

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 株式会社機能性ペプチド研究所
事業部

〒990-0823 山形市下条町4丁目3-3 2

TEL 023(646)2525 FAX 023(646)2526

「エンブリオパック」共培養セット

ウシ体外受精胚作成プロトコール

共培養法
Ver. 1.3

必要器材

1、「エンブリオパック」共培養基本セット

(製品番号、IFP346K)

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」共培養完全セット

(製品番号、IFP346C)

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、ディスプレイ注射器及び注射針

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、浮遊培養用、カタログ番号、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、コラーゲンコート済み)

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)

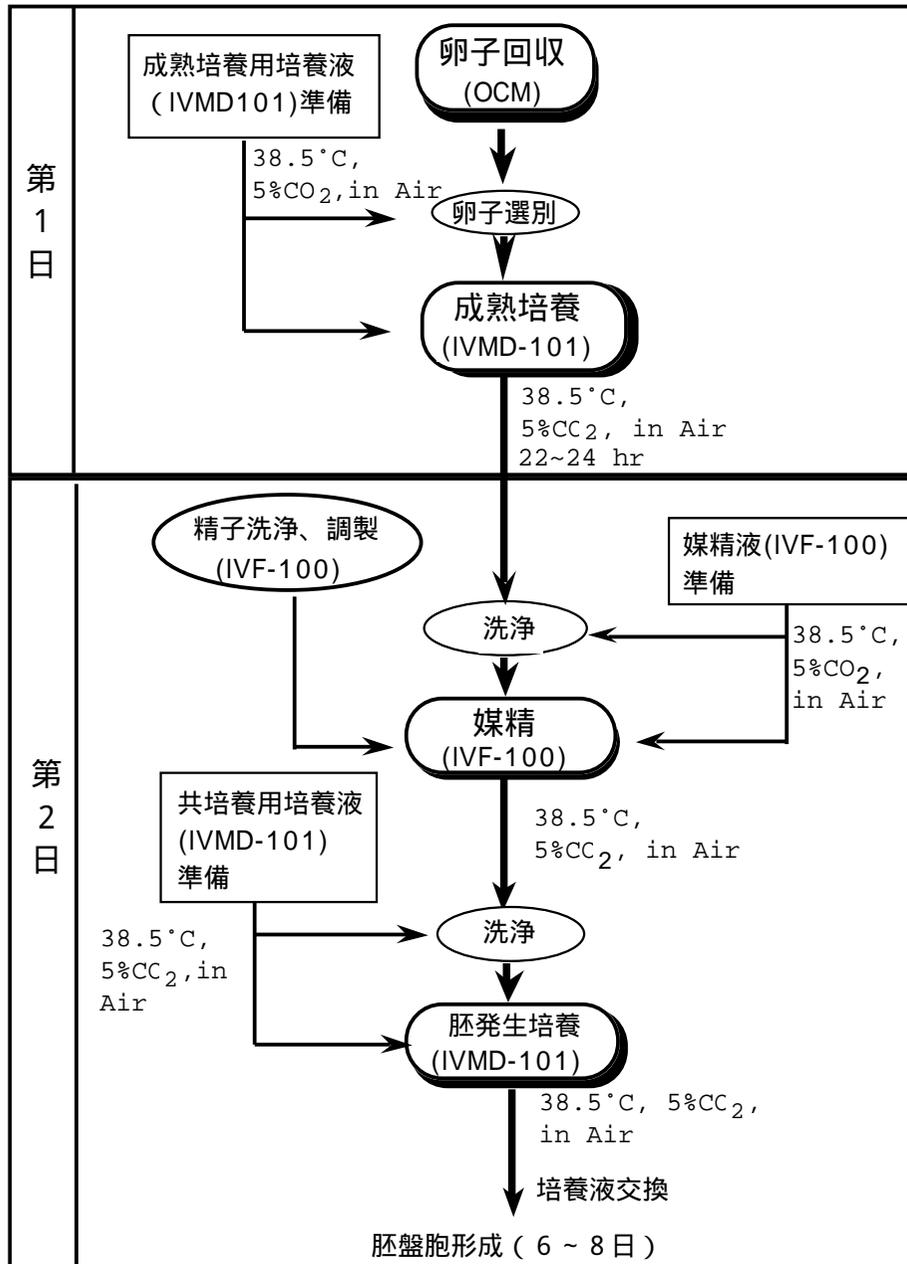
13、実体顕微鏡

14、炭酸ガスインキュベータ

15、恒温水槽

16、滅菌ビーカー

17、その他



無血清共培養法操作説明 (共培養法)

シャーレに蓋をし、インキュベータに入れる。

培養条件 (38.5℃, 5%炭酸ガス, 95%空気, 22~24時間)

第一日

、卵子回収

- ・屠場より持ち帰った卵巢を、約38.5℃で保温した滅菌生理食塩水で洗浄。
- ・全ての卵巢を殺菌のため70%エタノールで洗浄(1分以内)、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。
- ・採取された卵子卵胞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ずつ分注し、実体顕微鏡下で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：

屠殺ウシ卵巢卵子を用いる場合、卵巢運搬時の温度を15~20度に設定し、卵子採取開始までの時間を牛屠殺後3時間以内に設定することをお奨めします。

、成熟培養用培養液(IVMD-101)の準備

- ・卵子成熟、共培養用培養液(IVMD-101)パ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、350µl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ー内に1時間放置。

(培養液ドロップの作り方：50µlの培養液をシャーレ1枚につき7カ所にピペットの先端で滴下する。ミネラルオイル13mlを注入し、更にそれぞれの培地ドロップに培地を300µlずつ追加する。最終培地量350µl)

—— 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200~250µlの培地を入れ約100µlのミネラルオイルを重層します。(20~25個/ウエル)

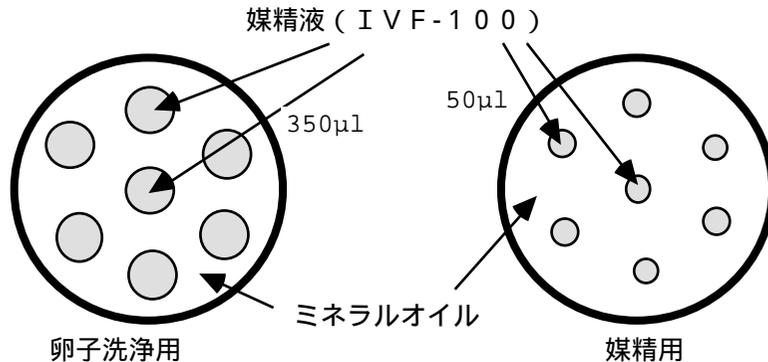
、卵子選別及び成熟培養

- ・回収した卵子を で準備した卵子成熟、共培養用培養液(IVMD-101)の1ドロップに全て集め、さらに卵子の選別を行い、選んだ卵子を3回以上培地ドロップを移動しながら洗浄し、ドロップ(350µl)あたり30個ずつ入れて

第2日

、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) と媒精液 (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に1時間放置。



(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カ所にピペットの先端で滴下する。ミネラルオイル13mlを注入、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 プレートの各ウェルに、洗浄として250 μ l、媒精用に50 μ lの媒精液 (IVF-100) を必要なウェルの数だけ準備する。

、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、密栓をして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2,000rpm、5 ~ 7分間遠心し、精子を沈殿させる。
- ・遠心後、ただちに上清を吸引除去し (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。) 保温しておいた媒精液 (IVF-100) 10mlの内、6mlを加えて懸濁し遠心。

- ・再び上清を捨て (上清約0.2mlを残す)、保温した媒精液 (IVF-100) を1ml 加え懸濁し、その10 μ lを3%食塩水で100倍に希釈し、血球計算盤で精子数を測定する。
- ・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。

、卵子洗浄及び媒精

- ・ で準備した媒精用ドロップまたはウェル (50 μ l) に、調整済み精子懸濁液を50 μ l 追加する。
(50 μ l+50 μ l=100 μ l 最終濃度 5×10^6 精子 / ml)
- ・ で培養した成熟後の卵子を で準備した洗浄用ドロップ(350 μ l)またはウェル(250 μ l)で3回洗浄し、媒精用ドロップまたはウェル (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:

媒精液 (IVF-100) は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。

媒精液 (IVF-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。

IVF-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は不要です。

、共培養用培養液 (IVMD-101) の準備

”リプロC - 1 プレート” を用いる場合、以下のコラーゲン処理操作は必要ありません

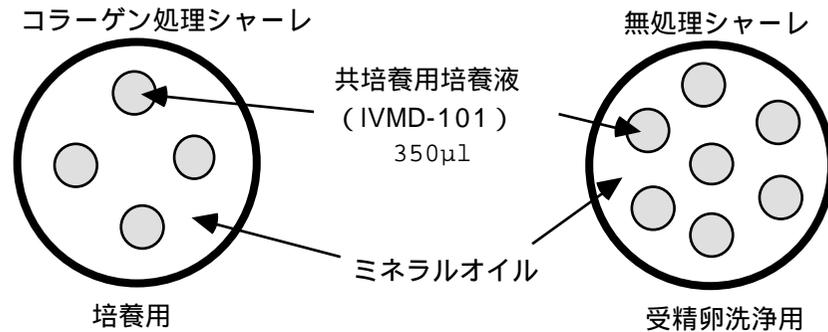
シャーレのコラーゲン処理

- ・シャーレに冷却した添付コラーゲン液 (100 μ g/ml) 150 μ lでドロップをつくり (1シャーレ当たり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。

(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、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ます。)

- ・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。
- ・また、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) も用意し、インキュベータ内に1時間放置。(培養に必要なドロップ数+2~3個の割で作る)

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。共培養系での胚の発生には卵丘顆粒膜細胞の良好な培養系を作る必要があります。そのためコラーゲン処理を行って卵丘顆粒膜細胞の培養容器への接着を促す必要があります。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。



——— リプロC - 1 プレートを用いた培養 ———

共培養用培養液 (IVMD-101) の準備：
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 (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。

、受精卵の洗浄と胚発生培養

- ・媒精6時間後、 で準備した洗浄用のドロップ内で受精卵を軽くピペッティングし、透明帯に付着している細胞を残し、余分な細胞と精子を取り除き、 で作った共培養用ドロップに移し換える。(透明帯の周辺に付いている細胞層約5層程度を残す)。**写真2及び写真3を参照**
培養条件 (38.5 , 5%炭酸ガス, 95%空気, 24時間)

* 培養する受精卵の数は下記を参考にして下さい。

培地ドロップ培養---35~20個 / 350 μ l

リプロC - 1 プレート---25個以下 / ウェル (250 μ l)

* 培養する受精卵の数に応じて培地量を調整する必要があります。

- ・2日後、胚を取り囲んでいる卵丘 / 顆粒膜細胞塊から胚をガラスピペットではずし、卵丘細胞の細胞シート上で培養します。
- ・観察の際、卵丘 / 顆粒膜細胞に発生中の胚が取り込まれていた場合はガラスピペットで胚を細胞シートから剥離します。(観察は出来るだけ短時間で行うこと。)
- また、シャーレ上に大きな細胞塊を形成した場合はガラスピペットで取り除く。

培養液交換

- ・媒精後5日目に培養液を **半量** だけ交換します。
- ・卵丘顆粒膜細胞の除去が不完全で多量の細胞が付着したままで培養を行った場合は2日に1回の割合で培地の半量交換を行ってください。

注意：

- @、培地交換のタイミングは8細胞期から桑実胚が出現する頃が最適です。8細胞期以前では発生が阻害される可能性があります。
- @、共培養中に卵丘 / 顆粒膜細胞が増殖してきますが、大きな細胞塊を形成した場合は硝子ピペットで細胞塊を取り除いてください。
- @、フィーダー細胞の状況をよく観察し培地交換のタイミングを設定して下さい

写真2： 媒精6時間後

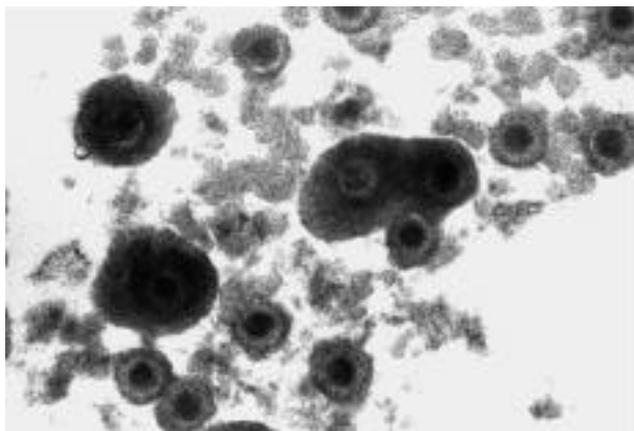
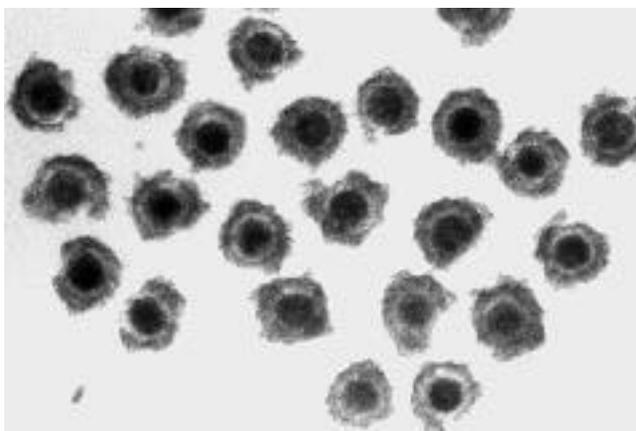


写真3： 媒精終了後、余分な卵丘細胞を除去した状態



【培養液使用上の注意】：

- 1、全ての培養液は滅菌済みです、このまま使用して下さい。
- 2、培地をバイアルから取り出すときは、滅菌済みディスプレイ注射器を使って必要量を取り出して下さい。
- 3、バイアルに充填してある培養液の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)
- 4、バイアルから取り出して保存しないでください。バイアルから取り出した場合はポリプロピレン製の滅菌済み容器に密栓をして冷蔵保存して下さい。ただし3日以上経た培養液は使用しないで下さい。(ポリカーボネート、ポリスチレン、ガラス製の容器厳禁)
- 5、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。
- 6、凍結厳禁、4℃保存、
- 7、使用期限厳守、バイアルの培養液は製造後2カ月。
- 8、この培養液はウシ受精卵専用です、他の動物では試験を行っていません。
- 9、ヒト体外受精には使用しないで下さい。
- 10、**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。

株式会社機能性ペプチド研究所

〒990-0823 山形市下条町4丁目3-3 2

電話 023-646-2525

F a x 023-646-2526

