树鼩精原干细胞移植

Transplantation of Spermatogenic Stem Cells of Tree Shrew

毕蕊^{1, #}, 李聪^{2, #}, 郑全振¹, 李余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;

* 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, 郑全振, 李余, 郑萍. (2021). 树鼩精原干细胞移植. *Bio-101* e1010936. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010936.

How to cite: Bi, R., Li, C., Zheng, Q.Z., Li, Y. and Zheng, P. (2021). Transplantation of spermatogenic stem cells of tree shrew. *Bio-101* e1010936. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010936. (in Chinese)

摘要: 树鼩的睾丸结构与灵长类动物类似, 精子在睾丸中生成以后, 经过输出管到附睾中形成成熟精子。本实验方案的主要内容是将转基因的精原干细胞通过输出小管移植到受体雄性树鼩的睾丸中, 移植后的精原干细胞可以在受体树鼩睾丸中存活并持续生成精子, 后期通过与雌性树鼩交配产生转基因树鼩。

关键词: 转基因树鼩, 精原干细胞移植, 曲细精管

材料与试剂

1. 树鼩

1 岁龄雄性, 购买于中国科学院昆明动物研究所灵长类中心。经白消安给药后 1 个月进行移植。

2. 试剂耗材

产品名称	品牌	货号/规格
毛细玻璃管	国产	内径 0.9 mm, 外径 1.1 mm
硅胶管	国产 (经销)	Int-G-237/内径 1 mm, 外径 3 mm
15 mL 离心管	NEST	601052
碘伏	安捷	500 ml
生理盐水	科伦	500 ml
滤纸	Solarbio/索莱宝 (生产)	YA0166-100 张/60×60 cm 100 张/包
手术垫	HUAYON (生产)	18-6040/50×60 cm
缝合线	金环	3-0
台盼蓝	SIGMA	T8154
PBS	Hyclone	SH30256.01B
10 mL 注射器	国产 (经销)	HMXL-610
1 mL 注射器	上海康寿	INJ-A-01

仪器设备

产品名称	品牌、型号
手术剪刀镊子	瑞沃德
细胞培养箱	Thermo Fisher , 型号: 371 气套式
超净工作台	苏净集团安泰公司, 型号: SW-CJ-2FD
高温高压灭菌锅	YAMATO, 型号: 全系列
移液器/移液枪	Eppendorf, 型号 Research plus
超纯水系统	Millipore, 型号 Milli-Q
平板离心机	Thermo Fisher, 型号: 75004380
拉针仪	Sutter, 型号: P-97
体视镜	Zeiss, 型号: FW 7301/12
电热垫	彩虹, 型号: TG104-X32
自动细胞计数仪	Countstar, 型号: IC1000
分析天平	Mettler Toledo, 型号: AB204-S

实验步骤

1. 移植前准备

- 准备手术器械, 包括手术镊子、剪刀等, 121 °C 高压灭菌 20 min, 烘干备用;

- b) 准备毛细玻璃管（内径 0.9 mm，外径 1.1 mm），用拉针仪拉制成尖端内径为 50-80 μm 的注射针，拉 3-5 根，备用；
- c) 注射装置准备：准备硅胶管（内径 1 mm，外径 3 mm），一端连上 10 ml 注射器，另一端连上拉制好的毛细管玻璃针，备用。

2. 精原干细胞准备

- a) 将培养的转基因精原干细胞（P15-P30）重悬至 15 ml 离心管，用细胞计数器计数；
- b) 1000 rpm 离心 5 min，弃去培养基上清；
- c) 将细胞沉淀用 PBS 重悬，浓度约 1×10^4 cells/ μl ，每只受体树鼯准备 100 μl 细胞悬液，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱备用。

3. 精原干细胞移植

- a) 树鼯麻醉：将树鼯装到透气的布袋中，称体重，用 200 mg/kg 剂量的氯胺酮，通过肌肉注射的方式对树鼯进行麻醉；
- b) 将麻醉后的树鼯置于手术垫上，平卧，展开四肢并固定；
- c) 备皮：由于树鼯的睾丸会在阴囊和腹腔间滑动，因此手术前需观察树鼯睾丸是否在阴囊中，如果没有，可用手轻轻往阴囊的方向推按其腹部，使睾丸归位到阴囊中。将树鼯阴囊外皮部分的毛发用剪刀去除，用碘伏消毒；
- d) 用剪刀将阴囊皮肤剪开，在阴囊附近放一张用生理盐水湿润的滤纸，将睾丸和附睾轻轻拽出，放到滤纸上；
- e) 在解剖镜下观察树鼯的睾丸，树鼯的输出小管位于睾丸与附睾的连接处的血管和脂肪间，用镊子将输出小管旁边的脂肪和血管拨开(图 1)；
- f) 向准备好的 PBS 细胞悬液中加入 0.04% 的台盼蓝，轻轻混匀。用前面制作好的注射装置，吸取 50 μl 转基因精原干细胞悬液；
- g) 左手持镊子将树鼯睾丸输出管拉直，右手持装载细胞悬液的注射针，在解剖镜下将注射针尽量平行地推入输出管，在针尖接近输出管与睾丸网的接口时停止。操作人员保持不动，请另一协助人员轻轻推动注射器，将细胞注入睾丸曲细精管中；
- h) 保持镜下实时观察，如果注射成功，可看到睾丸中的曲细精管变蓝 (图 2)，当 70% 以上的睾丸被混有台盼蓝的细胞悬液充盈时，可以停止注射，轻轻拔出注射针；
- i) 用相同的方法，对另一侧睾丸进行细胞移植；
- j) 将移植后的睾丸放回阴囊，对阴囊外皮进行缝合，用碘伏消毒；
- k) 术后的动物置于保暖垫上至有苏醒迹象，放回饲养笼，每天观察术后情况；
- l) 移植术后 2 个月左右，可使受体树鼯与雌性树鼯交配繁殖，对子代进行基因型鉴定。

图 1.树鼯睾丸解剖及精原干细胞移植示意图

结果与分析

在注射细胞时，可以看到混有台盼蓝的溶液沿着曲细精管快速充盈睾丸(图 2)。如果注射失败，蓝色液体不会如图 2 中这样呈管状分布，而是会将整个睾丸变蓝。

图 2. 以 0.04%台盼蓝作为指示剂将精原干细胞移植入受体树鼯睾丸曲细精管中

经验总结

1. 台盼蓝有一定毒性，因此在即将注射细胞的时候再混入台盼蓝，以免过早加入影响细胞活性。如果觉得颜色比较浅不容易观察，可将台盼蓝浓度提高一些（0.04%-0.1%）；
2. 树鼯的输出管离血管很近，因此操作不当容易引起大出血，应在正式注射前，多加练习。

溶液配方

无需现配溶液

致谢

1. 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。

2. 利用本研究相似的方案，我们建立了 GFP 转基因树鼩，相关工作于 2017 年发表于《Cell Research》(Li *et al.*, 2017)。
3. 前期严兰珍、赵旭东等建立了由输出管向树鼩睾丸曲细精管内移植的技术体系，为本实验方案提供了参考。

参考文献

1. Li C.H., Yan L.Z., Ban W.Z., Tu Q., Wu Y., Wang L., *et al.* (2017). [Long-term propagation of tree shrew spermatogonial stem cells in culture and successful generation of transgenic offspring](#). *Cell Res* 27: 241-252.