树鼯睾丸处理诱导生精细胞死亡

Depletion of Endogenous Germ Cells of Tree Shrew

毕蕊^{1, #}, 李聪^{2, #}, 马玉华³, 郑全振¹, 郑萍^{2, *}

¹动物模型与人类疾病机理重点实验室, 昆明动物研究所, 中国科学院大学, 昆明市, 云南省; ²遗传资源与进化国家重点实验室, 昆明动物研究所, 中国科学院大学, 昆明市, 云南省; ³灵长类中心, 昆明动物研究所, 中国科学院, 昆明市, 云南省;

*通讯作者邮箱: zhengp@mail.kiz.ac.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 毕蕊, 李聪, 马玉华, 郑全振, 郑萍. (2021). 树鼯睾丸处理诱导生精细胞死亡. *Bio-101* e1010933. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010933.

How to cite: Bi, R., Li, C., Ma, Y. H., Zheng, Q. Z. and Zheng, P. (2021). Depletion of Endogenous Germ Cells of Tree Shrew. *Bio-101* e1010933. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010933. (in Chinese)

摘要: 通过精原干细胞建立转基因树鼯, 需要将转基因的精原干细胞移植到受体树鼯的睾丸中, 因此需要先将受体树鼯内源的生精细胞清除。前期研究发现, 白消安(busulfan)给药可以有效去除小鼠、树鼯和猕猴等实验动物睾丸中的内源生精细胞, 因此被广泛用于精原干细胞移植受体制备和无精子症动物模型的建立。本实验方案描述了通过白消安腹腔给药(35 mg/kg)去除树鼯内源生精细胞的具体操作方法, 为后续树鼯转基因精原干细胞移植提供合适的受体树鼯。

关键词: 树鼯, 白消安, 生精细胞

材料与试剂

1. 树鼯 (1 岁龄雄性树鼯, 购买自中国科学院昆明动物研究所灵长类中心)
2. 白消安 busulfan (SIGMA, catalog number: B2635)
3. 1 ml 注射器 (上海康寿, catalog number: INJ-A-01)
4. 二甲基亚砜 DMSO (Amresco, catalog number: 0231)
5. 白消安水溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 移液器/移液枪 (Eppendorf)
2. 超纯水系统 (Millipore)
3. 恒温水浴锅 (北京水光明医疗器械)
4. 电子天平 (乐祺)
5. 分析天平 (Mettler Toledo)

实验步骤

1. 树鼩准备

由于树鼩的个体差异和白消安具有一定毒性，在白消安给药后，树鼩会有部分死亡的情况，因此根据实验动物数量需求，准备 2 倍数量的树鼩。本实验中准备 5 只 1 岁龄雄性树鼩。将树鼩装入透气的布袋中，称重并做好记录。

2. 配制白消安

2.1 将恒温水浴锅设置为 37 °C，准备 3 ml DMSO 和 3 ml ddH₂O，在水浴锅中预热至 37 °C。

2.2 用分析天平称取 50 mg 的白消安，溶于 2.5 ml 预热至 37 °C 的 DMSO 中，得到 20 mg/ml 溶于 DMSO 的白消安溶液，继续在 37 °C 水浴锅中孵育。

2.3 于 20 mg/ml 的白消安 DMSO 溶液中加入等体积的预热至 37 °C 的 ddH₂O，得到 10 mg/ml 的白消安溶液，继续在 37 °C 水浴锅中孵育。

3. 白消安给药

3.1 计算给药体积：前期研究发现，35 mg/kg 的白消安可以有效清除树鼩内源的生精细胞。以树鼩体重为 150 g 为例，需要注射的 10 mg/ml 的白消安溶液的体积为： $(35 \text{ mg/kg} \times 0.15 \text{ kg}) \div 10 \text{ mg/ml} = 0.525 \text{ ml}$ 。

3.2 戴好厚手套，用手隔着布袋固定树鼩头部，轻轻将树鼩双腿从布袋中拉出，露出腹部，用 1 ml 注射器，取相应体积的 37 °C 的 10 mg/ml 的白消安溶液，腹腔注射对树鼩给药。

4. 白消安处理效果鉴定

4.1 白消安给药后 30 天，戴厚手套抓住树鼩，通过按压树鼩腹部和阴囊探查树鼩辜

丸，可以发现白消安给药的树鼯，睾丸体积比未给药的同龄雄性树鼯明显变小。

4.2 处死树鼯后，取树鼯睾丸，通过 4%PFA 固定-石蜡包埋-HE 染色，观察树鼯的生精细胞的清除效果。

注：此步为可选步骤，如果后续要对树鼯注射精原干细胞建立转基因树鼯，那么可以直接通过上一步探查树鼯睾丸大小判断白消安给药是否有效。

结果与分析

树鼯 35 mg/kg 白消安给药后 30 天，用氯胺酮麻醉树鼯 (200 mg/kg)，取睾丸进行 HE 染色，结果见图 1 结果显示，白消安给药的树鼯，睾丸体积明显减小。曲细精管内部出现大面积空腔，生精过程被显著抑制。

图 1. 35 mg/kg 白消安处理 1 岁龄雄性树鼯 4 周后睾丸 HE 染色

经验总结

1. 配制的白消安水溶液特别容易析出，导致实验失败。
2. 在配制好白消安溶液以后，一定要保持温度 37 °C，并且尽快完成腹腔注射。如果树鼯比较多，可考虑单独配制每只树鼯的白消安水溶液，现配现用。

溶液配方

白消安水溶液：

配制的白消安终浓度为 10 mg/ml，溶剂为预热至 37 °C 的 1:1 的 DMSO 和 ddH₂O。

致谢

相关工作得到了中国科学院 (XDB13000000 和 XDA01010203)、云南省 (2015HA038)、NSFC-云南联合基金项目 (U1702284)以及昆明动物所“135”项目资助。利用本研究相似的方案，我们建立了 GFP 转基因树鼯，相关工作于 2017 年发表于《Cell Research》(Li *et al.*, 2017)。前期赵旭东、郭颖等的研究系统探索了不同白消安浓度对树鼯生精细胞的清除作用，并优化了最佳的给药剂量，为本实验方案提供了非常有价值的参考 (Liu *et al.*, 2017; 郑萍 等, 2014; 郭颖, 2014)。

参考文献

1. 郑萍, 赵旭东, 季爽, 郭颖 (2014). 利用树鼯精原干细胞建立转基因树鼯的尝试. 树鼯基础生物学与疾病模型, 第二十八章: 465-475, 云南科技出版社。
2. 郭颖. (2014). 不同浓度的白消安对树鼯精子发生过程的影响. 安徽大学硕士学位论文.
3. Li, C. H., Yan, L. Z., Ban, W. Z., Tu, Q., Wu, Y., Wang, L., Bi, R., Ji, S., Ma, Y. H., Nie, W. H., Lv, L. B., Yao, Y. G., Zhao, X. D. and Zheng, P. (2017). [Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring.](#) *Cell Res* 27(2): 241-252.
4. Liu, T., Guo, Y., Yan, L., Sun, B., Zheng, P. and Zhao, X. (2017). [Depletion of endogenous germ cells in tree shrews in preparation for spermatogonial transplantation.](#) *Exp Ther Med* 14(3): 2349-2354.