

**「エンブリオパック」非共培養用セットを用いた
牛体外受精卵の培養方法
(製品番号:IFP3456K または IFP3456C を使用)**

**裸化受精卵非培養法
(低酸素培養)**



株式会社機能性ペプチド研究所

<セットの構成>

○「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（IVMD101） 25ml×2 本
- ・ 媒精液（IVF100） 30ml×2 本
- ・ 裸化受精卵培養液（IVD101） 10ml×2 本
- ・ プレート用コート処理液
（0.01%コラーゲン溶液） 10ml×1 本

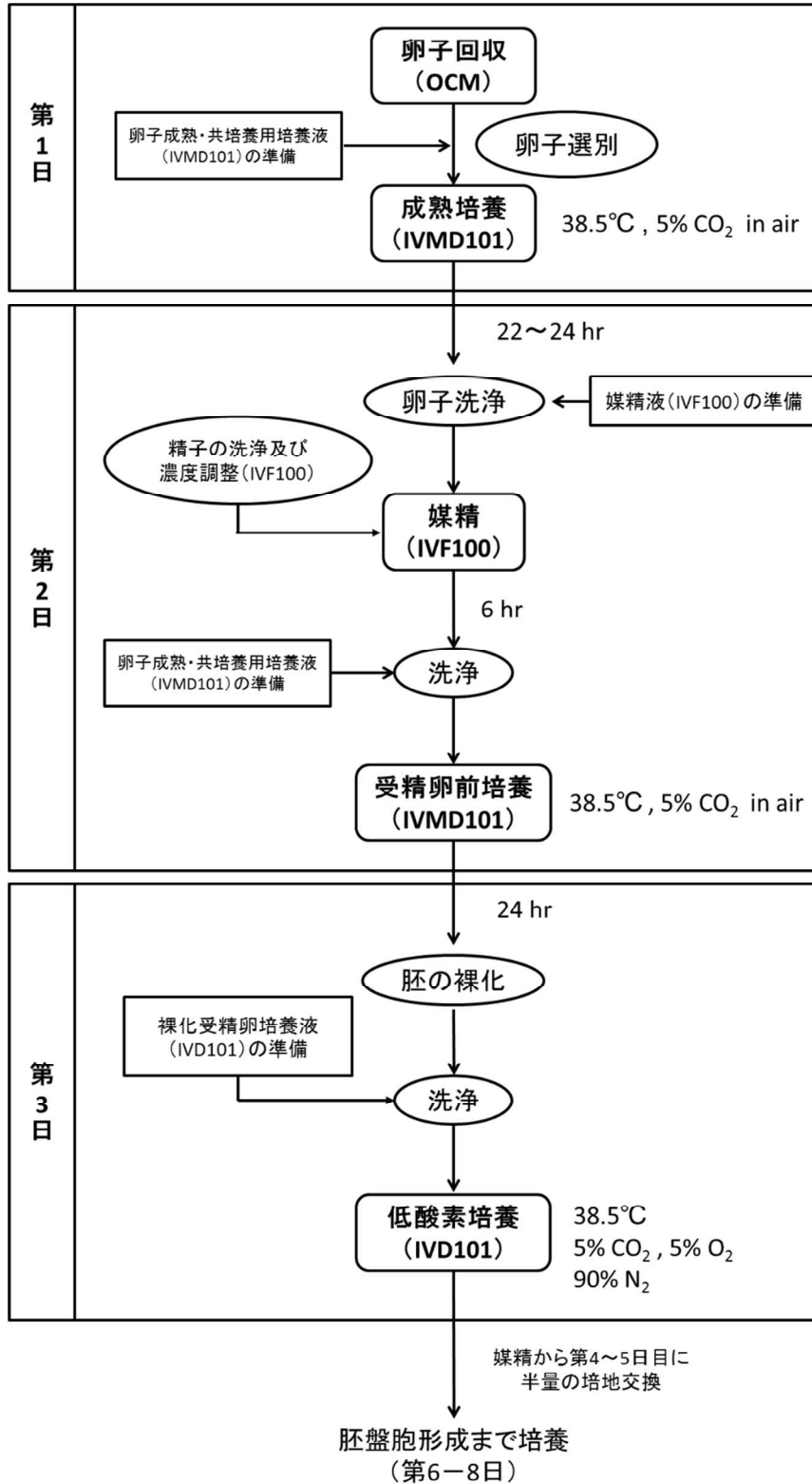
○「エンブリオパック」非共培養完全セット（製品番号：IFP3456C）

- ※「エンブリオパック」非共培養基本セット（IFP3456K）の0.01%コラーゲン溶液の代わりに、コラーゲン処理した培養用リプロ C-1 プレート（10 枚×2 袋）を含みます。

<その他必要な器材>

- 1) 卵子回収液（OCM）（製品番号：IFP9611）
- 2) 滅菌生理食塩水
- 3) 70%エタノール液
- 4) 酒精綿
- 5) 滅菌 PBS(-)または滅菌超純水
- 6) ディスポーザブルシリンジ（10ml）及び注射針（18G）
- 7) 滅菌済み遠心管（15 ml, 50 ml）
- 8) マイクロピペット（～1,000 μ l, ～200 μ l）
- 9) 採卵用プラスチックシャーレ（方眼付の角型プラスチックシャーレ等）
- 10) リプロプレート（製品番号：IFP9670）または培養用プラスチックシャーレ（60mm）
- 11) 胚培養試験済みミネラルオイル（パラフィンオイル）
- 12) ガラスキャピラリーピペット
- 13) 吸引チューブ
- 14) 実体顕微鏡
- 15) マイクロウォームプレート
- 16) CO₂ インキュベータ
- 17) O₂/CO₂ マルチガスインキュベータ（酸素濃度制御可能な培養装置）
- 18) 恒温水槽
- 19) 遠心機
- 20) クリーンベンチ

牛体外受精卵の培養フローチャート（裸化受精卵非共培養法）



裸化受精卵非共培養法の手順（低酸素培養法）

第1日

1. 卵子回収

- ・ 食肉処理場で採取した卵巣を、約 **38.5℃** に保温した滅菌生理食塩水で数回洗浄し、その後、殺菌のため1分以内、**70%エタノール液** で洗浄する。エタノール液を捨て、保温した滅菌生理食塩水ですみやかにエタノール液を洗い流す。
- ・ 吸引法等で卵子を卵子回収液（**OCM**）中に回収する。
- ・ 採取した卵子、卵胞液等の混合物を適量の卵子回収液（**OCM**）に攪拌し、採卵用プラスチックシャーレに入れる。実体顕微鏡下で卵丘/顆粒膜細胞が膨潤せず、**5層以上** 付着している卵子を回収する（図1）。

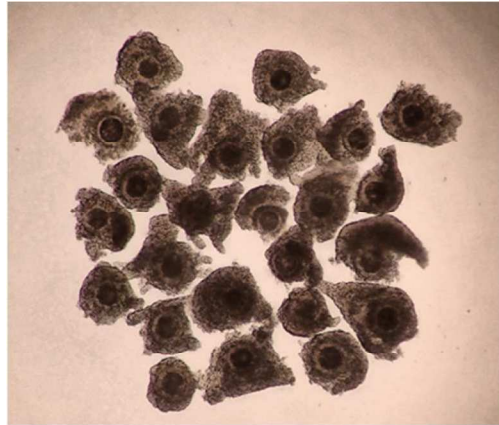


図1 回収した未成熟卵子—卵丘/顆粒膜細胞複合体

2. リプロプレートを用いた卵子成熟・共培養用培養液（IVMD101）の準備

- ・ 卵子成熟・共培養用培養液（**IVMD101**）をリプロプレート（図2）の**1ウェル**あたり**200μl**を入れ、ミネラルオイル約**100μl**を重層する（図3A）。
卵子洗浄用、培養用それぞれのリプロプレートを必要枚数分用意し、**5% CO₂** インキュベータ内で事前にガス平衡しておく。



図2 リプロプレート

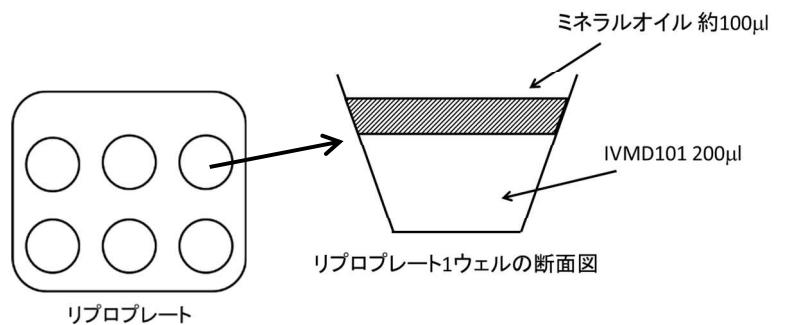


図3A リプロプレートを用いた培養液（IVMD101）の作製方法

○60mm の培養用シャーレを用いる場合の培養液 (IVMD101) 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 ケ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 (図 3B)。
最終培地量 : 350 μ l

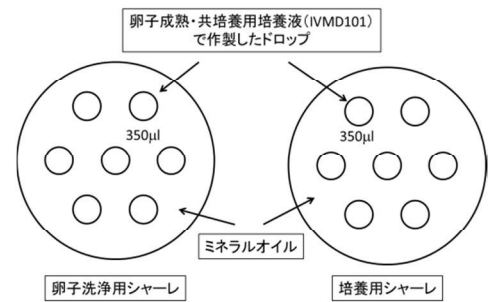


図 3B 洗浄用及び培養用シャーレの作製方法

3. 卵子選別及び成熟培養

- ・回収した卵子を卵子成熟・共培養用培養液 (IVMD101) の 入った洗浄用リプロプレート の 1 ウェルに集めてさらに選抜を行う。選んだ卵子を 3 回以上洗浄した後、培養用リプロプレートの 1 ウェルに 20~25 個ずつ入れ、体外成熟培養を行う。
培養条件 (38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ in air, 22~24 時間)

注意:

- * 卵子に付着している卵丘/顆粒膜細胞以外の卵胞膜等の間質組織は、ガラスキャピラリーピペットを用いて卵丘/顆粒膜細胞が 5 層程度残るように取り除く。

第 2 日

1. 媒精液 (IVF100) の準備

- ・リプロプレートに媒精液 (IVF100) を分注して卵子洗浄用と媒精用リプロプレートを作製し、5% CO₂ インキュベータ内で事前にガス平衡しておく (図 4)。

卵子洗浄用リプロプレート : 1 ウェルあたり媒精液 200 μ l にミネラルオイル約 100 μ l を重層

媒精用リプロプレート : 1 ウェルあたり媒精液 50 μ l にミネラルオイル約 200 μ l を重層

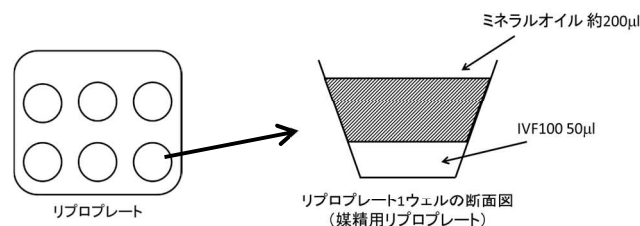


図 4 リプロプレートを用いた培養液 (IVF100) 作製方法

○60mm の培養用シャーレを用いる場合の媒精液ドロップの作り方

- 50 μ l の媒精液をシャーレ 1 枚につき 7 ケ所に
ピペットの先端で滴下する。
- ミネラルオイル 13ml をそそぎ込む。洗浄用の
ドロップの場合、更にそれぞれの培地
ドロップに 300 μ l ずつ媒精液を追加する (図 5)。
- 最終培地量：媒精用 50 μ l、洗浄用 350 μ l

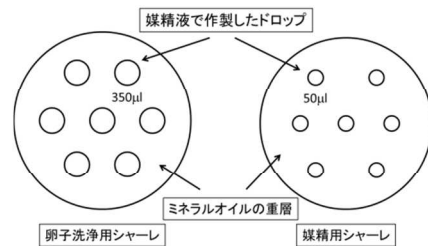


図 5 洗浄用及び培養用シャーレの作製方法

2. 凍結精子の洗浄及び濃度調整

- ・媒精液 (IVF100) を容量 15ml の滅菌済み遠心管 2 本に、それぞれ 6ml と 10ml を分注し、38.5 $^{\circ}$ C の恒温水槽で保温しておく。
- ・精子の凍結保存ストローを 35 $^{\circ}$ C 前後の温水中で融解し、保温した 6ml の媒精液 (IVF100) 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。懸濁液を約 1ml 程度残すと精子のロスがない)、保温した媒精液 (IVF100) 10ml から 6ml を加えて懸濁し、再度遠心する。
- ・上清を捨て (懸濁液約 0.5ml を残す)、保温してある媒精液 (IVF100) を 1ml 加えて懸濁後、10 μ l を取り、3%生理食塩水で 100 倍に希釈して血球計算盤を用いて精子数を計測する。
- ・精子懸濁液の最終精子濃度が 1×10^7 個/ml になるように媒精液 (IVF100) を加えて調整する。

3. 卵子洗浄及び媒精

- ・媒精用リプロプレート (1 ウェル (50 μ l) 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)
- ・体外成熟培養後の卵子 (図 6) は洗浄用に準備したリプロプレートで 3 回洗浄後、媒精用に準備したリプロプレートの精子懸濁液ウェル (100 μ l) に移し、体外受精を行う。培養条件 (38.5 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ in air, 6 時間)

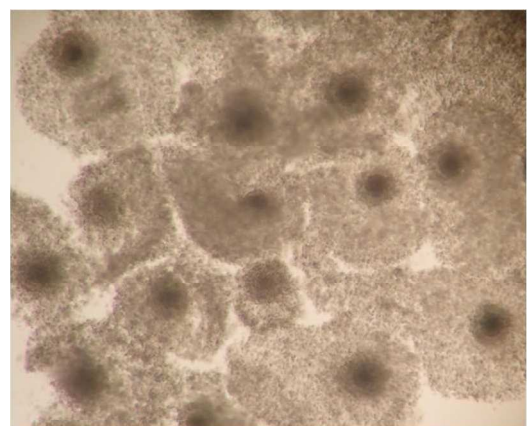


図 6 成熟培養後の卵子

注意:

*媒精液 (IVF100) 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成分を含んでいます。そのため、精子はすみやかに受精能を獲得し、短時間 (6 時間) で受精は完了します。

*IVF100 は、スウィムアップ法での精子の選抜には適しません。

4. 受精卵前培養 (媒精直後の胚培養) の準備

- リプロプレート 1 ウェルあたり 150 μ l の 0.01% コラーゲン溶液を分注し、室温で 1 時間静置する。
- その後、コラーゲン溶液を吸引除去し、250 μ l の PBS(-) でコラーゲン処理ウェルを洗浄する。
- PBS(-) を吸引除去後、卵子成熟・共培養用培養液 (IVMD101) で同様に 1 回洗浄し、コラーゲン処理を施したリプロプレートに卵子成熟・共培養用培養液 (IVMD101) を 1 ウェルあたり 200 μ l ずつ分注する。各ウェルあたりミネラルオイル約 100 μ l を重層し、共培養用リプロプレートを作製する。作製した共培養用リプロプレートは 5% CO₂ インキュベータ内で事前にガス平衡しておく。
(コラーゲン処理リプロプレートは PBS(-) の代わりに滅菌超純水での処理を行えば、乾燥させて室温で一定期間保存できるので、空き時間に多めに作製しておくが便利である。)
- コラーゲン無処理のリプロプレートで受精卵洗浄用リプロプレート (200 μ l の IVMD101 にミネラルオイル約 100 μ l を重層) を作製し、共培養用リプロプレートと同様に 5% CO₂ インキュベータ内で事前にガス平衡しておく。

*リプロ C-1 プレート (製品番号: IFP967C) を用いる場合

リプロ C-1 プレートは各ウェルがすでにコラーゲン処理済みですので、改めてコラーゲン処理を行う必要はありません。各ウェルに卵子成熟・共培養用培養液 (IVMD101) を 200 μ l 入れ、約 100 μ l のミネラルオイルを重層し、CO₂ インキュベータ内で事前にガス平衡化しておく。

○60mm の培養用シャーレを用いる場合（受精卵前培養の準備）

- ・シャーレに冷却した **0.01%**コラーゲン溶液（IFP9660）**150 μ l** でドロップを作り（培養用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、コラーゲン液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、卵子成熟・共培養用培養液（IVMD101）で同様に **1** 回洗浄し、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、上から卵子成熟・共培養用培養液（IVMD101）を **350 μ l** 滴下して共培養用ドロップを作製する。
（リプロプレートを用いた場合と同様に PBS(-)の代わりに滅菌超純水を用いればコラーゲン処理シャーレは乾燥させて室温で一定期間保存できますので、空き時間に多めに作製しておくと便利です。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目印を付けて下さい。）
- ・無処理シャーレに卵子成熟・共培養用培養液（IVMD101）で洗浄用のドロップ（**350 μ l**）を作製し、CO₂ インキュベータ内で事前にガス平衡しておく。

5. 受精卵の洗浄と前培養

- ・媒精 **6** 時間後（図 7）、受精卵洗浄用のドロップ内で受精卵をピペッティングし、透明帯周囲の一部卵丘/顆粒膜細胞を残し、余分な体細胞と精子を取り除く（図 8）。コラーゲン処理を施した培養用リプロプレートに移し、**24** 時間前培養する。（**38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ in air**）

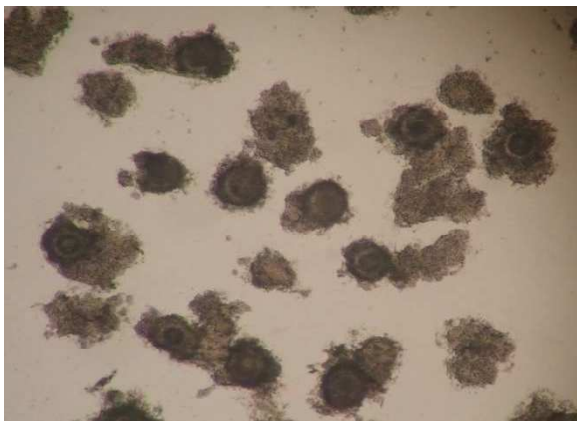


図 7 体外受精後（媒精操作から 6 時間後）の受精卵

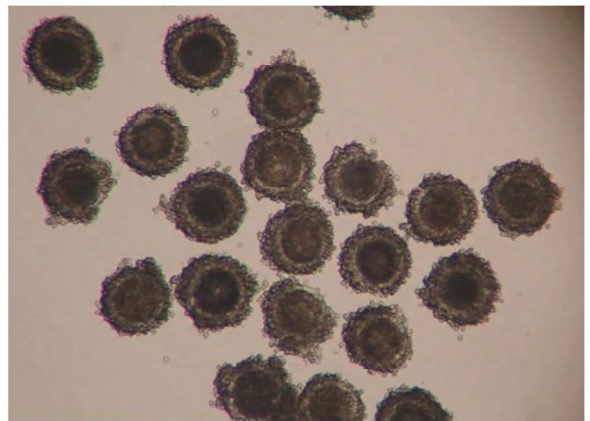


図 8 余分な体細胞と精子を取り除いた受精卵

@この培養操作によって、卵子に付着している卵丘/顆粒膜細胞はリプロプレートに接着し、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/顆粒膜細胞の接着を促進するため、リプロプレート、シャーレ等のコラーゲン処理を行う必要があります。
「エンブリオパック」非共培養基本セットを用いる場合は、**0.01%**コラーゲン溶液（**IFP9660**）でのコラーゲン処理を忘れずに行ってください。
- * コラーゲン処理した培養用リプロプレート、シャーレを使用するのは受精卵前培養時のみです。受精卵前培養以外には培養用リプロプレート、シャーレのコラーゲン処理は必要ありません。

第3日

注意:

*これ以後の培養には、低酸素培養を行うため O_2 / CO_2 マルチガスインキュベータが必要です。

1. 裸化受精卵培養液 (IVD101) の準備

- ・リプロプレートに1ウェルあたり 200 μ l の裸化受精卵培養液 (IVD101) を分注し、ミネラルオイル約 100 μ l を重層する。発生培養用と洗浄用リプロプレートを必要枚数用意し、マルチガスインキュベータ内でガス平衡化する。(38.5 $^{\circ}$ C、5% O_2 / 5% CO_2 / 90% N_2)

○60mm の培養用シャーレを用いる場合の裸化受精卵培養液 (IVD101) ドロップの作り方

「2.卵子成熟・共培養用培養液 (IVMD101) の準備」で行った培養液ドロップ作製方法と同様に培養用・洗浄用シャーレを準備する。50 μ l の培養液 (IVD101) 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 (IVD101) を追加する。最終培地量: 350 μ l

2. 受精卵の裸化操作

- ・前日から培養して卵丘/顆粒膜細胞で覆われている受精卵 (図9) を、極細のガラスキャピラリーピペットで受精卵に傷をつけないように注意深くピペッティングを行い、裸化受精卵にする (図10)。卵丘/顆粒膜細胞は出来るだけ取り除くようにする。

3. 裸化受精卵の洗浄及び低酸素培養

- ・裸化した胚を洗浄用リプロプレートに移して洗浄し、卵丘/顆粒膜細胞がほぼ剥離していることを確認し、裸化胚を裸化受精卵培養液 (IVD101) で作製した発生用リプロプレートに移し換え、培養する。(38.5 $^{\circ}$ C、5% O_2 / 5% CO_2 / 90% N_2)

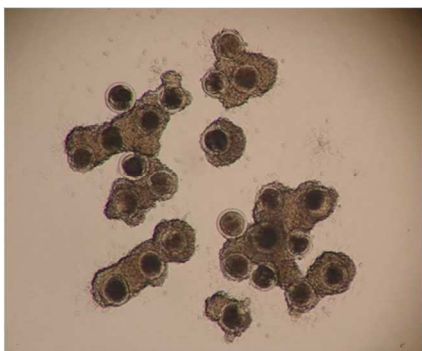


図 9 前培養 24 時間後の受精卵



図 10 卵丘/顆粒膜細胞を剥離した裸化受精卵

第 4 日～9 日

1. 胚盤胞形成までの培養

- ・体外受精（媒精）から 4～5 日後に裸化受精卵培養液（IVD101）を半量交換して、胚盤胞が形成されるまで培養（7～9 日）を続ける（図 11）。



図 11 媒精から 8 日目の胚盤胞期胚

【培養液使用上の注意】:

1. 培養液は全て滅菌済みです。そ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。
生物活性が失われます。
3. 無血清培養操作を行う場合、卵子、受精卵操作のガラスキャピラリーピペット以外
ガラス製の器具は使わないで下さい。
4. 凍結厳禁、4~6℃保存。
5. 使用期限厳守、未開封の培養液は製造後 2 カ月。
6. この培養液は牛体外受精卵専用です、他の動物では試験を行っておりません。
7. ヒト体外受精には使用しないで下さい。
8. 本キットは研究用試薬です。研究目的にのみ使用してください。
9. ヒト、動物等の臨床応用、診断、食品としての使用は禁止します。

本製品ならびに培養操作等に関するご質問は電話、FAX、メール等でお知らせ下さい。

(株) 機能性ペプチド研究所

〒999-3766 山形県東根市神町西 4-5-1

TEL 0237-53-1488

FAX 0237-47-1477

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

(Ver 1, 2019 年 10 月発行)