

「エンブリオバック」非共培養を 用いた牛体外受精胚の作成

裸化受精卵無血清培養法
(低酸素培養)
Ver. 1.2

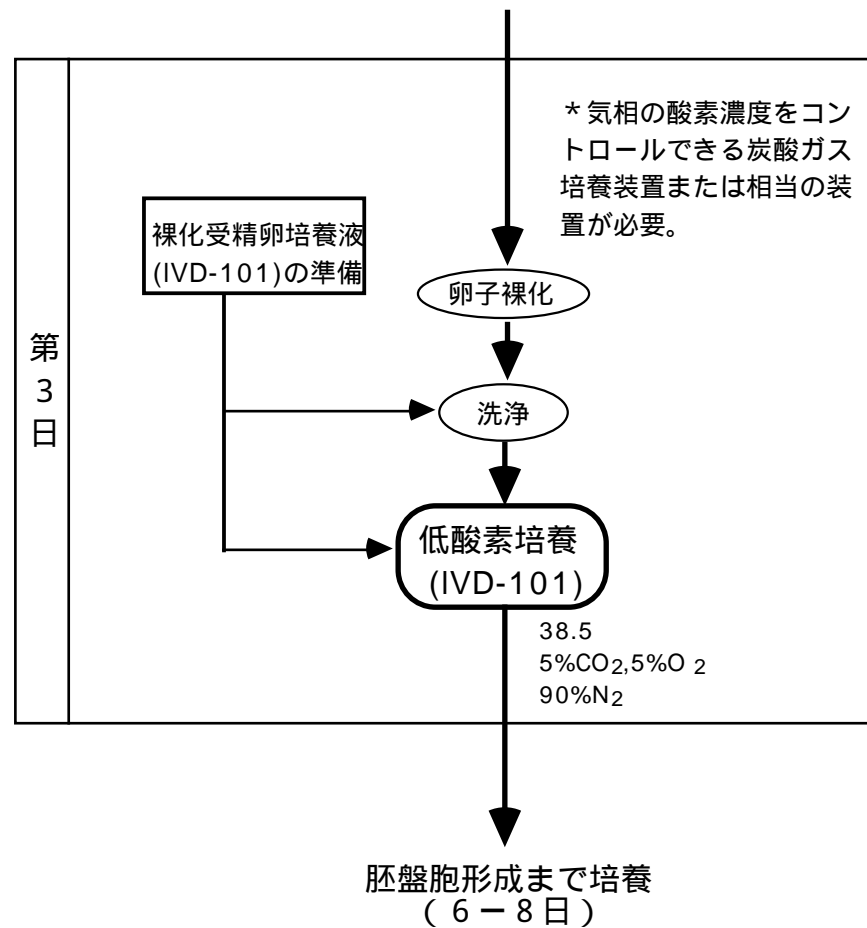
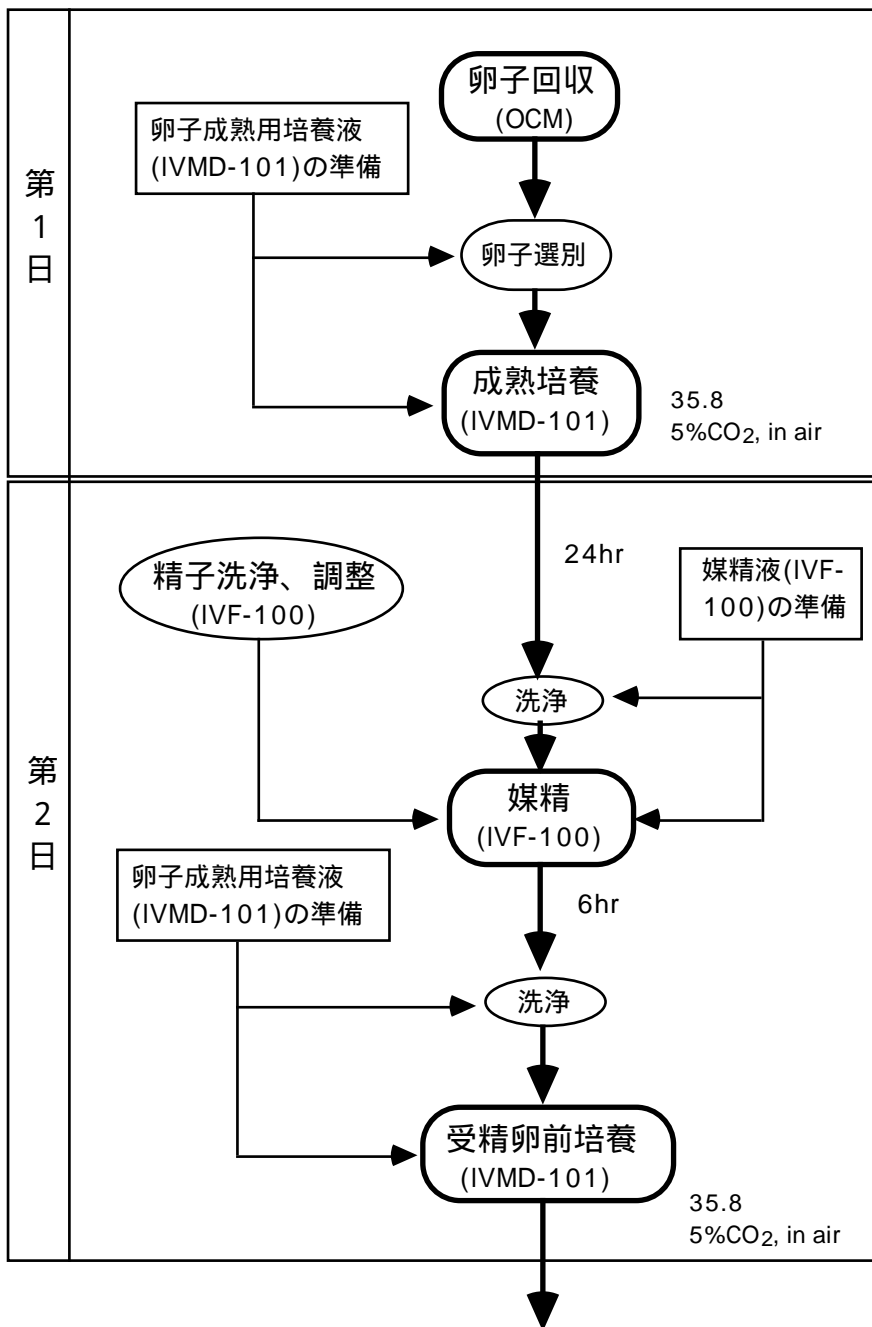
1997年12月1日

本プロトコールは「(株)機能性ペプチド研究所」で作製されたものです。無断複写、転載を禁止します。

編集、発行者 (株)機能性ペプチド研究所

山形市下条町4丁目3-3 2
〒 990-0823
TEL 023-646-2525

IFP
株式会社機能性ペプチド研究所



必要器材

- 1) 「エンブリオパック」非共培養基本セット
(製品番号、IFP3456K)
卵子成熟、共培養用培養液 (IVMD-101)
媒精液 (IVF-100)、タイプIコラーゲン液
または「エンブリオパック」非共培養完全セット
(製品番号、IFP3456C)
タイプIコラーゲン液に代わって
リプロC-1プレートが入っています。
- 2) 卵子回収液 (OCM) (製品番号: IFP9611)
- 3) 滅菌生理食塩水 / 1~2リットル
- 4) 70%消毒用アルコール / 500ml
- 5) 酒精綿
- 6) ディスポーザブル注射器及び注射針
- 7) 替え刃メス (フェザー No.20)
- 8) 採卵用プラスチックシャーレ (ファルコン1012)
- 9) 篩い (500 μ m, ステンレス製、)
- 10) 組織培養用プラスチックシャーレ (住友ベークライト製浮遊培養用、
カタログNo. MS-1160R)
または、リプロC-1プレート ((株)機能性ペプチド研究所、IFP967C)
- 11) 15ml滅菌試験管 (スピッツ型、ポリプロピレン製)
- 12) 培養試験済みミネラルオイル (パラフィンオイル)
- 13) 実体顕微鏡
- 14) 炭酸ガスインキュベータ
- 15) O₂ / CO₂ インキュベータ (酸素濃度制御可能な培養装置)
- 16) 恒温水槽
- 17) 滅菌ピーカー
- 18) その他

裸化受精卵無血清培養法操作説明 (低酸素培養法)

第一日

(1) 卵子回収

- ・屠場で採取した卵巣を、約38.5℃で保温した滅菌生理食塩水で洗浄し、ハサミで子宮間膜に接着していた部分から縦半分に分けて切り、余分な組織や血管、黄体を取り除き、約38.5℃に保温した滅菌生理食塩水中に保存する。
- ・全ての卵巣を切開後、殺菌のため1分以内で70%エタノール洗浄し、エタノールを捨て、保温した滅菌生理食塩水でただちにエタノールを洗い流す。
- ・切開法あるいは吸引法等で卵子を卵子回収液 (OCM) に採卵する。
- ・採取された卵子卵液等の混合物を適量の卵子回収液 (OCM) で希釈し、プラスチックシャーレ (FALCON 1012) に約10mlづつ分け入れ、実体顕微鏡下で観察し、卵丘細胞が膨潤せずに5層以上ついている卵子を回収する。

注意:

屠殺牛卵巣卵子を用いる場合、卵巣は屠殺直後から酸素欠乏状態に陥ります。そのため時間の経過と共に多量の乳酸が組織内に蓄積し、卵子や顆粒層細胞にさまざまな傷害が引き起こされることが考えられます。このような酸素欠乏による組織への悪影響をできるだけ少なくすることが体外受精を成功させるための大事なポイントになります。 卵巣運搬時の温度を15~20度 に設定し、卵子採取開始までの時間を屠殺後3時間以内 に設定することをお奨めします。

(2) 成熟培養液 (IVMD-101) の準備

- ・事前に成熟培養 (IVMD-101) バイアルから滅菌ディスポーザブル注射器で培地を抜き取り、350 μ lの培養液ドロップをシャーレ (住友ベークライト MS-1160R、直径60mm) 1枚当たり7個作り、5%炭酸ガスインキュベータ内でガス平衡する。

(培養液ドロップの作り方： 50 μ lの培養液をシャーレ1枚につき7ヶ所にピペットの先端で滴下する。ミネラルオイル13mlをそそぎ込み、更にそれぞれの培地ドロップに300 μ lずつ培養液を追加する。最終培地量：350 μ l。)

—— リプロC - 1 プレートを用いた培養 ——

リプロC - 1 プレートを用いる場合、各ウエル200 ~ 250 μ lの培地を入れ、約100 μ lのミネラルオイルを重層します。
成熟培養にはウエルに20 ~ 25個の卵子を入れます。

(3) 卵子選別及び成熟培養

- ・回収した卵子を成熟培養用培養液 (IVMD-101) の1ドロップに集めさらに選別し、選んだ卵子を3回以上洗浄した後、1ドロップ (350 μ l) に 24 ~ 30個ずつ入れ、体外成熟培養を行う。
培養条件 (38.5 , 5%炭酸ガス, 95%空気, 22 ~ 24時間)

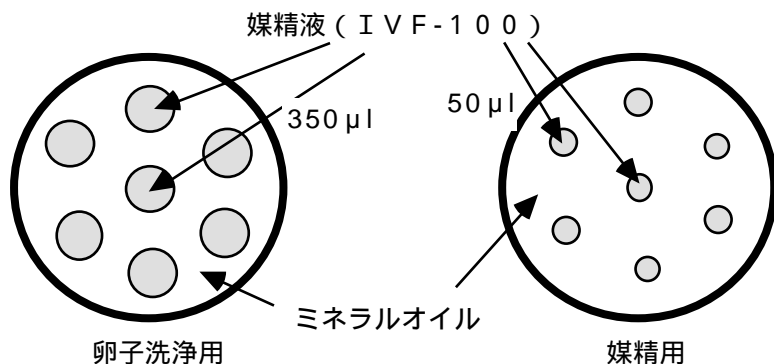
注意：

⑥、卵丘細胞以外の卵胞膜等の付属組織は出来るだけ取り除く。

第2日

(4) 媒精液 (IVF-100) の準備

- ・シャーレに媒精液 (IVF-100) で卵子洗浄用 (350 μ l) と媒精用 (50 μ l) のそれぞれの培養液ドロップを作成し、5%炭酸ガスインキュベータ内でガス平衡する。



(培養液ドロップの作り方： 50 μ lの培養液をシャーレ1枚につき7ヶ所にピペットの先端で滴下する。ミネラルオイル13mlをそそぎ込み、洗浄用培地ドロップに更に300 μ lずつ追加する。)

—— リプロC - 1 プレートを用いた培養 ——

リプロC-1プレートの各ウエルに、洗浄として250 μ l、媒精用に50 μ lの媒精液 (IVF-100) を必要なウエルの数だけ準備する。

(5) 凍結精子洗浄、調製

- ・媒精液 (IVF-100) を容量15mlのスπιツツ型ポリプロピレン製滅菌試験管2本に、それぞれ6ml、10ml用意し、38.5 の恒温水槽で保温。
- ・精子の凍結ストローを35 前後の温水で融解し、保温した6mlの媒精液 (IVF-100) に懸濁し、懸垂型遠心分離機で2,000回転 / 分、5 ~ 7分間遠心し、精子を沈殿させる。
- ・遠心後、ただちに上清を捨て (この時、沈降した精子まで吸引しないように注意する、培養液約0.5mlを残すと精子のロスがない。) 保温した媒精液 (IVF-100) 10mlの内、6mlを加えて懸濁し遠心。
- ・上清を捨て (培養液約0.2mlを残す)、保温した媒精液 (IVF-100) を1ml加え懸濁後、10 μ lを取り、3%食塩水で100倍に希釈して血球計算盤で精子数を計算する。
- ・もとの精子懸濁液の精子濃度が 1×10^7 個 / ml になるように媒精液 (IVF-100) を加えて調整する。

(6) 卵子洗浄及び媒精

- ・媒精用ドロップ (50 μ l) に、さらに50 μ lの精子懸濁液を加える。
(50 μ l+50 μ l=100 μ l 最終濃度 5×10^6 精子 / ml)
- ・体外成熟後の卵子を洗浄用ドロップ (350 μ l) で3回洗浄後、媒精用ドロップ (100 μ l) に移し、体外受精を行う。
培養条件 (38.5 , 5%炭酸ガス, 95%空気, 6時間)

注意：

①媒精液 (IVF-100) はアルブミン、ヘパリンその他の精子受精能獲得を促進する物質を含んでいます。そのため、精子は極めて早く受精能を獲得し、短時間で受精が終了します。6時間の培養で十分な受精率が得られます。

②IVF-100はスィムアップ法での精子の選抜には使用できません。

③IVF-100で洗浄調製した精子懸濁液は卵子に処理する前の前培養を必要としません。

(7) 受精卵前培養の準備

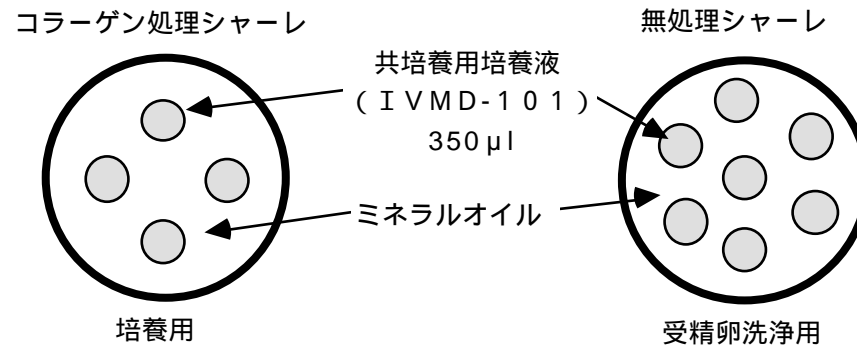
シャーレのコラーゲン処理

- ・シャーレに冷却したコラーゲン液150 μ lでドロップをつくり(シャーレ一枚当たり4ドロップまで)蓋をして室温で1時間静置する。
- ・1時間後、コラーゲンドロップを吸引除去し、150 μ lのPBS(-)を同じ場所に滴下する。
- ・PBS(-)を吸引除去後、共培養用培養液 (IVMD-101) で同様に洗浄し、ミネラルオイル (13ml) を流し入れ、コラーゲン処理した部分に、上から共培養用培養液 (IVMD-101) を350 μ l 滴下して共培養用ドロップを作成する。

(コラーゲン処理シャーレは乾燥させて室温に保存できますので、時間の空いている時に多めに作っておくと便利です。ただしコーティング部分がわかるように何らかの方法で印を付けて下さい。)

- ・無処理シャーレに共培養用培養液 (IVMD-101) で洗浄用のドロップ (350 μ l) を作成し、インキュベータ内でガス平衡化する。
(培養スポット数+2~3の割で作ると無駄がない。)

リプロC-1プレート((株)機能性ペプチド研究所、IFP967C)を用いるとコラーゲン処理の必要はありません。



リプロC-1プレートを用いた培養
リプロC-1プレートを用いる場合、プレートの各ウエルに培養液 (IVMD-101) を200~250 μ l分注し、約100 μ lのミネラルオイルを重層します。

(8) 受精卵の洗浄と受精卵前培養

- ・媒精6時間後、受精卵洗浄用のドロップ内で受精卵をピペティングし、透明帯周囲の細胞を残し、余分な細胞と精子を取り除き (9ページ写真2と写真3を参照)、コラーゲン処理した培養用ドロップに移し、下記の培養条件下で24時間前培養する。
培養条件 (38.5 $^{\circ}$ C, 5%炭酸ガス, 95%空気, 24時間)

④この培養によって、卵丘顆粒膜細胞はシャーレに結合し、受精卵の裸化操作が容易になります。

注意：

無血清培養液には細胞接着因子が含まれておりません。卵丘顆粒膜細胞の付着を促進するためコラーゲン処理を行う必要があります。
添付のコラーゲン液でのコーティングを忘れずに行ってください。

写真2 : : 媒精後6時間

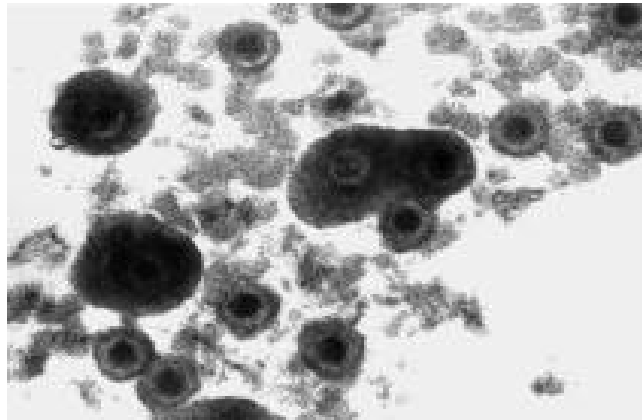
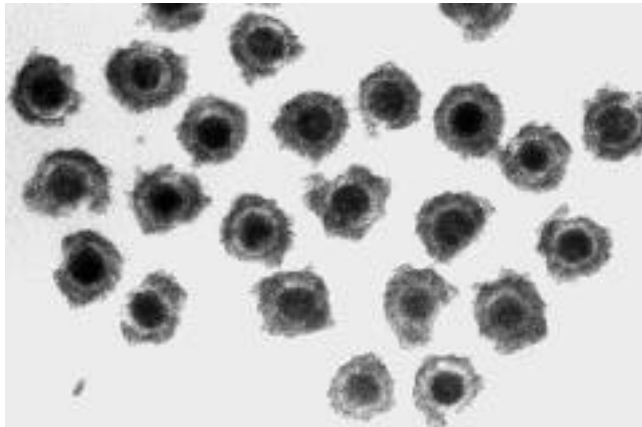


写真3 : 媒精終了後余分な卵丘細胞を除去した状態



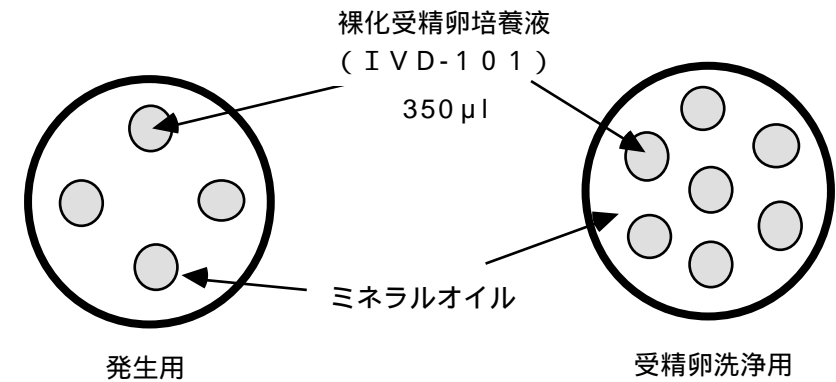
第3日

(9) 裸化受精卵培養液 (IVD-101) の準備

- ・シャーレに裸化受精卵培養液 (IVD-101) で発生培養用ドロップ (350ul、シャーレ当たり4ドロップまで) と洗浄用のドロップ (350 μ l) を用意し、インキュベータ内でガス平衡化する。

@コラーゲン処理は必要ありません。

(38.5、5%酸素、5%炭酸ガス、90%窒素)



リプロC-1プレートを用いた培養
リプロC-1プレートを用いる場合、プレートの各ウェルに培養液 (IVD-101) を卵子数に応じて50~250 μ l分注し、約100 μ lのミネラルオイルを重層します。

(10) 受精卵の裸化

- ・前日から培養していた卵丘・顆粒膜細胞で覆われている胚を、極細いピペット (使用時に洗浄済みのDrummondの100 μ lマイクロピペットを引いて作製) で、取り出し、注意深くピPETTINGを行い、裸化胚にする。

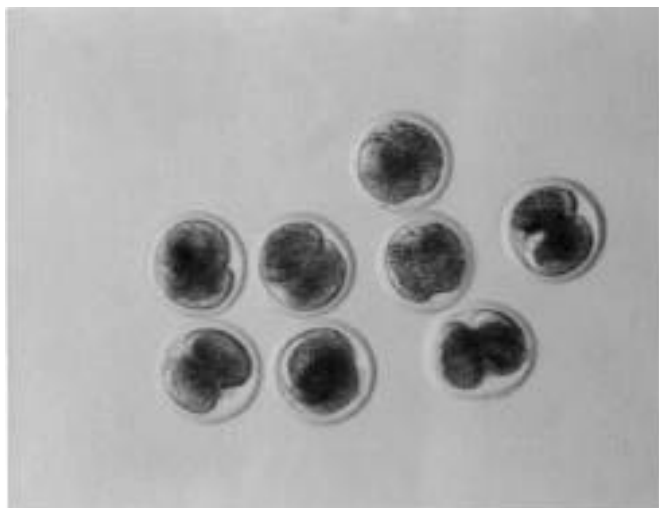
(11ページ写真4を参照)

注意： 卵丘顆粒膜細胞は出来るだけ完全に除去すること。

(11) 裸化受精卵の洗浄及び低酸素培養

- ・ 裸化した胚を洗浄用ドロップに移して洗浄し、卵丘・顆粒膜細胞が完全に剥離していることを確認。
- ・ 裸化受精卵培養液 (IVD-101) で作成した発生用のドロップに移し換え、下記条件下で培養する。
培養条件 (38.5℃, 5%酸素, 5%炭酸ガス, 90%窒素)
- ・ 裸化培養開始から 3 ~ 4 日後に培養液を半量交換 して、培養を続ける。

写真4： 卵丘細胞を完全に除去した受精卵



【培養液使用上の注意】：

- 1、培養液は全て滅菌済みです。このまま使用して下さい。
- 2、ボトルに充填してある培養液は、再濾過滅菌は行わないでください。発生促進活性が失われます。
(再濾過滅菌の禁止)
- 3、無血清培養操作を行う場合、卵子操作のガラスキャピラリーピペット以外にガラス製の器具は使わないで下さい。
- 4、凍結厳禁、4℃保存。
- 5、使用期限厳守、ボトルの培養液は製造後2カ月。
- 6、この培養液は牛受精卵専用です、他の動物では試験を行っていません。
- 7、ヒト体外受精には使用しないで下さい。
- 8、注射薬ではありません。

本製品ならびに培養操作等に関するご質問は電話，FAX等で下記宛にお願いします。

(株)機能性ペプチド研究所

〒990 山形市下条町4丁目3-3 2

TEL 023-646-2525

Fax 023-646-2526

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