

研究用試薬

「ブタ胚ガラス化保存液キット(PEV-SK)  
を用いたブタ胚のガラス化保存と融解(加  
温・希釈)方法」

製品番号 IFP16PVSK

株式会社 機能性ペプチド研究所

## < ブタ胚ガラス化保存液キット(PEV-S K)に含まれる溶液 >

- 1) ブタ胚 1 次平衡液(PES-1): 2 ml × 1 本
- 2) ブタ胚 2 次平衡液(PES-2): 2 ml × 1 本
- 3) ブタ胚ガラス化液(PVS): 2 ml × 2 本
- 4) ブタ胚加温・希釈液(PWDS): 30 ml × 4 本



図1 ブタ胚ガラス化保存液キット(PEV-SK)

## < 他に必要となる器材及び消耗品 >

- 1) ガラス化デバイス(Cryotop、北里バイオファルマ)
- 2) 液体窒素
- 3) 液体窒素容器(発泡スチロール、保存用タンク)
- 4) 一時保存用キャニスター等
- 5) 実体顕微鏡
- 6) マイクロウォームプレート
- 7) ガラスキャピラリーピペット
- 8) 吸引チューブ
- 9) ウォーターバス
- 10) カウントアップ機能付きタイマー
- 11) ピンセット
- 12) マイクロピペット(100  $\mu$ l, 1000  $\mu$ l)
- 13) リプロプレート(IFP9670;機能性ペプチド研究所)、35 mm カルチャーディッシュ等
- 14) PBM 培地(ブタ後期胚培養用培地;IFP1030P, 機能性ペプチド研究所)

# 胚のガラス化保存法

## 1. 事前の準備

- 1) 1次平衡液、2次平衡液およびガラス化液を 38℃ のウォーターバスで保温する。
- 2) ガラス化保存する胚(胚盤胞～拡張胚盤胞)を準備する(Cryotop 1本あたり 5～10個程度)。
- 3) Cryotop にラベルを貼る。
- 4) 発泡スチロール(深さ 15cm 以上)内に液体窒素を充填する(図 2)。



図 2

## 2. ブタ胚の平衡液およびガラス化液処理

- 1) リプロプレートのふた(内側)等に1次平衡液のドロップ(50  $\mu$ l)を1つ作製する(図 3a)。
- 2) 胚を培地からガラスキャピラリーピペットで取り出し、1次平衡液のドロップに投入し、タイマーをスタート(カウントアップ)する(図 3a)。
- 3) 胚が浮いてきたら液底面にガラスキャピラリーピペットで沈める(図 3b)。
- 4) 1次平衡液のドロップの隣に、2次平衡液のドロップ(50  $\mu$ l)を1つ作製する(図 3c)。
- 5) 1次平衡液投入 5分後、胚を2次平衡液のドロップに移し、浮いてくる胚を3)の方法で時々沈める(図 3b,c)。
- 6) 2次平衡液のドロップの隣に、ガラス化液のドロップ(50  $\mu$ l)を2つ作製する(図 3d)。
- 7) 2次平衡液投入 5分後、胚を一つ目のガラス化液ドロップに移し、同じドロップ内で2ヶ所ほど場所を変えて洗浄する(図 3d,e)。
- 8) 胚を二つ目のガラス化液ドロップに移し、胚の外液を完全にガラス化液に置換する。胚がガラス化液に触れてから液体窒素に入れるまでの工程は 1分以内に行う(図 3f)。
- 9) 実体顕微鏡下で、最小限のガラス化液とともに胚を Cryotop の先端部に乗せ、胚の周りの余分なガラス化液を吸引除去する(図 4)。
- 10) Cryotop を液体窒素中に一気に投入する(図 5a)。
- 11) ピンセットでストローキャップをつかんで液体窒素中に入れ(図 5b,c)、Cryotop をしっかりと差し込み、一時保存用キャニスター等に入れておく(図 5d)。
- 12) 胚のガラス化処理終了後、液体窒素タンク内に保存する(図 5e)。

### 注意点

ブタ胚の平衡液処理からガラス化液投入までの工程は、38℃ に設定したマイクロウォームプレートの上で作業する。

平衡液やガラス化液に胚を移す際は、各溶液の持ち込みをできるだけ少なくする。胚がガラス化液に触れてから液体窒素に入れるまでの時間をなるべく短くする。

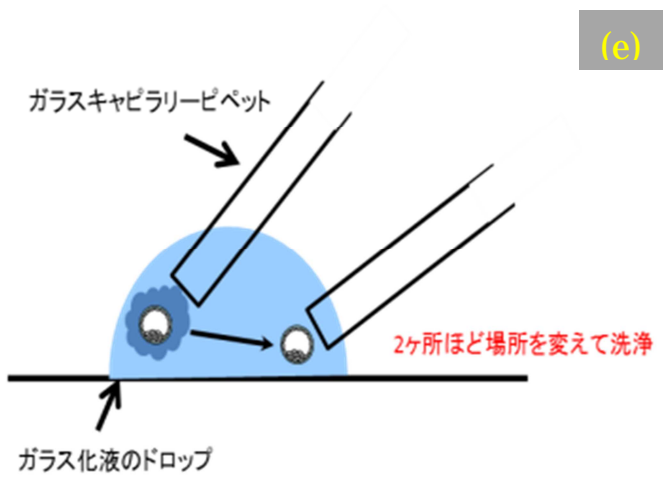
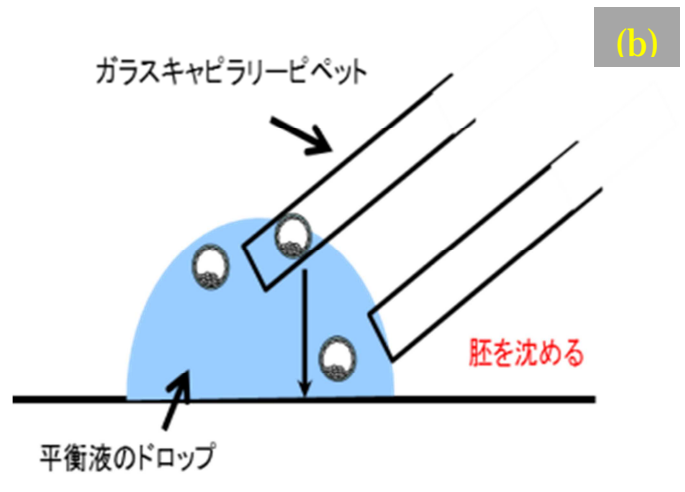


図3 平衡液及びガラス化液処理工程図

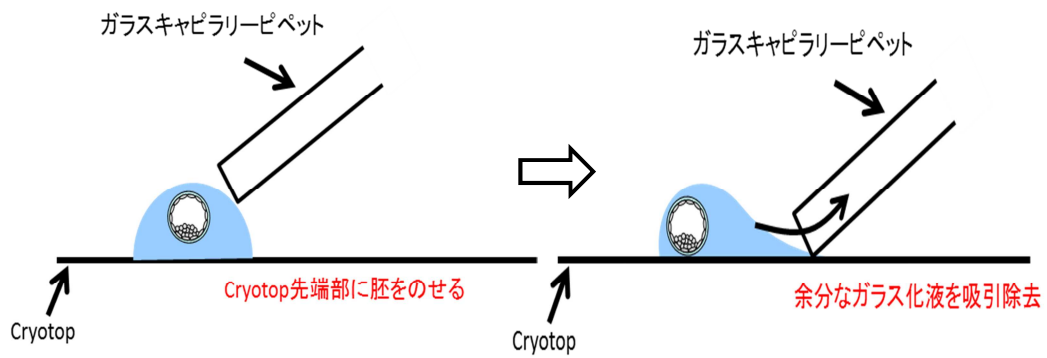


図4 余分なガラス化液の吸引除去方法

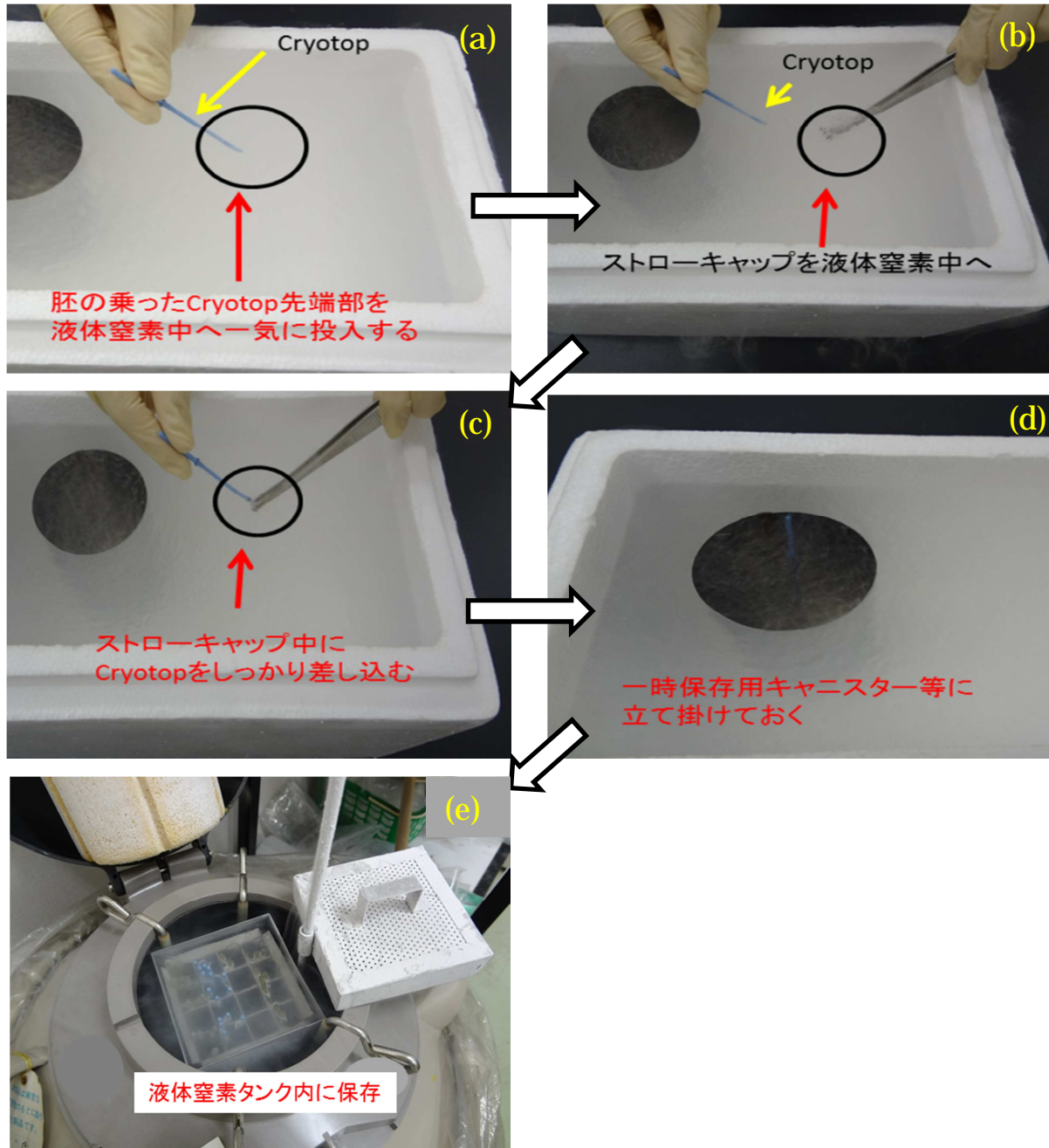


図5 ガラス化工程図

---

# ガラス化保存胚の加温・希釈法

---

## 1. 事前の準備

- 1) ガラス化保存胚の回復培養用培地 (10%牛胎仔血清添加 PBM など) をインキュベーター (38.5℃、5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) に入れて気相平衡しておく (胚培養用及び洗浄用に使用)。
- 2) 加温・希釈液をウォーターバスで 38℃ に保温する。
- 3) ガラス化保存胚が入っている Cryotop を液体窒素タンクからピンセットで取り出し、すみやかに液体窒素を充填した発泡スチロール中に移す。
- 4) 胚を回収するガラスキャピラリーピペットを準備しておく。

## 2. ガラス化保存胚の加温・希釈操作及び生存確認試験

- 1) 加温・希釈液を 35 mm のカルチャーディッシュに 3 ml、リプロプレートの各ウェルに 300 µl 入れる (図 6a)。
- 2) 1) で準備した 35 mm のカルチャーディッシュを実体顕微鏡のステージ上に置いて、焦点を合わせておく (38℃ に設定したマイクロウォームプレート使用) (図 6a)。
- 3) ストローから Cryotop を引き抜き、顕微鏡下の加温・希釈液中に Cryotop の先端を一気に投入し、振盪させる (図 6b,c)。
- 4) 加温・希釈液中に胚が遊離したのを顕微鏡で確認し、タイマーをスタート (カウントアップ) する (図 6c)。
- 5) 胚を回収して数を確認し、リプロプレートの加温・希釈液に移す (図 6c)。
- 6) 浮いてくる胚を沈めながら、3 分間希釈してガラス化液を除去する。
- 7) 次に、洗浄用に準備した回復培養用培地の異なる 3 ドロップで胚を洗浄し (図 6d)、培養用のドロップに移す。
- 8) インキュベーター (38.5℃、5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>) で加温・希釈した胚を培養 (10%牛胎仔血清添加 PBM など) し、24 時間、48 時間後に生存胚を確認し、生存率を求める。



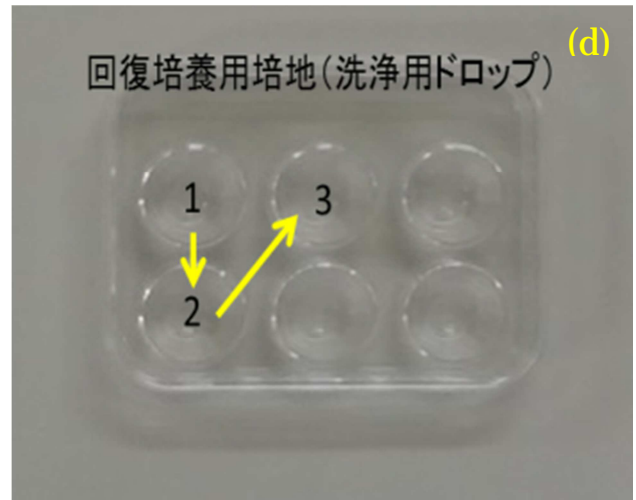
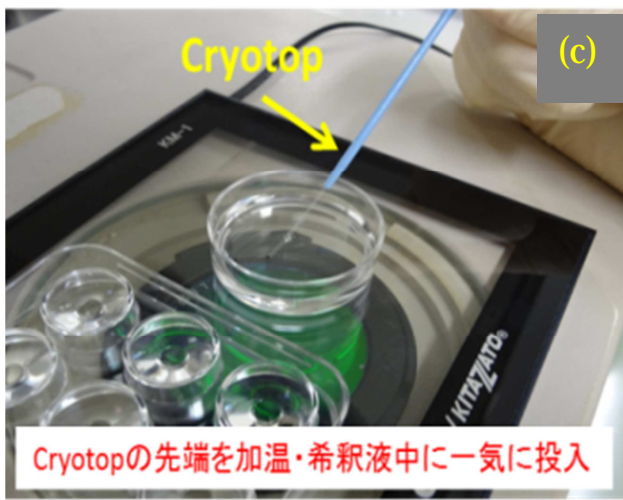
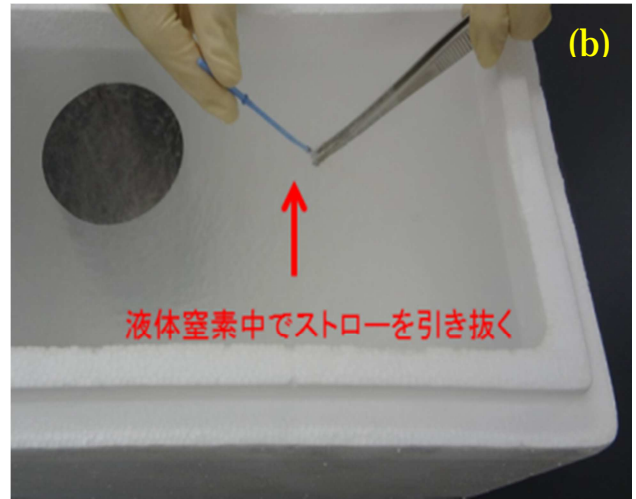
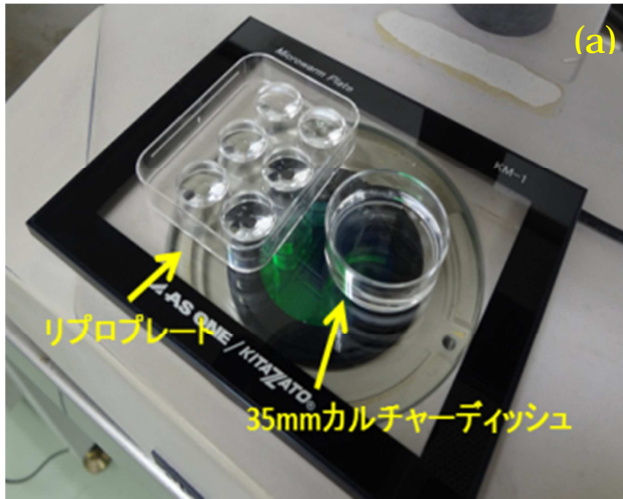


図6 加温・希釈操作工程図



## ブタ胚のガラス化保存及び融解（加温・希釈）工程

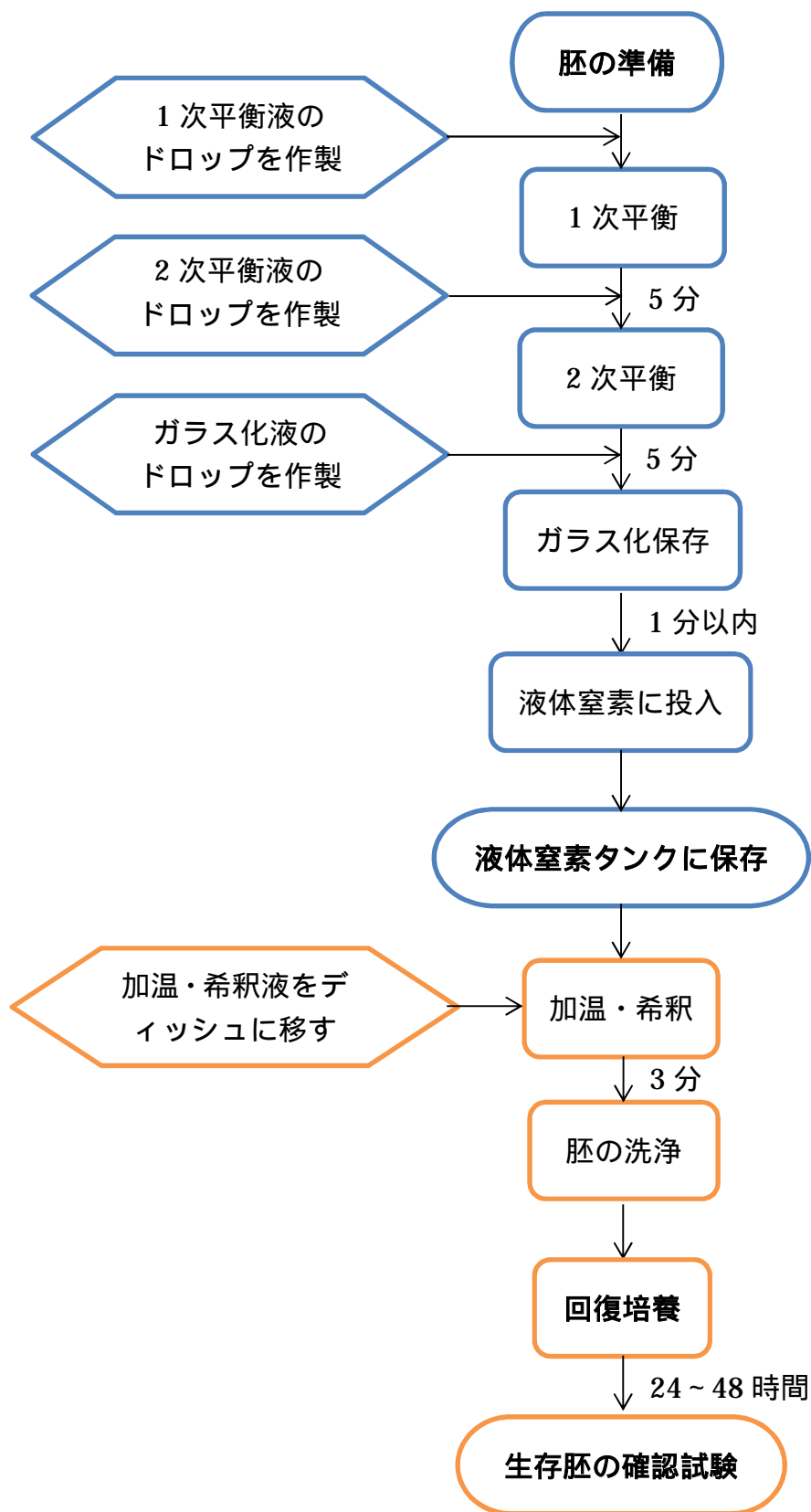


図7 ガラス化前のブタ胚



図8 加温・希釈直後のブタ胚

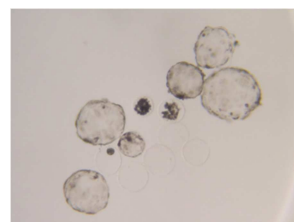


図9 回復培養 48時間後のブタ胚

## < 使用上の注意 >

1. 本キットはブタ胚のガラス化保存専用です。他の動物では試験を行っておりません。
2. ヒト体外受精卵には絶対に使用しないでください。
3. 本キットは研究用試薬です。注射薬又は診断薬ではありません。
4. 凍結厳禁。4 保存。
5. 有効期間は製造後 6 ヶ月間。使用期限厳守。
6. 本キットは研究用試薬であり、試験研究用以外あるいは人体には使用しないで下さい。本キットの使用に起因する事故や損害について責任を負いかねますのでご了承下さい。
7. 本品の使用により、必ずしも一定以上の胚生存率を保障するものではありません。

## < 参考文献 >

1. Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Misumi K, Hoshi T, Hoshi H. Birth of piglets from in vitro-produced porcine blastocysts vitrified and warmed in a chemically defined medium. Theriogenology 2015; 84: 1314-1320.
2. Misumi K, Hirayama Y, Egawa S, Yamashita S, Hoshi H, Imai K. Successful production of piglets derived from expanded blastocysts vitrified using a micro volume air cooling method without direct exposure to liquid nitrogen. J Reprod Dev 2013; 59: 520-524.
3. Kuwayama M, Vajta G, Kato O, Leibo S. Highly efficient vitrification method for cryopreservation of human oocytes. Reprod Biomed Online 2005; 11: 300-308.

製品ならびに操作等ガラス化保存に関する問い合わせは、電話・FAX・E-mail で下記宛にお願い致します。

本説明書を許可なく転載、複製することを禁じます。

(株)機能性ペプチド研究所

〒999-3766 山形県東根市神町西 4 丁目 5-1

TEL: 0237-53-1488

FAX: 0237-47-1477

E-mail: [service@func-p.co.jp](mailto:service@func-p.co.jp)