长爪沙鼠精子冷冻保存

Sperm Cryopreservation of Mongolian Gerbil

李长龙^{1, #}, 张静^{2 #}, 郭萌¹, 刘世景², 侯金莲², 朱艳敏², 吕珊², 杜小燕¹, 常在², 陈振文^{1*}

¹基础医学院, 首都医科大学, 丰台区, 北京市; ²实验动物中心, 清华大学, 海淀区, 北京;

*通讯作者邮箱: czwen@ccmu.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 李长龙, 张静, 郭萌, 刘世景, 侯金莲, 朱艳敏, 吕珊, 杜小燕, 常在, 陈振文. (2021). 长爪沙鼠精子冷冻保存. *Bio-101* e1010927. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010927.

How to cite: Li, C. L., Zhang, J., Guo, M., Lui, S. J. Hou, J., L, Zhu, Y., M., Lv, S., Du, X., Y., Chang, Z., and Chen, Z., W. (2021). Sperm Cryopreservation of Mongolian Gerbil. *Bio-101* e1010927. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010927. (in Chinese)

摘要: 长爪沙鼠精子冷冻保存是动物保种和确保遗传多样性的重要基础性工作, 也是实验动物生物净化的常用技术。我们综合考虑了年龄等多种因素, 通过实验验证制定本技术规程。结果表明, 方法有效可行, 为后续其他工作奠定了良好基础。

关键词: 长爪沙鼠, 精子, 冷冻保存, 复苏

材料与试剂

1. 麦管 (Planer, catalog number: FCBS010287)
2. EP 管 (Eppendorf)
3. 矿物油 (sigma, catalog number: M8410)
4. 精子冻存液 (CPA, catalog number: KYD-001-EX)
5. HTF (CPA, catalog number: R18S3)

仪器设备

1. 35 mm 培养皿(Nunc-153066)
2. 计时器 (kubler)
3. 浮漂 (自行制备)

4. 手术器械购置上海医疗器械（集团）有限公司，手术剪(Y00030,10cm 直尖头)，解剖剪(JD1050, 10cm, 直有钩)，眼科镊(JD1070, 10cm 直有钩)，显微镊(WA3210)，显微剪(WA1030)

实验步骤

1. 实验前准备

- ①标记好麦管编号。
- ②制作冻存管套，打好孔。标明麦管编号，长爪沙鼠品系，实验室 PI，冻存日期和实验者。
- ③提前将浮漂和冻存管套放入液氮中进行预冷。
- ④做 120 μ L 精子冻存剂(CPA)高滴。先用冻存保护剂做 60 μ L，覆盖少量矿物油后再加入 60 μ L，再用矿物油进行完全覆盖。
- ⑤另做两个 30 μ L 的 CPA 洗滴，用于在显微镜下清洗附睾(去除脂肪和血)
- ⑥取 2 ml 左右 HTF，用作于麦管的填充剂。

2. 实验步骤

- ①挑选适龄雄鼠，对雄鼠安死术。长爪沙鼠的雄鼠一般选择 10 w 以上，最佳 12 ~18 w。
- ②手术分离附睾，置常温的矿物油里清洗 2 遍；之后取出附睾，在吸水纸上去除上面肉眼可见的脂肪和血。
- ③将附睾放入 30 μ L CPA 溶液的洗滴中，将附睾上残存的脂肪和血液完全清理干净。将附睾放入被矿物油覆盖的 120 μ L CPA 做成的液滴中，用显微剪剪 3 下，让精子自然游出。
- ④常温下放在显微镜台面上 3 分钟，每分钟都要轻轻摇几下培养皿，使附睾中的精子可以尽量扩散到 CPA 中。用 10 μ L 移液器吸取精液，做成 10 μ L 的精液滴。
- ⑤接下来准备冻存管，用三通阀分别吸取 150 μ L HTF，30 μ L 空气，10 μ L 精子，然后吸取空气直至上端 HTF 溶液吸到麦管的过滤棉塞处。
- ⑥麦管两端用封口机进行封口。将封好口的麦管放入浮漂内，预冷 10 min。
- ⑦10 min 后将麦管放入液氮中的冻存管套里。

致谢

感谢国家自然科学基金项目（Nos. 31572341, 31572347, 31772545, 31572348）和国家科技支撑计划项目（No. 2015BAI09B00）的资助。

参考文献

1. Low, B. E., Taft, R. A. and Wiles, M. V. (2016). [Mouse Sperm Cryopreservation and Recovery of Genetically Modified Mice.](#) *Methods Mol Biol* 1438: 55-66.