

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
C12N 5/06 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810017382.3

[43] 公开日 2008年7月16日

[11] 公开号 CN 101220345A

[22] 申请日 2008.1.23

[21] 申请号 200810017382.3

[71] 申请人 西北农林科技大学

地址 712100 陕西省咸阳市杨凌示范区西农  
路22号西北农林科技大学动物科技学院

[72] 发明人 李青旺 胡建宏 赵宏伟 江中良

[74] 专利代理机构 西安西达专利代理有限责任公司  
代理人 李文义

权利要求书1页 说明书7页

### [54] 发明名称

一种牛冷冻精液稀释液及其制备方法

### [57] 摘要

本发明公开了一种牛冷冻精液稀释液，该100ml 稀释液中各原料的用量为：果糖 0.8 ~ 1.2g、柠檬酸钠 1.4 ~ 1.6g、TRIS 2.3 ~ 2.6g、低密度脂蛋白 7.5 ~ 9.5g、甘油 5 ~ 8ml、青霉素 8.5 ~ 12 万 IU、余量为蒸馏水。其制备方法是：将果糖、柠檬酸钠和 TRIS 溶于蒸馏水中配制成基础液；在基础液中加入青霉素 G 钠和低密度脂蛋白配制成 I 液；在 I 液中添加甘油即配制成 II 液；再调 pH 值为 6 ~ 7.5，然后进行过滤灭菌，冷却至室温，放入 2 ~ 5℃ 冰箱中备用。本发明的牛冷冻精液稀释液效果良好且可靠，能够为牛人工受精提供高质量的优质细管冷冻精液，具有十分广阔的市场应用前景。

1. 一种牛冷冻精液稀释液，其特征在于，该 100 ml 稀释液中各原料的含量为：

果糖 0.8~1.2g、柠檬酸钠 1.4~1.6g、TRIS 2.3~2.6 g、低密度脂蛋白 7.5~9.5 g、甘油 5~8ml、青霉素 8.5~12 万 IU、余量为蒸馏水。

2. 根据权利要求 1 的所述牛冷冻精液稀释液，该 100 ml 稀释液中各原料的含量为：

果糖 1.0g、柠檬酸钠 1.48g、TRIS 2.42 g、低密度脂蛋白 8.0 g、甘油 6.4ml、青霉素 10 万 IU、余量为蒸馏水。

3. 根据权利要求 1 的所述牛冷冻精液稀释液，其特征在于，所述的低密度脂蛋白是提取于新鲜鸡蛋的卵黄。

4. 制备权利要求 1 所述的牛精液冷冻稀释液的方法，其特征在于，包括下列步骤：

1) 称取各种原料果糖、柠檬酸钠、TRIS、青霉素 G 钠、甘油、低密度脂蛋白、蒸馏水备用；

2) 将所述重量的果糖、柠檬酸钠、TRIS 用蒸馏水配置成基础液；

3) 在步骤 2) 所配置的基础液中添加所述量的青霉素 G 钠和低密度脂蛋白配制成 I 液；

4) 在步骤 3) 所配置的 I 液中加入所述量的甘油制成 II 液；

5) 用酸或碱调整 pH 值为 6~7.5，然后进行过滤灭菌，冷却至室温，放入 2~5 °C 冰箱中备用。

## 一种牛冷冻精液稀释液及其制备方法

### 技术领域

本发明属于生物技术领域，涉及动物精液的超低温冷冻保存，特别涉及一种牛冷冻精液稀释液及其制备方法。

### 背景技术

牛精液冷冻保存与人工受精技术的结合在现代养牛业生产中发挥着极其重要的作用，应用冷冻精液进行人工受精可以不受时间、地域、牛品种及个体体格的限制，并且大量减少公牛的饲养数量，降低生产成本，提高优良种公牛的利用率，为养牛业带来巨大的经济效益。同时，牛精液冷冻技术的发展和牛冷冻精液的使用在牛品种引进、杂交改良，以及提高繁殖性能、疾病控制及牛遗传多样性保护方面具有重要的意义。

稀释液在冷冻精液的制作过程中是必不可少的成分，可以补充精子的营养，减少精液黏稠度，降低异物对精子的影响，同时缓和代谢产物的危害作用；另外还能够保护精子，增强其抵抗低温打击和抗氧化的能力，减少冷冻所造成的损伤。目前，在冷冻精液的制作过程中，常常选择易于抑制精子活动，减少能量消耗，延长精子寿命的弱酸性稀释液。通常选用葡萄糖、柠檬酸钠、卵黄、甘油、抗生素等作为稀释液的主要成分。其中添加卵黄的目的是为了降低在向 5 °C 降温过程中精子遭受冷休克的受损程度，但是，卵黄中并不是所有成分都对精子有益，其中某些成分可抑制精子呼吸，降低精子活率，如高密度脂蛋白。卵黄中对精子起保护作用的有效成分则是磷脂和低密

度脂蛋白，如果在稀释液中用低密度脂蛋白替代卵黄，则可提高冷冻—解冻后精子质量。

在我国，尽管近几年来牛精液冷冻技术有了一定的发展，冷冻精液广泛应用，但是目前使用的牛冷冻精液活率仍然很低，一般在36%左右（我国牛冷冻精液活率标准为30%），远远低于国外所使用的活率标准（50%~60%）。由于我国牛冷冻精液活率较低，人工授精后母牛的情期配种率低，受胎率低，从而严重影响了我国牛冷冻精液的进一步推广应用及生产效率的提高。

## 发明内容

针对目前我国牛精子冷冻后活率相对较低的缺陷，本发明的目的在于提供一种牛冷冻精液稀释液，应用该稀释液冷冻牛精液解冻后活率达到50%~68%的效果，大大的提高了我国牛冷冻精液生产效率。

实现上述发明目的技术方案是一种牛冷冻精液稀释液，其特征在于，该100 ml 稀释液中各原料的用量为：

果糖 0.8~1.2g、柠檬酸钠 1.4~1.6g、TRIS 2.3~2.6 g、低密度脂蛋白 7.5~9.5 g、甘油 5~8ml、青霉素 8.5~12 万 IU、余量为蒸馏水。

本发明的最佳配方：该 100 ml 稀释液中各原料的用量为：

果糖 1.0g、柠檬酸钠 1.48g、TRIS 2.42 g、低密度脂蛋白 7.5~9.5 g、甘油 6.4ml、青霉素 10 万 IU、余量为蒸馏水。

本发明所述的低密度脂蛋白是提取于新鲜鸡蛋的卵黄。

本发明还有一个目的是提供制备上述牛精液冷冻稀释液的方法，其特征在于，包括下列步骤：

1) 称取各种原料果糖、柠檬酸钠、TRIS、青霉素 G 钠、甘油、低密度脂

蛋白、蒸馏水备用；

2) 将所述量的果糖、柠檬酸钠、TRIS用蒸馏水配置成基础液；

3) 在步骤2)所配置的基础液中添加所述量的青霉素G钠和低密度脂蛋白配制成I液；

4) 在步骤3)所配置的I液中加入所述量的甘油制成II液；

5) 用酸或碱调整pH值为6~7.5，然后进行过滤灭菌，冷却至室温，放入2~5℃冰箱中备用。

(本发明的制备方法生产出来的只有一种产品II液，但是后边使用方法中却是先使用I液，后使用II液，这样写上下文不一致)

说明：最终产品是II液，但首先要配置I液，前面交代清楚了，应该没有问题。

本发明在国内首次将低密度脂蛋白添加到基础冷冻液中，进行牛精液的冷冻保存，获得了良好的效果，解冻后精子的存活率大大提高，显著提高了精液品质，该发明进一步拓展了超低温生物学的研究范围，为超低温保护材料提供了新的途径。该方法无论在超低温生物学领域，还是在动物繁殖生产方面，均具有其创造性和实用性。

### 具体实施方式

下面结合发明人给的产品制备方法实施例、使用方法实施例来进一步说明本发明的有益效果，但是本发明的保护范围不仅限于此。

#### 实施例1 低密度脂蛋白的提取工艺：

新鲜蛋黄收集后，先用等渗盐溶液(0.17 M NaCl, w/v)将卵黄稀释 2~3 倍，并不断搅拌 1 h，然后在 4℃的环境下 10,000×g 离心 45 min 后，将上清

液与沉淀物分离。为避免蛋黄中所含有的小颗粒物的干扰，同样条件下再次离心所分离出的上清液。将二次离心后收集的上清液与 40%的硫酸铵溶液混合，在 4℃的环境下充分搅拌 1 h 后，混合物离心 45 min (10,000×g, 4℃)，使溶液分层，以沉淀卵黄蛋白。离心后，弃去沉淀物，将上清液（漂浮物）用蒸馏水透析 12 h，以除去溶液中的硫酸铵。在硫酸铵从溶液中完全去除后，再次将溶液离心 45 min (10,000×g, 4℃)，所残余的漂浮即为 LDL，其纯度一般可达 97%。

### 实施例 2 牛冷冻精液稀释液的制备方法

用电子分析天平准确称取 1.0g 果糖、1.48g 柠檬酸钠、2.42g TRIS，将其溶解于 50ml 蒸馏水中，用磁力搅拌器搅拌均匀后，配置成 100ml 基础液。在基础液中添加 10 万 IU 的青霉素 G 钠和 8g 低密度脂蛋白配制成 I 液；在 I 液添加 6.4ml 的甘油配制成 II 液。再用精密 pH 计调整 pH 为 6.37，然后用 0.22 μm 的滤膜进行过滤，放入 2~5℃冰箱中备用。I、II 液需现用现配。

### 实施例 3 牛冷冻精液稀释液的制备方法

用电子分析天平准确称取 0.5g 果糖、2g 柠檬酸钠、1.5g TRIS，将其溶解于 50ml 蒸馏水中，用磁力搅拌器搅拌均匀后，配置成 100ml 基础液。在基础液中添加 5 万 IU 的青霉素 G 钠和 5g 低密度脂蛋白配制成 I 液；在 I 液添加 8ml 的甘油配制成 II 液。再用精密 pH 计调整 pH 为 6.4，然后用 0.22 μm 的滤膜进行过滤，放入 2~5℃冰箱中备用。I、II 液需现用现配。

### 实施例 4 牛冷冻精液稀释液的制备方法

用电子分析天平准确称取 1.5g 果糖、1g 柠檬酸钠、3g TRIS，将其溶解于 50ml 蒸馏水中，用磁力搅拌器搅拌均匀后，配置成 100ml 基础液。在基础

液中添加 12 万 IU 的青霉素 G 钠和 10g 低密度脂蛋白配制成 I 液；在 I 液添加 5ml 的甘油配制成 II 液。再用精密 pH 计调整 pH 为 6.2~6.5，然后用 0.22  $\mu\text{m}$  的滤膜进行过滤，放入 2~5℃ 冰箱中备用。I、II 液需现用现配。

**试验例** 以荷斯坦奶牛精液冷冻保存进行说明。

### （一）冷冻稀释液的配制

用电子分析天平准确称取 1.0g 果糖、1.48g 柠檬酸钠、2.42g TRIS，将其溶解于 50ml 蒸馏水中，用磁力搅拌器搅拌均匀后，配置成 100ml 基础液。在基础液中添加 10 万 IU 的青霉素 G 钠和 8g 的低密度脂蛋白配制成 I 液；在 I 液添加 6.4ml 的甘油配制成 II 液。再用精密 pH 计调整 pH 为 6.37，然后进行过滤灭菌，冷却至室温，放入 2~5℃ 冰箱中备用。I、II 液需现用现配。

### （二）精液的采集

利用假阴道采集法采集公牛精液，精液采集后，立即在 37.5℃ 下镜检，观察精子活力，并用分光光度计在 550nm 处进行比色，计算精子密度。所采集的精液为乳白色或乳黄色，无异味，精子形态正常，密度正常，活力在 0.7 以上的方可用于制作细管冷冻精液。

### （三）精液冷冻

1. 将用含有甘油的 II 液稀释的精液快速装管（0.25ml 细管），封口完毕后在 5℃ 冰箱或恒温箱中平衡 1.5~2h。

2. 平衡完毕后，装细管转移至冷冻室进行冷冻。先用程序冷冻仪冷冻，其程序是：按照 3℃/min 降温的速度，从 5℃ 降温至 -6℃。

3. 细管精液经过程序冷冻仪降温至 -6℃ 后，将细管迅速从冷冻仪中取出，放置在离液氮液上方 2~3cm 处快速降温，其降温速率是 -140℃/min，

然后迅速投入液氮冷冻保存。

#### (四) 细管冻精的解冻及精液品质评定

将超低温冷冻的细管从液氮中迅速取出后，投入 36~40℃水域中 30 秒，然后将精液与 PBS 液混合，在 37℃ 的温度下评定精液质量指标。

1. 用伟力彩色精子质量检测系统 (WLJY-9000) 测定精子的各种运动相关参数。包括：精子活率、活力、前向性 (STR)、直线性 (LIN)、曲线速度 (VCL)、直线速度 (VSL)、侧摆幅度 (ALH)、鞭打频率 (HZ)、摆动性 (WOB)、平均路径速度 (VAP)、平均移动角度 (MAD) 以及 a、b、c、d 四级精子的百分率等；

2. 采用 FITC 标记的花生凝集素染色后用荧光显微镜检测冷冻—解冻后精子顶体的完整性。将解冻后的细管精液用 37℃ 的 PBS 溶液稀释，调整精子密度，用移液枪吸取 30 μL 精液涂片，自然干燥后，室温下用甲醇固定 10 min，然后在每个精液涂片上分别滴上 FITC-PNA 染液，于 37℃、黑暗潮湿环境下孵育。之后用 PBS 液冲洗，自然干燥后滴加增光剂，盖上盖玻片，再用无色指甲油封片。用荧光显微镜检查精子的顶体状况，并用数码相机拍照。

3. 利用低渗膨胀试验 (HOST) 检查精子质膜的完整性。用移液枪吸取精液样品与低渗溶液混合，在 37℃ 下孵育 30 min 后，取 15 μL 精液样品于血细胞计数板上，400× 倒置显微镜下观察不同部位的 5 个视野，根据精子是否呈现卷尾来判断质膜的完整性。

#### (六) 评定结果

应用本发明的冷冻稀释液以及精液的冷冻—解冻方法，其评定结果如下：

1. 冷冻—解冻后精子活率达 50~68% 以上；



- 
2. 冷冻—解冻后精子直线运动速度达  $30\sim 35\ \mu\text{m/s}$ ；精子直线性达 55% 以上；精子平均路径速度达  $35\sim 38\ \mu\text{m/s}$ ；a 级精子的百分率达到 35% 以上；
  3. 精子的顶体完整率达 72% 以上；
  4. 精子的质膜完整率达 55% 以上。