



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2006119203/12, 02.06.2006

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.06.2006

(45) Опубликовано: 27.02.2008 Бюл. № 6

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: RU 2241324 C2, 10.12.2004. SU 986441
A1, 07.01.1983. SU 786947 A1, 15.12.1980. SU
818578 A1, 07.04.1981. SU 591164 A1,
05.02.1978. RU 2257710 C2, 10.08.2005. CS
205516 A, 29.05.1981. BS 33772 A, 16.05.1983.

Адрес для переписки:

141821, Московская обл., Дмитровский р-н, п.
Рыбное, ВНИИПРХ, патентный отдел

(72) Автор(ы):

Докина Ольга Борисовна (RU),
Цветкова Людмила Ивановна (RU),
Пронина Наталья Дмитриевна (RU),
Миленко Владимир Алексеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное унитарное
предприятие "Всероссийский научно-
исследовательский институт пресноводного
рыбного хозяйства" (ФГУП "ВНИИПРХ") (RU)

(54) СПОСОБ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИЯ СПЕРМЫ ОСЕТРОВЫХ РЫБ

(57) Реферат:

Изобретение относится к рыбной промышленности и может быть использовано в искусственном разведении осетровых рыб. Способ включает разбавление спермы перед замораживанием защитным раствором, содержащим сахарозу, хлорид калия и метанол, и последующее замораживание в парах жидкого азота. В защитный раствор вводят в качестве дополнительного криопротектора глицерин, замораживание разбавленной спермы

осуществляют в три этапа. Компоненты защитного раствора берут в следующем соотношении, мас. %: сахароза 0,05-0,5; хлорид калия 0,01-0,15; метанол 6-12; глицерин 0,05-5; дистиллированная вода - остальное. Обеспечивается сохранность оплодотворяющей способности спермы при криоконсервации за счет использования более эффективного состава защитного раствора и более щадящего режима замораживания. 1 з.п. ф-лы, 3 табл.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 317 703** ⁽¹³⁾ **C1**

(51) Int. Cl.

A01K 61/00 (2006.01)

A01N 1/02 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2006119203/12, 02.06.2006**

(24) Effective date for property rights: **02.06.2006**

(45) Date of publication: **27.02.2008 Bull. 6**

Mail address:

**141821, Moskovskaja obl., Dmitrovskij r-n, p.
Rybnoe, VNIIPRKh, patentnyj otdel**

(72) Inventor(s):

**Dokina Ol'ga Borisovna (RU),
Tsvetkova Ljudmila Ivanovna (RU),
Pronina Natal'ja Dmitrievna (RU),
Milenko Vladimir Alekseevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federal'noe gosudarstvennoe unitarnoe
predpriyatie "Vserossijskij nauchno-
issledovatel'skij institut presnovodnogo
rybnogo khozjajstva" (FGUP "VNIIPRKh") (RU)**

(54) **METHOD FOR CRYOGENIC PRESERVATION OF STURGEON FISH SEMEN**

(57) Abstract:

FIELD: fish industry, in particular, artificial rearing of sturgeon fish.

SUBSTANCE: method involves diluting semen with freezing protective solution before freezing procedure, said solution containing saccharose, potassium chloride, and methanol; freezing in liquid nitrogen vapor; introducing into protective solution glycerin as additional freezing protective agent; freezing diluted semen in three stages; using protective solution

components in the following ratio, wt%: saccharose 0.05-0.5; potassium chloride 0.01-0.15; methanol 6-12; glycerin 0.05-5; distilled water the balance.

EFFECT: retention of semen impregnation capacity after cryogenic preservation process owing to utilization of more effective composition of freezing protective solution and moderate freezing mode.

2 cl, 3 tbl, 3 ex

RU 2 3 1 7 7 0 3 C 1

RU 2 3 1 7 7 0 3 C 1

Изобретение относится к рыбной промышленности и может найти применение в искусственном разведении рыб, преимущественно осетровых, и при создании низкотемпературных генетических банков с целью сохранения биоразнообразия рыб.

Известны способы криоконсервации спермы сибирского осетра и стерляди (Tsvetkova L.I., Cosson J., Linhart O., Billard R. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser Baeri* and *A. ruthenus* // J. Appl. Ichthyol. - 1996. - V.12. - P.107-112), а также сибирского осетра, сахалинского осетра и севрюги (Drokin S.I., Kopeika E.F. Cryopreservation and phospholipids content of spermatozoa of some sturgeon species // 3 Int. Symp. Sturgeon, Piacenza, Italy, July 8 - 11, 1997. - Book. Abstr., Piacenza, 1997. - P.143-144), в которых для разбавления спермы используются защитные растворы на основе трис-НСI буфера (рН 8,0) с добавлением сахарозы, желтка куриного яйца и диметилсульфоксида в качестве криопротекторов. Однако применяемые криопротекторы диметилсульфоксид и желток недостаточно эффективны: сперма, криоконсервированная этими способами, оплодотворяла лишь 20-60% икры осетровых рыб.

Наиболее близким способом того же назначения к заявляемому изобретению является способ криоконсервирования спермы сибирского, русского и атлантического осетров, предусматривающий разбавление спермы защитным раствором, приготовленным на трис-НСI буфере (рН 8,0), содержащим 23,4 мМ сахарозы, 0,25 мМ хлорида калия и 10% метанола, и замораживание разбавленной спермы в пластиковых соломинках в парах жидкого азота (на высоте 3-4 см над его поверхностью) в течение 3 минут с последующим погружением в жидкий азот (Urbanyi B., Horvath A., Kovacs B. Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm // Aquaculture International. - 2004. - V.12. - P.47-56). Применение этого способа позволило получить при оплодотворении икры консервированной спермой от 17,4 до 50,0% выклева личинок.

Данный способ не позволяет сохранить высокую оплодотворяющую способность криоконсервированной спермы, что обусловлено как составом защитного раствора, так и способом замораживания. Содержание сахарозы и хлорида калия в используемом защитном растворе в указанных концентрациях недостаточно эффективно. Избыточное содержание сахарозы снижает его протективное действие, а недостаток хлорида калия не обеспечивает необходимого снижения двигательной активности клеток перед замораживанием. Приготовление защитного раствора на трис-НСI буфере не оказывает положительного влияния на сохранность и оплодотворяющую способность размороженной спермы. В применении буферной системы в данном случае нет необходимости, так как добавление остальных компонентов в указанных концентрациях не изменяет рН защитного раствора, а сам трис(оксиметил)аминометан (трис) не обладает криопротективными свойствами. Быстрое замораживание спермы при постоянной температуре не является целесообразным, так как быстрая кристаллизация внутриклеточной жидкости и образование крупных кристаллов льда при резком снижении температуры, вызывающие повреждение клеточных структур, приводит либо к утрате оплодотворяющей способности, либо к гибели значительного количества сперматозоидов.

Настоящее изобретение направлено на повышение сохранности оплодотворяющей способности спермы осетровых рыб при криоконсервации за счет более эффективного состава защитного раствора и более щадящего режима замораживания.

Указанный технический результат достигается тем, что в известном способе криоконсервирования спермы осетровых рыб, предусматривающем разбавление спермы перед замораживанием защитным раствором, содержащим сахарозу, хлорид калия и метанол, и последующее замораживание в парах жидкого азота, особенность заключается в том, что в защитный раствор вводят в качестве дополнительного криопротектора глицерин, замораживание разбавленной спермы осуществляют в три этапа, при этом компоненты защитного раствора берут в следующем соотношении, мас. %: сахароза 0,05-0,5; хлорид калия 0,01-0,15; метанол 6-12; глицерин 0,05-5; дистиллированная вода - остальное.

Замораживание целесообразно осуществлять от 5 до минус 15°C со скоростью 2-5°C/мин, от минус 15 до минус 70°C со скоростью 10-20 °C/мин, а затем плавно погружать в жидкий азот.

5 Введение в защитный раствор дополнительного криопротектора глицерина, обладающего выраженными антифризными свойствами и способного связывать внутриклеточную воду, снижает вероятность повреждения клеток из-за образования крупных кристаллов льда, тем самым повышает протекторное действие раствора. Кроме того, стабилизация глицерином белков и ферментов препятствует их холодной денатурации.

10 Использование в защитном растворе двух криопротекторов, проникающих в клетку через мембрану, позволяет уменьшить риск температурного шока для сперматозоидов и их повреждения благодаря синергетическому эффекту снижения температуры кристаллизации внутриклеточной жидкости. Совместное воздействие используемых криопротекторов, благодаря разным размерам и строению молекул, способствует также

15 продлению защитного действия раствора за счет их разной скорости диффузии через мембрану и взаимодействию с разными структурами клетки.

Использование в защитном растворе сахарозы в меньших концентрациях по сравнению с известным способом снижает осмотическое напряжение на мембранах, предотвращает осмотический шок и обезвоживание клеток из-за экзоосмоса. Применение хлорида калия в

20 значительно больших концентрациях позволяет снизить двигательную активность клеток перед замораживанием, что уменьшает вероятность их повреждения.

Предлагаемый состав защитного раствора предотвращает повреждение клеточных структур из-за преждевременной внутриклеточной кристаллизации, что в совокупном

25 воздействии с предлагаемым режимом замораживания обеспечивает сохранение оплодотворяющей способности 60-80% клеток (в зависимости от качества нативной спермы).

Замораживание спермы в три этапа с медленным снижением температуры позволяет избежать повреждения клеточных структур и тем самым способствует сохранности сперматозоидов и их оплодотворяющей способности.

30 Рекомендуемые пределы содержания компонентов защитного раствора и режимы замораживания установлены в процессе многочисленных экспериментов.

Таким образом, совокупность отличительных признаков описываемого способа обеспечивает достижение указанного технического результата.

35 Проведенный анализ уровня техники позволил установить, что не обнаружен источник, характеризующийся признаками, тождественными всем существенным признакам заявленного изобретения, следовательно, предлагаемое изобретение соответствует условию "новизна".

Дополнительный поиск известных решений показал, что заявленное изобретение не вытекает для специалиста явным образом из известного уровня техники, поскольку

40 совокупное действие защитного раствора указанного состава и предлагаемого режима замораживания спермы проявляет новые свойства с точки зрения воздействия на биологические объекты. Следовательно, заявленное изобретение соответствует условию "изобретательский уровень".

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения с получением

45 вышеуказанного технического результата.

Способ осуществляется следующим образом.

Защитный раствор для криоконсервации спермы осетровых рыб готовят непосредственно перед применением, растворяя в дистиллированной воде в

50 соответствующих концентрациях, мас. %: сахарозу 0,05-0,5; хлорид калия 0,01-0,15; метанол 6-12; глицерин 0,05-5; дистиллированная вода - остальное.

Сперму охлаждают до 10-15°C в холодильнике в течение 30 минут. К охлажденной сперме при непрерывном перемешивании добавляют охлажденный до той же температуры защитный раствор в объемном соотношении 1:1. Суспензию спермы в защитном растворе

оставляют на эквilibрацию в течение 1 часа при температуре 0-5°C. Разбавленную сперму разливают в хлорвиниловые пробирки емкостью 1,5 мл, которые герметизируют и устанавливают на диск замораживателя. Замораживание спермы проводят путем медленного опускания к поверхности жидкого азота пробирок со спермой, установленных на диск замораживателя, снабженного датчиком температуры и самописцем,

Сперму осетровых рыб замораживают по следующей программе:

I этап: от +5 до минус 15°C со скоростью 2-5°C/мин,

II этап: от минус 15 до минус 70°C со скоростью 10-20°C/мин,

III этап: плавное погружение в жидкий азот.

Размораживание спермы осуществляют, извлекая пробирки из жидкого азота и помещая их в водяную баню или устройство для размораживания МТА-70 с температурой 38-40°C, где встряхивают в течение 20-40 с до появления в них жидкой фазы.

В размороженных образцах определяют количество подвижных сперматозоидов.

Непосредственно после этого размороженную сперму удовлетворительного качества используют для осеменения икры. Для активации размороженных сперматозоидов используют технологическую воду. Осемененную икру обесклеивают и инкубируют согласно технологии воспроизводства осетровых рыб.

Сущность изобретения иллюстрируется примерами:

Пример 1.

На Конаковском заводе товарного осетроводства и в лаборатории криобиологии ВНИИ пресноводного рыбного хозяйства проводилась криоконсервация спермы сибирских осетров (ленской популяции) разного качества с использованием различных составов защитных растворов. Охлажденные до 15°C образцы спермы разбавляли в соотношении 1:1 защитными растворами, охлажденными до той же температуры. Полученную суспензию эквilibрировали в течение 1 часа при 0°C, затем разливали в хлорвиниловые пробирки объемом 1,5 мл и замораживали по трехэтапной программе: от 5 до -15°C со скоростью 2°C/мин, от -15 до -70°C со скоростью 20°C/мин, затем плавно погружали в жидкий азот. Размораживание пробирок осуществляли в приборе МТА-70 при температуре 38°C. Эффективность криоконсервации оценивали по оплодотворению икры размороженной спермой. Опыты ставились в лабораторных условиях на чашках Петри. Зависимость результатов оплодотворения икры сибирских осетров размороженной спермой от состава защитного раствора представлена в табл. 1.

Во всех опытах, где качественный и количественный состав защитных растворов соответствовал рекомендуемому в заявляемом изобретении пределам содержания компонентов, уровень оплодотворения икры криоконсервированной спермой был высоким, в ряде случаев даже превышал уровень оплодотворения свежей спермой в контроле, что свидетельствует о высокой эффективности примененного способа криоконсервации, позволяющего сохранять жизнеспособность и высокую оплодотворяющую способность сперматозоидов.

№ опыта	Содержание компонентов защитного раствора, %						Оплодотворение икры размороженной спермой	
	Сахароза	KCl	Метанол	Глицерин	Трис-HCl pH8	Дистиллированная вода	% оплодотворения	% от контроля
1	0,4	0,05	12	0,1	до 100	-	11,1	12,9
	0,4	0,05	12	0,1	-	до 100	62,1	72,4
	0,5	0,1	12	0,1	-	до 100	61,4	71,6
	0,6	0,1	12	0,1	-	до 100	50,5	58,7
2	0,05	0,05	12	0,1	-	до 100	62,4	93,1

5	3	0,1	0,02	8	0,2	-	до 100	64,7	73,5	
		0,1	0,04	8	0,2	-	до 100	70,5	80,1	
		0,1	0,15	8	0,5	-	до 100	74,7	84,9	
		0,1	0,20	8	0,5	-	до 100	49,8	56,7	
		0,1	0,01	6	0,1	-	до 100	63,5	72,2	
		0,1	0,01	8	-	-	до 100	52,1	59,3	
		1	0,1	10	5	-	до 100	64,9	73,8	
10	4	0,1	0,06	8	0,1	-	до 100	81,0	96,4	
		5	0,2	0,06	8	0,1	-	до 100	73,3	102,4
			0,2	0,05	7	0,1	-	до 100	66,7	93,2
			0,2	0,04	7	0,1	-	до 100	72,0	100,6
15	6	0,2	0,1	7	0,1	-	до 100	72,2	100,8	
		7	0,1	0,06	8	0,5	-	до 100	65,8	91,0
			0,1	0,08	8	0,05	-	до 100	81,4	102,6
			0,1	0,08	8	0,1	-	до 100	82,8	104,4
			0,1	0,08	8	0,5	-	до 100	85,6	107,9
0,1	0,08	8	1	-	до 100	79,2	99,9			
20	7	0,1	0,08	8	2	-	до 100	73,1	92,2	

Пример 2.

На Конаковском заводе товарного осетроводства, в садковом тепловодном хозяйстве на Краснодарской ТЭЦ, на Адыгейском осетровом заводе, на живорыбной базе Крас-НИИРХа "Читук", а также в криобанке ВНИИПРХ с целью формирования коллекции криобанка проводилась криоконсервация спермы разных видов осетровых рыб заявляемым способом. Охлажденные до 10°C образцы спермы разбавляли в соотношении 1:1 охлажденным до той же температуры защитным раствором, содержание компонентов которого соответствовало рекомендуемым в заявляемом изобретении пределам. Полученные суспензии эквilibрировали в течение 1 часа при 0°C, затем разливали в хлорвиниловые пробирки объемом 1,5 мл и замораживали по трехэтапной программе, описанной в примере 1, за исключением того, что охлаждение от 5 до минус 15°C проводили со скоростью 5°C/мин, от минус 15 до минус 70°C со скоростью 15°C/мин. Размораживание пробирок осуществляли в приборе МТА-70 при температуре 40°C. Проверку оплодотворяющей способности образцов спермы проводили в лабораторных условиях на чашках Петри. Результаты проверки в зависимости от составов использованных защитных растворов представлены в табл. 2.

Вид рыбы	Содержание компонентов защитного раствора, %					Оплодотворение икры размороженной спермой	
	Сахароза	KCl	Метанол	Глицерин	Дистиллированная вода	% оплодотворения	% от контроля
Русский осетр	0,5	0,05	10	0,05	до 100	62,7	-
						78,0	91,8
						81,0	96,4
Стерлядь	0,2	0,1	8	0,1	до 100	82,9	-
Белуга						60,0	-
Сибирский осетр (байкальская популяция)						64,2	-
Сибирский осетр (ленская популяция)						60,1	-
Сибирский осетр (ленская популяция)						63,7	88,1
Сибирский осетр (ленская популяция)						69,9	106,0
Сибирский осетр (ленская популяция)						64,0	92,3
Стерлядь						64,6	-
Белуга						60,8	130,0
Северюга						75,0	-

5	Сибирский осетр (ленская популяция)	0,1	0,08	8	0,5	до 100	68,7	179,4
							92,3	121,1
							77,9	95,6
							63,5	87,1
							66,4	77,8
							72,3	97,4
							73,3	98,9
Сибирский осетр (обская популяция)							72,6	89,0
Русский осетр							62,3	120,5

10 Приведенные данные свидетельствуют о том, что оплодотворяющая способность криоконсервированной заявляемым способом спермы разных видов осетровых рыб сохраняется на уровне нативной спермы в контроле, а иногда и превосходит ее.

Пример 3.

15 В производственных условиях Конаковского завода товарного осетроводства было проведено осеменение промышленных партий икры сибирских осетров смесью спермы нескольких самцов, криоконсервированной способом, описанным в примере 1, за исключением того, что защитный раствор содержал, мас. %: сахарозу - 0,1, КСI - 0,08, метанол - 8, глицерин - 0,7, дистиллированную воду - остальное. Осеменение и инкубация оплодотворенной икры осуществлялись в соответствии с принятой в 20 рыболовной практике технологией воспроизводства осетровых рыб. Результаты оплодотворения партий икры по 100 и 300 г разным количеством размороженной спермы сибирских осетров представлены в табл. 3.

Таблица 3.

Результаты оплодотворения икры сибирских осетров криоконсервированной спермой в промышленных условиях						
№ опыта	Объем икры, мл	Объем спермы, мл	Объем активатора, мл	Разбавление спермы активатором	Оплодотворение икры размороженной спермой	
					% оплодотворения	% от контроля
1	100	3	300	1:100	50,0	73,4
2		6	300		69,1	101,4
3	300	9	900	1:100	58,0	76,7
4		13,5	1350		58,7	77,6
5		18	1800		75,2	99,4

Полученные результаты свидетельствуют о возможности успешного применения криоконсервированной заявляемым способом спермы для осеменения икры в промышленных масштабах при разных соотношениях объемов спермы, икры и активатора.

35 Приведенные примеры иллюстрируют высокую эффективность криоконсервирования спермы осетровых рыб заявляемым способом, обеспечивающим выживаемость и высокую оплодотворяющую способность сперматозоидов.

Таким образом, изложенные выше сведения свидетельствуют о выполнении при использовании заявленного изобретения следующей совокупности условий:

40 - способ криоконсервирования спермы рыб по заявленному изобретению предназначен для использования в промышленности, в частности для криоконсервации спермы осетровых рыб с использованием защитного раствора, компоненты которого в указанных концентрациях в совокупности с предлагаемым режимом замораживания обеспечивают выживаемость и высокую оплодотворяющую способность размороженных сперматозоидов;

45 - для заявленного способа в том виде, как он охарактеризован в независимом пункте изложенной формулы изобретения, подтверждена возможность его осуществления с помощью описанных в заявке средств и методов.

Следовательно, заявленное изобретение соответствует условию "промышленная применимость".

Прототип

50 Urbanyi B., Horvath A., Kovacs B. Successful hybridization of Acipenser species using cryopreserved sperm // Aquaculture International. - 2004. - V.12. - P.47-56.

Впервые проведена успешная гибридизация стерляди (*A. ruthenus*) × сибирского осетра (*A. baeri*), стерляди × русского осетра (*A. gueldenstaedti*) и стерляди × атлантического

осетра (*A. sturio*) с использованием криоконсервированной спермы самцов осетров и гибрида стерлядь × стерлядь в качестве контроля. Сперму всех трех видов разбавляли защитным раствором, содержащим 23,4 мМ сахарозы, 0,25 мМ KCl, 30 мМ трис (pH 8.0) и 10% метанола. Образцы замораживали в пластиковых соломинках в парах жидкого азота на высоте 3 см над уровнем жидкого азота в течение 3 мин. После оттаивания примерно 3000 икринок стерляди было оплодотворено размороженной спермой из шести соломинок. Выклев личинок после оплодотворения спермой стерляди составил 30,6%, в то время как для гибридов *A. ruthenus* × *A. baeri*, *A. ruthenus* × *A. gueldenstaedti* и *A. ruthenus* × *A. sturio* эти показатели составляли соответственно 50%, 17,4% и 34%. Для подтверждения межвидовой гибридизации использовали морфометрические маркеры, а также оценку произвольно амплифицированной полиморфной ДНК (RAPD).

Aquaculture International 12: 47-56, 2004. © 2004 Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands.

Successful hybridization of Acipenser species using cryopreserved sperm

BELA URBANYI^{1*}, AKOS HORVATH² BALAZS KOVACS² Department of Fish Culture, Faculty of Agriculture and Environmental Sciences, Stent 1st van University, PösterK. u. 1., GodMS, H-2103, Hungary, ¹-Agricultural Biotechnology Center, Szent-Györgyi Albert ut 4, Gdaollo. H-2100, Hungary; * Author for correspondence (e-mail: urbanvib(a)nt.kts.sau.hu; phone: +36-28-522-000/1657; fax: +36-28-410-804).

Received 10 December 2002; accepted 20 June 2003

Abstract Successful hybridization of sterlet (*Acipenser ruthenus*) × Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*), sterlet × Russian sturgeon (*Acipenser gueldenstaedti*) and sterlet × European sturgeon (*Acipenser sturio*) was carried out for the first time using cryopreserved semen of sturgeon males and sterlet × sterlet crosses as controls. Sperm of all three species was diluted with a cryodiluent composed of 23.4 mM sucrose, 0.25 mM KCl, 30 mM Tris (pH 8.0) and 10% methanol. The samples were frozen in plastic straws in the vapor of liquid nitrogen at the height of 3 cm above the level of nitrogen for 3 min. Following thawing approximately 3000 sterlet eggs were fertilized with six straws of frozen-thawed sperm. The hatching rate with sterlet sperm was 30.6% while the hatching rate of *A. ruthenus* × *A. baeri*, *A. ruthenus* × *A. gueldenstaedti* and *A. ruthenus* × *A. sturio* hybrids was 50, 17.4 and 34%, respectively. Morphometric markers as well as random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay was used to verify interspecific hybridization.

Key words: Cryopreservation, Hybrids, RAPD, Sperm, Sturgeon

Формула изобретения

1. Способ криоконсервирования спермы осетровых рыб, включающий разбавление спермы перед замораживанием защитным раствором, содержащим сахарозу, хлорид калия и метанол, и последующее замораживание в парах жидкого азота, отличающийся тем, что в защитный раствор вводят в качестве дополнительного криопротектора глицерин, замораживание разбавленной спермы осуществляют в три этапа, при этом компоненты защитного раствора берут в следующем соотношении, мас. %:

сахароза	0,05-0,5
хлорид калия	0,01-0,15
метанол	6-12
глицерин	0,05-5
дистиллированная вода	остальное

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что замораживание спермы осуществляют от 5 до -15°C со скоростью 2-5°C/мин, от -15 до -70°C со скоростью 10-20°C/мин, а затем плавно погружают в жидкий азот.