

辽宁省地方标准

DB 21/T XXXX—XXXX

驴冻精制作技术规程

Technical code for producing frozen Donkey semen

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2023 年 8 月）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX—XX—XX 发布

XXXX—XX—XX 实施

目 次

前 言 2

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 制作程序 1

5 冻精包装、保存、标识 2

6 冻精取用 3

7 冻精运输 3

参考文献 4

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到专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由辽宁省农业农村厅提出并归口。

本文件起草单位：辽宁省现代农业生产基地建设工程中心、辽宁省辽宁绒山羊原种场有限公司、建平县芮林牧业有限公司、阜新市绿鲜原驴肉食品有限公司。

本文件主要起草人：韩迪、豆兴堂、刘兴伟、刘海英、高月、门德财、刘欣、王泽英、陈宁、王家明、郑旭、邹丽娜、王红光、绍梦跃、聂磊。

本文件发布实施后，任何单位和个人如有问题和意见建议，均可以通过来电和来函等方式进行反馈，我们将及时答复并认真处理，根据实际情况依法进行评估及复审。

归口部门通讯地址：辽宁省农业农村厅(沈阳市和平区太原北街2号)，联系电话：024-23447862。

本文件起草单位通讯地址：辽宁省现代农业生产基地建设工程中心（沈阳市皇姑区陵园街7-1号），联系电话：024-67998986。

驴冻精制作技术规程

1 范围

本文件规定了驴冷冻精液的技术要求，包括制作程序及方法、冻精包装、保存、标识、取用及运输等内容。

本文件适用于驴细管冻精制作，马属动物细管冻精制作可参照本规程。

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 4143-2008 牛冷冻精液

GB 5458 液氮生物容器

NY/T 3796-2020 马和驴冷冻精液

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

精子活力 semen vitality

在37℃环境下直线前进运动精子数占总精子数的百分率。

3.2

精液稀释液 semen diluent

保护精子延长其存活时间及增加精液容量的液体。

4 制作程序

4.1 采精

用假阴道法采集种公驴的精液。采精前分别用温水和灭菌生理盐水清洗公羊阴茎和包皮。安装好假阴道，用 75 % 酒精擦拭内壁进行消毒，待酒精挥发后用稀释液冲洗；注入适量的温水，水温控制在 38 ℃ ～ 40 ℃ ，在内壁边缘涂抹适量的凡士林润滑剂，润滑剂忌涂深。由助手牵公驴靠近，当公驴阴茎勃起时，先用 0.1 % 高锰酸钾对阴茎进行消毒，再用软毛巾蘸温开水擦洗干净。当公驴爬跨母驴身上时，迅速将公驴阴茎导入假阴道内，切忌用手使劲握、拉阴茎，此时假阴道角度为 35 度为宜，待公畜抽动数次射精后将假阴道前端（集精杯方向）放低。

4.2 液态精液检查

使用 600 X 光学显微镜将采集的精液稀释后于 37 ℃ 下肉眼观测活力和密度，当精子活力达 70 % 以上密度达中上标准后用于制作冻精。

4.3 精液离心与稀释

4.3.1 离心稀释液的配制

蔗糖分析纯试剂 110 g，加蒸馏水 1000 ml 煮沸至蔗糖全部溶解。

4.3.2 冷冻稀释液配制

准确称量各配方中的基础试剂, 煮沸溶解制成溶液，常温冷却后加入抗菌素和卵黄，搅拌均匀。

4.3.3 冻精稀释液准备

可直接使用商品驴冻精稀释液或自配冻精稀释液，推荐自配冻精稀释液配方：葡萄糖 1.2 g、柠檬酸 1.3 g、三羟甲基氨基甲烷 2.4 g、甘油 5 ml、卵黄 20 ml、双蒸馏水 100 ml、青链霉素各 1.0×10^5 IU。称量各配方中的基础试剂煮沸溶解制成溶液，常温冷却后加入抗菌素和卵黄，搅拌均匀。

4.3.4 精液离心与稀释

原精经纱布（6~8 层）过滤后，按 1: 1 体积比例加入离心液，缓慢均匀混合后，装入离心管，在 $(30 \pm 4)^\circ\text{C}$ 范围内以 2000 rpm/min 离心 10 min；弃去上清液后在干净的容器内按 1: 1~1: 2 比例加入冷冻稀释液，等温缓慢混匀。

4.3.5 降温平衡

稀释封装后的精液放入缓冲容器内，经 8~12 h，降温至 $0^\circ\text{C} \sim 2^\circ\text{C}$ 。

4.4 精液冷冻

将平衡后的细管精液移至 $-95^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C} \sim -140^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ 的低温环境中, 冷冻 5min，然后浸入液氮中。

4.5 细管冻精解冻

将液氮中的细管冻精取出，立即浸没于 $38^\circ\text{C} \sim 40^\circ\text{C}$ 的温水中, 轻轻摆动约 20 s 取出，用干净纱布擦干。

4.6 细管冻精解冻后检测

使用 600 X 光学显微镜将采集的精液稀释后于 37°C 下肉眼观测活力，解冻后的活力不低于 35 %。

5 冻精包装、保存、标识

经镜检合格后的冻精，0.5 ml 细管冻精采用指形管包装, 每个指形管中装有合格细管冻精 12 剂, 冻精包装应在 -80°C 以下的温度下中操作，包装后的冻精细管棉塞端在指形管的底部，不得倒置。每 8 个指形管包装于一个布袋内，再贮存于装有液氮的生物容器内，定期添加液氮，使细管冻精始终

浸没于液氮中。在冻精细管上,打印品种、驴号、生产日期(如:LXL-5609-2020.12.05 即 辽西驴 5609 号公驴、2020 年 12 月 5 日制作),在每个包装袋上标注驴号、解冻后活力和数量(如:1103、40%、86 剂)。

6 冻精取用

将冻精袋提升到液氮罐颈口下约 10 cm 处,再用长镊子迅速将细管冻精取出进行解冻,在颈口处操作时间应不超过 10 s,细管冻精在液氮罐外的停留时间应不超过 3 s。如需继续取出细管冻精,则将冻精包装袋浸入液氮中,再重复以上操作。

7 冻精运输

必须使用装有超低温液体的合格生物运输容器进行运输,运输过程中要保持细管冻精始终浸在超低温液体中并保持生物容器不损坏。

参考文献

- [1] 杨秋凤, 刘兴伟, 张晓鹰, 等, 不同降温平衡时间和温度对辽西驴细管冻精质量的影响试验[A]. 第六届(2020)中国驴业发展大会暨首届张家口特色牧业(阳原驴)发展研讨会论文集[C]. 2020: 95-98.
- [2] 武师良, 张立斌, 刘兴伟, 等, 辽西驴细管冷冻精液稀释液配方筛选试验[J]. 畜牧兽医科学(电子版), 2019 (21), 13-14.
- [3] 张晓鹰, 刘兴伟, 张兴会, 等, 辽西驴细管冷冻精液制作的研究[J]. 黑龙江动物繁殖, 2020, 28 (1): 14-19.
- [4] 刘新峰, 丁向彬, 石彦虎, 等, 不同稀释液配方对驴精液常温保存效果的影响[J]. 黑龙江畜牧兽医. 2018 (13): 102-104.
- [5] 杨秋凤, 刘兴伟, 张晓鹰, 等, 辽西驴鲜精人工授精试验效果观察[J]. 现代畜牧兽医. 2020 (6): 27-29.
-