

中华人民共和国农业行业标准

NY/T 4744—2025

犬冷冻精液生产技术规程

Technical code of practice for canine frozen semen production

2025-04-27 发布

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。

本文件由农业农村部农产品质量安全监管司提出。

本文件由全国伴侣动物(宠物)标准化技术委员会(SAC/TC 541)归口。

本文件起草单位：公安部南昌警犬基地、南昌理工学院医学院、农业农村部牛冷冻精液质量检验测试中心(南京)、公安部昆明警犬基地、北京小动物诊疗行业协会。

本文件主要起草人：余盼、叶俊华、吴衍、熊前、李莲、李川武、王振云、王春亮、肖远鹏、李杰、项茹雪、杨雪芹、潘芊芊。



犬冷冻精液生产技术规程

1 范围

本文件确立了犬冷冻精液生产的技术程序,规定了采精、精液品质检查、精液稀释、精液标识、精液冷冻、精液储存和精液运输等技术环节的基本要求,描述了证实方法。

本文件适用于犬冷冻精液生产。

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

GB/T 8170 数值修约规则与极限数值的表示和判定

GB/T 14174 大口径液氮容器

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

采精 semen collection

徒手获取公犬精液的方法。

3.2

精子密度 sperm concentration

单位体积精液中的精子数。

[来源:GB/T 25172—2020,3.4]

3.3

精子活力 sperm motility

在 37℃下呈直线前进运动的精子占总精子数的百分率。

[来源:GB/T 25172—2020,3.3]

4 冷冻精液生产技术程序

冷冻精液生产技术程序包括采精、精液品质检查、精液稀释与标识、精液冷冻、冷冻精液储存和冷冻精液运输等环节。犬冷冻精液生产技术流程见图 1。

5 采精

5.1 公犬选择

公犬应具有种用价值、体质健康、无遗传疾病,不应有已发布的动物防疫法所明确的二类疫病中的任何一种疾病。

5.2 采精准备

5.2.1 采精场所应保持安静,地面防滑,清洁卫生。

5.2.2 采精员应着洁净工作衣、帽和工作靴,戴一次性无毒手套。

5.2.3 玻璃器皿和采精器具清洁消毒应符合附录 A 的规定。集精管、集精杯、载玻片、盖玻片和精液处

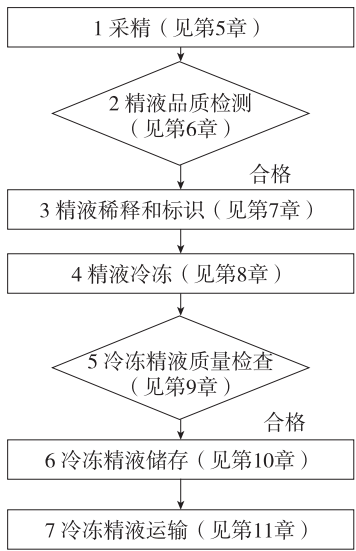


图 1 犬冷冻精液生产流程

理器皿应预热至 37℃，稀释液提前放置在 30℃～35℃ 的水浴锅中预热。

5.2.4 显微镜载物台恒温板应预热至 37℃。

5.2.5 采精时，应清洁体表，擦干水渍。阴毛过长时应适度修剪。包皮确需冲洗的，冲洗干净，30 min 后方可采精。

5.3 采精步骤

手握法采精时，应一只手戴无毒手套，按摩公犬包皮部。待阴茎开始勃起时，把包皮往上撸至露出阴茎球，握住阴茎球后端，同时给阴茎适当的按压，当阴茎充分勃起后犬开始射精。舍弃最先射出的透明水样液体；另一只手持集精杯或带漏斗的集精管置于阴茎下方，收集乳白色精液。

5.4 清洁

采精结束后，应及时清洁场地。

5.5 采精频率

根据公犬产精能力确定采精频率。成年公犬宜每周采精 1 次～2 次。

6 精液品质检测

6.1 精液处理室准备

精液处理室应设精液检查、稀释和分装区，温度宜为 22℃～25℃，不应太阳光直射。

6.2 原精液质量

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 犬原精液质量

编号	项目	指标	证实方法
1	外观	呈乳白色，均匀一致	目测
2	气味	略带腥味，无异味	鼻嗅
3	采精量	≥1 mL	见 6.3.1
4	精子密度	≥1×10 ⁸ 个/mL	见 6.3.2
5	精子活力	≥65%	见 6.3.3

6.3 证实方法

6.3.1 采精量测定

读取集精管的刻度测定采精量，精度应不小于 0.1 mL。

6.3.2 精子密度测定

采用精子密度仪测定,应定期用血细胞计数板法校正。

6.3.3 精子活力

取 5 μL ~10 μL 中层精液,置于载玻片上,加盖玻片,在有 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温装置的相差显微镜下用 200 倍~400 倍评定活力。每样片观察 3 个视野,计算平均值。使用自动分析仪器应按其检测方法操作。活力用百分率表示。

7 精液稀释和标识

7.1 精液稀释

7.1.1 稀释液总量计算

7.1.1.1 采精后应尽快稀释,放置时间不宜超过 15 min。采用等温稀释。精液与稀释液温差不得超过 1 $^{\circ}\text{C}$,根据精液温度调节稀释液温度,不得反向操作。

7.1.1.2 稀释液总量以体积 V 计,数值以毫升(mL)表示,按公式(1)计算。

$$V = \frac{v_1 \times c}{s} \times v_2 - v_1 \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中:

v_1 ——采精量的数值,单位为毫升(mL);

c ——精子密度的数值,单位为 10^8 个每毫升(10^8 个/mL);

s ——每剂量中呈直线前向运动精子数,单位为 10^8 个;

v_2 ——剂量的数值,单位为毫升(mL)。

7.1.1.3 稀释液配方见附录 B。采用一步法稀释时,稀释液总量为一步法稀释液的量。采用两步法稀释时,稀释液的量为 I 液和 II 液之和, I 液和 II 液比例可为 1 : 1。

7.1.2 精液稀释方法

7.1.2.1 一步法稀释

将水浴锅中的等温稀释液缓慢加入精液,摇匀。将稀释后的精液在 20 $^{\circ}\text{C}$ ~25 $^{\circ}\text{C}$ 下分装、封口,将细管放入 3 $^{\circ}\text{C}$ ~5 $^{\circ}\text{C}$ 的低温柜中平衡 1.5 h~4 h。

7.1.2.2 两步法稀释

使用两步法稀释时,可按下列方法操作:

- a) 将精液放入 32 $^{\circ}\text{C}$ ~34 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中,将与精液等温的第 I 液缓慢加入精液中,摇匀,并快速放至 3 $^{\circ}\text{C}$ ~5 $^{\circ}\text{C}$ 的低温柜中水浴降温,同时将第 II 液放至 3 $^{\circ}\text{C}$ ~5 $^{\circ}\text{C}$ 的低温柜中预冷;
- b) 水浴降温下平衡 1.5 h~2.5 h,加入等温的第 II 液;
- c) 完成稀释后可继续平衡 40 min,并于低温柜中分装和封口。

7.2 精液标识

储精细管标识应字迹清晰易认、信息齐全,标识内容应符合附录 C 的规定。

8 精液冷冻

8.1 上架

8.1.1 封装后的细管精液上架码放时,将棉塞封口端靠近操作者,封装口端远离操作者。入冷冻仪时,亦应如此放置。

8.1.2 不同犬的细管精液应分开码放并标记。

8.2 冷冻

8.2.1 程控冷冻法

采用程控冷冻法时,应在电脑中设置冷冻的最佳温度曲线,常见冷冻温度曲线见附录 D。冷冻仪与低温柜宜靠近,开启液氮罐阀门将冷冻仪降温至 4 $^{\circ}\text{C}$,将已排满待冻细管的冷冻架迅速放入冷冻仪,盖严盖

子,运行设定好的冷冻程序。

8.2.2 自制冷冻箱法

8.2.2.1 以液氮为冷源,用自制的冷冻箱冷冻细管时,冷冻箱的深度应在 50 cm 以上。

8.2.2.2 在装有液氮的冷冻箱内放一个能漂浮在液氮上的冷冻架,调节冷冻架置物面与液氮面的距离,一般为 1 cm~5 cm,预冷 5 min~10 min。

8.2.2.3 将细管精液上架码放,盖上盖子,熏蒸 5 min~10 min 后投入液氮中。

9 冷冻精液质量检查

9.1 取样

每头公犬的冷冻精液样品应是同一批次的产品。同一头犬、相同生产工艺、同一天采精生产的冷冻精液为一个批次。随机从液氮生物容器中抽取 2 支样品,样品离开液氮不应超过 5 s。

9.2 检验类型

9.2.1 常规检验

冷冻精液入库前检验。

9.2.2 型式检验

有下列情况之一时,应进行型式检验:

- a) 生产方抽样检验;
- b) 仲裁检验;
- c) 质量监督抽样时选定项的检验。

9.3 检验方法

9.3.1 预先将水浴箱水温加热至 38℃~40℃,取一支细管冷冻精液迅速浸泡入 38℃~40℃水中并晃动,待溶解后(约 1 min)立即取出,用吸水纸或纱布擦干水珠。

9.3.2 剪去封口端,将精液移入试管内,取解冻精液进行活力检查。

9.3.3 精子活力检测按照 6.3.3 的规定执行。

9.4 判断规则

9.4.1 样品精子活力不小于 30%,则判定该批次冷冻精液为合格。

9.4.2 样品精子活力小于 30%,应进行复检。复检后仍不符合规定的,判定该批次冷冻精液为不合格。

9.4.3 检测结果的极限数值判定按 GB/T 8170 中修约值比较法执行。

10 冷冻精液储存

10.1 收集

收集的冷冻精液移入液氮罐保存时,应按犬只对冷冻精液储存位置做好标识,细管封口端宜在上、棉塞封口端宜在下,迅速浸泡在液氮中。

10.2 储存

10.2.1 储存冻精的低温容器应符合 GB/T 5458 和 GB/T 14174 的要求。冷冻精液应浸在液氮中,由专人负责并及时观察补充液氮量。

10.2.2 发现液氮罐外壳结白霜,立即将精液转移入其他液氮罐内保存。

10.2.3 由一个液氮生物容器转移至另一个液氮生物容器时,间隔时间不得超过 3 s。

11 冷冻精液运输

11.1 液氮生物容器罐体外明显位置应标识“向上”“小心轻放”等储运图示标志。

11.2 液氮生物容器应轻装轻卸,不得倾斜、横倒、碰撞和强烈振动,应确保冷冻精液始终浸泡在液氮中。

11.3 冻精运输过程中应有专人负责,移动液氮生物容器应提握液氮生物容器手柄,抬起罐体后移动。

12 记录

冷冻精液生产应做好记录,精液生产记录表见附录 E。

附 录 A
(规范性)
器具清洗和消毒

A.1 玻璃器皿

A.1.1 首次使用玻璃器皿宜用自来水冲洗,去除灰尘。放入5%稀盐酸中浸泡12 h,取出后立即用自来水冲洗;再用手工或者超声波洗涤器中洗涤15 min~30 min,自来水冲洗干净后,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电热干燥箱、消毒柜、红外灭菌柜等消毒灭菌设备内,按操作说明书干燥、消毒、灭菌后待用。

A.1.2 使用过的玻璃器皿应用自来水冲洗;遇有污物或者油垢不易清洗的器皿,应放入重铬酸钾溶液中浸泡数小时,取出后立即用自来水冲洗,后续步骤同A.1.1。

A.2 采精器具

玻璃集精杯清洗消毒同A.1。塑料集精漏斗、集精管和盖子使用后,用水冲去表面污垢,在加有洗涤剂的温热水中用长毛刷刷洗,用水冲洗干净,再用蒸馏水逐个冲洗。将洗净的采精装置堆放在架子上,上覆盖2层清洁纱布,晾干后用长柄镊子夹75%的酒精棉球由内向外旋转,彻底消毒三角漏斗和采精管,待酒精挥发尽后方可使用。

A.3 纱布

经高压灭菌后待用。

A.4 其他器皿

金属镊子、止血钳、药匙、胶塞和吸管胶头等用75%的酒精擦拭消毒,待酒精挥发后方可使用。细管、冷冻架使用前应用紫外灯消毒30 min。

附 录 B
(资料性)
冷冻精液稀释液的配方与配制

B.1 稀释液配制要求

B.1.1 所有化学试剂应为化学纯以上；使用来源于非疫区无疫病鸡场的新鲜鸡蛋提取卵黄；稀释液溶剂应为双重蒸馏水或超纯水。

B.1.2 商品稀释剂应按说明书使用。不得使用过期的稀释剂。

B.2 配方

B.2.1 一步法稀释液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	3.025 g
一水柠檬酸	1.7 g
果糖	1.25 g
青霉素	10 万 IU
链霉素	10 万 IU
甘油	5 mL
加水至 100 mL。	

B.2.2 两步法稀释液

B.2.2.1 I 液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	3.025 g
一水柠檬酸	1.7 g
果糖	1.25 g
青霉素	10 万 IU
链霉素	10 万 IU
加水至 100 mL。	

B.2.2.2 II 液

三羟甲基氨基甲烷(Tris)	3.025 g
一水柠檬酸	1.7 g
果糖	1.25 g
甘油	10 mL
青霉素	10 万 IU
链霉素	10 万 IU
加水至 100 mL。	

B.3 配制方法

准确称量化学试剂，加超纯水定容、溶解、灭菌。根据稀释液的需要量取一定量的溶液，按照 4 : 1 的比例加入卵黄，搅拌均匀后待用。使用前配制，配制后及时贴上标签，标明品名、配制日期、时间和经手人。剩余稀释液应密封后置于冰箱中冷藏，时间不宜超过 24 h。

附 录 C
(规范性)
细管冷冻精液标记方法

C.1 细管冷冻精液标记方法

细管冷冻精液标记应由 12 位数两部分组成,排列顺序应符合下列规定:

- a) 第一部分:冻精生产日期 6 位数。按年月日次序排列,年月日各占 2 位数字,年度的后 2 位数组成年的 2 位数,月、日不够 2 位的,月、日前分别加“0”补充为 2 位数。
- b) 第二部分:犬芯片号的后 6 位数。

C.2 标记方法示例

图 C.1 给出了标记方法示例。



图 C.1 细管冷冻精液标记条

附 录 D

(资料性)

精液冷冻曲线

D.1 常见精液冷冻温度曲线一

见表 D.1。

表 D.1 犬精液冷冻温度设置程序

起始温度,℃	终止温度,℃	降温时间,s	降温速率,℃/min
4	－10	160	5.25
－10	－100	135	40
－100	－130	120	15

D.2 常见精液冷冻温度曲线二

见表 D.2。

表 D.2 犬精液冷冻温度设置程序

起始温度,℃	终止温度,℃	降温时间,s	降温速率,℃/min
5	－10	1 800	0.5
－10	－60	375	8

附 录 E
(资料性)
精液生产记录表

精液生产记录表见表 E. 1。

表 E. 1 精液生产记录表

序号	日期	犬芯片号	犬名	品种	采精员	采精量	精液颜色	精子活力	精子密度	检查员	稀释比例	平衡时间	冷冻数量	冷冻后活力	冷冻操作员	备注

参 考 文 献

- [1] GB 4143 牛冷冻精液
 - [2] GB/T 25172 猪常温精液生产与保存技术规范
 - [3] GB/T 30396 牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输
-