

透明帯菲薄化マニュアル

1. 用意するもの

試薬	通常用いられるもののほかに必要な器具
(1) DPBS (GIBCO 14287-080 500m) (2) 非働化新生仔ウシ血清 (GIBCO 26010-074 500m) (3) アクチナーゼ E (科研製薬 90002-1615 1g)	(1) 電子天秤 (2) 薬匙 (3) 薬包紙 (4) サンプルストックチューブ

2. 保存液の調製

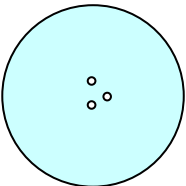
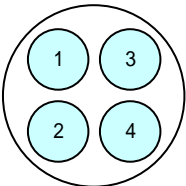
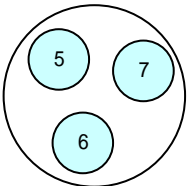
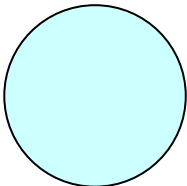
- (1) DPBS20m に非働化新生仔ウシ血清を 5ml 加える。
- (2) 0.22 μm フィルタでろ過滅菌する。

3. 菲薄化液の調製

- (1) 電子天秤でアクチナーゼ E を 30mg 計り取り、サンプルストックチューブに入れ、DPBS を 1m 加えてキャップを閉め、攪拌する。
- (2) 0.22 μm フィルタでろ過滅菌する。

4. 菲薄化の手順

- (ア) 胚を保存液に浸漬しておく。
- (イ) シャーレ (35mm など) に菲薄化液 100 μ のドロップを 4 つ作る。
- (ウ) 別のシャーレ (35mm など) に保存液 100 μ のドロップを 3 つ作る。
- (エ) さらに別のシャーレ (35mm) に保存液 2m を入れる。

(ア)保存液	(イ)菲薄化液ドロップ	(ウ)保存液ドロップ	(エ)保存液
			

ドロップ 1 の液でピペットをすすぎ、改めてドロップ 1 の液をピペットに吸い、(ア)の胚に吹き掛け、吹き掛けた液と共に胚をピペットに吸う。この時、(吹き掛けた液以外の)保存液の吸い込み量を最小限に抑える。

ピペットに吸った胚をドロップ 1 に移す。移した直後にカウントアップタイマーをスタートさせ、時間を計る¹。

ドロップ 2 の液でピペットをすすぎ、改めてドロップ 2 の液をピペットに吸い、ドロップ 1 の胚に吹き掛け、吹き掛けた液と共に胚をピペットに吸う。吸った胚をドロップ 2 に移す。

と同様の手順で胚をドロップ 3 に移し、さらに同様にドロップ 4 に移す。

ドロップ 5 の液でピペットをすすぐ。

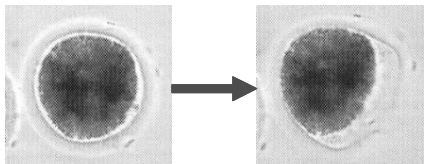
顕微鏡で観察を続け、透明帯の形状に変化²を認めたら、ドロップ 5 の液をピペットに吸い、ドロップ 4 の胚に吹き掛け、吹き掛けた液と共に胚をピペットに吸う。この時、(吹き掛けた液以外の)菲薄化液の吸い込み量を最小限に抑える。吸った胚をドロップ 5 に移す。

ドロップ 6 の液でピペットをすすぎ、改めてドロップ 6 の液をピペットに吸い、ドロップ 5 の胚に吹き掛け、吹き掛けた液と共に胚をピペットに吸う。吸った胚をドロップ 6 に移す。

と同様の手順で胚をドロップ 7 に移す。

(エ)の液でピペットをすすぎ、改めて(エ)の液をピペットに吸い、ドロップ 7 の胚に吹き掛け、吹き掛けた液と共に胚をピペットに吸う。吸った胚を(エ)に移す。

通常の胚操作に戻る。

<p>1...菲薄化液への暴露時間の目安</p> <ul style="list-style-type: none"> ・体内胚：60～180秒 ・体外胚：30～60秒 	<p>2...透明帯の形状の変化</p> <div style="text-align: center;">  </div>
--	--