

Técnicas de Ingeniería Reproductiva del Ratón

Manual Técnico

Por Naomi Nakagata

En colaboración con Shuuji Tsuchiyama

División de Ingeniería Reproductiva

Centro de Recursos Animales y Desarrollo (CARD)

Universidad de Kumamoto, Japón

Traducción por Jorge Szein

Corrección por Josep Marimon

3ra edición, Publicado por COSMO BIO CO., LTD.

Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-Ku, Tokio 135-0016

Japón

Tel: +81-3-5632-9617

Diseño de Tapa COSMO BIO CO., LTD.

Copyright©2015 Naomi Nakagata , Todos los derechos Reservados.

Impreso en Japón. No está permitida la venta de este libro

No está permitida la reproducción parcial o total de este documento,

copiar en un sistema de recuperación o transmisión en cualquier

forma o por cualquier medio, electrónico, mecánico, fotocopias,

grabaciones o por cualquier otro método, sin autorización previa del

titular de los derechos de autor.

Introducción

El número de ratones genéticamente modificados producidos en los últimos años ha incrementado dramáticamente. Por otra parte, ha sido notable el rápido progreso en el desarrollo de nuevas técnicas destinadas a la edición del genoma (TALEN y CRISPR/Cas9) en estudios de biología molecular, de manera tal que un ratón genéticamente modificado puede producirse fácilmente en un tiempo relativamente corto. Esta producción ha sido apoyada por técnicas de reproducción como la fertilización in vitro, la criopreservación de embriones, de espermatozoides y las técnicas de transferencia embrionaria. Estas técnicas se han convertido en inestimables métodos periféricos y su uso se ha popularizado rápidamente.

La rápida popularidad alcanzada, ha provocado la publicación de varios manuales técnicos relacionados con la tecnología de la reproducción del ratón (como este mismo) . Sin embargo, aun no ha sido publicado un manual con suficiente detalle dado que las técnicas de reproducción asistida del ratón involucran mayoritariamente delicadas operaciones bajo un microscopio estereoscópico.

Con ese objetivo en mente, en este libro hemos tratado de crear un manual sobre las técnicas reproductivas del ratón que pueda ser fácilmente comprendido por todos. En nuestro manual hemos incluido un número generoso de diagramas, fotografías y videos para explicar paso a paso cada técnica en la forma más clara y minuciosa que hemos podido. Sinceramente deseamos que nuestro manual se convierta en una guía definitiva para estudiantes, técnicos, investigadores y otras personas que desean estudiar las técnicas de reproducción asistida en ratón.

Naomi Nakagata

CONTENIDO

Capítulo 1 Fertilización *in vitro* (FIV)

- 1-1 Preparación y ensamblado de pipetas para manipular embriones 4
- 1-2 Fertilización *in vitro* (FIV) 6
- 1-3 Fertilización *in vitro* (FIV) usando el reactivo para ultra-superovulación12

Capítulo 2 Transporte de espermia

- 2-1 Recolección y transporte en frío de la cola (Cauda) del epidídimo 14
- 2-2 Fertilización *in vitro* usando espermia del epidídimo transportado en frío 18

Capítulo 3 Criopreservación de espermia

- 3-1 Criopreservación de espermia de ratón 20
- 3-2 Fertilización *in vitro* usando espermia criopreservado 26
- 3-3 Método de fertilización *in vitro* para el rescate de un stock legado de espermia criopreservado 32

Capítulo 4 Preparación de los ovocitos y embriones

- 4-1 Preparación de ovocitos micro-diseccionados con laser 36
- 4-2 Disección parcial de la zona pelúcida (DPZ) 39
- 4-3 Recolección de embriones en estadio de 2-Celulas 42

Capítulo 5 Transporte de ovocitos y embriones

- 5-1 Transporte en frío de embriones a 2-células 46
- 5-2 Transporte en frío de oviductos de ratón con embriones a 2-células 52

Capítulo 6 Criopreservación de ovocitos y embriones

- 6-1 Vitrificación simple de embriones de ratón 54
- 6-2 Vitrificación simple de ovocitos de ratón 59
- 6-3 Vitrificación y trasplante de ovarios de ratón 62

Capítulo 7 Otras técnicas

- 7-1 Vasectomía para la obtención de machos estériles 64
- 7-2 Transferencia Embrionaria en Oviducto 66
- 7-3 Transferencia Embrionaria en Útero 72
- 7-4 Cesárea y adopción 76

Capítulo 8 Medios

- 8-1 Almacenamiento de medios y soluciones en ampollas con gas de nitrógeno 78
- 8-2 Tabla de composición de los medios 79

*  Por favor, para más información consulte la página 90.

8-1 Almacenamiento de medios y soluciones en ampollas bajo gas de nitrógeno

Materiales y equipo

1. Sellador de doble llama (Adelphi Manufacturing, West Sussex, UK)
2. Ampollas (sterilized via hot air sterilization (180°C, 3 horas))
3. Medio
4. Jeringa y aguja 18 G
5. Pinza
6. Gas de nitrógeno

Procedimientos

Limpieza y esterilizado de las ampollas de vidrio

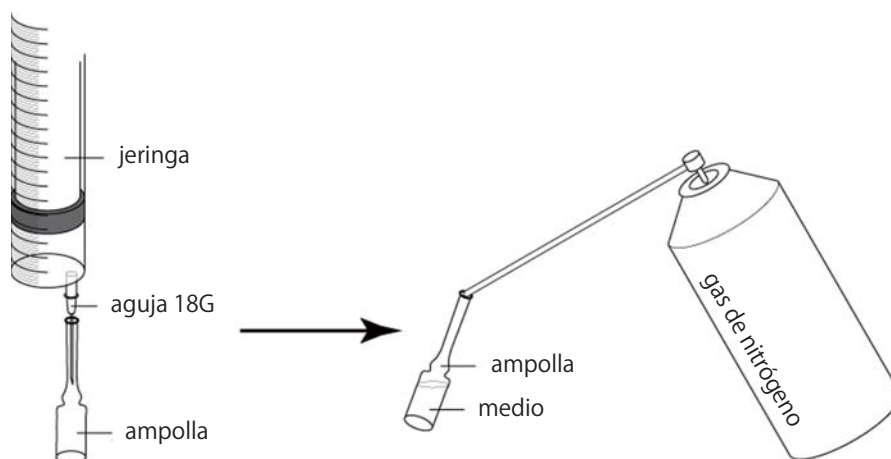
1. Enjuague las ampollas de vidrio solo una vez con agua corriente.
2. Enjuague las ampollas 2 veces con agua destilada.
3. Esterilice las ampollas por calor a 180°C durante 3 horas.

Encendido

1. Abra la llave del gas y encienda el sellador de ampollas de doble boca.
2. Ajuste las llamas del sellador de ampollas para que la llama sea azul.

Sellando las ampollas

1. Agregue la cantidad apropiada de medio a cada ampolla.
2. Introduzca el gas de nitrógeno en la ampolla e inmediatamente selle la punta de la misma usando las llamas del sellador. Repita con todas las ampollas restantes.



[Llenado de ampollas con medio] No. 20-01 

8-2 Tabla de composición de medios

mHTF

Formula del mHTF

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	593.8	Sigma	S 5886
KCl	35.0	Sigma	P 5405
MgSO ₄ • 7H ₂ O	4.9	Sigma	M 2773
KH ₂ PO ₄	5.4	Sigma	P 5655
CaCl ₂	57.0	Sigma	C 5670
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	50.0	Sigma	G 6152
Na-lactate**	0.34 mL	Sigma	L 7900
Na-Pyruvate	3.7	Sigma	P 4562
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA (Albumin, Bovine serum Fraction V Fatty Acid-Free)	400	MERCK/ ALBIOCEM	126575
0.5% phenol red	0.04 mL	Sigma	P 0290

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

**Ensayo; 70%

El mHTF se envasa en ampollas oscuras y almacena a 4°C .

Referencias

1. Kito S., Hayao T., Noguchi-Kawasaki Y., Ohta Y., Hideki U., and Tateno S. 2004. Improved *in vitro* fertilization and development by use of modified human tubal fluid and applicability of pronucleate embryos for cryopreservation by rapid freezing in inbred mice. *Comp. Med.* 54(5): 564-570.

Hialuronidasa

Composición de la hialuronidasa

Prepare una solución de stock al 1% como se indica abajo. Esterilize por filtración en y guardelo en alicuotas de 100 μL a -20°C . Antes de usar, diluya la solución de stock 10 veces. Ej.: agregue 20 μL de la solución de stock (1%) a la gota de 200 μL de mHTF que contiene los ovocitos para obtener una solución diluida al 0.1%.

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Hialuronidasa	10	Sigma	H 3506

*mg/mL en mHTF

Sacarosa 0.3 M (BSA-)**Composición de la sacarosa 0.3M (BSA -)**

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sacarosa	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20mL en PB1

Composición del PB1 (BSA-)

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.3M (BSA-) se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

0.3 M Sucrose (BSA +)

Composición del 0.3 M sucrose (BSA+)

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sucrose	2053.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL en PB1

Composición del PB1(BSA+)

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.3M (BSA-) se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

KSOM/AA**Composición del KSOM/AA**

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	555.0	Sigma	S 5886
KCl	18.5	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	4.75	Sigma	P 5655
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.95	Sigma	M 2773
CaCl ₂ · 2H ₂ O	25.0	Sigma	C 7902
NaHCO ₃	210.0	Sigma	S 5761
Glucose	3.6	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.2	Sigma	P 4562
DL-Lactic Acid sodium salt	0.174 mL	Sigma	L 1375
10 mM EDTA	100 µL	Sigma	E 6635
Streptomycin	5.0	Sigma	S 9137
Penicillin	6.3	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.1 mL	Sigma	P 0290
L-Glutamine	14.6	Sigma	G 8540
MEM Essential Amino Acids solution	1.0 mL	GIBCO	11130-051
MEM Non-essential Amino acid solution	0.5 mL	Sigma	M 7145
BSA	100.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

KSOM/AA se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

Referencias

1. Lawitts J. A., and Biggers J. D. 1993. Culture of preimplantation embryos. *Methods Enzymol.* 225:153-164.

Sacarosa 0.8M

Composición de la sacarosa 0.8M

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sucrose	5476.8	Sigma	S 1888

*mg/20 mL en PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.8M se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

PB1 se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

DMSO 1M**Composición del DMSO1M**

Nombre del compuesto	mL*	Vendedor	Número de catalogo
DMSO	1.56	Sigma	D 2650
PB1	18.44	-	-

*Volumen final: 20mL

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

El DMSO 1M se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

DAP213**Método de preparación del DAP213**

1. Primero se preparan la solución A y la solución B para que estén totalmente disueltas.
2. Se mezclan volúmenes iguales de A y B para obtener el DAP213.

Solución A

Nombre del compuesto	mL*	Vendedor	Número de catalogo
PB1	2.3088	-	-
DMSO	3.1252	Sigma	D 2650
Propylene glycol (PG)	4.556	Sigma	134368

Atención

La solución puede volverse opaca cuando se le agrega el DMSO.

Solution B

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Acetamide (AA)	1181.4	Sigma	A 0500

*mg/10 mL en PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

El DAP213 se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .

Sacarosa 0.25M

Composición de la sacarosa 0.25M

Nombre del compuesto	mg*	Vendedor	Número de catalogo
Sucrose	1711.5	Sigma	S 1888

*mg/20 mL en PB1

Composición del PB1

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	800.0	Sigma	S 5886
KCl	20.0	Sigma	P 5405
CaCl ₂	12.0	Sigma	C 5670
KH ₂ PO ₄	20.0	Sigma	P 5655
MgCl ₂ · 6H ₂ O	10.0	Sigma	M 2393
Na ₂ HPO ₄	115.0	Sigma	S 5136
Na-Pyruvate	3.6	Sigma	P 4562
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Penicillin	7.5	Sigma	P 7794
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

La sacarosa 0.25M se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C.

mWM

Composición del mWM

Nombre del compuesto	mg/100 mL*	Vendedor	Número de catalogo
NaCl	640.0	Sigma	S 5886
KCl	35.6	Sigma	P 5405
KH ₂ PO ₄	16.2	Sigma	P 5655
MgSO ₄ · 7H ₂ O	29.4	Sigma	M 7774
NaHCO ₃	190.0	Sigma	S 5761
Glucose	100.0	Sigma	G 6152
Na-Pyruvate	2.5	Sigma	P 4562
Ca-lactate pentahydrate	46.0	Sigma	C 8356
Streptomycin	5.0	Sigma	S 1277
Penicillin G	7.5	Sigma	P 7794
0.5% phenol red	0.2 mL	Sigma	P 0290
20 mM 2-ME	10.0 µL	Sigma	M 7522
100 mM EDTA	50.0 µL	Sigma	E 6635
BSA	300.0	Sigma	A 4378

*Agua para transferencia embrionaria; Sigma W1503

El mWM se envasa en ampollas oscuras y se almacena a 4°C .



Todos los videos de este manual se encuentran en la memoria extraíble USB/DVD. Si tiene alguna pregunta, por favor no dude en contactarnos.

Contacto:

Cosmo Bio Co., Ltd.

International Sales Dept.

Toyo-Ekimae Bldg., 2-20, Toyo 2-Chome, Koto-ku, Tokyo 135-0016, Japan

Tel: +81-3-56329617

Fax: +81-3-56329618

Email: export@cosmobio.co.jp

Web: www.cosmobio.com