

母猪批次管理中猪冷冻精液 生产技术规范探讨

张树山 副研究员

上海市农业科学院畜牧兽医研究所 上海种猪工程技术研究中心

时间:2020年8月

01

前言

02

猪冻精生产技术规范/标准的制 定背景与解读

03

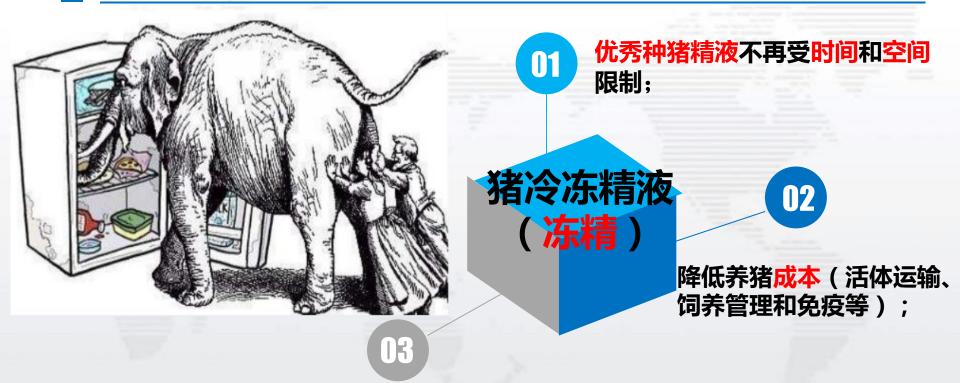
展望

01

前言

- ※ 猪冻精的意义
- ※ 猪冻精的应用现状





提高养猪企业的生物安全性。



1.2 猪冻精的应用现状

猪冻精技术的飞速发展

精子冷冻仪、灌封和标记等标准 化生产设备的应用

生物安全性、种公猪饲养的高成本

具备了猪冻精商业化生产条件。

猪冻精的平均受胎率和产仔数 等指标已接近液态保存精液。

养猪企业开始接受猪冻精。

天时、地利和人和。 猪冻精的春天来了!



猪冻精商业化生产要求:依据生产**技术**

规范实现标准化生产。



02

猪冻精生产技术规范/标准的制 定背景与解读

- ※ 技术规范/标准概念和意义
- ※ 家畜冻精生产技术规范/标准的制订情况
- ※ 家畜冻精生产技术规范/标准的解读



2.1 生产技术规范概念和意义

技术规范是标准文件的一种形式,是规定产品、过

程或服务应满足技术要求的文件。

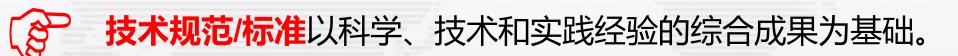
可以是技术标准的一部分(或独立部分), 其强制性

弱于标准(企业和行业标准)。



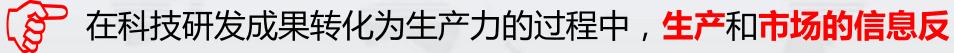
"不以规矩,不能成为圆"。

——《孟子》



在市场经济条件下,科技研发的成果通过一定的途径转化为技术标准。通过技术标准的实施来推动科技研发成用转化为代本力

准,通过技术标准的实施来推动科技研发成果转化为生产力。



馈又可以反作用于**技术标准的修订**和**科学研究**,从而促进技术标准

和科技发展。



□ 2.2 家畜冻精生产规范/标准制订情况

家畜中,牛冻精最先实现商业化生产和应用。

GBT 4143-1984 牛冷冻精液 NYT 1234-2006 **牛冷冻精液生产技术规程** GB 4143-2008 **牛冷冻精液** GB/T 30396-2013 **牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输**

羊:

DB21/T 1697-2008 辽宁绒山羊细管冷冻精液制作规程 DB61/T 306.6-2003 布尔羊冷冻精液 GB 20557-2006 山羊冷冻精液 DB52/T 504-2007 山羊冷冻精液



猪:

猪冻精已开始步入商业化生产,迫切需要**技术规**范/标准来约束。

DB13/T 2633-2017 **猪冷冻精液**(河北省) **种猪冷冻精液**(国家标准,修订中) **猪冷冻精液生产技术规范**(上海市标准,制定完成)



☑ 2.3 猪冻精生产技术规范/标准解读



- ※ 冻精制作基本流程
- ※ 现有国家、省市的相关规范/标准

DB13/T 2633-2017 猪冷冻精液(河北省)

猪冷冻精液生产技术规范(上海市标准,完成)

种猪冷冻精液(国家标准,修订中)

※ 国内外同行在猪冻精生产中积累的经验。



2.3.1 适用范围和内容

猪冻精技术规范/标准主要针对种猪细管冻精的商 业化生产,不适合地方猪品种冻精制作。

我国地方猪品种群体较小、甚至部分品种濒临灭绝, 少量的公猪显得尤为珍贵,故地方猪品种保种对公猪个 体、细管冷冻精液密度、解冻精液品质(活力、顶体完 整性等)等指标远低于商业化生产冻精的。

G	内容	题目	猪冷冻精液 (河北省)	种猪冷冻精液 (国家标准,修订中)	猪冷冻精液生产技术规范 (上海,制定完成)	
	术	吾	V	$\sqrt{}$	$\sqrt{}$	
	定	义	$\sqrt{}$	\checkmark	√ ====================================	
	取 样	精子耐 冻性			\checkmark	
	件	其它	\checkmark	\checkmark	\checkmark	
	冻精	制作			\checkmark	
	品质	顶体完 整性		\checkmark	\checkmark	
	检测	病毒 检测		\checkmark	\checkmark	
	包	装	V	V	V	
	运输		\checkmark	V	V	
	贝二	存	\checkmark	\checkmark	\checkmark	



2.3.2 相关术语(精液品质检测指标)

_	术语	定义
1	精子活力	直线运动精子的百分率。
	Sperm progressive motility	评价精子运动能力的最重要指标。
2	精子活率	活精子百分率。
	Sperm viability	
3	精子畸形率	畸形精子占总精子数的百分率。
	Abnormal sperm percentage	
4	菌落数	解冻后每毫升精液经培养后观察到的细菌菌落
	Bacteria count	数。
5	顶体完整性	解冻精子中活的且顶体完整精子百分率。
	Acrosome integrity	



__2.3.3 冻精制作环境要求

制作场地应考虑冻精制作流程、因地制宜、操作人员习惯等因素进行合理 布局。可以分为清洗间、冻精实验室和冻精储存区域等三部分。

- ※ 操作台和地面要求容易清洁、防滑;
- 具有控温(如空调)、除湿和通风设施;
- ※ 水、电符合生产要求。



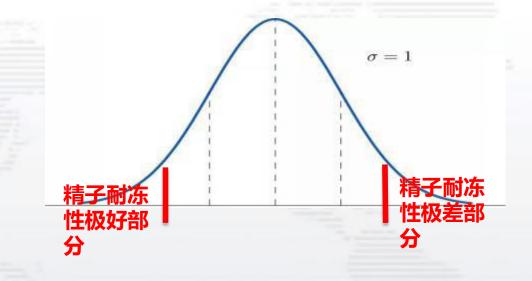


2.3.4 猪冻精生产相关仪器和耗材等

	仪器	作用										
1	17℃恒温箱	用于猪精液保存和17°C降温平衡。										
2	精子密度仪	测定精液密度。										
3	程控冷冻仪	冷冻降温。										
4	精液分装、打印和封口设备											
5	精子分析仪(CASA)	检测精子运动性能。										
6	离心机	去除精清。										
7	水浴锅(2个以上)											
8	荧光显微镜(用于检测精子顶体完整性)、冰箱、液氮罐、磁力搅拌器、高压灭菌锅、 声波清洗机、pH计和烘箱等;镊子、温度计、冷冻细管(0.5 mL)、拇指管、小布袋、 打印机油墨等耗材;不同规格的烧杯、量筒、移液枪、容量瓶等。											



▲ 2.3.5 种公猪的选择



- ※ 精子耐冻性
- ※ 鲜精品质(畸形率、活力等指标)
- ※ 公猪育种值



猪冻精的价值应该包括公猪育种值和其品

质(精子活力和顶体完整率等)等指标的<mark>加权</mark> 平均值。

高育种值、精子耐冻性差一些的种公猪的

冻精也有一定的商业价值。



___ 2.3.6 精液采集



自动采精系统取代传统的手握法可大幅度降低猪精液中细菌 数量,从而提高猪冻精品质。

原精液色泽为灰白色或乳白色,精子活力≥70%,精子 密度≥2亿个/mL,精子畸形率≤15%。



2.3.7 精液运输过程

原则:

尽可能地减小冻精制作地点与公猪站的距离; 建议采用可控温的17度恒温箱,其它参照液态

精液运输。





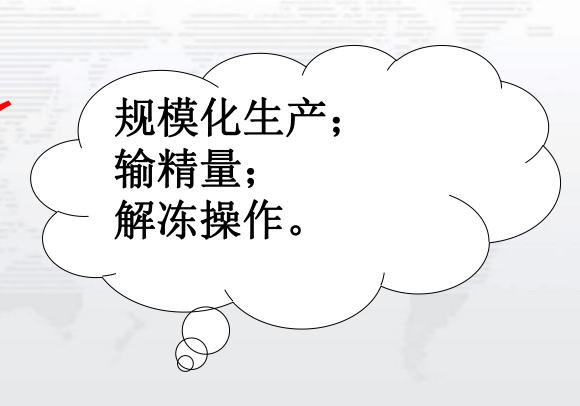
🔁 2.3.8 剂型

0.25 mL

0.50 mL

3.0 mL

5.0 mL





■ 2.3.9 精液稀释、降温平衡

- ※ 等温、分步稀释;
- ※ 17度降温平衡采用冰箱结合水浴法(逐步减少水
- 量)或可控温平衡仪。

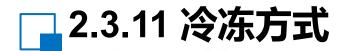


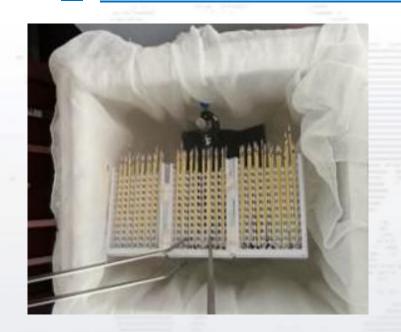




2.3.10 精液分装,细管标记和封口













解冻:

50℃、16 s,解冻、稀释后在37℃条件下水浴10~20 min,取精液约10 µL 置于精子计数板的池中,用CASA系统检测精子运动性能(包括活力、活率及运动速率等)。





2.3.12 猪冻精品质要求

ſ		项目	指 标
		外观	细管无裂痕、两端封口严密、所印字迹应清晰易认、信息齐全。
			0.5 mL细管
		剂型	1 mL细管
			5 mL细管
		0.5 mL细管, mL	≥0.4
	剂量	1 mL细管, mL	≥0.8
		5 mL细管, mL	≥4.0
	精	子活力,%	≥50
		0.5 mL细管, 个/剂	≥0.5×10 ⁸
	前向运动精子数	1 mL细管, 个/剂	≥1. 0×10 ⁸
		5 mL细管,个/剂	\geqslant 5. 0 × 10 ⁸
	精一	子畸形率,%	€20
	项位	本完整率,%	≥60
	菌溶	茎数,CFU/mL	≤500
] 蹄疫病毒、猪瘟病毒、猪 圆环病毒、猪细小病毒、布	病



※ **精子运动性能检测**: 活力(在37℃±1℃环境下前向运动精子的百

分率)和活率(在37℃±1℃环境下具有运动能力精子百分率)

CASA系统能客观、准确检测精子运动性能。

前向运动精子数(有效精子数):指每剂量精液中呈前向运动精子的数量,即细管精子密度×体积×活力。





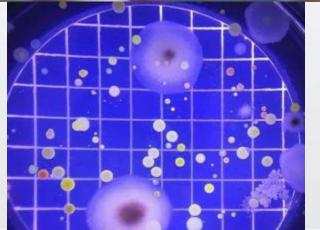




解冻精液 —>

菌落数小于 500 CFU/mL。







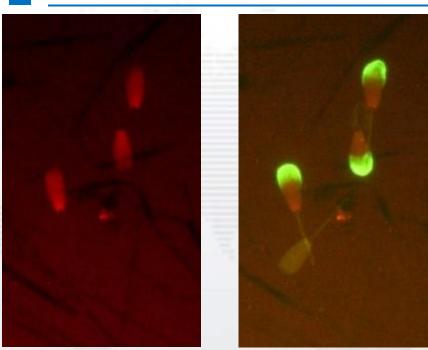
※ 精子畸形率检测

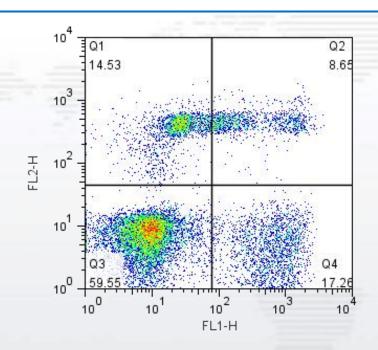
可采用伊红、姬姆萨等常规染色方法,也可采用CASA系统分析。











精子顶体完整性采用姬姆萨或荧光染色等方法,用油镜、 荧光显微镜或流式细胞仪等进行检测。



病原学检测阴性

主要通过对公猪定期检测来排除。



🔁 2.3.13 冷冻细管包装及保存

细管壁、布袋系绳上或提筒杆上分别打印或标记以下信 息,信息标记或标识要清楚、耐损。

- a) 生产厂家;
- b) 公猪品种;
- c) 公猪耳号;
- d) 生产日期或批次;
- e) 生产人员代号。







"**贮精管-纱布袋-细绳**"法,不同纱布袋的系绳容易缠到一起不容易取出。



"贮精管-贮精筒-提漏"法取放、解冻方便,更适合标准化生产和冻精的使用。



2.3.14 关于液氮和液氮罐



液氮罐在使用前后彻底检查和清洗。



定期添加液氮、做好记录,注意观察液氮罐状况,发现**液氮消耗明显增快**或容器外挂霜等异常情况,应立即更换。 自动监测补给系统。



运输过程中贮存容器**不得碰撞**或剧烈<mark>震动。</mark> 搬运、装车应该注意罐体防护,不得倾斜、横倒、碰撞和强烈 振动,确保冷冻精液始终浸泡在液氮中。



✓ 冻精储存数量较大时,制订冻精分类和存放位置的详细图表(电子和纸质版),防止不同品种或个体冻精发生混淆。

✓ 运输冻精时,应有专人负责,办好交接手续(应附带精液运输、交接卡片)。途中应及时检查和添加液氮。



2.3.15 冻精定期品质抽检

冻精指标(精子运动性能、顶体完整性和细菌含量等)在**产品入库** 前和出库前(销售前)各检测一次(或每隔半年一次)。

产品抽样方案参照现有猪冻精制作标准。

抱意 N		報單項量 LQ(不合格品百分數或每百单位产品不合格数>									1	N			diam'r.	la const		war.		1			1000				Jan.			Service.		lane.	
(100)00.17		0,50	0.80	1, 25	2,00	8,15	5, 00	6.00	12.5	20.0	n	/	10	15	20	25	30	35	40	45	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	170	190
16-25	Acc.	18	3.5	1.5	100	-		17	13	0	DQL	1																					
26~-50	Δe	-	3		2	(2)	28	22	15	10	2 3		3 2	4 n	5	6	7	8	9	10	11	14	16 10	18 11	19 13	21	25 15	25 16	30 18	30 19	35 21	35 23	40 25
\$1~90	n Ac	100	12	-	50**	64	34	24 D	16	10	4		-	2	Û	3	3	4	4	5	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	17	19
91-150	" Ac		8-1	80**	80	55	38 0	26 0	38	13	6	-	_		2	2	X	1	3	3	1	5	5	5	6	7	7	10	10	9	10	13	15
151-280	n Ae	200	170	130	95	65	4.8	28	20	20	7					Û	2	ğ	П	3	3	Û	4	5	5	6	6	7	7	8	8	9	10
281-500	n Ac	280	220 D	155	105	80	50 0	32	32	20	9						Û	Ď	2	ı		3	3	Û	4	ů	5	5	6	6	6	7	8
501-1 200	" Ac	380	235	170	125	139	80	50	32	32	10	-		-		-		-	2	2	2	Ŷ	3	3	4	4	4	5	5	5	6	7	7
1 201-3 200	π Ae	430 0	280	200 0	200	125	325	80	50	50	12								ш	U	2		Û	3	3	Ů	4	4	4	5	5	6	6
3 #01~ 10 000	n Ac	650	315	315	200	200	201	125	80	60 10	13											2		Û	3	3	3	4 D	4	4	5	5	5
10 001 33 000	# Ac	500	500	315	315	355	315 10	200	125	125	15							_					2	Ñ	U	3	3	3	Û	4	4	Û	5
83 001~ 158 000	z Ac	800 I	500	500	500 5	500 10	500 18	315	250 16	125	16 17												Û	2		l K	3	3	3	H	1	4	5 4
150 001~ 500 000	# Ac	800 1	800	800	800 10	800	500	315	200 18	126 18	18 19													2 2	1			3	3	3	Ü	4	4
500 001 東以上	Ac.	1 860 3	1 250	1 250	1 250 18	800 18	500 18	315 18	200	125	20													-	2	I II	Ш	111	ñ	3	3	ŭ	4



2.3.16 其它



注:程序化冷冻仪与液氮罐不连接时,要注意将液氮连接管密封,防止昆虫 类进入冷冻仪内部管道而导致故障(尤其在南方地区)。



护目镜₽

防护围裙₽

安全防护

保护躯体、免受液氮伤害

保护眼睛、免受液氮伤害

保护双手、免受液氮伤害

2.3.17 小结

- ※ 冻精生产场地建设、生产仪器配置应遵循"因地制宜、量力而行"原则,相关仪器基本实现国产化且具有较高的性价比;
- ※ 管理和生产人员要认真学习现有生产规范/标准,从而推动冻精产品的标准化生产;

科研人员、冻精生产和使用企业等在研究、生产和使用等过程中的反馈,从而促进猪冻精技术规范完善和升级!



展望





引种猪传源 存 存

"冷冻 精子库" 和商业 化生产 数据库

冷冻精 液商业 化生产 为地方 猪品特 遗传存 源保存 提供服 务

"冷冻 精子库" 数据库

猪冷冻精液商业化生产和研发平台

猪育种企业

科研院所、 大学



※ 冻精制作规范/标准;

※ 加强产、学、研紧密结合,以科技成果转化促进生产,从生产中为科研发现、提出科学问题。



浴 猪冻精商业化生产、销售和售后

服务体系的逐渐完善。

