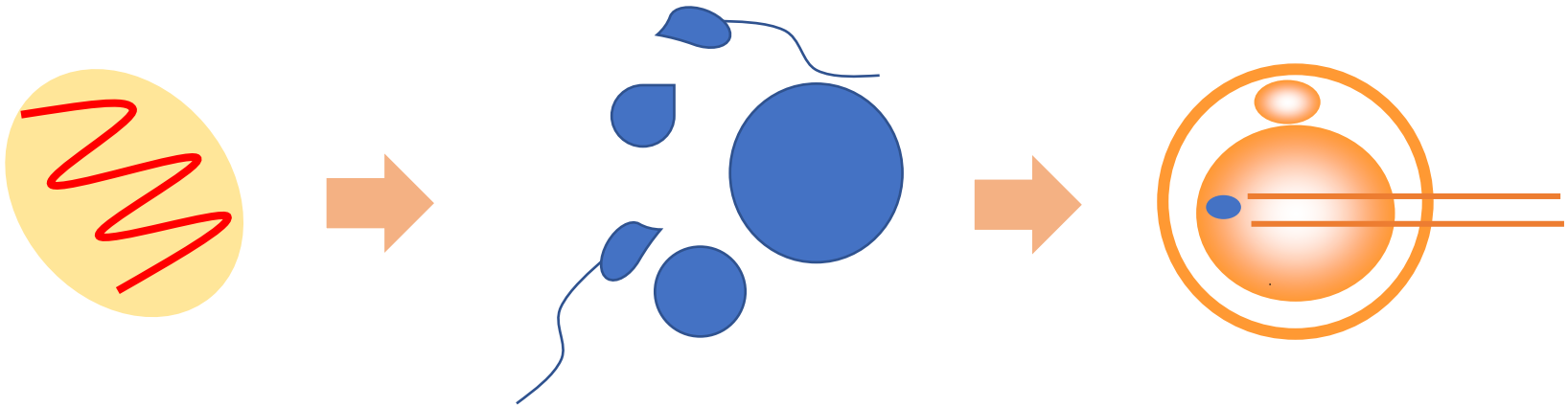
マウス精細胞の採取法

バイオリソース研究センター
遺伝工学基盤技術室プロトコール　#X

2025/03/15

Graphical Abstract



目次

- **説明**
- **試薬**
- **機器**
- **方法**
  1. 培養液の準備
  2. 精細胞の採取
  3. 器械的採取法
  4. 化学的採取法
- **補足**
- **作成者**

説明

目的

マウス精細胞を顕微注入に用いるために、採取した精巣より器械的あるいは化学的処理により精細胞を採取する。

説明

器械的採取法では、培養液中で精細管を細切し、精細胞を浮遊させる。主に精細管管腔側の精母細胞以降の精細胞が採取できる

酵素を用いた化学的採取法では、精巣基底膜に付着している精祖（精原）細胞やセルトリ細胞も含めたすべての精巣内細胞を採取できる。

試薬と機器

解剖道具（ハサミ、ピンセット）		
35mmシャーレ	IWAKIなど	1000-035
赤血球溶解緩衝液	自作	自作
精細胞浮遊用培養液　(GL-PBS)	自作	自作
保冷剤（4℃保存）		
パスツールピペット	先を短くしてカット面を バーナー等で丸める	自作
ナイロンメッシュ	日本理化学器械	内径37-50μ
15ml 遠沈管	IWAKIなど	
遠心機		
（化学的採取法）		
コラゲナーゼ	SIGMA	C-2674
DNase	SIGMA	DN-25
トリプシン	SIGMA	T-9201
シェーカー		

方法

1. 培養液の準備

- 赤血球溶解緩衝液

NH_4Cl	155 mM	0.829 g /100 ml
$KHCO_3$	10mM	0.1 g /100 ml
EDTA	2 mM	0.0744 g /100 ml

(pH 7.4)

- GL-PBS

0.1 mg/ml polyvinyl alcohol入りDulbecco-PBS(+)		500 ml
Glucose	5.6 mM	0.5045 g
Sodium lactate	5.4 mM	0.3026 g
BSA	5 mg/ml	2.5 g

方法

2. 精細胞の採取

すべての操作は冷蔵した（冷凍ではない）保冷剤上で行う。4℃以下にならないように注意

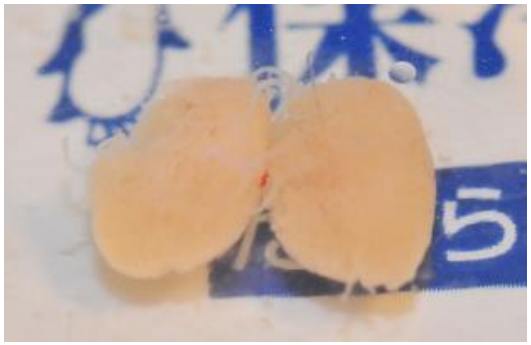
① 雄マウスより精巣を採取する。

② 赤血球溶解緩衝液の入ったシャーレに精巣を入れる。

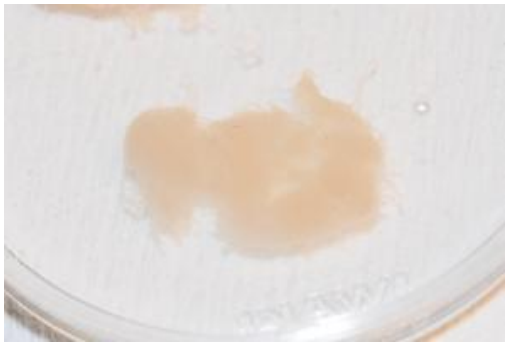
③ ピンセットを用いて白膜を除去する。

④ 精細管をGL-PBSの入ったシャーレに移動させ、ピンセットでほぐす（切れないように注意）。

赤血球溶解緩衝液入り6 cm シャーレ中の精巣（4℃保冷剤上）



白膜を除いた精巣



精細管をほぐした精巣

方法

3. 器械的採取法

① 眼科ハサミを用いて精細管に切れ目を入れる（5-6か所/精巣）。

② 加工したパスツールピペットを用いてやさしくピペッティングし、精細胞をGL-PBS中に浮遊させる。

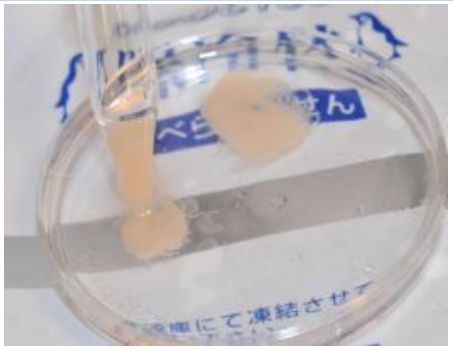
③ 遠沈管にナイロンメッシュをセットして精細胞浮遊液をろ過する。

④ 800rpm、4分、 8℃ で遠心し、上清を除去。

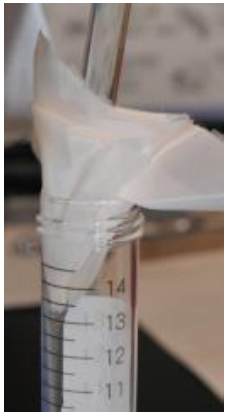
⑤ GL-PBSを 3-4ml添加してやさしくピペッティングする。合計3回遠心洗浄。

⑥ 最後に沈査に0.5-1ml GL-PBSを添加してやさしくピペッティングする。

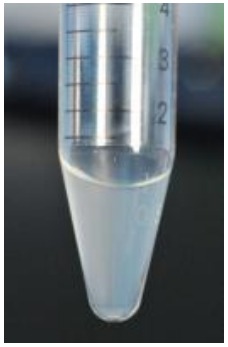
⑦ 実験まで4℃にて保存する。



ピペッティングによる精細胞の遊離



ナイロンメッシュで精細管成分を除去



得られた細胞浮遊液（主に精母細胞以降の精細胞）

方法

4. 化学的採取法

① 精細管を1.5ml GL-PBS +150 μl 1%コラゲナーゼ+50 μl 0.5% DNaseが入った遠沈管に入れる。

② 37℃のシェーカーでやさしく振とう（30分程度）。

③ 加工したパスツールピペットでやさしくピペッティングする。

④ 800rpm、4分間、室温で遠心。

⑤ 上精を除去し、100 μl GL-PBS（BSA free)+200 μl 1%トリプシン+20 μl 0.5% DNaseを加えやさしくピペッティングする。

⑥ 37℃のシェーカーで精細管がほぼバラバラになるまで（5-10分程度）やさしく振とう。

⑦ 700 μl GL-PBS（BSA入り）を加えやさしくピペッティングする。

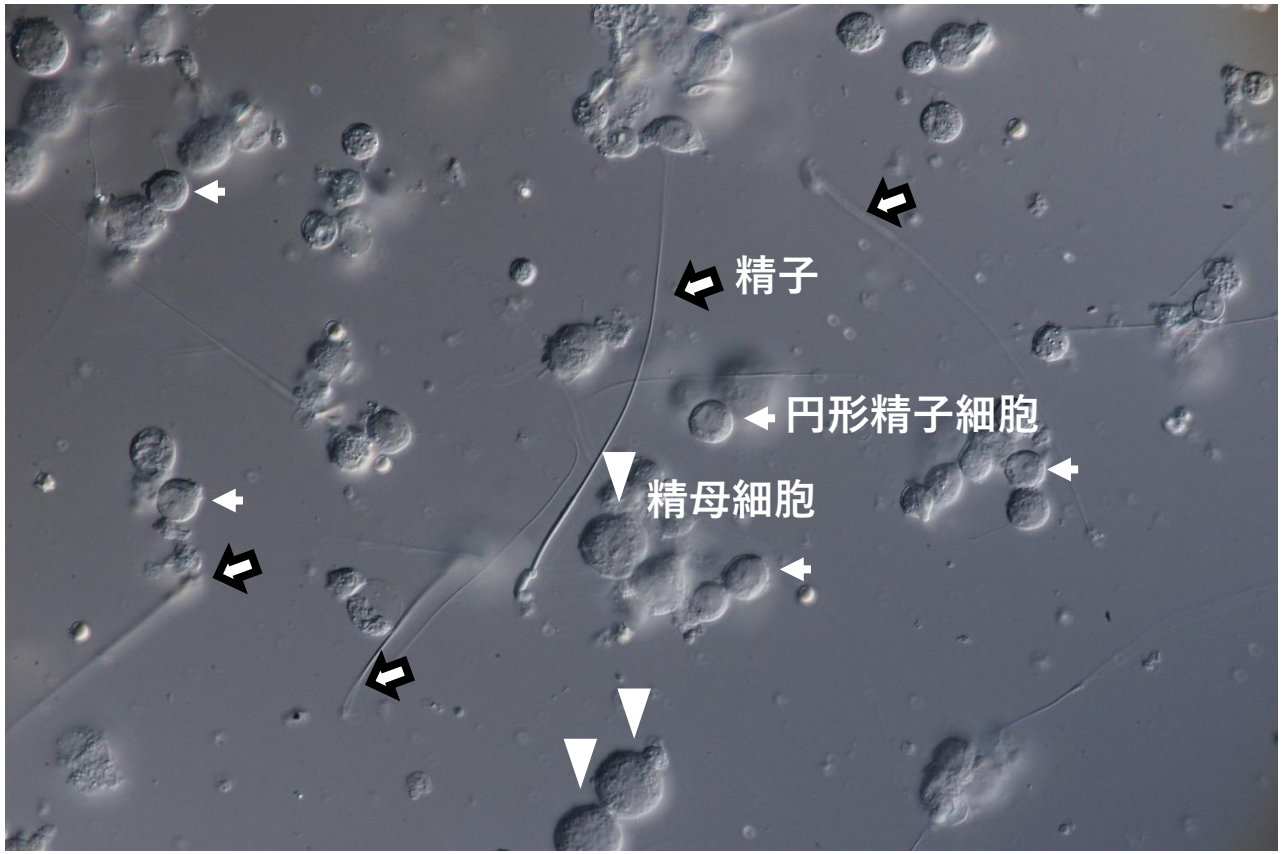
⑧ 800rpm、4分間、室温で遠心。合計3回遠心洗浄を行う。

⑨ 沈殿物に0.5-1ml GL-PBSを添加してやさしくピペッティングする。

⑩ 実験まで4℃にて保存する。

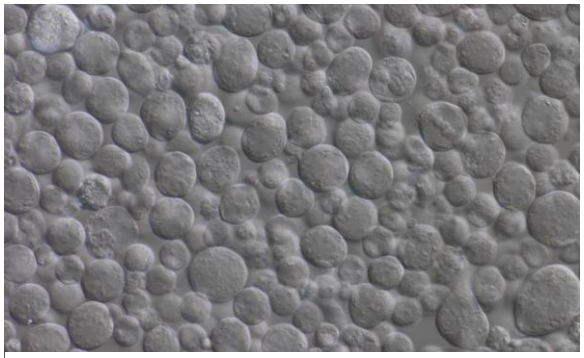
方法

精細胞懸濁液（器械的採取法）



補足

- 採取した精細胞懸濁液は、冷蔵庫(4°C～10°C）で数日間保存可能。
- 採取した精細胞懸濁液は、GL-PBS液に7.5%グリセロール＋7.5%ウシ胎仔血清を加えることで凍結保存が可能 (Ogura et al., 1996)。
- 1～2日程度冷蔵保存(4°C～10°C）した精巣からも細胞の採取は可能。
- 精巣丸ごとの凍結融解では、精細胞のほとんどは死滅してしまうため、精子あるいは伸張精子細胞のみ顕微授精に用いることができる。
- ナイロンメッシュでろ過する前に pronase 処理をすると、精子と伸長精子細胞を凝集させ、取り除くことができる (Ogura et al. 1993)。円形精子細胞など丸い細胞のみを使う実験には便利。



pronase 処理により、ほぼ円形細胞のみになった懸濁液

参考文献

Ogura et al., 1996, J.Assist. Reprod. Genet. 13, 431-434.

越後貫ほか、2001, 羊土社実験医学別冊　幹細胞・クローン研究プロトコール 240-250.

作成者

- 遺伝工学基盤技術室
- 質問などの連絡先

越後貫成美：narumi.ogonuki@riken.jp