

# 斑马鱼精子冻存和体外受精 技术要点

潘鲁媛

2017年3月31日

( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )



# 准备工作要点

- 鱼的准备
- 材料的准备
- 试剂的准备
- 储藏设备的准备

国家斑马鱼资源中心  
( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )



# 鱼的准备

## 雄鱼

- 年龄：6-18个月
- 有交配经历
- 与雌鱼隔离一月以上

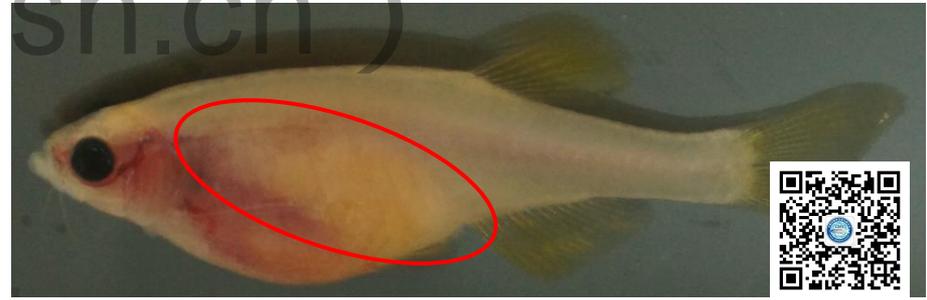
## 雌鱼

- 年龄：6-18个月
- 有交配经历
- 近一周内没有配鱼产卵

- 活饵料喂养

- 健康无病，不瘦弱

- 稳定光周期



国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)

# 材料的准备

- 干冰：新鲜、细粉末、压实
- Falcon离心管：标记编号
- 冻存管标记：低温标签或手写
- 冻存操作记录表：PI5
- 计时器
- 毛细管：刻度标记

国家斑马鱼资源中心

( www.zfish.cn )



# 试剂和设备的准备

- 10x Ginsberg Fish Ringer: 4°C保藏, <6个月
- 冻存液: 实验当天新鲜配置
- 奶粉: 全脱脂, 有机奶粉, 不要用western试剂
- Hanks储液1/2/4/5: 过滤除菌, 4°C保藏, <6个月
- Hanks premix: 过滤除菌, 4°C保藏, <3个月
- Hanks buffer: 当天新鲜配置
- NaHCO<sub>3</sub>: 试剂日常保存得到, 不结块, 不过期  
( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )
- 液氮储藏罐: 体积>50L, 液位有保证



# 精液收集操作要点

- 雄鱼麻醉
- 吸干水分
- Mounting

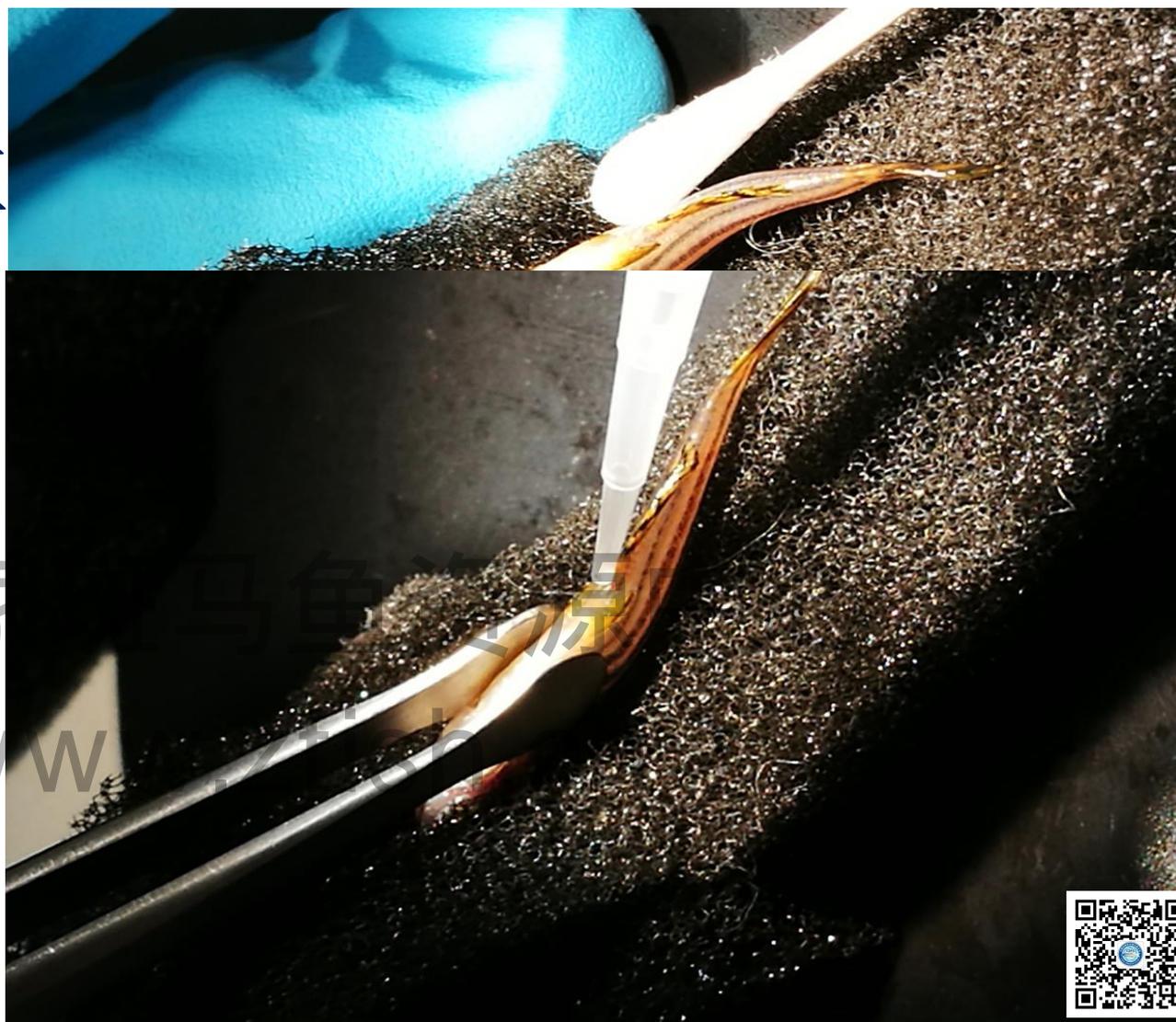


国家斑马鱼资源中心  
( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )



# 精液收集操作要点

- 分开腹鳍
- 用镊子挤压
- 收集精液



# 精液冻存过程要点

- 以无甲醇冻存液补齐3.3ul
  - 混入16.7ul含有甲醇冻存液中（达到20ul）
  - 分装入2个冻存管
  - 装入Falcon离心管中，埋入干冰
  - 以上步骤尽量在1分钟内完成
  - 记录样品、管号、放入时间，并计算取出时间
  - 20分钟后取出样品，迅速投入液氮中
- ( www.zfish.cn )
- 短期保藏 (<5天) : 溶于50ul Hanks Buffer
  - 4°C保藏



# 冻存精子样品复苏操作准备

- 前一天准备雌鱼：1M vs 2-3F
- 用隔板隔开，不要接触
- 按照1个复苏样品，6F准备
- 须在早上开灯后3小时内完成
- 新鲜配置Hanks Buffer
- 冻存精子样品事先从液氮储藏罐中取出备用，新鲜收集精子需要先操作
- 挤压收集卵子的操作，频度不超过2周，最好大于一个月
- 雌鱼可用于下周自然配鱼

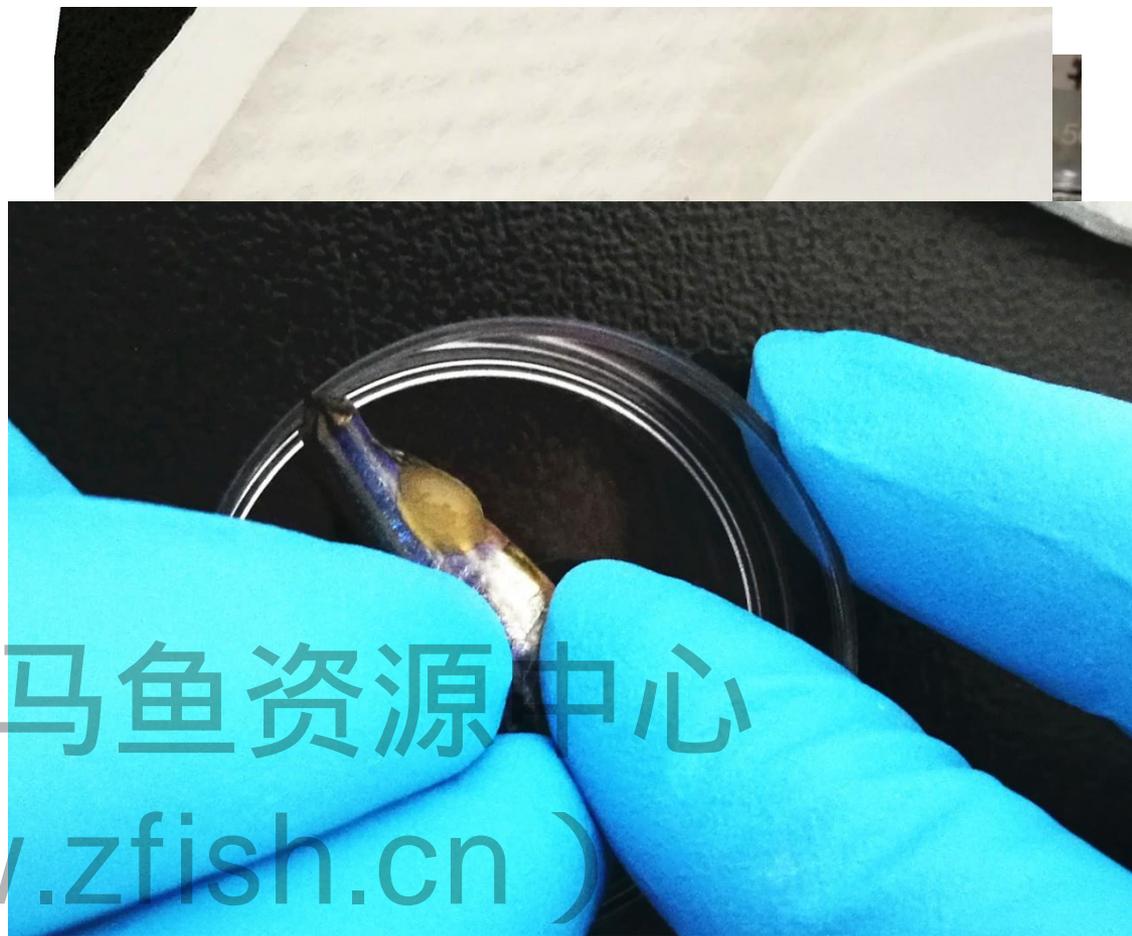


国家斑马鱼资源中心  
(www.zfish.cn)



# 体外受精和冻存精子复苏操作

- 雌鱼麻醉
- 吸干水分
- 放入35mm平皿
- 一只手轻轻抵住鱼背，一手轻轻按压鱼腹
- 将卵与鱼身轻柔分开，鱼放回水中
- 鱼卵离开母体5分钟内必须完成操作



# 体外受精和冻存精子复苏操作



# 鱼卵质量控制



# 受精操作

- 冻存精子从液氮中取出
- 小心打开冻存管，倒出液氮
- 33°C水浴回温8-10秒钟
- 加入50ul Hanks Buffer，混匀
- 精子样品混入未受精卵
- 加入~750μl养殖水，激活精子
- 5分钟后，加水至平皿的2/3
- 当天下午分拣受精卵和未受精卵，计算受精率



# 冻存样品的质量监控

- 冻存库平均受精卵需  $>25\%$
- 保存对照样品，作为监控的复苏样品
- 每月/每季度复苏样品，监控受精率
- 及时补充液氮，保证液氮储藏设备的稳定
- 回温不能高于 $-120^{\circ}\text{C}$
- 液氮储藏罐体积不能太小
- 保存良好的精子样品寿命可 $>10$ 年

( [www.zfish.cn](http://www.zfish.cn) )



**液氮和干冰都是超低温材料**

**可造成冻伤**

**请务必戴手套操作**

**（ 注意实验安全 ）**



Questions?

