

ICS 65.020.30

B 40

中华人民共和国国家质量监督
检验检疫总局备案号：52076-2016

DB53

云南省地方标准

DB53/T 760.2—2016

云南半细毛羊养殖 第2部分：人工授精

2016-09-10 发布

2016-12-01 实施

云南省质量技术监督局 发布

前 言

DB53/T 760—2016《云南半细毛羊养殖》分为以下部分：

- 第1部分：品种
- 第2部分：人工授精；
- 第3部分：胚胎移植；
- 第4部分：营养需要；
- 第5部分：饲草饲料；
- 第6部分：饲养管理；
- 第7部分：疫病防治；
- 第8部分：羊舍建设；
- 第9部分：档案管理。

本部分为DB53/T 760的第2部分。

本部分按照GB/T 1.1—2009《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》给出的规则起草。

本部分由云南省农业厅提出。

本部分由云南省农业标准化专业技术委员会（YNTC07）归口。

本部分起草单位：云南省畜牧兽医科学院。

本部分主要起草人：权国波、洪琼花、李东江、兰蓉、朱兰、吕春荣、石国庆、赵远崇、周翔。

云南半细毛羊养殖 第2部分：人工授精

1 范围

本部分规定了采精、精液保存和输精等要求。

本部分适用于云南半细毛羊。

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，仅所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 5458 液氮生物容器

3 采精

3.1 种公羊选择和调教

3.1.1 种公羊选择

种公羊选择应符合下列要求：

- a) 系谱清楚、遗传稳定、生产性能好，符合云南半细毛羊特级或一级种羊要求；
- b) 无遗传性或传染性疾病，体质健康，发育良好；
- c) 每次射精量在 0.75 mL 以上，精子活力在 0.7 以上，密度在 3×10^9 个/mL 以上，畸形率低于 15%。

3.1.2 种公羊调教

对初次采精的种公羊宜用下列方法调教：

- a) 让种公羊与发情母羊在采精室本交 3 次~5 次。
- b) 将发情母羊的阴道分泌物涂抹在种公羊鼻尖上，以刺激其性欲。
- c) 每天用温水擦洗种公羊阴囊，然后用手从下往上轻轻按摩睾丸，早晚各 1 次，每次 10 min 左右。
- d) 采精时，让被调教种公羊在旁边“观摩”。

3.2 采前准备

采精宜用假阴道法进行，采精地点应固定，要求平坦、避风、安静，避免阳光直射。按下列顺序进行采精前准备：

- a) 检查假阴道是否漏气、橡皮内胎是否扭转，松紧是否适度；
- b) 灌注 50℃~55℃热水，竖直假阴道使水量至出口处；
- c) 装上气嘴和经消毒处理及生理盐水冲洗过的集精杯，吹气至内胎呈松紧适度的三角形；
- d) 取适量消过毒的凡士林由外向内涂擦假阴道前 1/3 处；

- e) 检查内胎夹壁温度，最适宜的采精为温度为 40℃～42℃。

3.3 操作方法

采精操作方法和要求如下：

- 采精人员站立于公羊右侧，右手握假阴道，食指、中指夹住集精杯，气嘴向内下侧，在公羊上跳发情母羊时采精人迅速下蹲，将假阴道以斜上 45 度角靠近发情母羊臀部，用左手轻轻引导公羊阴茎至假阴道内；
- 当公羊的后躯向前冲即完成射精，公羊从母羊身上滑下时，顺势将假阴道取下，竖立集精杯，打开气卡活塞放气，待精液完全流入集精杯后，取下集精杯加盖送操作室，记录射精量，进行精液品质检查；
- 每只种公羊每天可采精 2 次～3 次，每次射精量 0.5 mL～2.0 mL，两次采精间隔 5 min～10 min，连续采精 5 d～7 d，休息 1 d。

3.4 精液品质检查

3.4.1 肉眼观察

正常的精液呈浓厚乳白色不透明，用肉眼观察能见到云雾状运动。

3.4.2 活力评定

精子活力采用 0 分～1.0 分评级。在 400 倍显微镜视野里，以做快速直线运动精子的比例进行评分，当 100% 的精子作直线运动时，评为 1.0 分，80% 的精子作直线运动时，评为 0.8 分，以此类推。

3.4.3 密度评定

精子密度评定分为“密”、“中”、“稀”、“无”。在 400 倍显微镜视野内精子与精子间的距离小于一个精子的长度为“密”；精子间有明显的空隙，两精子间的距离相当于 1 个～2 个精子长度为“中”；在视野中只有少数精子，精子之间超过两个精子的长度为“稀”；若视野里没有精子则记为“无”。

3.5 采精记录

采精记录参见表 1。

表 1 采精记录表

公羊耳号	采精日期	采精量(mL)	精子活力	精子密度	备注

4 精液保存

精液保存方式有常温保存和冷冻保存。采精后 2 d 内使用宜采用常温保存，2 d 后使用宜采用低温冷冻保存。

4.1 常温保存

4.1.1 稀释液配制

精液常温保存稀释液配制参见附录A。

4.1.2 稀释

精液稀释按照以下步骤进行：

- a) 将装有稀释液的 50 mL 锥形离心管置于 37℃ 水浴锅中至稀释液温度与精液相同；
- b) 沿装有精液的 15 mL 锥形离心管管壁缓缓加入稀释液，同时轻轻摇晃至精液和稀释液混匀。

4.1.3 包装、标记、贮存和运输

4.1.3.1 包装

用经过灭菌处理的 15 mL 锥形塑料离心管装分装精液。

4.1.3.2 标记

精液包装器皿上应标明产品名称、公羊品种、编号、采精日期、精液剂量、稀释液种类、稀释倍数、精子活力、精子密度和贮存温度。

4.1.3.3 贮存

置于 15℃～20℃ 恒温箱内保存。

4.1.3.4 运输

置于 15℃～20℃ 的运输箱内运输，注意避光，运输过程中避免强烈震动和碰撞。

4.2 冷冻保存

4.2.1 稀释液配制

精液冷冻稀释液配制参见附录B。

4.2.2 冷冻

4.2.2.1 稀释：将新鲜精液和冷冻稀释液按 5 倍～10 倍体积比稀释，用于稀释的精液和冷冻稀释液温度应相同。

4.2.2.2 装管：在塑料细管上打印好品种、羊号、生产日期后，将稀释后的精液分装于 0.25 mL 塑料细管，并用封口粉封口。

4.2.2.3 降温：以 0.1℃/min～0.6℃/min 速率缓慢降温至 5℃，在此温度下平衡 2 h～4 h。

4.2.2.4 预冻：预冻时塑料细管与液氮面的距离应该在 1 cm～1.5 cm，预冻温度为 -80℃～-120℃，预冻时间为 5 min～10 min。

4.2.2.5 保存：预冻结束后将塑料细管直接投入液氮进行长期保存，储存冻精的液氮容器应符合 GB/T 5458 的规定。

4.2.3 解冻

将细管冻精从液氮中取出，空气浴 10 s 后，置于 37℃ 水浴锅中解冻 30 s。

4.2.4 质量评价

解冻后的精子满足以下两个方面的指标，即视为质量合格：

- a) 解冻后精子活力不低于 0.3，质膜完整率不低于 50%，顶体完整率不低于 70%，运动速度在 100 $\mu\text{m/s}$ 以上。
- b) 每头份冻精解冻后成直线运动的精子数不低于 1000 万个。

5 输精

5.1 母羊发情鉴定

每天上、下午用试情公羊试情，母羊接受公羊爬跨，站立不动，即为发情。

5.2 输精时间

母羊发情后 8 h~12 h 第一次输精，间隔 10 h~12 h 第二次输精，若还持续发情的，可在第二次输精后 8 h~12 h 进行第三次输精。

5.3 输精操作

5.3.1 输精前将母羊外阴部用 0.1% 新洁尔灭溶液擦洗消毒，再用生理盐水冲洗干净；

5.3.2 将用生理盐水湿润过的内窥镜慢慢插入母羊阴道，打开电源开关，寻找子宫颈口；

5.3.3 采用鲜精输精时，用 2 mL 注射器连接输精枪，先吸取 0.5 mL 空气后吸取 0.5 mL 精液。采用冻精输精时，剪掉已解冻精液细管的封口粉部，把细管装入冻精输精枪；

5.3.4 将输精枪慢慢插入子宫颈口内 0.5 cm~1.0 cm 处，缓慢将精液注入；

5.3.5 输精完毕使母羊继续倒立 2 min，防止精液倒流。

5.4 输精记录

人工授精记录参见表 2。

表 2 人工授精记录表

母羊 编号	发情 时间	第一次输精			第二次输精			第三次输精			妊娠 情况	产羔 日期	产羔 数	备注
		时间	公羊 编号	输精 量	时间	公羊 编号	输精 量	时间	公羊 编号	输精 量				

附 录 A
(资料性附录)
精液常温保存稀释液配制

精液常温保存稀释液分为即配即用稀释液和短期保存稀释液：

A.1 即配即用稀释液

保存期为3 h~5 h，可选择下列稀释液之一：

A.1.1 牛、羊奶稀释液：

把鲜牛奶或羊奶用6层~8层纱布过滤，然后隔水煮沸10 min~15 min，冷至室温，除去奶皮备用，一般稀释2 倍~4 倍。

A.1.2 脱脂乳稀释液：

脱脂奶粉10 g、葡萄糖0.2 g溶于100 mL蒸馏水，95 ℃加热处理8 min。冷却至室温后加入0.5 g青霉素和链霉素。然后于8000 g×30 min离心去上清，用0.45 μm滤器过滤备用。

A.1.3 柠檬酸钠、蛋黄、葡萄糖稀释液：

取柠檬酸钠2.3 g、葡萄糖1.0 g，溶于100 mL蒸馏水中，过滤后加入蛋黄10 mL、青霉素10万单位、链霉素10万单位、磺胺粉0.3 g。

A.2 短期保存稀释液

保存期为1 d~2 d，可选择下列稀释液之一：

A.2.1 柠檬酸钠、葡萄糖、磷酸氢二钠、氨苯磺胺、蛋黄稀释液

取柠檬酸钠1.6 g、葡萄糖0.97 g、磷酸氢二钠0.15 g、氨苯磺胺0.3 g溶于100 mL蒸馏水中，消毒冷却至室温后加入青霉素10万单位、链霉素10万单位、蛋黄20 mL。

A.2.2 Tris、葡萄糖、柠檬酸、蛋黄稀释液：

取Tris 2.71 g、葡萄糖1.0 g、柠檬酸1.4 g、青霉素0.0627 g、链霉素0.1335 g溶于90 mL蒸馏水中，0.22 μm滤器过滤除菌后于4 ℃保存。使用前加入10 mL蛋黄。

A.2.3 Tris、Tes、葡萄糖、蛋黄稀释液：

取Tris 0.9691 g、Tes 4.0339 g、葡萄糖0.1622 g、青霉素0.0150 g、链霉素0.0250 g溶于80 mL蒸馏水中，0.22 μm滤器过滤除菌后于4 ℃保存。使用前加入20 mL蛋黄。

附录 B
(资料性附录)
精液冷冻稀释液配制

B.1 精液冷冻稀释液配制

- a) 基础稀释液：取 Tris 2.71 g、柠檬酸 1.4 g、葡萄糖或果糖 1 g、青霉素 0.0627 g、链霉素 0.1335 g、用超纯水稀释至 84 mL、最后用 0.22 μm 一次性滤器过滤，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存不应超过 1 个月；
- b) 冷冻稀释液：取基础稀释液 8.4 mL，加蛋黄 1 mL、甘油 0.6 mL，混合均匀。然后用离心机高速离心（16000 $\text{g} \times 30 \text{ min}$ ），取上清用 0.45 μm 滤器过滤备用。冷冻稀释液应现用现配，在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下不应超过 24 h。



