



# 中国实验灵长类养殖开发协会团体标准

T/CLPBDA0014-2024

## 食蟹猴/猕猴 精子冷冻与复苏方法

Cynomolgus macaque / Rhesus macaque- The method of sperm freezing and resuscitated

2024-10-01 发布

2024-10-01 实施

中国实验灵长类养殖开发协会发布

## 目 次

前言 .....	II
1 范围 .....	1
2 规范性引用文件.....	1
3 术语和定义 .....	1
4 精子冷冻与复苏.....	2
4.1 试剂、耗材及仪器.....	2
4.1.1 试剂.....	2
4.1.2 耗材.....	2
4.1.3 仪器.....	2
4.2 精子冷冻实验步骤.....	2
4.3 精子复苏实验步骤.....	3
附录 A (资料性) 实验所需试剂.....	4
附录 B (资料性) 实验所需耗材.....	5
附录 C (资料性) 实验所用仪器.....	6
参考文献 .....	7

## 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专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国实验灵长类养殖开发协会提出并归口。

本文件主要起草单位：中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心。

本文件参与起草单位：中国实验灵长类养殖开发协会、中国科学院昆明动物研究所、中国医学科学院医学生物学研究所、中国医学科学院医学实验动物研究所、军事医学研究院实验动物中心、广东省实验动物监测所、广东省科学院动物研究所、莫泰科生物技术咨询（北京）有限公司、苏州西山生物技术有限公司、从化市华珍动物养殖场。

本文件主要起草人：孙强、许玉婷、聂艳红、刘璐、黄韧、李秦、魏强、时长军、吕龙宝、和占龙、邱业峰、张睿、黄健华、张玉超。

本标准赞助单位：从化市华珍动物养殖场、广东春盛生物科技发展有限公司、广西雄森灵长类实验动物养殖开发有限公司、广西桂东灵长类开发实验有限公司、广西南宁通灵生物科技有限责任公司、湖北天勤生物科技有限责任公司、海南金港生物技术股份有限公司、四川格林豪斯生物科技有限责任公司、四川横竖生物科技股份有限公司、北京昭衍新药研究中心股份有限公司、昆明亚灵生物科技有限责任公司。

# 食蟹猴/猕猴 精子冷冻与复苏方法

## 1 范围

本文件规定了食蟹猴/猕猴精子冷冻与复苏的方法。

本文件适用于包括：转基因猴模型制备、基因编辑猴模型制备、基因改造猴模型扩繁等食蟹猴/猕猴辅助生殖类型实验中的精液冷冻与复苏。

## 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/T 35823-2018 实验动物 动物实验通用要求

## 3 术语和定义

### 3.1

**精液 Semen**

是精子与精浆的混合液。精子由睾丸产生，在附睾内成熟，通过输精管道输出。精浆主要是前列腺、精囊腺和尿道球腺等附属腺体分泌的混合液，还包括少量睾丸液、附睾液等。精浆占精液体积的90%以上。

### 3.2

**精子冷冻 Sperm Freezing**

指利用冷冻保护剂和逐步降温程序，将精子冻存于液氮中进行长期保存。

### 3.3

**精子复苏 Sperm Resuscitation**

指在需要使用冻存精子的时候，将冻存的精子在适当温度下进行复苏使其重新获得游动活力。

### 3.4

**精液液化 Sperm Liquefaction**

指刚射出的胶冻状形态的精液放置在室温 10-20 分钟后，在纤维蛋白溶解酶的作用下，向液相转变成精子可以充分活动的状态，这个过程就叫做精液液化。

T/CLPBDA0014-2024

## 4 精子冷冻与复苏

### 4.1 试剂、耗材及仪器

#### 4.1.1 试剂

4.1.1.1 实验所需试剂参见附录 A，也可用其他等效试剂。

4.1.1.2 TH3 试剂的配制见本系列标准食蟹猴/猕猴 卵母细胞采集方法--附录 D，也可用其他等效试剂。

4.1.1.3 精子冷冻保护剂使用前分装至 0.2mL 离心管内-20℃保存待用。

#### 4.1.2 耗材

实验所需耗材参见附录 B，也可用其他等效耗材。

#### 4.1.3 仪器

实验所需仪器参见附录 C，也可用其他等效仪器设备。

### 4.2 精子冷冻实验步骤

4.2.1 解冻精子冷冻保护液，放于 37℃ 恒温试管架加热 30 min，摇匀精子冷冻保护液。

4.2.2 将 TH3 放于 37℃ 恒温试管架上预热 30 min。

4.2.3 提前在精子冷冻麦管上标注好具体信息：如动物编号、冷冻日期等。

4.2.4 将采集的精液放于 37℃ 恒温试管架上液化 15-20 min。

4.2.5 将液化好的精液用移液器吸入 1.5 mL 的离心管中，如精液密度大于  $1 \times 10^7$  个/mL，可加适量 TH3 进行稀释。

4.2.6 冷冻保护液和精液按照 1:3 的配比，用移液器吸取所需剂量的冷冻保护液加入精液离心管中。加冷冻液时应一滴一滴慢慢加入，加入一滴就轻摇一下，冷冻液加完后，用移液器轻轻吹打精液与冷冻液的混合液，直至混合均匀。

4.2.7 用注射器连接上提前标记好的冷冻麦管，先吸一段 40  $\mu$ L 的 TH3 液，再吸一段空气，然后吸 80  $\mu$ L 的精子液，再吸一段空气，然后再吸 40  $\mu$ L 的 TH3，最后分别将麦管两头在酒精灯上烧软化后捏紧封口(见图 1)。



图 1. 精液吸入冷冻麦管后将两头封口

4.2.8 先放入 4 °C 的冰箱内 1 h，然后再将麦管放于距液氮面 2cm 的液氮蒸汽上方 30 min，最后放入液氮罐内冷冻保存。

### 4.3 精子复苏实验步骤

4.3.1 提前半小时打开 37 °C 水浴锅让水温升至 37 °C。

4.3.2 提前半小时将 TH3 放于 37 °C 恒温试管架上预热。

4.3.3 用镊子从液氮中取出冷冻麦管，在空气中停留 10 s，然后放 37 °C 的水浴锅中 1 min。

4.3.4 加入 1 mL 预热好的 TH3 液体在 15 mL 的离心管内并将离心管置于 37 °C 恒温试管架上，将精子冷冻麦管两头剪开，用注射器将精子推至 TH3 液体中，静置 10 min。

4.3.5 再加入 4 mL TH3 液体在精子离心管内，静置 10 min。

4.3.6 将混合液 1,800 rpm，离心 5 min，去上清，加入 5 mL 的 TH3 液体。

4.3.7 再将混合液 1,800 rpm，离心 5 min，去上清，加入 1 mL 的 TH3 液体。

4.3.8 再次将混合液 1,800 rpm，离心 5 min，离心后静置等待精子上游。

4.3.9 上游 3min 后取中层的精子液，在培养皿内制备精子液滴，盖上矿物油，放入 37 °C 培养箱待用。

T/CLPBDA0014-2024

## 附录 A

(资料性)

### 实验所需试剂

A.1 精子冷冻保护液

A.2 矿物油

A.3 NaCl

A.4 KCl

A.5  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

A.6  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

A.7  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

A.8  $\text{NaHCO}_3$

A.9 HEPES

A.10 D-Glucose

A.11 Sodium Pyruvate

A.12 Sodium lactate (60% syrup)

A.13 BSA

A.14 penicillin-streptomycin (100X)

A.15 Phenol Red

注：也可用其他等效试剂。



## 附录 B

(资料性)

### 实验所需耗材

B.1 冷冻麦管

B.2 移液器吸头 (10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L)

B.3 离心管(0.2 mL、1.5 mL、15 mL)

B.4 3.5 cm 培养皿

B.5 一次性使用无菌注射器带针 (1 mL)

B.6 镊子

B.7 麦管衔接器

B.8 液氮

B.9 泡沫盒

注：也可用其他等效耗材。



T/CLPBDA0014-2024

## 附录 C

(资料性)

### 实验所用仪器

C.1 移液器 (10  $\mu$ L、200  $\mu$ L、1000  $\mu$ L)

C.2 恒温试管架

C.3 培养箱

C.4 水浴锅

C.5 离心机

C.6 冰箱

C.7 液氮罐

注：也可用其他等效仪器。



### 参考文献

- [1] 胡京美, 许成岩, 李媛, 耿玲, 马刚, 王丽, 陈子江. 冷冻保护剂与精液比例对冷冻复苏后精子活力的影响. 中华男科学杂志, 2009 年 5 期
- [2] 朱文兵, 范立青, 卢光琇. 不同配比的保护剂对人类精子冷冻复苏后活动能力的影响. 中国现代医学杂志, 2005 年 6 月第 15 卷第 11 期
- [3] 司维, 李亚辉, 关沫, 季维智. 四种渗透性防冻剂在猕猴精子低温冷冻保存中对精子功能状态的影响 [J]. 动物学研究, 2004 年 01 期

