

一种简便的小鼠精原干细胞分离培养方法

宋锐 曹鸿国* 陶勇 张运海 刘亚 黄伟玲 孙雪萍 殷慧群 章孝荣

(安徽农业大学动物科技学院, 安徽省地方畜禽遗传资源保护与生物育种省级重点实验室, 合肥 230036)

摘要 采用一步酶消化法分离小鼠精原干细胞, 比较 α -MEM、DMEM 培养基对体外培养的精原干细胞生长状态的影响, 对精原干细胞集落进行形态观察、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)染色和免疫组化鉴定, 并诱导精原干细胞向精子细胞分化。结果显示, 以小鼠胚胎成纤维细胞作为饲养层, 用 α -MEM 培养的精原干细胞集落较大且呈葡萄串状或念珠状, 细胞状态较好; 小鼠精原干细胞集落的 AKP 染色阳性呈紫红色; 在红色荧光下精原干细胞集落的 Oct-4 核蛋白表达为阳性、膜蛋白 c-Kit、 β_1 -integrin 和 Gfr α -1 表达为阳性; 精原干细胞经维甲酸(all-trans-retinoic-acid, RA)诱导可初步分化成精子样细胞。因此, 采用一步酶消化法能够分离小鼠精原干细胞, α -MEM 更适合小鼠精原干细胞体外培养。

关键词 小鼠; 精原干细胞; 分离; 培养

精原干细胞(spermatogonial stem cells, SSCs)是生长于生精小管上皮近基底膜区域的雄性生殖干细胞, 它主要参与精子发生, 通过自我更新维持生殖干细胞库稳定或是自我分化成一定数量的精母细胞并最终发育成精子, 保证雄性动物正常的生殖能力^[1]。SSCs 是雄性动物中唯一能将遗传信息传递给后代的干细胞, 具有很强的可塑性, 因此它是生殖医学、干细胞工程和发育生物学等方面的重要研究材料, 具有极大的科研价值^[2-4]。目前国内外常用的分离纯化 SSCs 方法主要有差速贴壁法^[5]、两步酶消化法^[6]、Percoll 密度梯度分选法^[7]、免疫磁珠分选法^[8]、免疫荧光激活细胞分选^[9]或是上述几种方法的结合, 然而这些方法存在操作流程繁琐、酶消化作用时间长、富集后细胞活力不高或成本较高等缺点; 而目前适合维持 SSCs 增殖和干细胞特性所需的营养成分和培养基尚不完全明确, 不同实验室培养体系参差不齐, 这给力求深入研究 SSCs 的常规实验室带来诸多不便。本实验尝试建立一种简便的分离培养小鼠精原干细胞(mouse SSCs, mSSCs)的方法。

1 材料与方法

1.1 动物与试剂

7 日龄雄性 ICR 小鼠; 全反式维甲酸(all-trans-retinoic-acid, RA)、中性蛋白酶 II 均购自 Sigma 公司; α -MEM、DMEM 均购自 Gibco 公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自 Hyclone 公司、新生牛血清(newborn calf serum, NCS)购自杭州四季青公司; 细

胞碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)检测试剂盒购自南京建成生物公司; 牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自 Solarbio 公司; GDNF、c-Kit、 β_1 -integrin 和 Gfr α -1 (GDNF family receptor α -1)抗体均购自北京博奥森生物公司; Oct-4 抗体购自 Abcam 公司。

1.2 培养基

mSSCs 培养液包括含 10% FBS 的 α -MEM 和含 10% FBS 的 DMEM, 上述培养液中均添加 1% 非必需氨基酸、1% L-谷氨酰胺、1% 丙酮酸钠和 20 ng/ml GDNF。

1.3 mSSCs 的分离与培养

1.3.1 mSSCs 的分离 小鼠颈椎脱臼处死, 酒精消毒后取睾丸, 用含 5% 双抗 PBS 将组织漂洗 3 遍; 在含 1% 双抗的 PBS 中去除脂肪垫、微血管及附睾; 在体视镜下用眼科镊剥离睾丸白膜, 将游离出来的生精小管撕成 1~2 mm³ 小块或小段。

采用一步酶消化法, 离散的生精小管小段用含 1% 双抗的 PBS 漂洗 2 遍后移入离心管中, 加入中性蛋白酶 II, 37 °C 消化 20~30 min, 期间不时震荡离心管或用移液枪反复吹吸; 待消化液中出现白色絮状漂浮物时收集消化液 800 r/min 离心 3 min, 去上清液后用 DMEM 洗涤 1 次, 用 mSSCs 培养液重悬; 将悬液用 200 目尼龙筛过滤; 收集滤液, 将其接种至含小鼠成纤维细胞饲养层的培养皿中。

收稿日期: 2009-12-14 接受日期: 2010-03-15

国家高技术研究发展计划(863计划)(No.2008AA101003), 安徽农业大学资助引进与稳定人才科研启动项目(No.yj2007-10)

* 通讯作者。Tel: 0551-5786357, E-mail: caohongguo1@yahoo.com.cn

1.3.2 mSSCs 的培养与传代 分别用 α -MEM 和 DMEM 为基础培养基的培养液培养 mSSCs, 每 2~3 天传代 1 次。收集细胞培养液至离心管中, 用 DMEM 基础培养基洗涤细胞 2 次, 滴加少量中性蛋白酶 II 至培养皿中, 消化时间 2~3 s, 期间轻拍培养皿的边缘使 mSSCs 集落脱落; 添加 DMEM 基础培养基使脱落的集落悬浮并回收至离心管中; 800 r/min 离心 3 min 后用 mSSCs 培养液重悬, 轻轻吹打离散细胞后, 按 1:2 接种至新鲜饲养层上进行培养。

1.4 mSSCs 的鉴定

将传代的 mSSCs 接种至含饲养层的培养皿中, 24~48 h 后吸去培养液, PBS 洗涤细胞 2 遍, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 用 PBS 洗涤细胞 3 遍, 每遍 5 min, 加入 AKP 染液, 染色 15 min 后显微镜下观察。

传代 mSSCs 接种至铺满饲养层的培养皿中培养。24~48 h 后 PBS 洗涤, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 0.5% Triton PBS 透化 10 min; 含 1% BSA 的 PBS 封闭 30 min, 分别添加一抗为 Oct-4、c-Kit、 β_1 -integrin 和 Gfr α -1 的兔多克隆抗体 4 °C 过夜, PBS 洗涤后添加二抗为罗丹明标记的羊抗兔 IgG 室温温育 1 h, PBS 洗涤后加 DAPI 染色 1 min, 荧光显微镜下观察。

1.5 mSSCs 诱导分化精子样细胞

将一步酶消化法得到的生精小管细胞悬液接种至培养皿中, 用含 10% FBS 的 α -MEM 培养液培养;

24 h 后将培养液去除, 滴加少量中性蛋白酶 II 消化 2~3 s, 期间轻拍培养皿的边缘使 mSSCs 集落脱落; 用 α -MEM 洗涤使脱落的集落悬浮并去除; 贴壁细胞继续用培养液培养 24 h 后用 10 μ g/ml 丝裂霉素 C 处理 2.5 h, 作为饲养层待用。将传代的 mSSCs 接种至含生精小管来源细胞饲养层的培养皿中, 用含 2 μ mol/L RA 的 mSSCs 培养液培养, 24 h 后将 mSSCs 传代至新鲜的生精小管来源细胞饲养层并用含 10% FBS 的 α -MEM 继续培养, 每天半量换液, 显微镜观察细胞形态变化。

2 结果

2.1 mSSCs 生长特性及形态特征

从睾丸经中性酶消化离散的单个细胞接种至饲养层上, 24 h 后可见一些由多个细胞聚集, 形成细胞集落生长于饲养层上, 集落中的细胞大小均一、饱满呈圆形, 边缘光滑有折光性, DAPI 染色表明核质比高; 细胞集落一般由三个至几十个细胞聚集成团或呈一字形排列, 细胞之间连接紧密呈葡萄串状或念珠状(图 1A 和图 1B)。传代 3 次后, 细胞集落体积进一步增大、细胞数量增多, 集落细胞饱满且葡萄串状明显, 立体感增强(图 1C)。传代 4 次后细胞增殖较快, 细胞集落状态良好(图 1D)。

2.2 不同培养基对 mSSCs 生长状态的影响

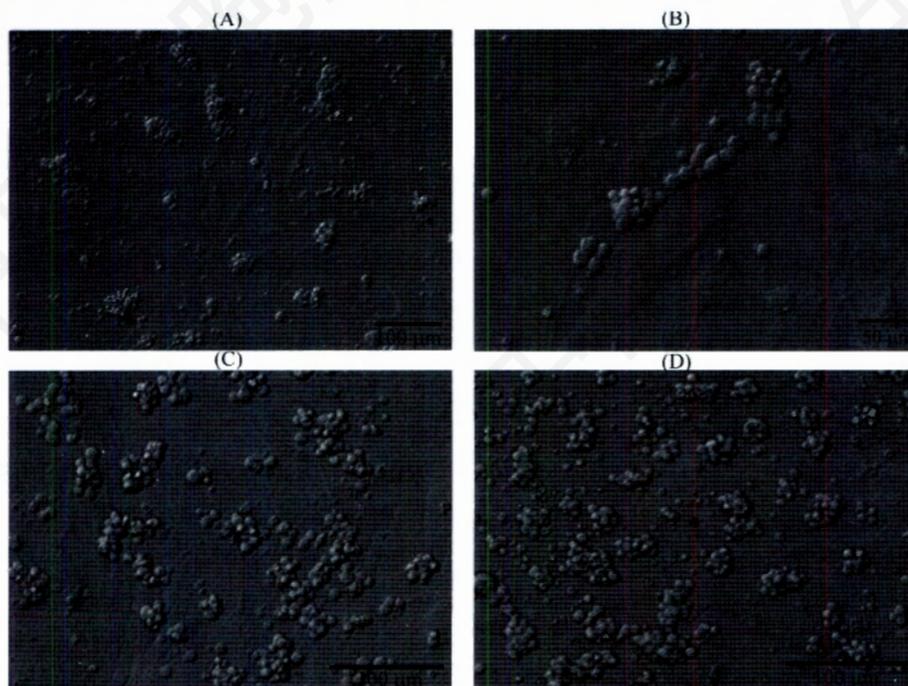


Fig.1 The image of mSSCs colonies

A: the shape of mSSCs colonies after 24 h culture; B: the grape bunch-like and rosary-like mSSCs colonies were formed after 24 h culture; C: the shape of mSSCs colonies after passaged cells three times; D: the shape of mSSCs colonies after passaged cells four times.

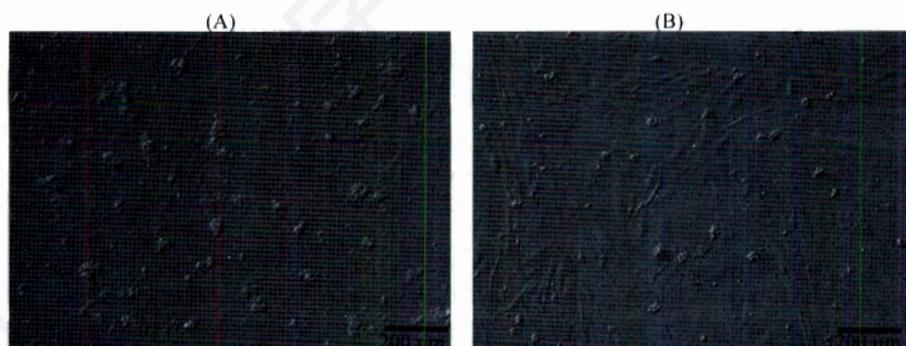


Fig.2 Isolated mSSCs by different culture mediums and observed the colonies growth status after 72 h culture

A: the mSSCs colonies cultured by α -MEM; B: the mSSCs colonies cultured by DMEM.

分别用 α -MEM 和 DMEM 为基础培养基的全培养液培养 mSSCs, 观察细胞集落生长状态的变化。结果显示使用 α -MEM 为基础培养基的全培养液培养 mSSCs, mSSCs 生长状态较好, 主要表现为单个集落中所含细胞数量较多, 细胞集落增殖速度较快, 细胞之间连接致密, 形成较为紧凑的 mSSCs 集落(图 2A); 以 DMEM 为基础培养基的全培养液培养 mSSCs, 在其他条件相同的情况下 mSSCs 集落数量较少, 体积较小, 主要表现为细胞集落增殖速度较慢(图 2B)。

2.3 mSSCs 的鉴定

mSSCs 集落经 AKP 染色后倒置显微镜下观察呈深紫色, 强阳性(图 3)。荧光显微镜观察免疫组化处理后 mSSCs 集落, 结果显示 mSSCs 的 Oct-4 为核特异性表达, 与特异性核荧光染料 DAPI 的染色结果相一致(图 4A~图 4C); c-Kit 为膜特异性表达, 蛋白均匀分布于细胞膜上, 使球形 mSSCs 组成的集落立体感明显(图 4D~图 4F), β_1 -integrin 为膜特异性表达, 呈弥散性分布于 mSSCs 胞膜及细胞之间连接区域(图 4G~图 4I), Gfra-1 为膜特异性表达, 均匀分布于细胞膜上, 使球形 mSSCs 集落立体感明显(图 4J~图 4L)。

2.4 mSSCs 诱导分化精子样细胞

经 RA 体外培养诱导 24 h, 用含 10% FBS 的 α -MEM 继续培养 4 天后, 观察到 mSSCs 集落部分细胞由圆形变为圆锥形, 一端出现尾巴样小突起(图 5A); 再继续培养 4 天后圆锥形细胞增多, 圆锥状头部膨大, 尾巴样小突起进一步伸长变为尖刺状(图 5B)。

3 讨论

SSCs 的成功分离培养是对其进行深入研究的基础, 但由于其在动物睾丸中含量极少^[12], 不易分离纯化, 给体外培养 SSCs 造成一定的困难。张学明等^[5]、王庆忠等^[6]均采用两步酶消化与差速贴壁结合分离富集 SSCs, 其分离使用了胶原酶、透明质酸酶以及

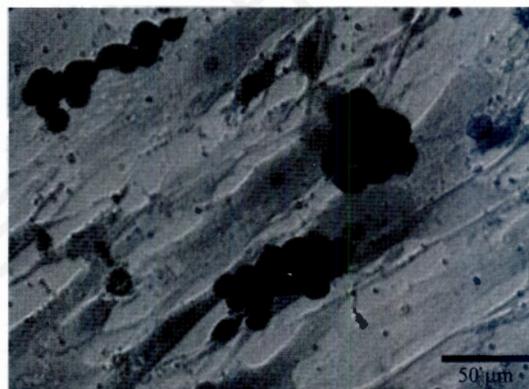


Fig.3 AKP staining of the mSSCs colonies

胰蛋白酶消化睾丸细胞, 富集步骤持续 5~6 h 甚至过夜; 多种消化酶对细胞作用和长时间悬浮可导致 SSCs 活力持续下降, 且分离液中残留红细胞等不易贴壁细胞则会影响富集效果。柴玮杰等^[7]将用两步酶消化法分离得到的睾丸细胞经 Percoll 密度梯度离心富集 SSCs, 这样虽缩短了富集时间, 但仅离心时间就长达 20 min, 较长时间的离心力作用也会对细胞活力造成一定的影响。中性蛋白酶是一种比胰蛋白酶、胶原酶在消化性质上更温和且效率更高的消化酶, 本实验采用中性蛋白酶 II 一次性消化分离睾丸细胞, 只需 37 °C 水浴短暂消化, 因此即简化了传统分离步骤、缩短了分离时间, 并且减小酶对细胞的刺激、有效保证 SSCs 活力; 本实验将 SSCs 富集步骤与传代有机结合, 使用中性蛋白酶 II 短时间(2~3 s)消化原代贴壁的 SSCs 集落, 并结合轻微震荡培养皿可使 SSCs 集落脱落, 杂细胞和饲养层不被消化下来, 从而达到较好的分离富集效果, 即简化了富集步骤也避免了传统富集方法时间过长、细胞活力不高的缺陷。使用磁珠分选仪和流式细胞仪富集 SSCs, 即免疫磁珠分选和免疫荧光激活细胞分选^[5,6], 虽能达到很高的细胞纯度, 但分选速度较慢不适合大批量的 SSCs 富集, 这对于力求深入研究 SSCs 的常规实验室

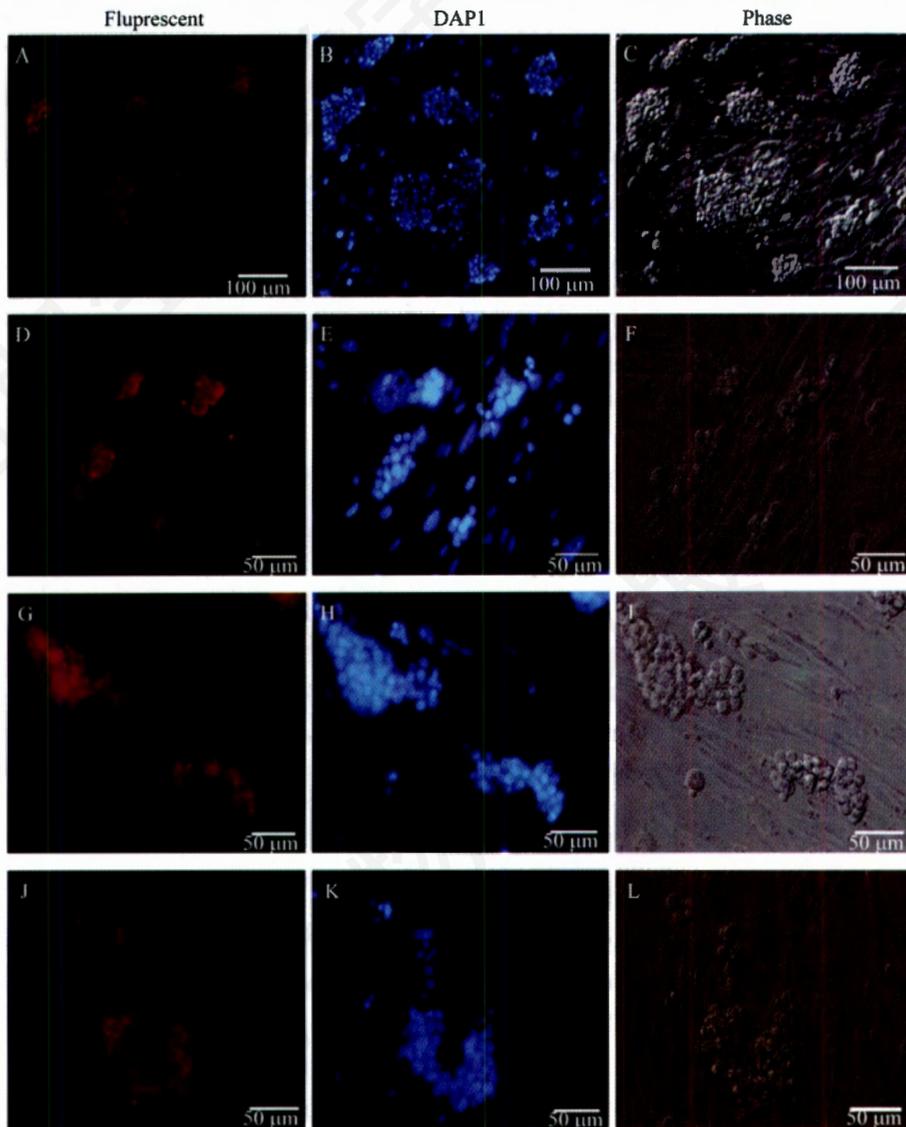


Fig.4 Immunohistochemistry assay of the mSSCs colonies

A: the Oct-4 positive mSSCs colonies; D: the c-Kit positive mSSCs colonies; G: the β_1 -integrin positive mSSCs colonies; J: the Gfra-1 positive mSSCs colonies; B, E, H, K: cellular nucleus were stained with DAPI; C, F, I, L: light microscope of the mSSCs colonies.

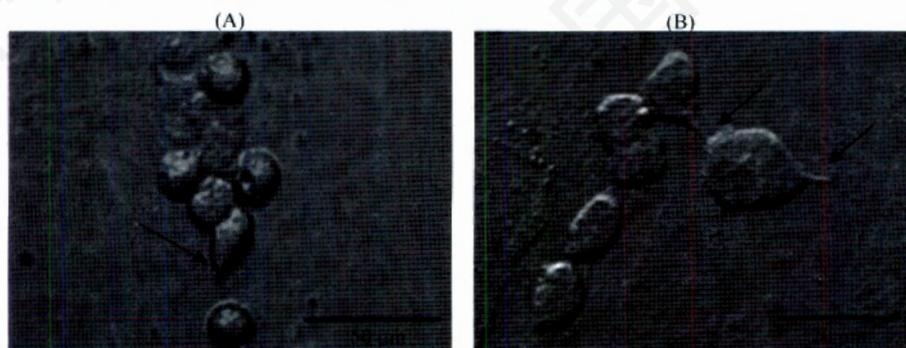


Fig.5 *In vitro* induced the mSSCs differentiated into sperm-like cells

A: the conical cell and small tail-like protrusion appeared in mSSCs colonies; B: the conical cells and small Spiked-like protrusions appeared in sperm-like cells.

来说实验成本过高。总之,一步酶消化法是一种简便的分离富集 SSCs 方法。

本实验以 α -MEM 为基础培养基培养的 mSSCs 在细胞状态、集落大小、数量方面都比 DMEM 效果好,结果证明 α -MEM 比 DMEM 更适合 SSCs 体外培养。原因可能是 α -MEM 更全面的氨基酸和辅助成分使得 SSCs 在营养物质代谢水平和利用率上提高、遗传物质合成代谢加快以及培养液的整体抗氧化能力提高,从而使得细胞整体的生长状态和增殖速度得到改善。 α -MEM 与 DMEM 相比,氨基酸的种类更多、含量更高,且含有一些 DMEM 没有的辅助成分(如维生素 C、生物素、维生素 B₁₂ 以及亚油酸等)。GDNF 目前已证明是能明显促进 SSCs 增殖并维持其自我更新和未分化状态的重要因子^[13],它由支持细胞产生并通过 SSCs 的膜受体 Gfr α -1 和 c-Ret 跨膜酪氨酸激酶起作用^[1]。Kubota 等^[14]用含 GDNF 的培养液培养 SSCs,可使其 7 天增殖 1.5 倍。

正常 SSCs 的 AKP 检测呈阳性并表达 c-Kit、 β_1 -integrin 及 GFR α -1 等特异性表面分子标志^[15,16]。Oct-4 的表达是干细胞的重要特征之一,在睾丸细胞中只有 SSCs 表达 Oct-4,其他细胞如支持细胞、间质细胞等均不表达,故 Oct-4 可用于 SSCs 鉴定^[17]。c-Kit 是干细胞因子的受体,主要分布于细胞膜上,其介导的信号通路可调控 SSCs 进入有丝分裂并进一步分化;研究表明 A₀ 型 SSCs 不表达 c-Kit,而 A₀ 型转化为 A₁-A₄ 型 SSCs 后 c-Kit 可重新高表达,细线期精母细胞表达较低、后期精母细胞和精子基本不表达 c-kit^[18-20]。 β_1 -integrin 存在于干细胞或成体细胞如生殖干细胞、造血干细胞等的膜表面,并与 α -integrin 形成二聚体,参与细胞的迁移、附着和识别机制;Shinohara 等^[21]证实 SSCs 膜表面也存在 β_1 -integrin,并可作为 SSCs 的富集筛选标记。Gfr α -1 是 GDNF 在 SSCs 膜表面的辅助受体,在新生和成年小鼠睾丸都有表达,它与 c-Ret 共同构成完整受体介导 Src、Ras、Numb 等胞内信号通路,调控相关基因表达并维持 SSCs 的增殖、自我更新^[1,22]。本实验通过对 mSSCs 集落 AKP 染色和特异性蛋白 Oct-4、c-Kit、 β_1 -integrin、Gfr α -1 的鉴定充分验证了我们分离富集的细胞是未分化的 SSCs,且表明体外分离培养的 mSSCs 到 7 天时大部分为 A₁-A₄ 型。

RA 是维生素 A 的代谢中间产物,作为极性分子可直接作用于细胞核受体参与转录水平基因的表达调控,诱导生殖干细胞减数分裂和分化^[23]。Koubova 等^[24]研究表明 RA 能激活小鼠睾丸组织 Stra8

(stimulated by retinoic acid gene 8)基因表达,使处于分裂静止期的 A 型 mSSCs 同期化并重新启动减数分裂而形成精母细胞,最终发育为成熟的精子。Anderson 等^[25]、Zhou 等^[26]证实 RA 参与小鼠精子发生,通过上调 Stra8 蛋白水平促进减数分裂相关基因表达上调,引发生殖干细胞减数分裂。本实验将 mSSCs 经 RA 处理 24 h 后用含 10% FBS 的 α -MEM 继续培养 4 天,可见细胞集落中出现圆锥状细胞和尾巴状突起;培养 8 天可观察到细胞圆锥状头部膨大,尾巴样小突起变长,细胞分化为初步的精子样细胞形态。

总之,本试验证明了一步酶消化法分离 mSSCs 的可行性,探索了不同常规培养基对 mSSCs 生长状态的影响,尝试将 mSSCs 诱导分化为精子样细胞,为今后深入研究精原干细胞功能机制和生殖医学上的应用打下基础。

参考文献 References

- Hofmann MC. GDNF signaling pathways within the mammalian spermatogonial stem cell niche. *Mol Cell Endocrinol* 2008; 288(1-2): 95-103.
- Dym M, He Z, Jiang J, Pant D, Kokkinaki M. Spermatogonial stem cells: unlimited potential. *Reprod Fertil Dev* 2009; 21(1): 15-21.
- Hamra FK, Gatlin J, Chapman KM, Grelles DM, Garcia JV, Hammer RE, *et al.* Production of transgenic rats by lentiviral transduction of male germ-line stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(23): 14931-6.
- Simon L, Ekman GC, Kostereva N, Zhang Z, Hess RA, Hofmann MC, *et al.* Direct Transdifferentiation of stem/progenitor spermatogonia into reproductive and nonreproductive tissues of all germ layers. *Stem Cells* 2009; 27(7): 1666-75.
- 张学明,李德雪,岳占碰,于家傲,张世庆,李恩中,等。睾丸提取液、EGF、雌激素对小鼠精原干细胞体外存活和增殖的效果。《中国农学通报》2006; 22(6): 1-4.
- 王庆忠,韩春生。Knockout™ SR 无血清培养基支持小鼠精原干细胞的短期存活。《分子细胞生物学报》2008; 41(2): 162-6.
- 柴玮杰,王玉燕,高珉之,王瑞钟,赵博。小鼠精原干细胞体外培养的研究。《医学动物防治》2008; 24(8): 567-8.
- Kokkinaki M, Lee TL, He Z, Jiang J, Golestaneh N, Hofmann MC, *et al.* The molecular signature of spermatogonial stem/progenitor cells in the 6-day-old mouse testis. *Biol Reprod* 2009; 80(4): 707-17.
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, *et al.* Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* 2006; 440(7088): 1199-203.
- Simon L, Ekman GC, Tyagi G, Hess RA, Murphy KM, Cooke PS. Common and distinct factors regulate expression of mRNA for ETV5 and GDNF, Sertoli cell proteins essential for spermatogonial stem cell maintenance. *Exp Cell Res* 2007; 313(14): 3090-9.
- Aponte PM, Soda T, Kant HJG, de Rooij DG. Basic features of bovine spermatogonial culture and effects of glial cell line-derived neurotrophic factor. *Theriogenology* 2006; 65(9): 1828-47.

- 12 Oatley JM, Brinster RL. Spermatogonial stem cells. *Meth Enzymol* 2006; 419: 259-82.
- 13 Meng X, Lindahl M, Hyvönen ME, Parvinen M, de Rooij DG, Hess MW, *et al.* Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science* 2000; 287(5457): 1489-93.
- 14 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biol Reprod* 2004; 71(3): 722-31.
- 15 Kanatsu-Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, *et al.* Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum or feeder-free conditions. *Biol Reprod* 2005; 72(4): 985-91.
- 16 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100(11): 6487-92.
- 17 Kubota H, Avarbock MR, Brinster RL. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(47): 16489-94.
- 18 Copeland NG, Gilbert DJ, Cho BC, Donovan PJ, Jenkins NA, Cosman D, *et al.* Mast cell growth factor maps near the steel locus on mouse chromosome 10 and is deleted in a number of steel alleles. *Cell* 1990; 63(1): 175-83.
- 19 Ohta H, Yomogida K, Dohmae K, Nishimune Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 2000; 127(10): 2125-31.
- 20 Dolci S, Pellegrini M, Di Agostino S, Geremia R, Rossi P. Signaling through extracellular signal-regulated kinase is required for spermatogonial proliferative response to stem cell factor. *J Biol Chem* 2001; 276(43): 40225-33.
- 21 Shinohara T, Avarbock MR, Brinster RL. β_1 - and α_6 -integrin are surface markers on mouse spermatogonia stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(10): 5504-9.
- 22 Sariola H, Saarma M. Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 2003; 116(Pt 19): 3855-62.
- 23 Bowles J, Koopman P. Retinoic acid, meiosis and germ cell fate in mammals. *Development* 2007; 134(19): 3401-11.
- 24 Koubova J, Menke DB, Zhou Q, Capel B, Griswold MD, Page DC. Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103(8): 2474-9.
- 25 Anderson EL, Baltus AE, Roepers-Gajadien HL, Hassold TJ, de Rooij DG, van Pelt AM, *et al.* Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105(39): 14976-80.
- 26 Zhou Q, Li Y, Nie R, Friel P, Mitchell D, Evanoff RM, *et al.* Expression of stimulated by retinoic acid gene8 (stra8) and maturation of murine gonocytes and spermatogonia induced by retinoic acid *in vitro*. *Biol Reprod* 2008; 78(3): 537-45.

A Simple and Convenient Method of Mouse Spermatogonial Stem Cells Isolation and Culture

Rui Song, Hong-Guo Cao*, Yong Tao, Yun-Hai Zhang, Ya Liu, Wei-Ling Huang,
Xue-Ping Sun, Hui-Qun Yin, Xiao-Rong Zhang

(Anhui Provincial Key Laboratory of Local Livestock and Poultry Genetic Resources Conservation and Bio-Breeding, School of Animal Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract We isolated mouse spermatogonial stem cells (mSSCs) by the method of one-step enzymatic digestion, cultured mSSCs *in vitro* and compared the effect of α -MEM and DMEM on growth condition. The mSSCs colonies were identified by morphology observation, alkaline phosphatase (AKP) staining, immunohistochemistry and we induced the mSSCs differentiated into sperm-like cells. The results showed that using the mouse embryonic fibroblast cell as the feeder cell. the mSSCs colonies cultured by α -MEM were in good state and the graped-like or rosary-like; AKP staining showed the colour of mulberry as the positive; under the red fluorescent, the Oct-4 nucleoprotein of mSSCs colonies cells expressed positive and the membrane protein of C-Kit, β_1 -integrin and Gfr α -1 expressed positive; the mSSCs treated with retinoic acid (RA) can be induced into the initial status of sperm-like cell. It was concluded that used the method of one-step enzymatic digestion could isolate mSSCs successfully and α -MEM was more suitable for mSSCs *in vitro* culture.

Key words mouse; spermatogonial stem cells; isolation; culture

Received: December 14, 2009 Accepted: March 15, 2010

This work was supported by the National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No.2008AA101003), Anhui Agricultural University Introduction and Stability Talent Project (No.yj2007-10)

*Corresponding author. Tel: 86-551-5786357, E-mail: caohongguo1@yahoo.com.cn