

CARD FERTIUP®ラット精子凍結保存液を用いたラット精子凍結方法及び融解方法

1. ラット精子凍結方法

A 3 mLのCARD FERTIUP®ラット精子凍結保存液（2チューブ）（室温）を35mmシャーレに加え、その中に1匹分の精巣上部尾部（2個）を入れる。

※精巣上部尾部1個の場合、1.5mLの精子凍結保存液を加える。

B ハサミとピンセットを用いて、まず、尾部を中央から2つに切り離す①。続いて、切り離したそれぞれの尾部組織をさらに細切する②③。

C クラッシュアイス上の金属製トレーに精巣上部尾部を細切したシャーレを載せ、10分間氷冷する。

D 1mLシリンジに装着したコネクターにストローを挿入する。

E 精子懸濁液のストローへの充填法

a) まず、mHTFを約1cm、吸引する。

b) 次に空気相を約1cm作った後、約150μLの精子懸濁液を吸引する。

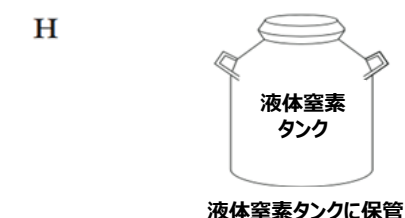
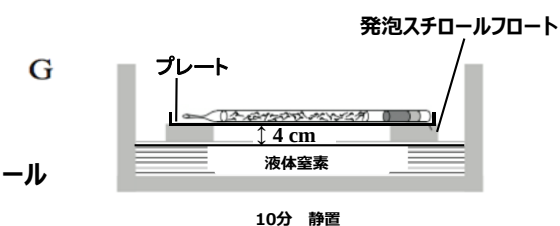
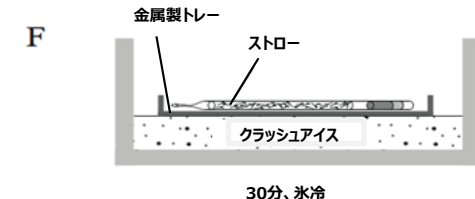
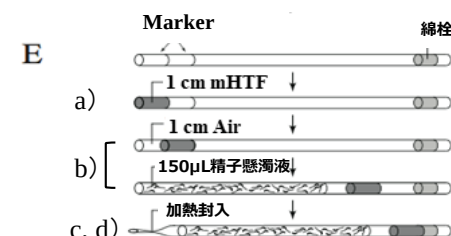
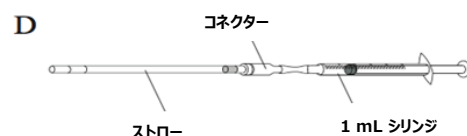
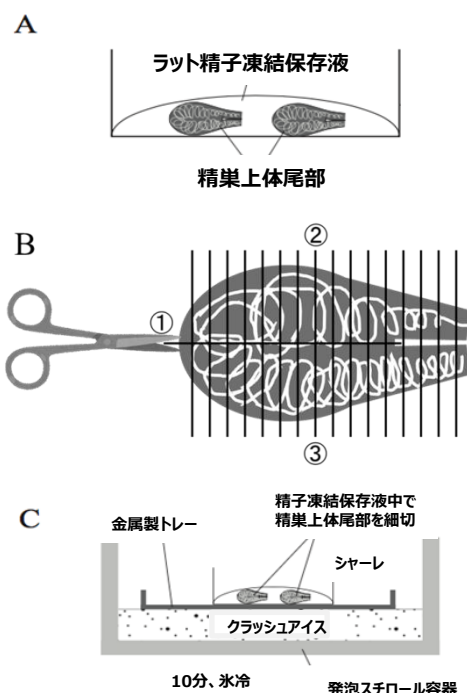
c) 続いて、mHTFが綿栓に達するまで、1mLシリンジの内筒を引く。

d) 最後に、ストロー先端を加熱封入する。

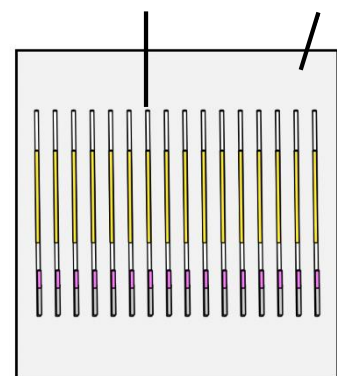
F 精子懸濁液を充填したストローを金属製トレー上で30分間静置する。

G あらかじめ氷上で冷やしておいたプレートにストローを並べ、液体窒素に浮かべた発泡スチロールフロート（CARDラット精子凍結用キット）の上にプレートを載せる。10分後、ストローを液体窒素中に沈め、保存容器に入れる。

H 保存容器を液体窒素保管器内で保存する。

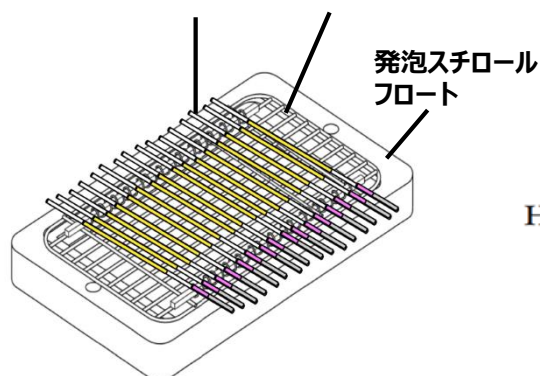


F 精子充填済ストロー 金属製トレー



正面図

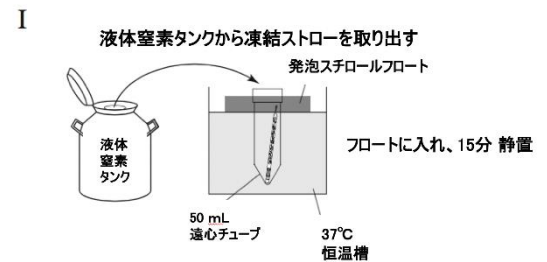
G 精子充填済ストロー プレート



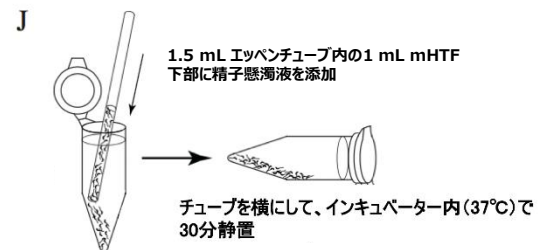
鳥瞰図

2. ラット凍結精子融解方法

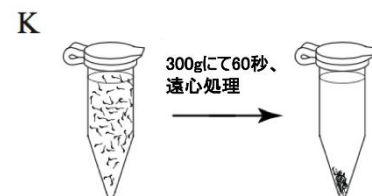
I 液体窒素タンクから凍結ストローを取りだし、恒温槽内（37℃）のフロートに入れ、15分間静置する。この間、1.5 mL エッペンチューブ内に1.0 mLのmHTFを分注し、37℃でインキュベートする。



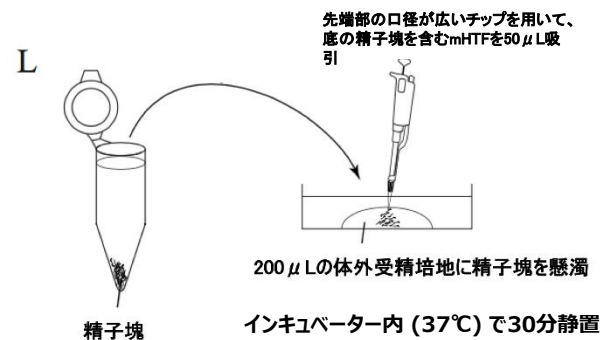
J ストローをフロートから取り出し、ストロー表面の水分をキムタオルでふき取る。次に、精子懸濁液側のストロー先端をカットし、エッペンチューブ内に挿入する。続いて、綿栓側をカットして精子懸濁液をmHTF下部に導入後、チューブを横にして、インキュベーター内（37℃）で30分静置する。



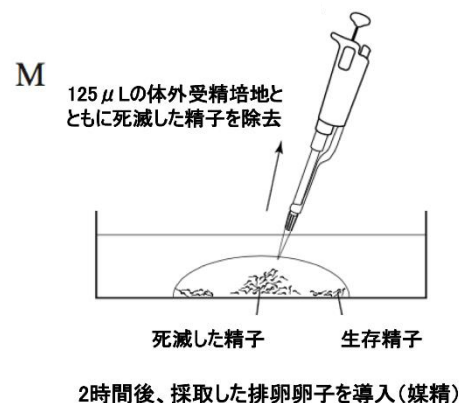
K 30分後、チューブをゆっくり2～3回転倒混和させ、300gにて60秒、遠心処理する。



L 先端部の口径が広いチップをチューブの底に静かに挿入し、底の精子塊を含むmHTFを50μL吸引、吸引した精子塊をシャーレ内の200μLのCARDラット体外受精培地のドロップに添加する。



M インキュベーター内で30分間静置後、先細のチップを用いて、125μLの体外受精培地とともに死滅した精子を除去する。2時間後、採取した排卵卵子を導入する（媒精）。



参考文献

論文名：Establishment of sperm cryopreservation and in vitro fertilisation protocols for rats

著者：Naomi Nakagata, Nobuyuki Mikoda, Satohiro Nakao, Ena Nakatsukasa& Toru Takeo

掲載誌：ScientificReports

doi：https://doi.org/10.1038/s41598-019-57090-7

URL：https://www.nature.com/articles/s41598-019-57090-7