

ラット胚の融解 (2 細胞期胚以降)

準備

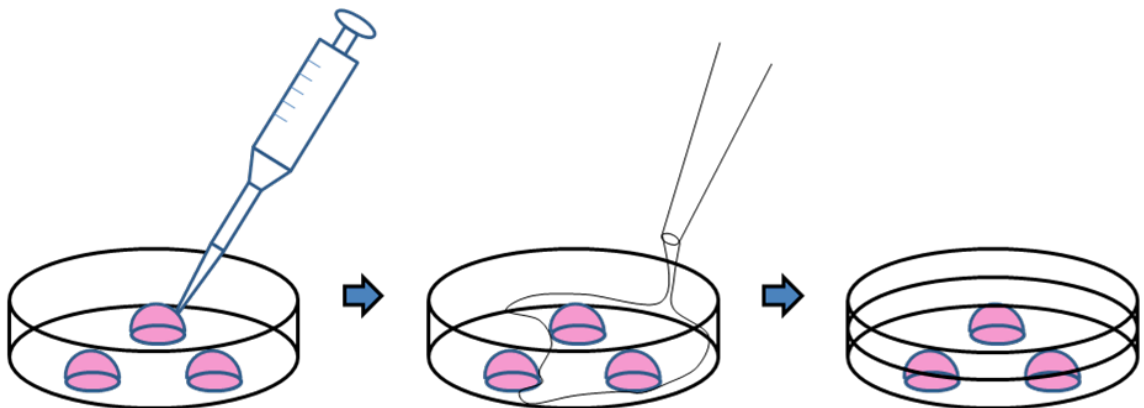
- ・ ピペットマン (1000 μ l 用)
- ・ Dish (IWAKI 35mm Code No.1000-35)
- ・ 流動パラフィン (ナカライテスク Code No. 26137-85)
- ・ Rat KSOM (推奨) または mR1ECM (弊社販売)
- ・ 0.25M Sucrose (弊社販売)
- ・ CO₂ インキュベータ (37°C、5%CO₂ in air)

※消耗品等のメーカーは推奨するものであり、他のメーカーでも構いません。

前準備

1. mR1ECM または Rat KSOM のドロップ (3 つ玉) を作製する (図 1)。

〈図 1〉



ピペットマンで Rat KSOM または mR1ECM の 100 μ l の 3 つ玉を Dish に作製する。

培地を崩さないように流動パラフィンを流し入れる。

流動パラフィンで培地を完全に覆い Dish にフタをする。

2. ドロップは、インキュベータ内で 30 分以上静置し、温度及びガス平衡させてから使用する。
3. 0.25M Sucrose 溶液は 37°C に加温しておく。

※CO₂ インキュベータにて加温する場合、0.25M Sucrose 溶液が CO₂ と反応してしまい pH 値が変わってしまうのでガス平衡はしない (アンプル管を折らずにインキュベータに入れる)。

方法

1. 凍結チューブを液体窒素タンクから取り出し、直ちにフタを外してチューブ内の液体窒素を捨て、室温に 30 秒静置する〈図 2-①〉。

2. ピペットマンで、あらかじめ 37°C に加温しておいた 0.25M Sucrose 溶液 0.9ml をチューブ内へ添加し、素早くピペッティングしシャーレに移す〈図 2-②〉。

※注意点：0.25M Sucrose 溶液をチューブ内へ添加し、完全に保存液が溶けるまで全体が攪拌されるようにピペッティングする。その際、泡立てないようにする。

この操作は出来るだけ速やかに行う。

上記は良好な胚の生存性を維持するために極めて重要である。

3. さらに、0.4ml~0.5ml の 0.25M Sucrose 溶液でチューブ内を共洗いする。

4. (2)、(3)の内容液より胚を回収し〈図 2-③〉、あらかじめガス平衡しておいた Rat KSOM または mR1ECM のドロップに移し〈図 2-④ A〉、10 分静置する。

5. Rat KSOM または mR1ECM のドロップで 2 回洗浄する〈図 2-④ A→B、B→C〉。

※注意点：保存液のキャリーオーバーを極力避けるため、できる限り少量の培地と共に胚を移動させる。

6. 各種アッセイ、移植及び培養等、目的の実験に利用する。

〈図 2〉

