

ICS 65.020.30

CCS B 43



中华人民共和国国家标准

GB 20557-2025

代替 GB 20557-2006

羊冷冻精液

Frozen semen of goat and ram

(征求意见稿)

2025-xx-xx 发布

2026-01-01 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会

发布

目次

前 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 技术要求	2
5 取样	3
5.1 基本要求	3
5.2 取样量	3
5.3 取样方法	3
6 检验方法	3
6.1 剂量	3
6.2 精子活力	3
6.3 前向运动精子数	4
6.4 精子畸形率	4
6.5 菌落总数	4
7 检验规则	4
7.1 检验类型	4
7.2 判定规则	4
8 标志和随行文件	5
8.1 标志	5
8.2 随行文件	5
9 包装、贮存和运输	5
9.1 包装	5
9.2 贮存	5
9.3 运输	5
10 不合格产品处置	6
附录 A	7
羊冷冻精液质量检验方法	7
A.1 通则	7
A.2 剂量	7

A.3	精子活力	7
A.4	前向运动精子数	9
A.6	菌落总数	12
参考文献	14

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。

本文件代替 GB 20557-2006《山羊冷冻精液》。与 GB 20557-2006 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更新了规范性引用文件（见 2）；
- 增加了“畸形精子”的术语和定义（见 3.4）；
- 增加了“批次”的术语和定义（见 3.7）；
- 删除了“种公羊”、“新鲜精液”、“冻精外观”、“颗粒冻精”要求（见 2006 年版 4.1、4.2、4.3、4.3.2）；
- 更改了“前进运动精子数”、“菌落总数”的定义（见 3.4、3.6，2006 年版的 3.1、3.4）；
- 更改了“剂量”、“精子活力”、“前向运动精子数”、“精子畸形率”和“菌落总数”的技术要求（见第 4 章，2006 年版的 4.4、4.5.1、4.5.2、4.5.3、4.5.4）；
- 增加了绵羊冷冻精液的技术要求（见第 4 章）；
- 删除了“抽样”章节（见 2006 年版的第 5 章、附录 A 和附录 B），增加了“取样”内容（见第 5 章）；
- 更改了“试验方法”（见第 6 章，2006 年版的第 6 章）、“检验类型”（见 7.2，2008 年版的 6.4）、“判定规则”（见 7.3，2006 年版的第 7 章）
- 增加了“型式检验”情况的描述（见 7.2.2）；
- 增加了“随行文件”条款（见 8.2）、“贮存”和“运输”条款（见 9.3）、“不合格产品处置”条款（见第 10 章）；
- 删除了附录 B 和附录 C（见 2006 年版的附录 B 和附录 C）。

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。本文件由中华人民共和国农业农村部提出并归口。

本文件历次版本发布情况为：

- 2006 年首次发布为 GB 20557-2006；
- 本次为第一次修订。

羊冷冻精液

1 范围

本文件规定了绵羊和山羊冷冻精液产品的技术要求、取样、标志和随行文件、包装、贮存、运输和不合格产品处置，描述了羊冷冻精液质量检验的试验方法和检验规则。

本文件适用于羊冷冻精液产品。

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，仅注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 30396-2013 牛冷冻精液包装、标签、贮存和运输

GB/T 5458-2012 液氮生物容器

GB/T 14174-2012 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

冷冻精液 frozen semen

经特殊方法处理、超低温冷冻后在液氮中（-196℃）长期保存的精液。

[来源：GB 4143-2008，3.4]

3.2

精子活力 sperm motility

在 37℃环境下呈前向运动精子数占精子总数的百分率。

[来源：GB 23238-2021，3.4]

3.3

前向运动精子数 number of progressively motile sperm

每剂量精液中呈前向运动精子的总数。

[来源: GB 23238-2021, 3.5]

3.4

畸形精子 abnormal sperm

形态异常的精子。

包括但不限于大头、小头、断头、双头、原生质滴、尾部曲折、卷尾、断尾等。

[来源: GB 23238-2021, 3.6]

3.5

菌落总数 aerobic plate count

每剂量精液在一定条件下培养后观察计数得到的菌落总数。

3.6

批次 batch

同一生产线、同一时间, 使用同一份精液稀释液分装生产的一批精液产品。

[来源: GB 23238-2021, 3.8]

4 技术要求

羊冷冻精液应符合表 1 中的规定。

表 1 技术指标

项目	单位	指标
剂量	mL	微型 ≥ 0.19
		中型 ≥ 0.42
精子活力	%	≥ 35
前向运动精子数	10^5 个/剂	山羊 ≥ 100
		绵羊 ≥ 150
精子畸形率	%	≤ 20

菌落总数	CFU/剂	≤300
------	-------	------

5 取样

警示：取样人员应意识到取样过程可能涉及到液氮（-196℃）冻伤的危害和危险，应采取适当的安全和防护措施。

5.1 基本要求

5.1.1 取样应由受过培训的人员执行。

5.1.2 取样应遵循随机性原则。每头公羊及每批次的羊冷冻精液被取样的机会均等。

5.1.3 取样和样品保存使用的液氮生物容器应符合 GB/T 5458-2012、GB/T 14174-2012 的规定。

5.2 取样量

5.2.1 交收检验

每批次抽取不少于 4 支（含复检备样）。

5.2.2 型式检验

每批次抽取不少于 15 支（含复检备样）。

5.3 取样方法

5.3.1 每头公羊的冷冻精液样品应是同一个批次的产品。

5.3.2 随机从液氮生物容器中抽取样品，样品离开液氮的时间不应超过 5 s。

5.3.3 取样完成后应立即填写样品登记单（包括实际取样支数、取样日期、取样地点、公羊品种、公羊号、样品生产日期或批号及取样人签字等信息）并与样品随行。

6 检验方法

6.1 剂量

按照附录 A.2 给出的方法检测。

6.2 精子活力

按照附录 A.3 给出的方法检测。

6.3 前向运动精子数

按照附录 A.4 给出的方法检测。

6.4 精子畸形率

按照附录 A.5 给出的方法检测。

6.5 菌落总数

按照附录 A.6 给出的方法检测。

7 检验规则

7.1 检验类型

7.1.1 交收检验

交收检验项目为精子活力。

7.1.2 型式检验

型式检验项目为第 4 章的全部项目。冷冻精液生产正常时，每 2 个月至少进行一次型式检验。

有下列情况之一时，应进行型式检验：

- a) 生产工艺及设备有变更时；
- b) 所用生产试剂有变化时；
- c) 种公羊发生疾病康复后或注射疫苗后；
- d) 停产 3 个月以上恢复生产时；
- e) 交收检验结果与型式检验结果有较大差异时；
- f) 监督管理部门提出要求时。

7.2 判定规则

7.2.1 所检项目全部符合本文本规定时，则判定该批次冷冻精液为合格。

7.2.2 样品中任何项目检验不符合规定的，应用备样进行复检，复检结果全部符合本文件规定时，则判定该样品合格；复检后仍不符合规定的，判定该批次冷冻精液为不合格。

7.2.3 各项目检测结果的极限数值判定按 GB/T 8170-2008 中修约值比较法执行。

8 标志和随行文件

8.1 标志

8.1.1 应易于识别，不易脱落或损坏；

8.1.2 羊冷冻精液细管管壁上及包装袋上清晰印制以下标志内容：

- a) 生产主体；
- b) 公羊品种；
- c) 公羊号；
- d) 生产日期。

8.2 随行文件

随行文件应包括冷冻精液来源公羊的系谱及种用性能资料。

9 包装、贮存和运输

9.1 包装

细管冷冻精液封口严密、标志清晰，用专用的塑料管包装。容量应大于第 4 章中规定的对应产品最低剂量的 110%。

9.2 贮存

贮存冻精的低温容器应符合 GB/T 5458-2012 规定；冻精应浸在液氮中；每只公羊的冻精单独贮存；贮存冻精的容器每年清洗、消毒应不少于一次并更换新鲜液氮；取放冻精时，冻精离开液氮的时间不得超过 5 s。

9.3 运输

冻精运输过程中应有专人负责，贮存容器不得横倒及碰撞和强烈振动，保证冻精始终浸在液氮中。

10 不合格产品处置

不得出售和使用检验不合格的产品。不合格产品应按有关规定进行无害化处理。

附录 A

(规范性)

羊冷冻精液质量检验方法

A.1 通则

试验中除非另有规定，仅使用分析纯以上的试剂。试验用水为新制备的去离子水或蒸馏水。试验所用的测量仪器应经过计量检定机构检定合格，并在有效期内。

A.2 剂量**A.2.1 器材**

A.2.1.1 分度吸量管：精度 0.01 mL。

A.2.1.2 细管专用剪刀。

A.2.1.3 细管专用推针。

A.2.1.4 试管：1.5 mL。

A.2.2 试样制备

取 2 剂细管冷冻精液于 37°C 解冻后，剪去封口端，用细管推针将全部样品推至同一个试管内。

A.2.3 试验步骤

用分度吸量管吸取全部试样，并读取试样总量。

A.2.4 试验数据处理

按式 (A.1) 计算剂量值，结果保留 2 位小数：

$$V = \frac{V1}{2} \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

V ——剂量值，单位为毫升 (mL)；

$V1$ ——2 支试样总量，单位为毫升 (mL)。

A.3 精子活力

A.3.1 仪器和器材

- A.3.1.1 显微镜：配有相差物镜，20×、40×、100×。
- A.3.1.2 显微摄像系统：显微镜、摄像头、电脑及显示屏。
- A.3.1.3 显微镜恒温载物台：37°C ± 1°C。
- A.3.1.4 恒温水浴锅：37°C ± 1°C。
- A.3.1.5 试管：1.5 mL。
- A.3.1.6 移液器：量程 20 μL。
- A.3.1.7 载玻片。
- A.3.1.8 盖玻片。

A.3.2 试样制备

取 2 剂细管冷冻精液，置于 37°C 水浴解冻，解冻时间微型不少于 10 s、中型不少于 15 s。并将解冻后样品剪去封口端，用细管推针全部推至同一个试管内，混匀后置于 37°C 水浴中恒温待用。

A.3.3 试验步骤

吸取 10 μL 试样置于预热的载玻片上，加盖预热的玻片，立即在 37°C 恒温载物台上，用 200 倍 ~ 400 倍显微镜观察活力，也可通过显示屏观察。分别观察两个样片，每样片至少观察 3 个以上视野，并应观察不同液层内的精子运动状态，给出综合评定值。

A.3.4 试验数据处理

精子活力按式 (A.2) 计算，结果取整数：

$$M = \frac{n1 + n2}{2} \dots\dots\dots (A.2)$$

式中：

- M——精子活力，单位为百分比 (%)；
- n1——第一样片精子活力，单位为百分比 (%)；
- n2——第二样片精子活力，单位为百分比 (%)。

两个样片的精子活力在重复性条件下，测定结果的相对偏差不得超过 5%，否则应复检。

A.4 前向运动精子数

A.4.1 试剂

3.0%氯化钠溶液：称取氯化钠 3.0 g，加蒸馏水溶解并定容至 100 mL。

A.4.2 设备和器材

A.4.2.1 显微镜：配有相差物镜，20×、40×、100×。

A.4.2.2 显微摄像系统：显微镜、摄像头、电脑及显示屏。

A.4.2.3 血球计数板：25×16 型（汤麦式），盖玻片。

A.4.2.4 计数器。

A.4.2.5 移液器：量程 10 μL、20 μL、1000 μL。

A.4.2.6 试管：5.0 mL。

A.4.3 试样制备

解冻方法按 A.2.2 的规定。

量取 10 μL 样品注入盛有 0.99 mL 的 3.0%氯化钠溶液的试管内，混匀，使之成为 100 倍稀释试样。

A.4.4 试验步骤

a) 用盖玻片将血球计数板的计数室盖好，分别吸取一滴试样置于 2 个计数室边缘，使试样自行流入计数室，均匀充满，然后在 400 倍显微镜下观察计数，每试样观察 2 个计数室。

b) 每个计数室按对角线方位，选择左上、左下、右上、右下 4 个及中央 1 个共 5 个中方格进行分别计数，对于方格压线精子（以头部为准）采取数上不数下，数左不数右的原则。记录计数室中 5 个中方格精子数，两个计数室中 5 个中方格总精子数求算术平均数（st）。

A.4.5 试验数据处理

每剂量中前向运动精子数按式 (A.3) 计算, 结果取整数:

$$P = st \times 5 \times 10 \times 1000 \times 100 \times V \times m \dots\dots\dots (A.3)$$

式中:

P——每剂量中前向运动精子数, 单位为个;

st——两个计数室中 5 个中方格总精子数的平均值, 单位为个;

5——5 个中方格精子数推及 25 个中方格的精子数;

10——推及 1mm³ 中精子数;

1000——推及 1mL 中精子数;

100——试样稀释倍数;

V——样品剂量值, 单位为毫升 (mL);

m——精子活力, 单位为百分比 (%)。

两个计数室中 5 个中方格的精子数, 在重复性条件下, 两次独立测定结果的相对偏差不得超过 5%, 否则应重检。

A.5 精子畸形率

A.5.1 试剂

A.5.1.1 姬姆萨染料。

A.5.1.2 磷酸二氢钠 (NaH₂PO₄·2H₂O)。

A.5.1.3 磷酸氢二钠 (Na₂HPO₄·12H₂O)。

A.5.1.4 甲醇 (CH₃OH)。

A.5.1.5 甲醛 (HCHO)。

A.5.1.6 甘油[C₃H₅(OH)₃]。

A.5.1.7 磷酸盐缓冲液: 称取磷酸二氢钠 0.55 g、磷酸氢二钠 2.25 g, 加水溶解并稀释至 100 mL。

A.5.1.8 中性福尔马林固定液: 称取磷酸二氢钠 0.55 g、磷酸氢二钠 2.25 g, 用 0.9%氯化钠 50.0 mL 溶解后, 加入 10.0 mL 40%甲醛 (使用前经碳酸镁中和过滤), 再加 0.9%氯化钠溶液稀释至 100 mL。

A.5.1.9 姬姆萨原液：称取姬姆萨染料 1.0 g、量取甘油 66.0 mL、甲醇 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研钵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。

A.5.1.10 姬姆萨染液：量取姬姆萨原液 2.0 mL、加磷酸盐缓冲液 3.0 mL、蒸馏水 5.0 mL，现配现用。商品化试剂按说明书配制使用。

A.5.2 设备和器材

A.5.2.1 显微镜：配有相差物镜，20×、40×、100×。

A.5.2.2 显微摄像系统：显微镜、摄像头、电脑及显示屏。

A.5.2.3 电子天平：精度 0.001 g。

A.5.2.4 血球分类计数器。

A.5.2.5 载玻片。

A.5.2.6 移液器：量程 20 μ L。

A.5.3 试样制备

解冻方法按 A.3.2 的规定。

A.5.4 试验步骤

a) 取试样一滴，滴于载玻片一端，用另一边缘光滑的载玻片与有试样的载玻片呈 35° 夹角，将试样均匀地拖布于载玻片上，自然风干，每试样制作两个抹片。

b) 将已风干的抹片置于染色板上，用中性福尔马林固定液固定 15 min 后，用清水缓缓缓冲去固定液，自然风干。

c) 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，1.5 h 后用清水缓缓缓冲去染液，晾干待检。

d) 将制备好的抹片在 400 倍显微镜下观察精子的形态。观察范围为抹片的左、中、右三个区域，用血球分类计数器分别记录正常精子数和畸形精子数，每个抹片累计观察精子 200 个以上。

A.5.5 试验数据处理

精子畸形率按式 (A.4) 计算, 结果取整数:

$$R = \frac{A1}{A1+N} \times 100 \dots\dots\dots (A.4)$$

式中:

R——精子畸形率, 单位为百分比 (%);

A1——畸形精子数, 单位为个;

N——正常精子数, 单位为个。

两个样片的畸形率在重复性条件下, 两次独立测定结果的相对偏差不得超过 5%, 否则应重检。

A.6 菌落总数

A.6.1 试剂

A.6.1.1 羊肉浸膏。

A.6.1.2 蛋白胨。

A.6.1.3 磷酸氢二钾 ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$)。

A.6.1.4 氯化钠 (NaCl)。

A.6.1.5 琼脂粉。

A.6.1.6 蒸馏水。

A.6.1.7 营养琼脂培养基: 取羊肉浸膏 5.0 g、蛋白胨 10.0 g、磷酸氢二钾 1.0 g、氯化钠 5.0 g, 用蒸馏水 1000 mL 溶解, 加琼脂粉 20 g, 加温融解。调 pH 至 7.4~7.6, 并用脱脂棉过滤, 分装于三角烧瓶中, 高压灭菌 (0.1 MPa、20 min)。商品化的试剂按说明书配制使用。

A.6.2 设备和器材

A.6.2.1 恒温培养箱: $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

A.6.2.2 恒温水浴锅: $46^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。

A.6.2.3 天平: 精度 0.001 g。

A.6.2.4 无菌操作台。

A.6.3 试样制备

解冻方法按 A.2.2 规定。

A.6.4 试验步骤

取 2 剂细管冷冻精液，在无菌操作台内，用酒精棉球将细管消毒后，将试样分别加入 2 个标记的灭菌培养皿内，将 15 mL ~ 20 mL 冷却至 46°C 的培养基倒入培养皿，水平晃动培养皿使精液与培养基均匀混合。待琼脂凝固后翻转培养皿，置 37°C ± 1°C 恒温培养箱内培养 48 h 取出。观察、统计每个培养皿内菌落数，菌落计数按照 GB 4789.2-2008 中 6.3 的规定。应设置空白对照，若空白对照内出现菌落，应重检。

A.6.5 结果计算

菌落总数按式 (A.5) 计算，结果取整数：

$$N = \frac{n1+n2}{2} \dots\dots\dots (A.5)$$

式中：

N——样品中的菌落数，单位为菌落形成单位 (CFU)；

n1——第一培养皿菌落数，单位为菌落形成单位 (CFU)；

n2——第二培养皿菌落数，单位为菌落形成单位 (CFU)。

参考文献

- [1] GB 4143-2022 牛冷冻精液
 - [2] GB 23238-2021 种猪常温精液
-