

精子冷冻与复苏

Cryopreservation and Resuscitation of Sperm

王燕、许玉婷、李春杨、孙强*

中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心，中国科学院，上海

*通讯作者邮箱: gsun@ion.ac.cn

引用格式: 王燕, 许玉婷, 李春杨, 孙强. (2023). 精子冷冻与复苏. *Bio-101* e1010984. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010984.

How to cite: Wang, Y., Xu, Y. T., Li, C. Y., and Sun, Q. (2023). Cryopreservation and Resuscitation of Sperm. *Bio-101* e1010984. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010984. (in Chinese)

摘要: 精子冷冻与复苏, 是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。在需要使用的时候, 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。复苏后挑选活力良好的精子可用于后续的辅助生殖, 最终得到存活动物个体。本文详细描述了猴精子冷冻与复苏的方法及流程。

关键词: 冷冻, 复苏, 辅助生殖

材料与试剂

1. 冷冻麦管 (IMV, catalog number: 005565)
2. 移液枪及枪头 (Eppendorf)
3. 1.5 ml 离心管 (AXYGEN, catalog number: MCT-150-C-S)
4. 15 ml 离心管 (Corning, catalog number: 430791)
5. 3.5 cm 培养皿 (CORNING, catalog number: 430165)
6. 一次性使用无菌注射器带针 (KDL 1ml)
7. 镊子 (吉尔泰)
8. 液氮
9. 矿物油 (Sigma, catalog number: M8410)
10. 精子冷冻保护液 (Irvine Scientific, catalog number: 90128)
11. TH3 液 (见溶液配方)

12. T3 液（见溶液配方）

仪器设备

1. 恒温试管架（Cook）
2. 培养箱（Thermo Scientific, model: Forma 3111、Forma 371）
3. 冰箱（海信）
4. 水浴锅（bluepard）
5. 离心机（Eppendorfcentrifuge, model: 5702）

实验步骤

一、精子冷冻

1. 解冻精子冷冻保护液，放培养箱 37 °C 加热 30 min，摇匀精子冷冻保护液；
2. 将 TH3 放于 37 °C 恒温试管架上预热 30 min；
3. 提前在精子冷冻麦管上标注好具体信息；
4. 将采集的精子放于 37 °C 恒温试管架上液化 15-20 min；
5. 将液化好的精子用移液枪吸入 1.5 ml 的离心管中，根据精子的液化浓度加入适量的 TH3 液，即精子液化量与 TH3 液的总量是三的倍数；
6. 按照冷冻保护液：精液等于 1:3 的比例，用移液枪在离心管内加入冷冻保护液，加冷冻液时应一滴一滴慢慢加，加入一滴就轻摇一下，冷冻液加完后，用移液枪轻轻吹打；
7. 用注射器连接上提前标记好的冷冻麦管，先吸一段 40 μ l 的 TH3 液，再吸一段空气，然后吸 80 μ l 的精子，再吸一段空气，然后再吸 40 μ 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

8. 先放入 4 °C 的冰箱内 1 h，然后再将麦管放于距液氮面 2 cm 的液氮蒸汽上 30 min，最后放入精子冷冻液氮罐内；

9. 做好详细记录。

二、精子复苏

1. 提前半小时打开 37 °C 水浴锅让水温升至 37 °C;
2. 提前半小时将 TH3 和 T3 放于 37 °C 恒温试管架上预热;
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. 加入 1 ml TH3 液体在 15 ml 的离心管内, 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;
5. 再加入 4 ml TH3 液体在精子离心管内, 静置 10 min;
6. 将精子 1,800 rpm, 离心 5 min, 去上清, 加入 5 ml 的 T3 液体;
7. 再将精子 1,800 rpm, 离心 5 min, 去上清, 加入 1 ml 的 T3 液体;
8. 再次 1,800 rpm, 离心 5 min, 离心后等待精子上游;
9. 上游后取中层的精子, 在培养皿内制备精子滴, 盖上矿物油, 放入培养箱待用。

溶液配方

1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) (表 1)

表1. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium with HEPES (TH3) 配制表

成分	/100ml	/50ml	备注
NaCl	3.329 ml	1.665 ml	200 mg/ml stock
KCl	239 µl	119.5 µl	100 mg/ml stock
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294 µl	147 µl	100 mg/ml stock
MgCl ₂ ·6H ₂ O	102 µl	51 µl	100 mg/ml stock
NaH ₂ PO ₄	48 µl	24 µl	100 mg/ml stock
NaHCO ₃	210.6 mg	105.3 mg	
HEPES	240 mg	120 mg	
D-Glucose	90 mg	45 mg	
Sodium Pyruvate	12 mg	6 mg	
Sodium lactate (60% syrup)	0.17 ml	85 µl	
BSA	300 mg	150 mg	
penicillin-streptomycin (100X)	1 ml	500 µl	
Phenol Red (0.01%)	10 µl	5 µl	
pH	7.4		

2. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium without HEPES (T3) (表 2)

表2. Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate medium without HEPES (T3) 配制表

成分	/100ml	/10ml	备注
NaCl	3.329 ml	333 μ l	200 mg/ml stock
KCl	239 μ l	23.9 μ l	100 mg/ml stock
CaCl ₂ ·2H ₂ O	294 μ l	29.4 μ l	100 mg/ml stock
MgCl ₂ ·6H ₂ O	102 μ l	10.2 μ l	100 mg/ml stock
NaH ₂ PO ₄	48 μ l	4.8 μ l	100 mg/ml stock
NaHCO ₃	210.6 mg	21.06 mg	
Glucose	90 mg	9 mg	
Sodium Pyruvate	12 mg	1.2 mg	
Sodium lactate (60% syrup)	0.17 ml	17 μ l	
BSA	300 mg	30 mg	
penicillin-streptomycin (100X)	1 ml	100 μ l	
Phenol Red (0.01%)	10 μ l	1 μ l	
pH	7.4		

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