

ICS 65.020.30
B 43



中华人民共和国国家标准

GB/T 31582—2015

GB/T 31582—2015

牛性控冷冻精液

Bovine frozen sexed-semen

中华人民共和国
国家标准
牛性控冷冻精液
GB/T 31582—2015

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)
网址 www.spc.net.cn
总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

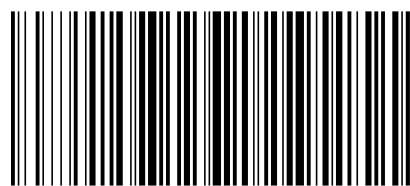
*

开本 880×1230 1/16 印张 1 字数 24 千字
2015年6月第一版 2015年6月第一次印刷

*

书号: 155066·1-51985 定价 18.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 31582—2015

2015-05-15 发布

2015-10-01 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

入甲醇充分溶解,过滤后贮于棕色瓶中待用,贮存时间越久染色效果越好。

A.7.2.4 姬姆萨染液

取姬姆萨原液(A.7.2.3)2.0 mL,加磷酸盐缓冲液 3.0 mL 及蒸馏水 5.0 mL。现配现用。

以上所用化学试剂纯度应达到分析纯。

A.7.3 制片染色、镜检、计算

A.7.3.1 抹片

取解冻后精液 1 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成 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 2 个抹片。

A.7.3.2 固定

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

A.7.3.3 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。

A.7.3.4 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 2 个区),取 2 片的平均值,2 片的变异系数不得大于 20%,若超过应重新制片。

A.7.3.5 计算

精子畸形率按式(A.7)计算:

$$A = \frac{A_1}{S} \times 100 \quad \dots\dots\dots(A.7)$$

式中:

A ——精子畸形率, %;

A₁ ——畸形精子数,单位为个;

S ——精子总数,单位为个。

A.8 细菌菌落数的检测

A.8.1 主要器材

培养箱、超净化工作台、天平、高压蒸汽灭菌锅、恒温水浴锅、培养皿。

A.8.2 培养基的配制

普通琼脂的制作:取牛肉浸膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、磷酸氢二钾(K₂HPO₄·3H₂O)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。调整 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。

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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(SAC/TC 274)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(北京)、内蒙古赛科星繁育生物技术股份有限公司、北京奶牛中心、中国农业大学、全国畜牧总站、农业部牛冷冻精液质量监督检验测试中心(南京)。

本标准主要起草人:张晓霞、李喜和、周文忠、刘海良、孙飞舟、张胜利、张海涛、刘玉、赵小丽、赵鹏、陆汉希、王建国、胡树香、施亮、张勇、钱松晋。

其浓度调至 2.5×10^8 /mL,依次使用 溶液 B、溶液 C、无水乙醇处理精子使其解凝聚,然后滴片、烘干。烘干后的片子在冰箱中放置过夜,隔天取出片子晾干后,首先在 $2 \times \text{SSC}$ (pH 7.0) 孵育,然后用胃蛋白酶溶液消化,消化后的片子用 $1 \times \text{PBS}$ 冲洗,甲醛固定,最后用 70%、85%、100% 乙醇处理。将处理好的精子玻片上滴上精子特异性 DNA 探针封片,杂交过夜。隔天在 $0.4 \times \text{SSC}$ 溶液(0.3% NP-40)溶液中除去封片胶,在 $2 \times \text{SSC}$ (0.1% NP-40)溶液中除去盖玻片,最后依次使用 $0.4 \times \text{SSC}$ 溶液(pH 7.0)、 $2 \times \text{SSC}$ 溶液(pH 7.0)溶液洗片,片子风干后滴上 DAPI 在显微镜下计数。统计具有蓝色荧光的总精子数和绿色杂交点的 Y 精子数。每次检测 2 张带有精子样品的载玻片,每张载玻片计数 200 个左右的精子,最后计算出总数。

A.3.2.4 计算

X 精子的分离准确率按式(A.3)计算:

$$A = \left(1 - \frac{Y}{T}\right) \times 100 \quad \dots\dots\dots(A.3)$$

式中:

A —— X 精子性控分离准确率, %;

Y —— Y 精子数,单位为个;

T —— 总精子数,单位为个。

A.4 精子活力的检测

A.4.1 主要仪器和器材

相差显微镜、电视显微系统、计算机、恒温水浴箱、5.0 mL 试管、载玻片或精液性状板、盖玻片、显微镜恒温装置、移液器。

A.4.2 检测方法

2 剂细管性控冷冻精液分别直接置于 37°C 水浴中解冻,取解冻后混合精液约 20 μL 置于载玻片上,加盖玻片后立即在 200 倍~400 倍相差显微镜或电视显微系统上观察活力,载物台温度保持 38°C ,每个样品观察 3 个视野。

A.4.3 计算

精子活力是 3 个视野精子活力评价值的平均数,按式(A.4)计算:

$$M = \frac{n_1 + n_2 + n_3}{3} \quad \dots\dots\dots(A.4)$$

式中:

M —— 精子活力, %;

n_1 —— 第一视野活力评价值, %;

n_2 —— 第二视野活力评价值, %;

n_3 —— 第三视野活力评价值, %。

A.5 每剂量中精子总数检测

A.5.1 主要器材

血球计数板、血色素管、1 mL 刻度吸管、小试管、计数器、移液器、显微镜或电视显微系统。

牛性控冷冻精液

1 范围

本标准规定了牛性控冷冻精液技术要求、抽样、试验方法、判定规则和标识、包装。
本标准适用于采用流式细胞分离技术生产牛性控冷冻精液。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 2828.2—2008 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 2828.11—2008 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 4143 牛冷冻精液

GB/T 5458 液氮生物容器

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

性控冷冻精液 frozen sexed-semen

分离后富含 X 精子或 Y 精子、经超低温冷冻后在液氮中长期保存的精液。

3.2

精子分离准确率 X or Y ratio of sexed-semen

X 精子或 Y 精子占分离后精子总数的百分率。

4 要求

4.1 种公牛

经审定或鉴定的公牛,体质健康,无遗传病,不允许有《中华人民共和国动物防疫法》中所明确的两类疫病中的任何一种。

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 $\geq 4 \times 10^8$ 个/mL,精子畸形率 $\leq 15\%$ 。

4.3 每剂量解冻后精液

4.3.1 外观

细管无裂痕,两端封口严密。