

体外受精用培地の調整法

バイオリソース研究センター
遺伝工学基盤技術室プロトコール #3

2020/06/17

目次

- **説明**
- **試薬**
 - Stock solution(x1)用試薬
 - 改変HTF用試薬
- **Stock solutionの調整**
- **改変HTFの調整**
- **補足**
 - アンプル封入のやり方
 - 用意するもの、封入手順
- **作成者**

説明

体外受精用培地として改変HTF (HTFにBovine serum albumin とHypotaurineを添加) の調整に必要な試薬および調整法を記載する。

試薬

Stock solution (x1)用試薬

	mg / 100ml	mg / 500ml	mg / 1L	
NaCl	581.7	2908.5	5817	Wako, 191-01665, 500g
KCl	35.0	175	350	Wako, 163-03545, 500g
KH_2PO_4	5.0	25	50	Wako, 169-04245, 500g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5.0	25	50	Wako, 131-00405, 500g
NaHCO_3	210.0	1050	2100	Wako, 191-01305, 500g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	30.0	150	300	Wako, 031-00435, 500g
Phenol red sodium salt	0.2 (適量)	1.0 (適量)	2.0 (適量)	Sigma-Aldrich, P4758, 5g

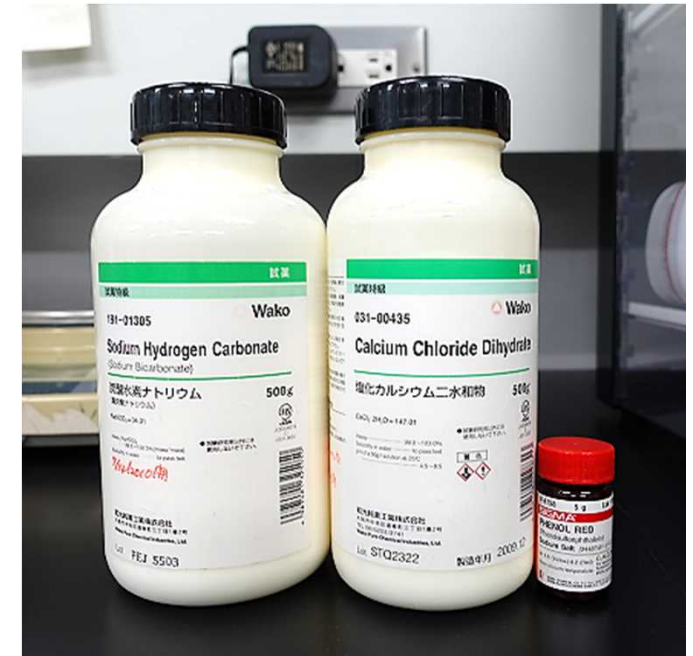
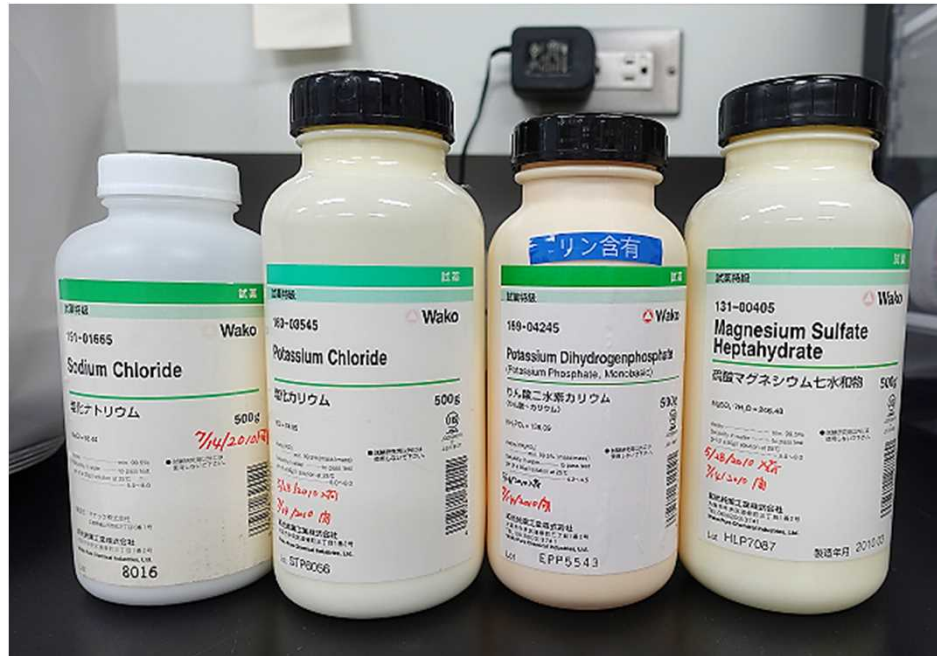
試薬

改変HTF用試薬

	mg / 100ml	mg / 50ml	mg / 25ml	mg / 10ml	
Glucose	50.0mg	25.0mg	12.5mg	5.0mg	Wako, 049-31165, 500g
Na Pyruvate	3.6mg	1.8mg	90 μ l ※	36 μ l ※	Sigma-Aldrich, P8574, 5g
Na Lactate (60% syrup)	400 μ l	200 μ l	100 μ l	40 μ l	Sigma-Aldrich, L7900, 100ml
Penicillin G	10.0mg	5.0mg	2.5mg	1.0mg	Sigma-Aldrich, P7794, 1MU
Hypotaurine	11.0mg	5.5mg	2.8mg	1.1mg	Sigma-Aldrich, H1384, 250mg
Albmin, Bovine Serum, FractionV	300.0mg	150.0mg	75.0mg	30.0mg	Merck Millipore, 12657, 25g, Crystalline

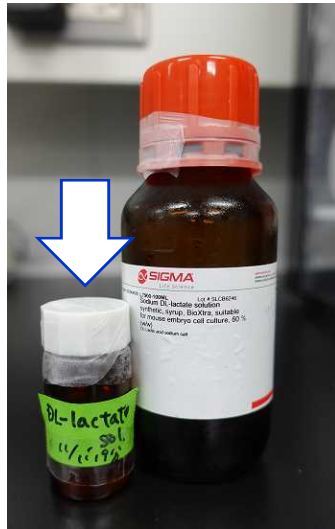
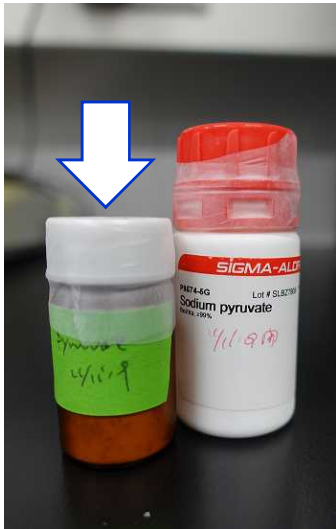
※ Na pyruvate stock sol. ...10mg / mlをエッペンチューブに分注(50 μ l)して-40°C保存

Stock solutionの調整



Stock solution用試薬を秤量、蒸留水(HLPC用, Wako, 046-16971)に溶解し、最後にメスアップする。4°C保存。

改変HTFの調整



① **冷蔵保存試薬** (ピルビン酸、乳酸) から秤量し、Stock sol.に加える。

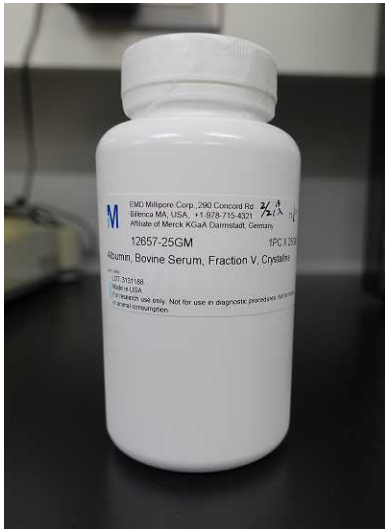
ポイント：

購入後、小瓶に**小分け**し、3-4ヶ月で交換する。元の試薬も購入から1年で更新する。



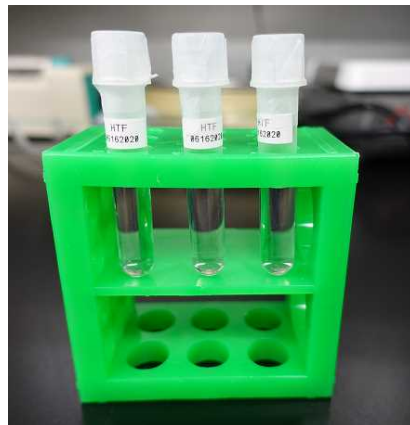
② 室温保存の試薬を秤量し、Stock sol.に加える。

改変HTFの調整



③他の試薬を完全に溶解した後、左の写真のようにBSAを液面にのせ、自然に溶けるまで待つ。

ポイント：
BSAは室温に戻してから使用する。



④0.25 μm のフィルターで濾過滅菌する。tubeにパラフィルムを巻き、4°C保存する。

ポイント：
3週間を目安に次を調整する。

補足

・アンプル封入のやり方

《用意するもの》

窒素ガス

アンプル
〔洗浄後、
乾熱滅菌〕



シリンジ、注射針、フィルター

ブローワー（エアークラウド）



熔閉器

補足

・アンプル封入のやり方

《封入手順》



①分注

濾過滅菌しながら分注（口に液体を付けないように注意）



②窒素ガス充填

アンプル内の空気を置き換えるように、ゆっくり吹き込む



③熔閉

アンプルの先を十分に熱し、ピンセットで引いて、焼き切る



④完成

完全に閉じていることを確認

※アンプル入りHTFは、4°Cで約1年間保存可能

作成者

- 遺伝工学基盤技術室
- 質問などの連絡先
長谷川歩未：ayumi.hasegawa@riken.jp