**English version below**

**Informationen zur Kryokonservierung von Mausspermatozoen und Mausembryonen**

● Bitte verwenden Sie bei Aufträgen zur Kryokonservierung und für den Schriftverkehr **grundsätzlich** die E-Mail-Adresse cryopreservation-service@dkfz-heidelberg.de

● Prüfen Sie anhand der Regularien, ob Sperma oder Embryonen kryokonserviert werden sollen

● Füllen Sie bei einem Auftrag zur Kryokonservierung das entsprechende [Formular](https://intranet.dkfz-heidelberg.de/Deutsch/wiss-services/core_facilities/biotechniken/download/Seiten/default.aspx) aus und senden Sie es als E-Mail Anhang an die oben genannte Adresse

● **Bitte markieren Sie alle Mäuse, die zur Kryokonservierung reserviert werden sollen, in MoVi im Kommentarfeld mit dem Text < freeze sperm > bzw. < freeze embryos >**

● **Stellen Sie zusätzlich einen Task Request „freeze sperm“ bzw. „freeze embryos“ für diese Tiere an den zuständigen Haltungsbereich**

● **Der Transgen-Service bucht alle Mäuse, die zur Kryokonservierung verwendet werden auf das MoVi Master Protokoll/Permit „Cryo-Mouse“**

● Der Zeitbedarf für die Kryokonservierung liegt zwischen einem Tag bei Spermfreezing und mehreren Wochen bei Embryofreezing

● Vorzugsweise Kryokonservierung von Spermien
Aus Tierschutzgründen ist vorzugsweise die Kryokonservierung von Spermien durchzuführen, weil der Tierbedarf hierfür nur bei vier fertilen Männchen pro Linie liegt.
Tierbedarf: 4 fertile Männchen im Alter von 12-26 Wochen; falls vorhanden, können die Nutzer Männchen auswählen, die schon im Rahmen der allgemeinen Zucht in Verwendung waren. Es ist zu berücksichtigen, dass die Re-Vitalisierung von Spermien in der Regel durch eine In-Vitro-Fertilisation mit Wildtyp-Oozyten erfolgt. Dies kann bei komplexen Genotypen (Mehrfachmutanten, Homozygotie der Mutationen) zu Problemen führen, weil der ursprüngliche Genotyp der asservierten Mauslinie durch die IVF verloren geht und nur durch umfangreiche Zucht wiederhergestellt werden kann. In diesen Fällen bitte Embryonen einfrieren lassen und eine entsprechende Begründung auf dem Formular für Embryofreezing angeben.

● Embryonenfreezing nur zur Kryokonservierung komplexer Genotypen
Eine Kryokonservierung von Mauslinien durch Embryonenfreezing darf nur bei komplexen Genotypen (Mehrfachmutanten, Homozygotie der Mutationen) erfolgen. Hierzu werden Embryonen eingefroren, die aus Verpaarungen innerhalb derselben Mauslinie (Incrossing) stammen.
Tierbedarf: 10 fertile Männchen im Alter von 12-26 Wochen und 20 - 40 Weibchen im Alter von 5-10 Wochen; die Zucht der Weibchen für die Kryokonservierung darf erst nach Rücksprache mit der Kryokonservierungs-Unit erfolgen. Um unnötige Zuchtüberschüsse zu vermeiden, werden zunächst Embryonen aus 20 Eispenderinnen eingefroren. Je nach Anzahl wird dann entschieden, wie weitergezüchtet werden soll.

● Nach Abschluss des Embryonenfreezings wird als zusätzliches Backup Sperma aus zwei übrigen Männchen eingefroren, falls die Auftraggeber:innen nicht widersprechen

● Der Transgen-Service führt Qualitätskontrollen des eingefrorenen Materials durch.

Spermfreezing: Bestimmung der Anzahl beweglicher Spermatozoen in aufgetautem Sperma.
**Der/die Auftraggeber:in erhält Mausschwanzbiopsien der beiden Spermaspender, führt eine Genotypisierung durch und teilt dem Transgen-Service das Ergebnis zur Dokumentation mit.**
Embryofreezing: Auftauen eingefrorener Embryonen, Kultur bis zum Morula-/Blastozystenstadium.
**Der/die Auftraggeber:in erhält die kultivierten Embryonen und unter Umständen die eingefrorenen Eileiter der Spenderweibchen, führt eine Genotypisierung durch und teilt dem Transgen-Service das Ergebnis zur Dokumentation mit**

● Nach Abschluss des Auftrages erhält der/die Auftraggeber:in eine Projektdokumentation (PDF-Dokument)

● Nach Abschluss des Auftrages können die **nicht** für die Kryokonservierung genutzten Tiere wieder frei verwendet werden.

● Für den/die Auftraggeber:in entstehen aktuell keine Kosten mit Ausnahme der Haltungskosten der verwendeten Tiere

● Die AG Transgen Service dokumentiert die Projektdaten in einer Datenbank

**Information about the cryopreservation of mouse spermatozoa and embryos**

● Please use the following e-mail address cryopreservation-service@dkfz-heidelberg.de **for any orders and correspondence** concerning the cryopreservation of mouse spermatozoa and embryos

● Carefully check the prerequisites for the cryopreservation of mouse embryos or sperm

● Use the “cryopreservation” [**order form**](https://intranet.dkfz-heidelberg.de/English/wiss-services/core_facilities/biotechniken/download/Pages/default.aspx) for the cryopreservation of mouse spermatozoa and embryos. Please send the filled in form as attachment to the e-mail address listed above

● **Please mark all mice to be reserved for cryopreservation in MoVi in the comments field
with < freeze sperm >**

● **Additionally, send a „freeze sperm“ task request for these animals to the appropriate animal barrier**

● **The Transgenic Service will book all mice that are used for cryopreservation onto the MoVi Master Protocol/Permit “Cryo-Mouse”**

● The cryopreservation procedure will take one day for sperm freezing and several weeks for embryo freezing

● Cryopreservation of spermatozoa is the method of preference

The Animal Welfare Act describes the obligation to reduce the amount of animals for science as much as possible. It is therefore preferable to cryopreserve spermatozoa. For this procedure, the animal requirement is four fertile males per mouse line.

Requirement: Four fertile males, 12 – 26 weeks of age, if available, users can select males that have already been in use as part of general breeding. Please be aware that an In-Vitro-Fertilization (IVF) is done with wild-type oocytes to revitalize the spermatozoa. This could cause problems in case of multiple mutations or homozygosity. The original genotype of the mouse line will be lost after IVF, and can be recovered by extensive breeding only. Please provide us with a compelling reason for embryo freezing, instead of sperm freezing, on the order form.

● Embryo freezing for cryopreservation of mouse lines with multiple mutations

Cryopreservation of embryos from mouse lines is only allowed for complex genotypes (e.g. lines with multiple mutations, homozygous mutations). In this case, embryos from matings between mutant males and mutant females (incrossing) will be used

Requirement: 10 fertile males (12 – 26 weeks of age) and 20 – 40 females (5 – 10 weeks of age)

Matings for the purpose of cryopreservation can be set up only after consultation with the Transgenic Service. To avoid mating surpluses embryos will be isolated from 20 donor females. Depending on the amount of frozen embryos, a decision about additional matings will be made to obtain extra donor females.

After embryo freezing is completed, two remaining males will be used for sperm cryopreservation as an additional backup, unless the customer/scientist objects to this procedure.

● Quality controls will be done for all material frozen by the Transgenic Service

Sperm freezing: Analysis of the amount of motile spermatozoa after thawing

**The customer/scientist receives tail biopsies of the two male mice used for sperm freezing. After genotyping by the scientist, the information is forwarded to the Transgenic Service for documentation**

Embryo-freezing: thawing of frozen embryos followed by development into the morula/blastocyst stage by incubation at 37°C

**The customer/scientist receives cultured embryos and, in certain circumstances, the frozen oviducts of the donor females. After genotyping by the scientist, the information is forwarded to the Transgenic Service for documentation**

● After finishing the assignment the customer/scientist will receive the final documentation (PDF-file)

● After finishing the assignment all non-used animals reserved for cryopreservation can freely be used for other purposes

● The service is currently free of charge except for the husbandry costs of the animals used for cryopreservation

● All data will be documented in a database by the Transgenic Service