

「ブタ体外受精卵生産用培養基本キット」 使用説明書

製品番号 IFP100PEP-BK

株式会社 機能性ペプチド研究所

<キット内容>

- 1) ブタ卵子・胚回収液:POE-CM(IFP1040P), 100 ml×3 本
- 2) ブタ卵子成熟用基本培地:POM(IFP1010P), 25 ml×2 本
- 3) ブタ媒精液:PFM(IFP1020P), 100 ml×1 本
- 4) ブタ培養胚発生用培地:PZM-5(IFP0410P), 25 ml×1 本
- 5) dbcAMP 濃縮液(100 倍液):dbcAMP-100×(IFP1060P), 0.3 ml×1 本
- 6) リプロプレート(IFP 9670), 10 枚×3 パック

<その他必要器材>

- 1) PBS(-)または滅菌生理食塩水(0.9%)
- 2) ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG): エール薬品、ピーメックス(1,000 IU)
- 3) ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG): エール薬品、プベローゲン(5,000 IU)
- 4) 流動パラフィン: メルク(107162)
- 5) パーコール: GE ヘルスケア バイオサイエンス(17-0891-02)
- 6) 媒精用精液希釈液(5 倍液):SEM-5×(IFP1050P; 機能性ペプチド研)
- 7) 培養ディッシュ
 - ・ 35 mm 培養ディッシュ: greiner bio-one(627160)
 - ・ ペトリディッシュ: FALCON(1112)
- 8) 遠心管(15 ml, 50 ml)
- 9) ディスポーザブルシリンジ(10 ml)
- 10) 注射針(18G)
- 11) ピペット
- 12) ガラスキャピラリーピペット
- 13) 吸引チューブ
- 14) ストローカッター
- 15) トーマ血球計算盤
- 16) 実体顕微鏡
- 17) マルチガスインキュベーター
- 18) クリーンベンチ
- 19) 遠心機
- 20) 恒温槽
- 21) マイクロウォームプレート
- 22) ボルテックスミキサー
- 23) その他

<試薬の調製法>

☆ 性腺刺激ホルモンストック液(eCG, hCG 各 1,000 IU/ml)の調製(100×)

1) 2,000 IU/ml eCG

eCG(1,000 IU/管)を1管あたり0.5 mlのPOM培地で溶解する。

2) 2,000 IU/ml hCG

hCG(5,000 IU/管)を1管あたり2.5 mlのPOM培地で溶解する。

3) eCG, hCG(各 1,000 IU/ml)

2,000 IU/ml eCGと2,000 IU/ml hCGを等量混合し、70 µlずつ分注して、-30°Cで保存する。

☆ 媒精用精液希釈液(5倍液): SEM-5×*

組成	SEM-5×
Glucose	137.50 g/L
Na-citrate·2H ₂ O	34.50 g/L
Citric acid·H ₂ O	14.50 g/L
NaHCO ₃	5.00 g/L
EDTA·2Na·2H ₂ O	11.75 g/L
Tris (TRIZMA BASE)	28.25 g/L
Gentamicin	0.05 g/L

0.22 µm フィルターで濾過滅菌後、分注して、-30°Cで保存する。

* 当社の別売製品(IFP1050P)は滅菌済みですので、すぐご利用になれます。

☆ 等張パーコール液

組成	80%パーコール液	50%パーコール液
パーコール	1.6 ml	1 ml
ミリQ水	-	0.6 ml
SEM-5×	0.4 ml	0.4 ml

要時調製。

<培地の調製>

☆ ブタ卵子成熟用基本培地(POM)の調製

- ・ 1st POM 培地: POM+1 mM dbcAMP+10 IU/ml eCG+10 IU/ml hCG

1st POM 培地(要時調製)

- 1) POM 培地 4.95 ml に dbcAMP 濃縮液(100 倍液)50 μ l を添加して 1 mM dbcAMP 溶液を調製する(全量 5 ml)。
- 2) 1) で調製した 1 mM dbcAMP 溶液から 50 μ l を除去する(全量 4.95 ml)。
- 3) 2) で調製した 1 mM dbcAMP 溶液 4.95 ml に性腺刺激ホルモンストック液 50 μ l を添加する(1st POM 培地)。

- ① 卵子洗浄用: 1st POM(200 μ l) + ミネラルオイル(約 100 μ l)
- ② 成熟培養用: 1st POM(150 μ l) + ミネラルオイル(約 150 μ l)

- ・ 2nd POM 培地: POM 培地(基本培地)

- ③ 卵子洗浄用: POM(200 μ l) + ミネラルオイル(約 100 μ l)
- ④ 成熟培養用: POM(150 μ l) + ミネラルオイル(約 150 μ l)

☆ ブタ媒精液(PFM)の調製

- ⑤ 卵子洗浄用: PFM(200 μ l) + ミネラルオイル(約 100 μ l)
- ⑥ 媒精用: PFM(50 μ l) + ミネラルオイル(約 200 μ l)

☆ ブタ培養胚発生用培地(PZM-5)の調製

- ⑦ 胚洗浄用: PZM-5(200 μ l) + ミネラルオイル(約 100 μ l)
- ⑧ 胚発生培養用: PZM-5(50 μ l) + ミネラルオイル(約 200 μ l)

※ 必要数のドロップをリプロプレートに作成し、あらかじめインキュベーター内(39°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)で気相平衡しておく。

<ブタ胚の体外生産法>

1. 卵子の採取と成熟培養法

- 1) 屠場で採取したブタ卵巣を室温(約 25°C)の PBS(-)または滅菌生理食塩水で数回洗浄し、直径 3~6 mm の卵胞から卵子を吸引採取する。
- 2) 吸引した卵子を含む卵胞液は、遠心管中に集めて 20 分間静置する。
- 3) 上清を取り除き、室温に戻した POE-CM 培地で沈査を希釈してペトリディッシュに分注し、実体顕微鏡下で卵丘細胞が 2~3 層以上付着した卵子を回収・選抜する(写真 1)。
- 4) 選抜した卵子は、リプロプレートに調製しておいた 1st POM 培地(①)で 2 回洗浄し、培養用の 1st POM 培地(②)に 1 ドロップあたり 15~20 個ずつ入れて 20~22 時間成熟培養する。
- 5) 成熟培養開始 20~22 時間後、リプロプレートに調製しておいた 2nd POM 培地(③)で卵子を 3 回洗浄し、成熟培養用 2nd POM 培地のドロップ(④)に移してさらに 22~24 時間成熟培養する。

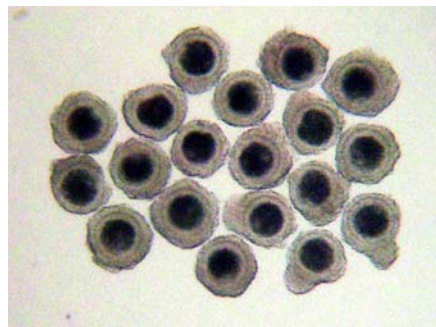


写真 1: 回収直後の卵丘-卵子複合体

2. 精子の処理と体外受精法

- 1) PFM 培地(約 20 ml)、80%および 50%等張パーコール液を 38°Cの恒温槽で保温する。
- 2) 凍結精液*1 のストローを 38°Cの温水で融解し、50%パーコール液中に懸濁する。
- 3) 懸濁した精液は 80%パーコール液の上に静かに重層し、遠心機で 700×g、20 分間遠心する(35°Cまたは室温でも可)。
- 4) 下部の精子を残して上清をアスピレーターで除去した後、約 7 ml の PFM 培地を加えて軽く転倒混和し、遠心機で 500×g、5 分間遠心する。
- 5) 4)を繰り返す。
- 6) 上清を除去し、約 0.5~1 ml の PFM 培地を加えて懸濁後、血球計算盤等で精子数を計測する。
- 7) 精子濃度が 2~20×10⁶/ml*2 になるように PFM 培地で希釈する。

- 8) リプロプレートに調製し、気相平衡しておいた PFM 培地のドロップ(⑥)に、濃度調整した精子懸濁液を 50 μ l ずつ加える(最終精子濃度 $1\sim 10\times 10^6/\text{ml}^{*2}$)。
- 9) 体外成熟後の卵子は、リプロプレートに調製しておいた PFM 培地(⑤)で 2 回洗浄後、精子を含むドロップに 15~20 個ずつ導入し、10~20 時間^{*2} 媒精する。

*1 液状精液を使用する場合の精子の調整法については、弊社までお問い合わせください。

*2 精子によって受精に至適な精子濃度および媒精時間は異なります。予備試験を行い、適切な条件を確認してください。

3. 胚の体外発生培養法

- 1) 媒精後の胚は、38°Cに保温した POE-CM 培地で 1 回洗浄した後、POE-CM 培地(1 ml)の入った 15 ml 遠心管に移し、ボルテックスミキサーで 4 分間攪拌混合することにより卵丘細胞を除去する。
- 2) 遠心管から裸化胚(写真 2)を回収する。卵丘細胞が強固に付着している胚や細胞質が変性した胚は取り除く。
- 3) 選抜した胚は、POE-CM 培地で 2 回洗浄後、リプロプレートに調製しておいた PZM-5 培地(⑦)で 2 回洗浄する。
- 4) リプロプレートに調製しておいた PZM-5 培地のドロップ(⑧)に胚を 20~30 個ずつ入れて培養すると、媒精後 5~6 日で胚盤胞へ発育する(写真 3)。

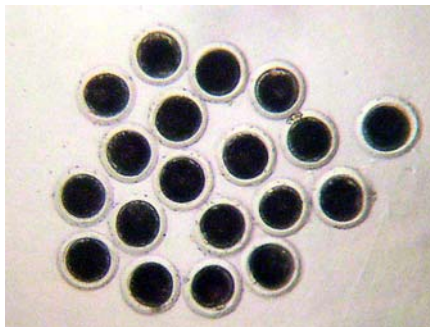


写真 2: 裸化後の胚

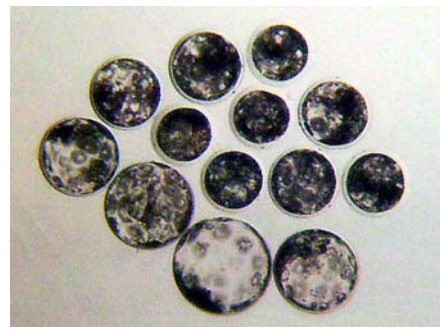
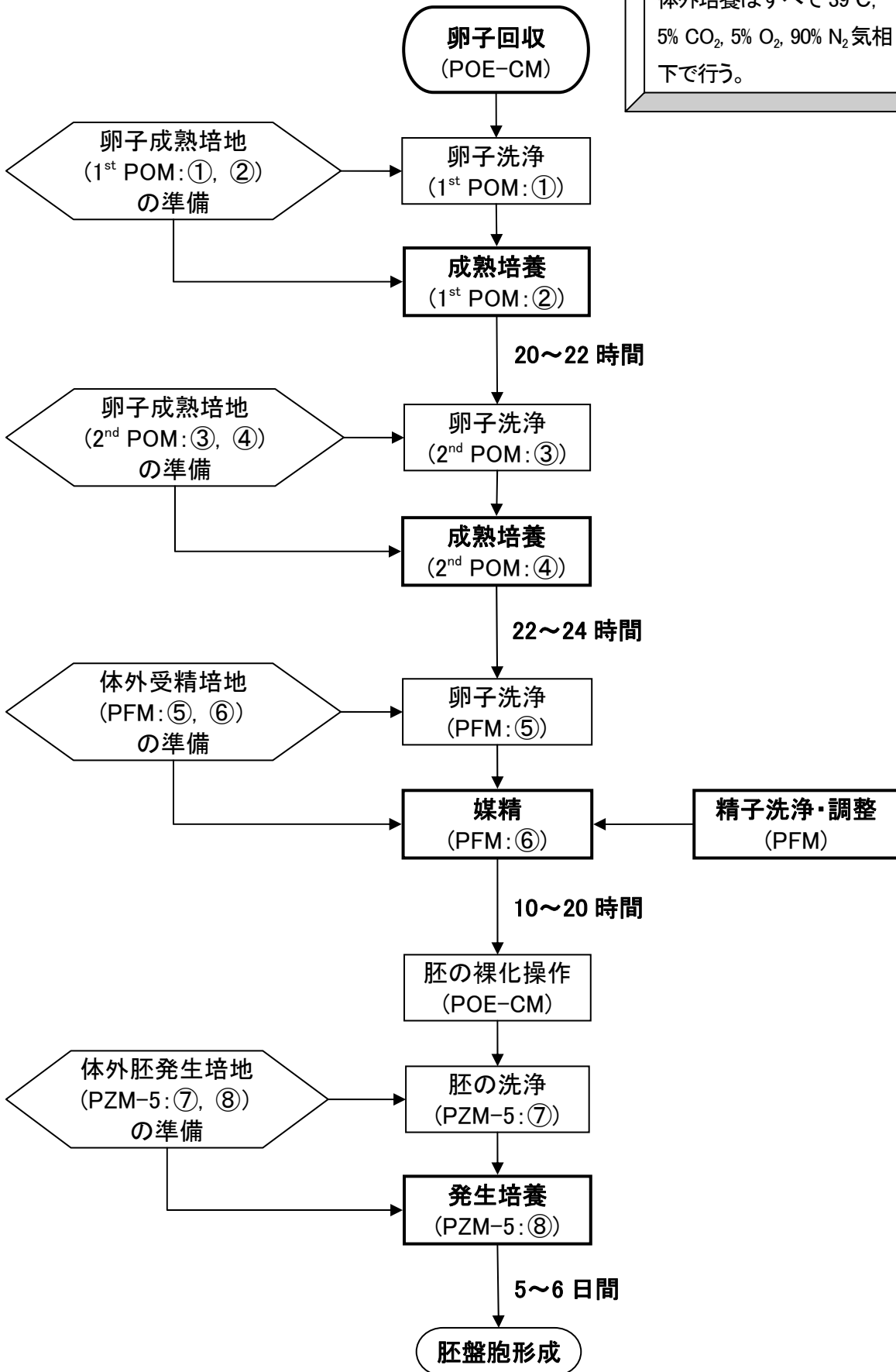


写真 3: 胚盤胞

<ブタ体外生産胚の作製工程>

体外培養はすべて 39°C,
5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 気相
下で行う。



＜培地使用上の注意＞

1. 培地はブタ卵子又は胚の体外培養専用です。他の動物では試験を行っておりません。
2. ヒト体外受精には絶対に使用しないでください。
3. 注射薬又は診断薬ではありません。
4. 凍結厳禁。4℃保存。
5. 有効期間は製造後 4 ヶ月間。使用期限厳守。
6. 万一、製造過程での不備がありました場合には、代替品とお取替え致します。それ以外の責はご容赦お願い致します。
7. 本品の使用により、必ずしも一定以上の胚発生率を保障するものではありません。

＜参考文献＞

1. 曾根勝, 知久幹夫, 吉田光敏, 番場公雄, 小笠晃. 各種希釈保存液を用いた豚液状精液の長期保存試験. 日豚会誌 1992; 29: 41-50.
2. Mito T, Yoshioka K, Nagano M, Suzuki C, Yamashita S, Hoshi H. Transforming growth factor- α in a defined medium during in vitro maturation of porcine oocytes improves their developmental competence and intracellular ultrastructure. *Theriogenology* 2009; 72: 841-850.
3. Suzuki C, Yoshioka K. Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 789-795.
4. Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, Takahashi M. Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and in vitro development of porcine preimplantation embryos. *Zygote* 2007; 15: 317-324.
5. Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 60: 112-119.
6. Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. *Biol Reprod* 2003; 69: 2092-2099.
7. Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J Reprod Dev* 2008; 54: 208-213.

製品ならびに培養操作等に関する問い合わせは、電話・FAX・E-mail で下記宛にお願い致します。

(株)機能性ペプチド研究所

〒999-3766 山形県東根市神町西4丁目5-1

TEL: 0237-53-1488

FAX: 0237-47-1477

E-mail: service@func-p.co.jp