

改良 R18S3 冷冻液对 cre 转基因小鼠精子冷冻效果探讨

陈瑜¹, 王芊芊¹, 张匀²

(浙江大学 1. 实验动物中心, 2. 附属第二医院, 杭州 310058)

[摘要] 目的 比较改良精子冷冻液与传统冷冻液对 cre 转基因小鼠的精子冻存和体外受精率的影响, 建立采用精子冷冻技术稳定保存两种 cre 转基因小鼠的方法。方法 以 R18S3 作为精子冷冻液和以 R18S3 作为基础液添加 477 $\mu\text{mol/L}$ 的硫代甘油(MTG)配成 R18S3+MTG 冷冻液, 冻存 Neurog3-cre 和 Itgax-cre 雄鼠精子, 采用相同方法复苏精子。同时, 以两种 cre 小鼠的背景鼠 C57BL/6J 作为对照组, 另选用 ICR 和 FVB 小鼠用两种冷冻液冻存并复苏精子, 进行体外受精, 统计受精率来评价精子冷冻效果。结果 以 R18S3 冷冻并复苏的两种 cre 小鼠及野生型 C57BL/6J 的精子体外受精率分别为 10.5%, 11.6% 和 12.0%, 无显著差异。以 R18S3+MTG 冷冻并复苏的精子体外受精率分别为 66.4%, 62.5% 和 67.6%, 相对传统冷冻液有显著提高。ICR 和 FVB 小鼠用改良精子冷冻液前后的体外受精率分别是 34.1%, 46.7% 和 65.7% 和 70.2%, 后者都有所提高。结论 改良后的 R18S3+MTG 冷冻液能明显提高以 C57BL/6J 为背景的 cre 转基因小鼠冷冻后精子的体外受精率, 对 ICR 和 FVB 品系的小鼠的体外受精率也有提高。

[关键词] 精子冷冻; 传统冷冻液; 改良冷冻液; 体外受精率; cre 转基因小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2014)01-0053-03

在条件性基因敲除小鼠研究中, cre 转基因小鼠以其能在时空上调控特定基因的关闭而显示出极大的优势, 因而又被称为 cre 工具鼠^[1-3]。然而获得并维持一个转基因小鼠品系实为不易且成本高昂。故此, 胚胎和精子冻存, 体外受精等保种技术是保存 cre 转基因小鼠的有效方法。

本文通过两种精子冷冻液对 B6.FVB(Cg)-Tg(Neurog3-cre)C1Able/J(简称 Neurog3-cre 小鼠)和 C57BL/6J-Tg(Itgax-cre, -EGFP)4097Ach/J(简称 Itgax-cre 小鼠)两种转基因小鼠品系以及 ICR 和 FVB 品系小鼠的冷冻精子体外受精率的比较, 来探索用精子快速冷冻法保存这两种 cre 转基因小鼠的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验组: 用于采精的 cre 转基因阳性雄鼠购于美国 The Jackson Lab, 后在浙江大学实验动物中心 [SYXK(浙)2007-0098] 繁殖扩群获得的 8~12 周龄的雄鼠, 实验 2 周前与雌鼠交配后单笼饲养。供卵雌鼠选用 SPF 级 4 周龄的 C57BL/6J 小鼠, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK(沪)2007-0005]。对照组: SPF 级 C57BL/6J、ICR 和 FVB 雌雄鼠分别为 4 周龄和 8 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。

1.2 动物饲养与实验条件

动物饲养于 SPF 级屏障环境中, 室内温度为 21℃~25℃, 相对湿度为 40%~60%。饲料辐照消毒, 小鼠自由采食和饮水。明暗周期为 12 h : 12 h (8 : 00 a.m~8 : 00 p.m, 为光照时间)。

[收稿日期] 2013-10-10

[作者简介] 陈瑜(1990-), 主要从事转基因小鼠的研制和实验小鼠净化及其生殖细胞冷冻保存工作,
E-mail: Charleschen 2005@gmail.com

1.3 试剂与仪器

试剂: 注射用孕马血清素(PMSG)(生产批号: 111118)和注射用人绒毛膜促性腺激素(hCG)(生产批号: 110426), 杭州动物药品厂, 规格为: 1 000 IU/支, 冻干粉剂, 分别于 4℃、-20℃保存, 使用前用 0.9% 生理盐水配制成稀释液, 矿物油(Sigma, M8410-1L), Raffinose(棉籽糖)(Sigma, R7630), 脱脂奶(Difco), HTF 培养液由本实验自行配制(参考: 小鼠胚胎操作实验指南), 配制后用 0.22 μm 的滤器过滤。仪器: 超净工作台, CO₂ 恒温培养箱(Thermo), Olympus 显微镜, 纯水仪, 高压灭菌锅, 培养皿(NUNC), 酒精灯, 自制洗卵针, 显微镊, 移液枪, 精子冻存麦管, 液氮罐等。

1.4 方法

1.4.1 两种精子冷冻液的配制 R18S3 的配制: Raffinose, 脱脂奶按 18%(W/V)和 3%(W/V)的比例与双蒸水在 60℃温水中充分溶解后, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液用 0.22 μm 的过滤器过滤后备用。R18S3+MTG 的配制: 在 4.75 ml 的 M2 中加入 40 μl 的 MTG, 用 0.22 μm 的过滤器过滤后配成 100 mmol/L 的 MTG 存放于 4℃冰箱中。精子冻存实验当日, 将 R18S3 和 100 mmol/L 的 MTG 按 200:1 的比例混合配成 R18S3+MTG 冷冻液。

1.4.2 精子采集及冻存 实验组: 颈椎脱臼法处死 2 月龄以上与雌鼠交配后单笼饲养一周的雄鼠, 腹部用 75% 酒精消毒, 打开腹腔, 取出附睾尾, 除去脂肪并用滤纸擦去血渍, 分别将左右附睾尾放入 R18S3 和 R18S3+MTG 中, 以显微镊刺破附睾尾, 使精子流出, 指根轻弹 10 次, 使之与冷冻液充分混合, 将麦管装在 1 ml 注射器上, 依次吸入 100 μl HTF、10 mm 空气柱、10 μl 精子悬液, 将麦管近精子悬液端封口, 在液氮表面静置 3~5 min 后, 存入液氮中保存。

1.4.3 雌鼠超排和取卵 两组实验均采用 4 周龄的雌鼠, 于第一日下午 5:00 腹腔注射 10 IU 的 PMSG, 48 h 后再腹腔注射 10 IU 的 HCG, 注射后 16 h 取卵。颈椎脱臼法处死雌鼠, 消毒体表, 剪下双侧输卵管放入平衡 2 h 的 HTF 液滴旁的矿物油中, 在显微镜下刺破输卵管膨大部, 用显微镊子将卵子团引入 HTF 液滴中, 每 100 μl HTF 液滴中放入 30~40 枚卵。

1.4.4 精子复苏和体外授精 在取卵的当日将冻存的精子于液氮罐中取出, 迅速置于 37℃水浴中 15 min。取出麦管擦干表面水滴, 剪断麦管精子端的封口,

将精子悬液推入预先在 CO₂ 恒温培养箱中平衡 2 h 的 100 μl HTF 中, 获能 1.5 h。根据精子活力和浓度用微量移液器吸取适量精子(约 10 μl, 每 μl 约 80~100 个精子)悬液加入卵细胞附近。再将培养皿放入 37℃、5% 的 CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h。次日早晨统计 2- 细胞胚胎数、未受精卵和异形卵数, 计算体外受精率。

1.5 实验数据统计分析

采用单因素方差分析对两组精子冷冻液之间的数据进行方差分析。

2 结果

2.1 以 C57BL/6J 为背景的三组小鼠体外受精率的比较

用传统的 R18S3 作冷冻液, Neurog3-cre、Itgax-cre 和 C57BL/6J 小鼠精子复苏后的受精率(2-细胞胚胎数/卵子总数), 两种 cre 小鼠和其背景鼠的复苏精子受精率都较低, 三者之间无显著差异($P>0.05$)(表 1)。用作者改良的 R18S3+MTG 作冷冻保护剂, 两种 cre 小鼠与其对照组 C57BL/6J 小鼠之间也无显著统计学差异($P>0.05$)(表 1)。单个品系的小鼠分别用 R18S3 和 R18S3+MTG 作为精子冷冻液的受精率都有较大差异。相比用 R18S3 冷冻液, 三种小鼠平均受精率为 11.4%, 用 R18S3+MTG 作为精子冷冻液的平均受精率为 65.5%, 有明显提高($P<0.05$)。

2.2 C57BL/6J、ICR 和 FVB 三种小鼠用改良精子冷冻液前后的体外受精率比较

C57BL/6J、ICR 和 FVB 三种小鼠用传统冷冻液冷冻精子复苏后的受精率均低于 50%, 改良的冷冻液冷冻复苏后的体外受精率均相比传统冷冻液有明显提高($P<0.05$), 其中以 C57BL/6J 差异最大(表 1)。

3 讨论

自 Nakagata 等报道用棉籽糖-脱脂奶粉(R18S3)作为小鼠精子冷冻保护剂以来^[4], 逐步建立了相对稳定的小鼠精子冷冻保存方法, 并一直沿用至今。世界上许多实验室重复了以 R18S3 作为精子冷冻保护剂的方法, 证明对于远交系和杂合背景的小鼠, 这种保护剂可获得比较理想的体外受精率^[5,6]。但对于近交品系如 C57BL/6J, BALB/c 和 129S3 等小鼠, R18S3 冷冻后的精子体外受精率普遍较低^[7~12]。本实验中两种 cre 小鼠和其背景小鼠的实验结果也

表 1 两种精子冷冻液冷冻五种小鼠精子后体外受精率比较

雄鼠品系	R18S3			R18S3+MTG		
	卵子总数 / 枚	2-细胞胚胎数 / 枚	受精率 / %	卵子总数 / 枚	2-细胞胚胎数 / 枚	受精率 / %
Neurog3-cre	286	30	10.5	253	168	66.4
Itgax-cre	242	28	11.6	264	165	62.5
C57BL/6J(WT)	117	14	12.0	139	94	67.6
ICR	126	43	34.1	105	69	65.7
FVB	152	71	46.7	121	85	70.2

证实了单纯采用 R18S3 很难达到通过精子冻存保存转基因小鼠品系的目的。而大量的基因修饰小鼠的背景都是近交系, 所以一定要改良 R18S3 来建立保存近交系小鼠的方法。

Ecroyd 等^[13]提到精子内源性产生的活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS) 在精子获能反应中起很大作用, 但精子冻存复苏后, 产生过量的 ROS 是引起精子细胞损伤和降低精子受精能力的因素^[14], Ostermeier 等^[15]选择添加 MTG 作为改良传统 R18S3, 原因可能是 MTG 作为一种还原剂被广泛应用于无血清的 ES 细胞培养基^[16], 在复苏精子进行体外受精的体系中 MTG 能降低 ROS 的浓度, 从而减少精子损伤。实验显示添加了 477 μmol 的 MTG 后, 冻存精子的体外受精率有了大幅提高。本实验结果也证实了, 改良后的精子冷冻液可以达到比较稳定的复苏后的体外受精率, 且这两种 cre 小鼠与其背景小鼠的体外受精率没有明显差异。

作为条件性基因敲除小鼠的工具鼠, cre 小鼠在基因工程小鼠研究中的地位举足轻重。但最终获得条件型基因敲除小鼠后, 特定的 cre 小鼠又暂时不会被使用。活体保存必然会消耗大量的资源, 相比之下, 精子冻存有节约资源、避免疫病传播, 防止长期饲养引起基因漂移等优势^[11,17]。改良后的 R18S3+MTG 精子冷冻液配制简便, 易操作, 能实现这两种 cre 小鼠的品系保存, 在 cre 小鼠的品系保存方面有较大应用前景。

[参考文献]

- [1] Ramirez-Solis R, Liu P, Bradley A. Chromosome engineering in mice [J]. *Nature*, 1995, 378:720-724.
- [2] Schwenk F, Kuhn R, Angrand PO, et al. Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice [J]. *Nucleic Acids Res*, 1998, 26:1427-1432.
- [3] Utomo AR, Nikitin AY, Lee WH. Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17:1091-1096.
- [4] Takeshima T, Nakagata N, Ogawa S. Cryopreservation of mouse spermatozoa [J]. *Jikken Dobutsu*, 1991, 40:493-497.
- [5] Nakagata N, Takeshima T. Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains [J]. *Jikken Dobutsu*, 1993, 42:317-320.
- [6] Songsasen N, Leibo S P. Cryopreservation of mouse spermatozoa I. Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa [J]. *Cryobiology*, 1997, 35:240-254.
- [7] 徐平, 山村绫子, 唐一岷, 等. 不同品系小鼠的体外受精、胚胎冷冻及移植的比较研究[J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(3):147-151.
- [8] 史晓萍, 董婉维, 周生来, 等. FVB小鼠精子冷冻及体外受精的研究[J]. *中国医科大学学报*, 2006, 35(3):253-255.
- [9] 赵丹凤, 刘丽均, 狄敏, 等. 影响小鼠冻融精子体外受精率的主要因素探讨[J]. *中国比较医学杂志*, 2006, 16(12):736-739.
- [10] Nakagata N, Ueda S, Yamanouchi K, et al. Cryopreservation of wild mouse spermatozoa [J]. *Theriogenology*, 1995, 43:635-634.
- [11] Nakagata N. Cryopreservation of mouse spermatozoa [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11:572-576.
- [12] Fray M D. Biological methods for archiving and maintaining mutant laboratory mice. Part I: Conserving Mutant Strains [J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 561:301-319.
- [13] Ecroyd HW, Jones RC, Aitken RJ. Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation [J]. *Biol Reprod*, 2003, 69:347-354.
- [14] Chatterjee S, Gagnon C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing [J]. *Mol Reprod Dev*, 2001, 59:451-458.
- [16] Wiles MV, Johansson BM. Embryonic stem cell development in a chemically defined medium [J]. *Exp Cell Res*, 1999, 247(1): 241-248.
- [15] Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, et al. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation [J]. *PLoS One*, 2008, 3:e2792.
- [17] Marschall S, Angelis MH. Cryopreservation of mouse spermatozoa: double your mouse space [J]. *Trends Genet*, 1999, 15:128-131.

作者: 陈瑜, 王芊芊, 张匀
作者单位: 陈瑜, 王芊芊(浙江大学实验动物中心, 杭州310058), 张匀(浙江大学附属第二医院, 杭州, 310058)
刊名: 实验动物与比较医学 **ISTIC**
英文刊名: Laboratory Animal and Comparative Medicine
年, 卷(期): 2014, 34(1)

参考文献(17条)

1. Ramirez-Solis R;Liu P;Bradley A Chromosome engineering in mice 1995
2. Schwenk F;Kuhn R;Angrand PO Temporally and spatially regulated somatic mutagenesis in mice 1998
3. Utomo AR;Nikitin AY;Lee WH Temporal, spatial, and cell type-specific control of Cre-mediated DNA recombination in transgenic mice 1999
4. Takeshima T;Nakagata N;Ogawa S Cryopreservation of mouse spermatozoa 1991
5. Nakagata N;Takeshima T Cryopreservation of mouse spermatozoa from inbred and F1 hybrid strains 1993
6. Songsasen N;Leibo S P Cryopreservation of mouse spermatozoa I Effect of seeding on fertilizing ability of cryopreserved spermatozoa 1997
7. 徐平, 山村绫子, 唐一岷, 陆晔, 川野佳代, 刘丽均, 小川真美, 中泻直己 不同品系小鼠的体外受精、胚胎冷冻及移植的比较研究[期刊论文]-中国实验动物学报 2004(3)
8. 史晓萍, 董婉维, 周生来, 杨威, 于洋, 张梅英, 王禄增 FVB小鼠精子冷冻及体外受精的研究[期刊论文]-中国医科大学学报 2006(3)
9. 赵丹凤, 刘丽均, 狄敏, 赵立虎, 张春燕, 张守纯, 徐平 影响小鼠冻融精子体外受精率的主要因素探讨[期刊论文]-中国比较医学杂志 2006(12)
10. Nakagata N;Ueda S;Yamanouchi K Cryopreservation of wild mouse spermatozoa 1995
11. Nakagata N Cryopreservation of mouse spermatozoa 2000
12. Fray M D Biological methods for archiving and maintaining mutant laboratory mice Part I:Conserving Mutant Strains 2009
13. Ecroyd HW;Jones RC;Aitken RJ Endogenous redox activity in mouse spermatozoa and its role in regulating the tyrosine phosphorylation events associated with sperm capacitation 2003
14. Chatterjee S;Gagnon C Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing 2001
15. Wiles MV;Johansson BM Embryonic stem cell development in a chemically defined medium 1999(01)
16. Ostermeier GC;Wiles MV;Farley JS Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation 2008
17. Marschall S;Angelis MH Cryopreservation of mouse spermatozoa:double your mouse space 1999

引用本文格式: 陈瑜, 王芊芊, 张匀 改良R18S3冷冻液对cre转基因小鼠精子冷冻效果探讨[期刊论文]-实验动物与比较医学 2014(1)