

マウス2細胞期胚のEFS溶液を用いたガラス化法による凍結保存の手順

* 使用する器具類 *

実体顕微鏡、タイマー、
胚操作用ピペット(内径120-150 μ m)、
クライオチューブ(NUNC#366656)、
ピペッター(100または200 μ l用)、
培養用ディッシュ(35mm)、ピンセット、
液体窒素取り扱い用グローブ、フェイスマスク。

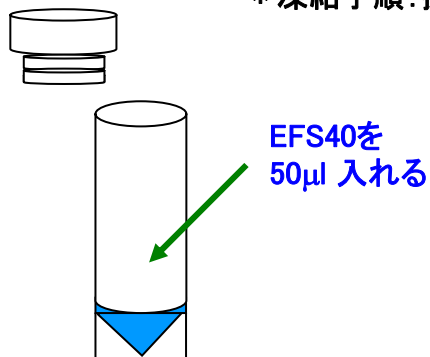
* 使用する試薬 *

EFS20(平衡液)およびEFS40(ガラス化液)。
<注意:直前にそれぞれをよく混和してください。>

調整の仕方:
30% w/v Ficoll 70 + 0.5M sucrose-PB1で
ethylene glycol を20%および40%に希釈。

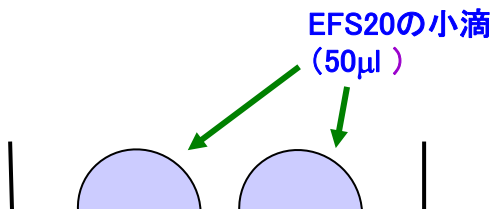
* 凍結手順:操作はすべて室温(23 \pm 2 $^{\circ}$ C)で行います *

図1



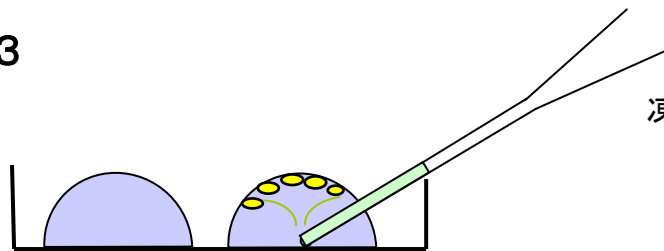
ピペッターでEFS40を50 μ l クライオチューブに入れます。

図2



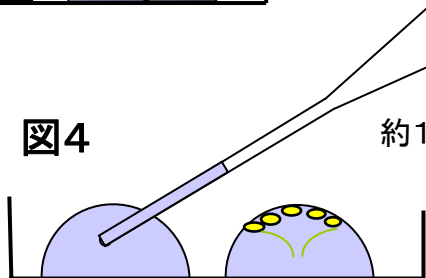
EFS20の小滴(50 μ l)を2つ、ディッシュのフタなどに
載せておきます。

図3



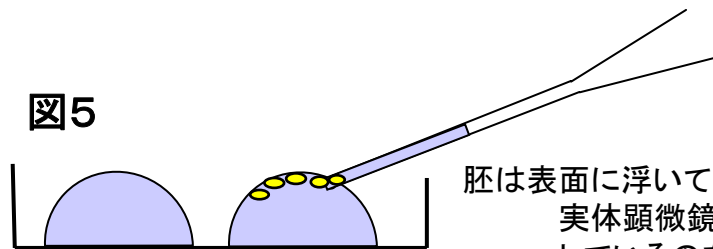
凍結する胚をなるべく少量の培養液と共に(胚操作用ピペットの先を底に近づけて)、EFS20の小滴へ移します。

図4



約1分後、空にした胚操作用ピペットでEFS20をピペットの細い部分の半分まで吸います。

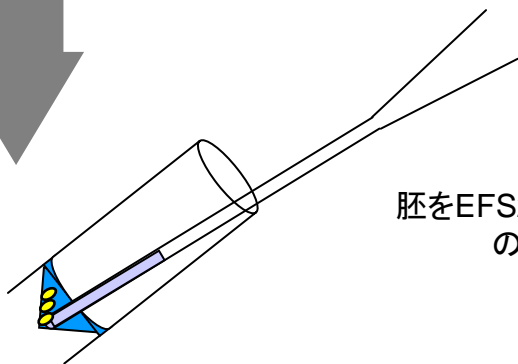
図5



胚は表面に浮いているので、実体顕微鏡で胚が収縮しているのを確認しながら、なるべく少量のEFS20と共に吸い取ります。

2分間

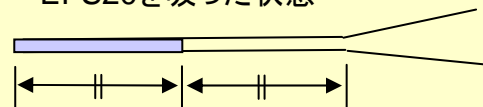
図6



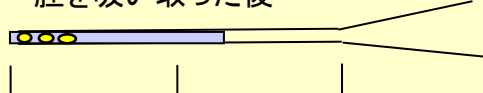
胚をEFS20に浸してから2分後に、チューブ内のEFS40の中へ胚を移します。

ピペット操作のコツ

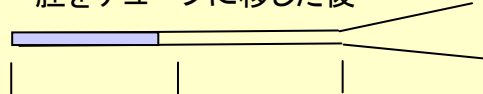
EFS20を吸った状態



胚を吸い取った後

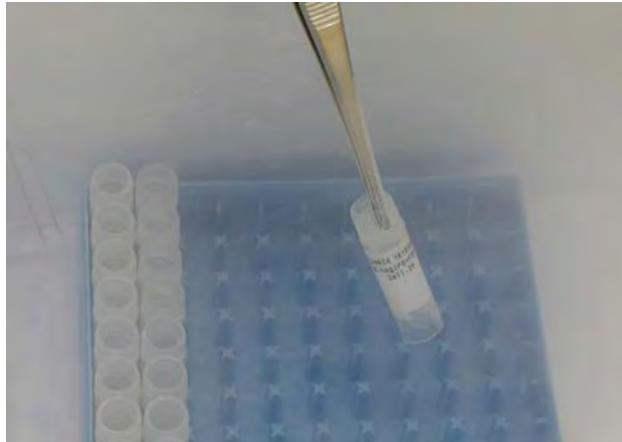


胚をチューブに移した後



1分間

図7



更に1分後、チューブを液体窒素へ浸けて凍結させます。

そのまま、液体窒素タンク内にて、チューブが液体窒素に浸かっている状態で保存を行います。

注意点：多量の培養液を胚と共にEFS20へ移すと平衡化がうまくいかない場合があります。
ピペットの内径を細くするなど培養液をなるべく持ち込まないように操作を行ってください。
EFS20の中で胚が収縮しない場合は注意が必要です。

EFS溶液を用いてガラス化凍結保存したマウス胚の融解・回収手順

* 使用する試薬 *

融解液1 (TS1) : 0.75 M sucrose - PB1 (37°Cで使用)。
融解液2 (TS2) : 0.25 M sucrose - PB1 (室温で使用)。
培養液 (M16) : 予め5%CO₂インキュベータ内、37°Cで平衡させておく。

* 使用する器具類 *

実体顕微鏡、タイマー、胚操作用ピペット、ピンセット、
ピペッター(1,000μl用および100または200μl用)、
培養用ディッシュ(35mm)、
培養用ディッシュ(50mm)のフタまたは時計皿など、
液体窒素取り扱い用グローブ、フェイスマスク。

図1

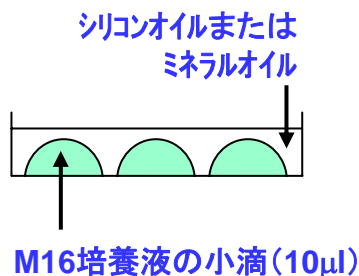
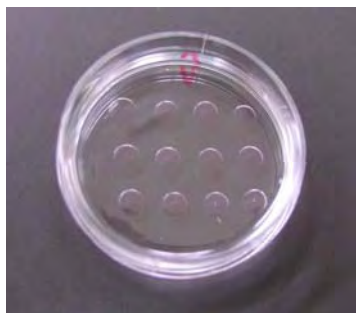
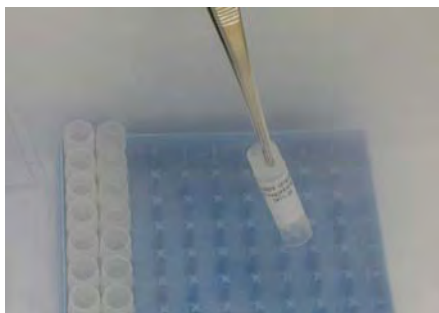


図2



液体窒素中から
チューブを取り出す

図3



液体窒素を捨て、
30秒間静置

* 融解・回収手順 *

TS1のチューブを予め37°Cに温めておきます。
凍結胚融解後の培養用ディッシュ(35mm)を準備します。

フェイスマスク、グローブをつけ、液体窒素の中から
凍結チューブを取り出します。

フタを開けて内部の液体窒素を捨て、机に立ててそのまま
30秒間、静置します。

図4 TS1 (37°C)を
850 μ l 入れる

溶けるまでピペッ
ティングを行う
(20-25秒)



TS1 (37°C) 850 μ l をチューブの中に入れます。
ピペッティングで10-12回 (20-25秒間) ゆっくりと出し入れをしながら
ガラス化溶液が融けるまで混ぜ合わせます。

静かにピペッティング操作を行うと気泡ができにくいので、
胚の回収が容易です。

図5

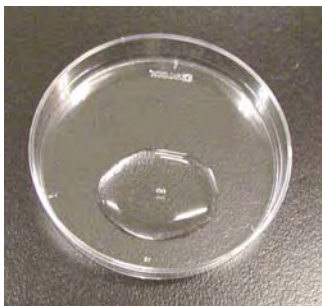


ディッシュの
フタへ
溶液を移す

融けたら速やかに全溶液を50mmディッシュのフタ(時計皿など)へ
ピペッターで移し、タイマーで3分間計測開始します。

3分間

図6

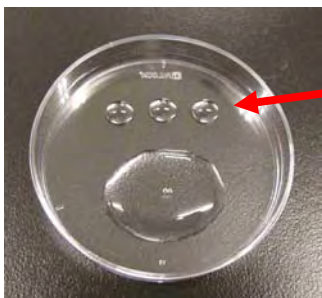


揺らして溶
液を広げる

ディッシュのフタを軽く揺らして溶液を広げます。

(胚のピックアップが容易になります)

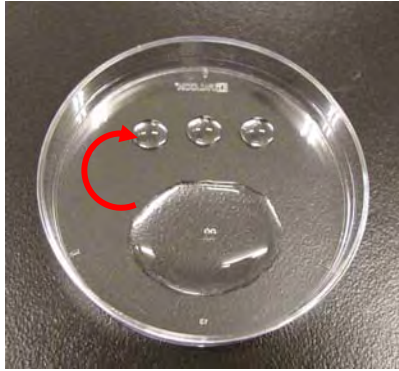
図7



TS2 の小滴
(50 μ l) を
載せる

ディッシュに、TS2の小滴(50 μ l)を3つ載せます。

図8



融解から3分後、
TS2の小滴へ
胚を移す

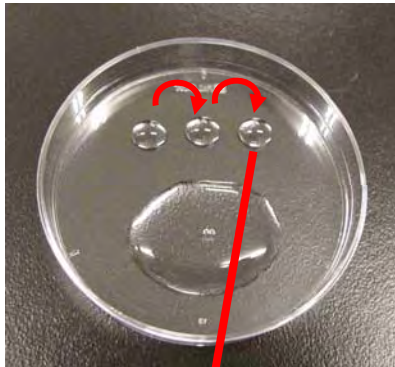
融解から3分後に、TS1の中の胚を胚操作用ピペットで回収し、
TS2の小滴へ移します。

タイマーで3分間計測開始

回収の際、胚は表面に浮いていることもあり、
ディッシュを軽く揺らすと見つけやすくなります。

3分間

図9



3分後、TS2の
小滴に2回 胚
を移す

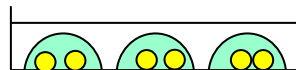
TS2へ胚を移して3分後に、残り2つの小滴で胚を洗浄して
から、培養用ディッシュの培養液中に胚を移します。

移植までインキュベーター内で培養します。

図10



M16培養液中で
移植まで培養



融解直後の胚は浸透圧変化に敏感なので、
必ずM16培養液を用いてください。

胚移植は、当日臍栓を確認した偽妊娠雌の
卵管内へ、融解した日に行ってください。

PB1 based solutions for thawing

1) Preparation of BSA-free PB1

Compound	M.W.	mM	mg/100ml
NaCl	58.4	136.98	800.0
KCl	74.6	2.68	20.0
KH ₂ PO ₄	136.1	1.47	20.0
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	358.14	8.04	288.1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	203.3	0.49	10.0
Glucose	178.6	5.56	100.0
Na pyruvate	110	0.33	3.6
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	0.9	13.2
Penicillin G			6.0 (approx)

Sterilize the solution by filtration.

2) Preparation of 0.75M sucrose-PB1 (TS1)

Dissolve 7.7 g of sucrose in PB1 (BSA free) and bring the total volume to 30 ml.

Mix by gentle shaking until sucrose is completely dissolved.

Add 90 mg of BSA onto the surface of the solution and leave it stand until completely dissolved.

Sterilize the solution by filtration.

Aliquot and store in a refrigerator.

3) Preparation of 0.25M sucrose-PB1 (TS2)

Dilute the 0.75M sucrose-PB1 solution with x2 volume of PB1 medium.

Aliquot and store in a refrigerator.

If I can be of any further assistance, please do not hesitate to contact me.

Thank you.

Atsuo Ogura, Ph.D., D.V.M.,
ogura@rtc.riken.jp