长爪沙鼠胚胎冷冻保存与复苏

Embryo Cryopreservation and Recovery in Mongolian Gerbils

李长龙^{1, #}, 张静^{2 #}, 郭红刚^{3 #}, 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; ³杭州医学院, 杭州, 浙江;

*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, 郭红刚, 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* e1010928. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010928.

How to cite: Li, C. L., Zhang, J., Guo, H., G., 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* e1010928. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010928. (in Chinese)

摘要: 长爪沙鼠 (*Meriones unguiculatus*, Mongolian Gerbil) 胚胎冷冻保存是确保遗传多样性的重要基础性工作, 也是实验动物保种和生物净化的常用技术。我们综合考虑了年龄、胚胎细胞等多种因素, 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, 胚胎, 冷冻保存, 复苏

材料与试剂

1. 医用缝合线 (上海浦东金环医疗用品股份有限公司, catalog number: 11U0907)
2. 麻醉剂 Avertin (sigma-Aldrich, catalog number: T4,840-2)
3. 人绒毛膜促性腺激素 (hCG) (宁波第二激素厂, catalog number: 140322)
4. 孕马血清促性腺激素 (PMSG) (宁波第二激素厂, catalog number: 140324)
5. 矿物油 (sigma-Aldrich, catalog number: M8410)
6. M2 培养 (sigma-Aldrich, catalog number: M7167)
7. DMSO (sigma-Aldrich, catalog number: D2650)
8. 1 M DMSO (自行配制, 参见参考文献)

9. 冻存液 DAP213（自行配制，参见参考文献）
10. DPBS 缓冲液（GIBCO, catalog number: C14190500BT）
11. KSOM (Merck Millipore, catalog number: MR-107-D)
12. sucrose (Merck Millipore, catalog number: 1.00892.9050)

仪器设备

1. CO₂ 培养箱(Thermo, Herocell 180)
2. 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）
3. 体视显微镜(Motic SN-168)

实验步骤

1. 超数排卵与合笼交配

取 6 周龄雌性长爪沙鼠，每只动物腹腔注射 PMSG 10 IU，70 小时后腹腔注射 hCG 10 IU，之后与 10 周龄以上雄性长爪沙鼠合笼(图 1)，使用露底的笼盒以便检查阴道栓。

图 1. 检查阴道栓使用的露底笼盒

合笼第二天在检查到阴道栓（长爪沙鼠阴道栓呈乳白色，外形及大小类似大米，但两端稍尖），之后将雌性动物与雄性动物分开饲养，第三天早上对雌性长爪沙鼠实施

安死术，使用 DPBS 溶液冲出输卵管全部 2-cell 胚胎，进行胚胎冻存

2. 2-cell 期胚胎冷冻试剂准备：（根据胚胎数量，决定使用每种试剂的量）

①DMSO（常温），DAP213A，DAP213B 冰上预冷 1 小时以上。

②实验过程使用的 EP 管需要冰上预冷；冻存管常温。

③DAP213（DAPA：DAPB=1：1）使用前配制混匀。

④在冻存管标记品系信息（一定清晰准确，以防品系混淆）。

3. 洗卵和冻存：

在培养皿中做四个 1M 的 DMSO 液滴（100 μ L/液滴），其中一个液滴用于清洗胚胎，其他的液滴则用于放置清洗后准备冷冻的胚胎。用口吸管将一组胚胎移入其中的一个液滴内，以清洗其培养液或胚胎采集溶液等，然后均匀分配胚胎至另外三个液滴中。例如，采集了 150 个胚胎，先将其移入一个 DMSO 液滴中，然后按照每组 50 个分别移入另外三个液滴中。用移液器调整移液量至 5 μ L 后吸取 50 枚胚胎，移入冷冻管内，然后将冷冻管放入冰上，在 0 $^{\circ}$ C 状态平衡 5 分钟后，加入预先放置在 0 $^{\circ}$ C 冰上平衡的 DAP213 溶液 45 μ L，盖子拧紧后回拧半圈，在冰上再平衡 5 分钟，取出平衡后的冷冻管，迅速装入冷冻管固定夹后，直接浸入液氮中。

4. 胚胎复苏

准备预热的 KSOM 培养滴，80 μ L/滴。

从液氮中取出冻存管，倒掉液氮，室温放置 30 s，加入 900 μ L sucrose，轻轻吹打 10 次左右，吸出试剂和胚胎；再吸取剩余的 sucrose 加入冻存管，吸出遗漏的胚胎。

致谢

感谢国家自然科学基金项目（Nos. 31572341, 31572347, 31772545, 31572348）、国家科技支撑计划项目（No.2015BAI09B00）和“十三五”时期北京市属高校高水平教师队伍支持计划(IDHT20170516)的资助。

参考文献

1. 郭红刚，卢领群，周生来，戴方伟，李巍，李长龙，陈振文，萨晓婴(2014). [乙二醇玻璃化冷冻液二步法对长爪沙鼠2-细胞胚胎的冷冻保存](#). 实验动物科学.31: 28~31，

64~65

2. 梁洋,杜文敬,王春生,朴善花,安铁洙(2010). 小鼠早期胚胎的EFS20/40、EFS40、DAP213和GP25玻璃化法冷冻保存. 江西农业大学学报.32(06): 1248~1252