌平皿内; 把已凉至 50℃ 左右的普通琼脂以无菌操作倾倒入平皿内, 每皿约 15 mL, 并转动平皿使精液混合均匀, 同时做空白对照平皿。待琼脂凝固后翻转平皿, 置 37℃ 恒温箱内培养 48 h 取出, 计数平皿内菌落数。每头公牛样品取两支做两个平皿, 取平均值。

B.6.4 计算

所检细管样品的细菌数按式(B.5)计算:

$$B = \frac{n_1 + n_2}{2} \dots\dots\dots (B.5)$$

式中:

B ——细菌数, 单位为个;

n_1 ——第一平皿菌落数, 单位为个;

n_2 ——第二平皿菌落数, 单位为个。

附 录 C
(规范性附录)
种公牛的品种代号

C.1 导言

本附录给出了最简称的公牛品种代号。

C.2 原则和方法

以牛品种英译汉的汉语名称第一和第二个字的汉语拼音的第一字母组合,涉及国家为多字的,以该国的第一字、第二字和品种第一字的汉语拼音的第一字母组合。

示例 1: 荷斯坦牛的品种代号以“荷”和“斯”两字汉语拼音第一字母组合为“HS”。

示例 2: “丹麦红牛”以国家第一字、第二字和品种第一字的汉语“丹麦”和“红”的拼音第一字母组合为“DMH”。

C.3 种公牛品种代号

见表 C.1。

表 C.1 种公牛品种代号

公牛品种	品种代号	公牛品种	品种代号
荷斯坦牛	HS	摩拉水牛	PM
沙西瓦	SA	尼里/拉菲	DMH
娟珊牛	JS	金黄阿奎丹	PA
西门达尔	XY	比利时兰	NY
兼用短角	JD	南德文	QC
草原红牛	CH	德国黄牛	YB
新疆褐牛	XJ	蒙贝利亚	LX
三河牛	SH	——	JN
肉用短角	RD	——	FZ
夏洛来	XL	——	ML
海福特	HF	——	NL
安格斯	AG	——	JH
利木赞	LM	——	BL
莫累灰	MH	——	ND
抗旱王	KH	——	DGH
辛地红	XD	——	MB
楼来恩	LL	——	—