

## Hoechst 33258 Staining을 이용한 음성 생쥐 성세포의 간편 분류

김 경 국<sup>1</sup> · 박 영 식<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>연변대학교 동물과학과, <sup>2</sup>경북대학교 축산생명공학과

## Simple Classification of Male Mouse Germ Cells using Hoechst 33258 Staining

Kyoung Guk Kim<sup>1</sup> and Young Sik Park<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Animal Science, Agricultural College of Yanbian University, Yanji Jilin 133002, China

<sup>2</sup>Dept. of Animal Science and Biotechnology, College of Ecology and Environment Science, Kyungpook National University, Sangju 742-711, Korea

### ABSTRACT

In the study for a differentiation and development of spermatogonial cells, the researchers should commonly require a simple, fast and reasonable method that could evaluate the developmental stage of male germ cells without any damage and also relentlessly culture them so far as a cell stage aiming at experimental applications. For developing the efficient method to identify the stage of sperm cells, the morphological characteristics of sperm cells were investigated by staining the cells with blue fluorescent dye Hoechst 33258, and a criterion for male germ cell classification was elicited from results of the previous investigation, then the efficiency of the criterion was verified by applying it to assort the germ cells recovered from male mice in age from 6 to 35 days. As morphological characteristics, spermatogonia significantly differed from spermatocytes in size, appearance and fluorescent patches of nucleus, and spermatids could also be distinguished from spermatozoa by making a difference in the volume and shape of nucleus and the shape and fluorescence of tail. Aforesaid criterion was applicable for classifying *in vitro* cultured sperm cells by verifying its efficiency and propriety for assorting the stages of testicular germ cells. However, the fluorescent staining showed that germ cells in mouse testis should be dramatically differentiated and developed at 21 days and 35 days of age, which were known as times of sexual puberty and maturity in male mice, respectively. In conclusion, the results indicated that this simple criterion for sperm cell classification using fluorescence staining with Hoechst 33258 may be highly efficient and reasonable for spermatogenesis study.

(Key words: spermatogonia, *in vitro* spermatogenesis, Hoechst 33258, germ cell classification)

### 서 론

불임치료를 목적으로 정원세포로부터 반수체인 정자 또는 정자양세포를 얻기 위한 다양한 연구가 진행되고 있다. Marh 등(2003)은 1차 정자세포로부터 원형의 정자양세포까지 분화시켰고, Lee 등(2001)은 정원세포로부터 반수체인 정자양세포를 분화시키는데 성공하였으며, Feng 등(2002)은 stem cell factor를 이용하여 A형의 정원세포로부터 정자세포와 정자양세포의 분화를 유도하였다. 이렇듯 정자양세포까지 정자발생을 유도한 연구들이 다수 있으나, 이러한 기술을 남성 불임치료를 적용하기 위해서는 성세포의 분화 발생을 효과적으로 유도할 수 있는 체외배양기술이 지속적으로 개발되어야 한다.

체외배양으로 성세포를 목적인 발생단계까지 배양하기 위

해서는 다양한 배양환경에 대한 연구가 필요한데, 특히 발생 단계별 요구되는 발생 자극 인자를 추적하기 위해서는 살아 있는 상태에서 성세포를 분류할 수 있어야 한다. 성세포를 발생 단계별로 분류하기 위해서 주로 염색을 하게 되는데, 일반적으로 형광염색물질인 Hoechst 33258이 많이 사용되고 있다. 이는 세포막 침투성이 우수하고, 무엇보다 살아있는 세포에서도 사용이 가능하며, 특히 adenine과 thymine이 풍부한 DNA 사슬의 minor groove에 결합하여 핵의 상태를 밝히는데 유용한 것으로 알려져 있다(Latt 등, 1975; Portugal과 Waring, 1988).

핵익식 또는 체외수정 등 수정에 사용 가능한 발생단계인 정자양세포 또는 정자까지 정원세포를 체외배양하기 위해서는 배양환경의 개선 못지않게 배양하고 있는 세포의 발생단계를 구별하고, 적정시기에 활용할 수 있어야 한다. 따라서 본 연구

\* Correspondence : yspark@knu.ac.kr

에서는 신속하면서 생존에 영향을 미치지 않으며, 정자의 발생 단계를 추정할 수 있는 방법을 개발코자 하였으며, 이를 위해 세포의 생존에 영향을 미치지 않는 Hoechst 33258을 이용 음성 성세포를 형광염색하고, 발생단계별 형태적 특징을 조사하여 음성 성세포 분류기준을 설정한 다음, 다양한 일령의 생쥐로부터 채취한 정소세포를 형광염색한 후 앞서 제시한 기준을 적용하여 발생단계별로 분류하면서 본 연구에서 제시하고 있는 성세포분류기준의 적정성을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시동물

정소세포를 회수용 생쥐 신생자를 생산하기 위해 8주령 암컷과 수컷 ICR(Institute for Cancer Research) mouse를 Samtako Co.(경기도, 한국)에서 구입하였으며, 10:14시간 명암주기, 50% ±10% 습도 및 23±2°C 온도로 조건화된 환경에서 사육하면서 물과 사료(AIN 93 G; Feedlab Co., 경기도, 한국)를 충분히 공급하였다. 본 실험은 경북대학교 실험동물 사용윤리규정에 의해 제정된 경북대학교 실험동물 사용지침서를 준수하여 진행하였다.

### 2. 주요 시약

배양액 제조를 위해 검정된 시약을 구매하여 사용하였으며, 주요 시약은 다음과 같다; Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, Thermo, SH30243.01, Thermo Fisher Scientific Inc.), penicillin/streptomycin(Gibco, 15140, Thermo Fisher Scientific Inc.), heat-inactivated fetal bovine serum(FBS, JRS, 43640, JR scientific. Incs), bovine serum albumin(BSA, Sigma, A9418, Sigma-Aldrich Co.), collagenase type IV(Sigma, C5138, Sigma-Aldrich Co.), 0.25% trypsin/EDTA solution(Gibco, 12605, Thermo Fisher Scientific Inc.), MEM non-essential amino acids (NEAA, Sigma, M7145, Sigma-Aldrich Co.), Hoechst-33258 (Sigma, H-6024, Sigma-Aldrich Co.), phosphate buffered saline (PBS, Gibco, 10010023, Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 3. 용액의 제조

정소조직을 1차 소화하는데 사용하는 collagenase 용액은 collagenase type IV 분말을 10 mg/ml 되도록 PBS로 용해하여 제조하였다. 제조된 용액은 0.22 µm의 filter로 여과한 후 0.5 ml씩 분주하여 -20°C에서 보관하였으며, 사용하기 직전에 용해 후 collagenase 최종농도가 1 mg/ml 되도록 PBS로 희석하였다.

정소세포의 처리에 사용되는DMEM 배양용액은 DMEM에 penicillin/streptomycin 용액과 NEAA 용액을 각각 1% 및 ×1이

되도록 희석 첨가하여 제조하였다.

정소세포를 형광염색하기 위해 사용되는 Hoechst 33258 용액은 Hoechst 33258의 최종농도가 20 µg/ml가 되도록 PBS로 용해하여 제조하고, 0.5 ml씩 분주하고 사용 시까지 -20°C에서 냉동 보관하였다.

### 4. 정원세포의 분리

실험에 공시할 정소세포는 Guan 등(2009)의 방법을 준용하여 분리 회수하였으며, 요약하면 다음과 같다.

출생 후 35일령까지의 신생 생쥐를 실험목적에 따라 1~5마리로부터 외과적 방법으로 정소를 채취한 다음 PBS로 세척하고, 정소백막을 제거하였다. 이렇게 나화된 정소를 collagenase 용액에 넣고 37°C에서 15분간 배양하였으며, 이어서 0.25% trypsin/EDTA 용액에서 15분간 배양하여 정소조직의 소화를 유도하였다. 효소에 의한 소화작용을 중지시키기 위해 10% FBS 함유 DMEM 용액을 정소조직 소화용액에 1:1 비율로 첨가하였다. 효소 반응이 중지된 세포 부유 용액을 25 µm 공극의 nylon mesh에 통과시켜 커다란 입자 및 세포덩어리를 제거한 다음, 회수한 용액을 1,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 버리고, 세포펠렛을 회수하였다. 회수한 세포펠렛은 5 ml의 DMEM 배양용액으로 희석 세척하였으며, 동일한 방법으로 원심분리하여 2회 반복 세척한 후 1 ml의 DMEM 배양용액으로 재부유하여 형광염색에 공시하였다.

반복 세척하여 회수한 정소세포 용액에 들어있는 세포수를 혈구계산기를 이용하여 측정하였으며, trypan blue 생사염색 (Somfai 등, 2002)을 통해 세포의 생존 여부는 조사하였다. 특히 생사염색에서 세포의 생존율이 90% 이상인 시료만 실험에 공시하였다.

### 5. 형광염색

정소로부터 회수한 세포를 PBS로 희석한 다음 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세척하고, 동일한 방법으로 정자를 한번 더 세척한 다음, 실온에서 Hoechst 33258 용액으로 도포하고, 암실에서 30분간 방치하여 염색을 유도한 후 핵과 핵인 등을 형광현미경(Leica Co., Germany)으로 관찰하였다.

### 6. 실험설계

정원세포, 정자세포, 정자양세포 및 정자를 포함하는 성세포와 세르톨리세포를 포함한 체세포의 형태학적 특성을 형광염색을 통해 조사하고, 이를 바탕으로 새로운 음성 성세포의 분류기준을 제안하였다.

한편, 제안된 분류기준을 각기 다른 일령의 생쥐로부터 회수한 성세포의 발생단계를 구분하는데 적용하여, 제안된 성세포의 형광염색 분류기준이 적정함을 검증하였다.

## 7. 통계분석

측정된 자료들은 dBSTAT for window 4.0(software, dBSTAT, 대한민국)을 이용 통계 분석하였는데, 각 처리에 대한 평균과 표준편차 및 처리 간 차이의 유의성은 일원분산분석(One-way ANOVA)을 이용 산출하였으며, 차이의 유의수준은  $P < 0.05$ 로 설정하였다.

## 결 과

### 1. 체외 발생 정자세포의 형광현미경 관찰

형광염색을 이용하여 정자발생시 각 단계별 성세포의 주요 특징을 조사하여 성세포를 용이하게 구분할 수 있는 분류기준을 도출하려고 시도하였던 바, 얻어진 결과는 다음과 같다.

정원세포(spermatogonium)는 구형으로 세포막의 윤곽이 뚜렷하였으며, 핵인이 진하게 형광으로 염색되었는데, 일부 정원세포에서는 다양한 모양을 나타내고 있었다(Fig. 1). 대부분 정원세포의 크기에 따라 핵의 크기에 차이가 있었고, 구형인 핵 속에 핵질보다 진하게 형광을 나타내는 반점의 수에 차이가 있었는데(Fig. 1, a'), 주로 2~3개 정도의 형광반점이 관찰

되었다(Fig. 1, b'과 c').

정자세포(spermatocytes)의 경우, 핵에는 구름모양의 형광이 있었으며, 이것보다 강한 형광을 나타내는 반점들이 다수 나타났고(Fig. 1, d'과 e'), 강한 형광반점이 전체 핵을 차지하는 경우도 관찰되었다(Fig. 1, f'). 감수분열 말기의 제1차 정자세포(primary spermatocyte)의 경우 두 set의 핵을 관찰할 수가 있었으나, 제2차 정자세포(secondary spermatocyte)는 짧은 분열과정으로 인해 형광 염색한 세포 중에서 거의 관찰할 수 없었다.

정자양세포(spermatid)의 경우, 원형 정자세포의 핵은 세포 중심으로부터 이동하여 세포막에 인접해 있고, 핵인은 핵 중심에 위치하여 있었는데, 역시 형광반점이 핵 중심에 위치해 있는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, g'). 또한 핵막에 인접한 침체과립이 있는 정자양세포도 관찰할 수 있었다. 그리고 핵인이 세포질에 인접된 정자양세포에서는 응축되고 신장된 핵의 형광을 관찰할 수 있었고(Fig. 1, h'), 곧고 짧은 꼬리를 지닌 정자양세포(Fig. 1, i')에서는 거의 정자에서만 볼 수 있는 핵의 형태를 지니고 있었으나, 꼬리부분에서는 형광을 관찰할 수 없었다.

정자(spermatozoon)에서는 정자양세포에 비해 길게 신장

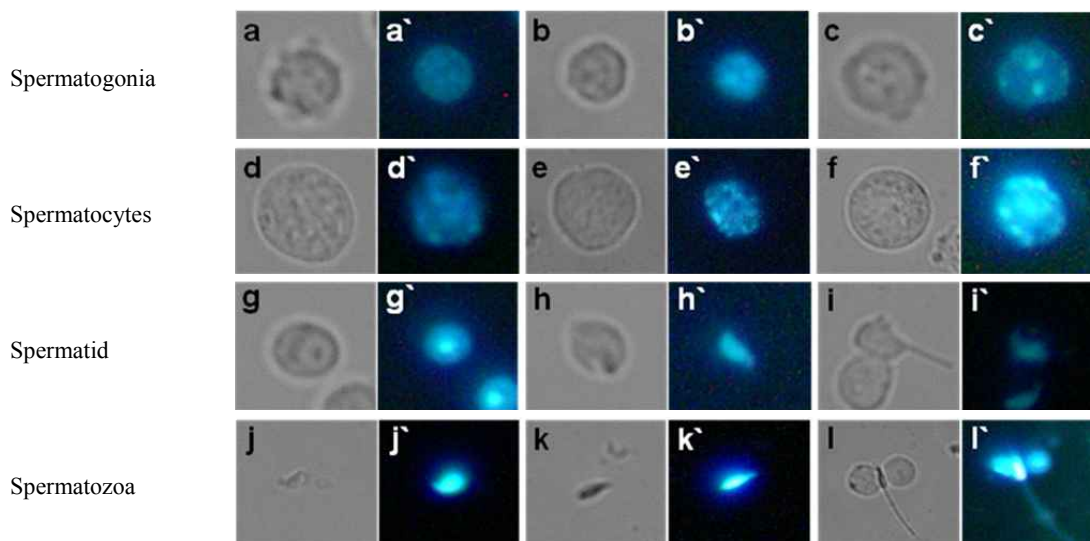


Fig. 1. The different types of testicular germ cells. The germ cells were stained with fluorochrome Hoechst 33258 and observed by biological and fluorescent microscope (400×). Spermatogonia (8~12 μm) showed a spherical and refractile appearance, two or three nucleoli eccentrically placed in the nucleus, and partly multiple nucleoli close to the nuclear membrane according to spermatogonium types in photos of a and a', b and b', c and c'. Spermatocytes (10~18 μm) had a granular appearance, a thin rim of cytoplasm, a large nucleus with fine strands of spiralizing chromatin or thick strands of bivalent chromosomes, and a prominent XY heterochromatic body adjacent to the nuclear envelope in photos of d and d', e and e', f and f'. Spermatids (7~10 μm) contained smaller nucleus with homogeneous chromatin and prominent central nucleolus in photos of g and g', h and h', i and i'. Some spermatids showed the eccentric and condensed nucleus and the acrosome that was covered over the nucleus and protruded from the body of the cell. Spermatozoa (5~7 μm) had elongated nucleus with condensing or fully condensed chromatin and flagella in photos of j and j', k and k', l and l'.

된 두부에 더욱 강한 형광반점이 나타났으며(Fig. 1, j'과 k'), 후기 정자양세포와 달리 미토콘드리아가 미부의 중편부에서도 뚜렷한 형광을 볼 수 있었다(Fig. 1, l').

형광염색을 통해 조사된 정자발생 단계별 형광특성 중에서 성세포의 단계별 분류기준으로 사용할 주요 특징을 정리하였으며, 결과는 Table 1과 같다.

즉, 정원세포로부터 발생한 정자세포는 상대적으로 더 큰 핵과 많은 형광반점을 가지고 있었으며, 이들보다 핵의 크기가 뚜렷이 작고 단일 형광반점을 가지고 있는 정자양세포의 경우, 핵이 거의 응축되어 있고, 상대적으로 강한 형광반점을 보여주는 정자와 구분할 수 있었으며, 특히 정자형태 형성이 거의 완료된 경우 정자의 경우 미부에서 형광이 나타났다.

## 2. 체외발생 성세포 분류지표의 검증

위에서 제시한 간편한 음성 성세포의 분류기준을 출생 후 6일령부터 성 성숙이 완성되는 35일령까지의 생쥐에서 회수한 정소세포의 발생단계 분류에 적용하였던바 얻어진 결과는 Table 2와 같다.

생쥐 정소에서 각 발생단계의 성세포 출현시기와 이후 변화를 살펴보면, 정원세포는 생후 8일령까지 유일한 성세포로

서 출생 후 8일까지 증가하다가 이후 35일까지 지속 감소하였다. 정자세포는 생후10일경 출현하여 이후 생후 28일까지 증가하다가 감소하였으며, 정자양세포는 생후 21일경에 출현한 다음 이후에 지속 증가하였고, 정자는 생후 35일경에 비로서 출현하였다. 세르톨리세포를 포함한 체세포의 비율은 출생 후 지속적으로 감소하였다. 출생 후 일령이 증가하면서 전체적으로 성세포 비율의 증가하였고, 기타 체세포 비율은 감소하였으며, 특히 춘기발동기가 시작되는 생후 21일경에 기타 세포 비율이 현저히 감소하였고, 성 성숙시기인 35일령에서는 더욱 감소하였다.

춘기발동기인 생후 21일령에는 정소세포 중에서 정자세포가 현저히 증가하였고, 정자양세포도 출현하였다. 이후 생후35일령에 정자양세포의 비율은 지속 증가하여 최고치에 도달하였으며, 이때 정자가 출현하는 것이 관찰되었다.

## 고 찰

음성 성세포의 발생단계 중 정자(spermatozoon)의 경우, 미부를 확인함으로써 구분할 수 있으나, 나머지 정원세포(spermatogonium), 정자세포(정모세포와 정낭세포; primary- & secon-

Table 1. Fluorescent characteristics of male mouse germ cells

Germ cells	Nucleus appearance of head			Fluorescence in tail
	Shape of fluorescence	Size of fluorescent matrix	No. of fluorescent patches	
Spermatogonia	Circle	Moderate	2~3 or more	no
Spermatocytes	Irregular circle	Large	Many	no
Spermatids	Round to head shape	Very small or small	1	no
Spermatozoa	Head shape*	Verysmall	1	yes

\* Head shape means the appearance of mouse specific sperm head.

Table 2. Percentages of germ cells in *in situ* testis of male mice

Cell types	Percentage <sup>1</sup> of each cell at postpartum days						
	6	8	10	14	21	28	35
Spermatogonia	14.8±2.0	22.4±4.2	22.0±4.8	13.0±3.0	13.0±2.1 <sup>z</sup>	8.8±3.4	5.1±1.0 <sup>z</sup>
Spermatocytes	-	-	7.4±3.6	9.6±3.0	21.5±4.1 <sup>y</sup>	24.8±6.1	18.2±4.3 <sup>y</sup>
Spermatids	-	-	-	-	7.8±3.9 <sup>z</sup>	35.8±5.4	43.1±4.3 <sup>x</sup>
spermatozoa	-	-	-	-	-	-	14.5±3.8 <sup>y</sup>
Others cells	85.2±2.0	77.6±4.2	70.6±7.0	77.4±3.4	58.5±3.9 <sup>x</sup>	30.6±5.5	19.1±1.8 <sup>y</sup>

<sup>1</sup> The percentages of testicular cells were subscribed as mean±S.D.

Superscripts, x,y, and z, mean significant differences among percentages of testicular cell types in the same ppd ( $p < 0.05$ ).

dary-spermatocytes) 및 정자양세포를 현미경을 이용, 육안으로 구분하는 것은 매우 숙련된 기술을 필요로 한다. 일반적으로 핵과 세포질의 특징을 활용하여 각 단계별 생식세포를 형태학적으로 구분할 수 있으나, 체외발생 실험에서 세포에 악영향 없이 짧은 시간 내에 세포단계를 구분하는 방법이 소개된 바 없다.

형광염색을 이용해 세포의 단계를 구분하려고 시도한 본 연구에서 성세포가 분화 발생하는 동안 핵의 수와 모양에서 다양한 형태를 관찰할 수 있었다. 즉, 정자발생 과정에서 핵의 형태와 핵인의 수에서 변화가 일어났는데, de França 등(1995)은 정자발생 동안에 일어나는 핵을 포함한 세부구조의 변화를 특성화하면서 이들은 기능의 변화와 관련이 있다고 보고한 바 있다.

정자발생동안 일어나는 핵에서 일어나는 형태적 변화를 다양한 방법으로 추정할 수 있다. 예로서, 정원세포로부터 발생하는 동안 발현되는 mRNA 또는 단백질을 조사하여 성세포의 특정 단계를 규정하거나(Drabent 등, 1996; Singer-Sam 등, 1990), nucleolus organizer regions(NORs) 특이 Ag 염색방법을 통해 발생단계를 추정할 수 있다(Schmid 등, 1983). 또한, 핵의 변화를 이중나선구조의 특정부위와 결합하는 형광염색을 이용해 구분할 수 있는데, 예로서, 웅성 성세포를 염색하기 위해 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)를 이용 면역형광염색(Yang 등, 2014)을 하거나 또는 성세포의 분화발생 동안 염색사의 구조를 밝히기 위해 DNA 또는 RNA fluorescence *in situ* hybridization 방법이 제안(Namekawa, 2014)되고 있다. 하지만 이들은 모두 표본을 슬라이드로 제작하여 분석하기 때문에 살아 있는 세포에 적용할 수 없다.

본 연구는 살아있는 세포막을 통과하기 어려운 DAPI를 대신해서 핵산을 염색하기 위해 Hoechst 33258 이용 성세포의 발생 정도를 평가하기 위한 방법을 개발하고자 시도하였고, 결과로 웅성 성세포 간편 분류지표를 제시하였다. 이를 생체 내 정자의 발생과정에 적용하여 적정성을 조사하였던 바, 생쥐의 생후 일령과 정자발생의 시기는 깊은 상관관계가 있다는 것을 밝힐 수 있었다.

예로서, 출생 후 생쥐의 일령이 증가하면서 정원세포와 정자세포의 수는 증가하는 반면, Sertoli 세포를 포함하는 기타 세포의 비율이 점차 감소하였으며, 특히 초기발동기가 개시되는 3주령부터 기타 세포의 비율이 현저히 감소하였다. 이는 출생 이후 정원줄기세포의 자가재생과 정자세포로의 지속적인 분화발생 및 Sertoli세포의 안정화에 기인한 결과로 사료된다. 한편, 출생 후 5일령에 정원세포가 A형에서 B형으로 분화 발생하고, 생후 8일령부터 정자세포로 분화하기 시작한다는 Drumond 등(2011)의 연구를 고려하면, 생후 10일령 생쥐에서 정자세포가 처음 관찰되었다는 본 연구에서의 결과는 적절한

것으로 사료된다. 또한 성 성숙을 유발하는 성선자극호르몬과 성선호르몬이 정자의 발생과 밀접한 관계가 있다는 McLachlan (2000)의 연구결과를 고려할 때, 성 성숙기에 도달하는 35일령에 정자가 출현하였다는 본 연구의 결과 또한 유의한 것으로 사료된다.

한편, 성세포를 제외한 기타 정소세포의 경우, 생후 35일령까지의 검증기간 동안 유의하게 감소하였으나, 생후 10일령에 비해 14일령에 오히려 증가한 것은 초기발동기 직전에 예상되는 정소의 급격한 성장과 관련이 있을 것으로 추론된다. 즉, 생후 14일령에 예상되는 급격하게 증가하는 체성장과 더불어 정소가 성장하는데, 이때 정소의 모든 세포가 증식하게 된다. 한편, 이 시기는 초기발동기 직전으로 성선자극호르몬이 감소하는데, 이 호르몬의 감소는 성세포의 분화 발생에 필요한 자극의 감소를 의미한다. 즉, 성장하는 정소에서 기타 세포의 수적 증가에 비해 정원세포와 정자세포 즉 성세포의 수적 증가가 상대적으로 크지 않았으며, 따라서 10일령에 비해 14일령에는 기타 세포의 백분율이 증가한 것으로 사료된다.

결론적으로 본 연구에서 제시한 형광염색을 이용한 성세포의 분류 방법은 발생 중인 성세포의 발생단계를 규정하는데 있어서 간단하면서 적정하며 효율적인 것으로 사료된다.

## 결론

체외에서 정원세포의 분화발생을 유도하기 위한 연구에서는 체외에서 배양되는 세포의 손상을 줄이고, 배양을 지속하기 위해 간단하고 빠르며 적절한 성세포의 발생단계별 분류 방법이 요구된다.

본 연구에서 살아 있는 세포에서도 사용 가능한 Hoechst 33258 이용 형광염색을 실시하고, 발생단계별 성세포의 형태적 및 구조적 특징을 조사하였다, 형광 특성에 따라 성세포를 분류하는 기준을 설정하고, 이러한 분류기준이 웅성 생쥐의 정소세포의 분류에 효율적이고 적절한 지를 조사하였던바 얻어진 결과는 다음과 같다.

1. 정원세포는 핵의 크기와 모양 및 핵 내 형광반점의 수에 있어서 정자세포와 구분할 수 있었으며, 이들보다 핵이 크기가 매우 작은 정자양세포는 핵의 용적과 모양 및 꼬리의 형광 유무에 있어서 정자와 차이가 있었다.
2. 이러한 형광염색의 특징을 고려해서 성세포의 분류기준을 설정하고, 웅성 생쥐의 정소세포를 대상으로 이 기준의 효율성과 적정성을 검증하였을 때 유의한 결과를 얻었다. 한편, 출생 후 초기발동기 및 성 성숙기에서 웅성 성세포의 분화와 발생이 급격히 이루어지는 것을 관찰할 수 있었다.

결론적으로, 본 연구에서 제시한 Hoechst 33258 형광염색

을 이용한 성세포 분류기준은 정자발생 연구를 위해 간단하면서 신뢰할 수 있는 것으로 사료된다.

## REFERENCES

- de França LR, Ye SJ, Ying L, Sandberg M and Russell LD. 1995. Morphometry of rat germ cells during spermatogenesis. *Anat. Rec.* 241(2):181-204.
- Drabent B, Bode C, Bramlage B and Doenecke D. 1996. Expression of the mouse testicular histone gene H1t during spermatogenesis. *Histochem. Cell Biol.* 106(2):247-51.
- Drumond AL, Meistrich ML and Chiarini-Garcia H. 2011. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: A high-resolution light microscopy approach. *Reproduction.* 142(1):145-55.
- Feng LX, Chen Y, Dettin L, Reijo Pera RA, Herr JC and Goldberg E. 2002. Generation and *in vitro* differentiation of a spermatogonial cell line. *J. Science.* 297(5580):392-5.
- Guan K, Wolf F, Becker A, Engel W, Nayernia K and Hasenfuss G. 2009. Isolation and cultivation of stem cells from adult mouse testes. *Nat. Protoc.* 4(2):143-54.
- Latt SA, Stetten G, Juergens LA, Willard HF and Scher CD. 1975. Recent developments in the detection of deoxyribonucleic acid synthesis by 33258 Hoechst fluorescence. *J. Histochem. Cytochem.* 23 (7):493-505.
- Lee DR, Kaproth MT and Parks JE. 2001. *In vitro* production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *J. Biol. Reprod.* 65(3):873-8.
- Marh J, Tres LL, Yamazaki Y, Yanagimachi R and Kierszenbaum AL. 2003. Mouse round spermatids developed *in vitro* from preexisting spermatocytes can produce normal offspring by nuclear injection into *in vivo*-developed mature oocytes. *J. Biol. Reprod.* 69(1):169-76
- McLachlan RI. 2000. The endocrine control of spermatogenesis. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 14(3):345-362.
- Namekawa SH. 2014. Slide preparation method to preserve three-dimensional chromatin architecture of testicular germ cells. *J. Vis. Exp.* 10;(83):e50819.
- Portugal J and Waring MJ. 1988. Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study. *Biochimica. et Biophysica. Acta.* 949 (2):158-168.
- Schmid M, Müller H, Stasch S and Engel W. 1983. Silver staining of nucleolus organizer regions during human spermatogenesis. *Hum. Genet.* 64(4):363-70.
- Singer-Sam J, Robinson MO, Bellvé AR, Simon MI and Riggs AD. 1990. Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase, and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. *Nucleic Acids Res.* 18(5):1255-9.
- Somfai T, Bodó S, Nagy S, Gócsa E, Iváncsics J and Kovács A. 2002. Simultaneous evaluation of viability and acrosome integrity of mouse spermatozoa using light microscopy. *Biotech. Histochem.* 77(3):117-20.
- Yang M, Zuo X, Li Y, Huang L and Xing X. 2014. A fast method for preparing the mouse germ cell slides. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi.* 30(2):202-5.

---

Received May 7, 2015, Revised May 27, 2015, Accepted September 30, 2015