

National BioResource Project (NBRP) methods

ゼブラフィッシュ精子凍結保存法

この凍結方法は、自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンスセンター 分子発生学 研究部門 内海様、越田先生、高田先生が開発した方法を基にナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)・ゼブラフィッシュが作成した方法です。論文等に記載する際には、NBRP・ゼブラフィッシュの明記をお願いいたします。

freezing sperm

準備するもの

- ・ 2ml セラムチューブ (IWAKI 2.0ml/vial 2782-002)
- ・ 15ml 遠沈管 (CORNING 430766)
- ・ 50ml 遠沈管 (CORNING 430291)
- ・ ライフロンチューブ 内径 8mm×外径 11.5mm (コクゴ)
- ・ 発泡スチロール箱 内寸 W160×D230×H150mm、外寸 W190×D265×H205mm (蓋込)
- ・ 50ml 用ステンレス製チューブ立て
- ・ 液体窒素
- ・ 0.5ml マイクロチューブ
- ・ 0.5ml マイクロチューブ用ホモジナイザーペッスル
- ・ 20 μ l ガラスキャピラリー (HIRSCHMANN LABORGERATE minicaps 20 μ l)
- ・ 精密ピンセット
- ・ はさみ
- ・ 注射針
- ・ 解剖台 (SYLGARD, Dow Corning Toray, Co. Ltd.)
- ・ 顕微鏡

試薬

- ・ 麻酔液¹⁾
Ethyl 3-aminobenzoate methanesulfonate salt (SIGMA A5040) 別名 : MS-222, Tricaine

MS-222 400mg を DW 98ml に溶かし、1M Tris (pH9) で pH7 に調整し、100ml にする (麻酔ストック液)。

麻醉ストック液 4.2ml に魚を飼育している水を加え 100ml にし、麻醉液とする。

・ 凍結液 (10%DMF-FBS)²⁾

standard Fetal Bovine Serum (FBS/Hyclone)

N, N-Dimethylformamide (DMF/nacalai)

0.5ml マイクロチューブに 90 μ l FBS と 10 μ l DMF を入れ、氷上で冷やす。

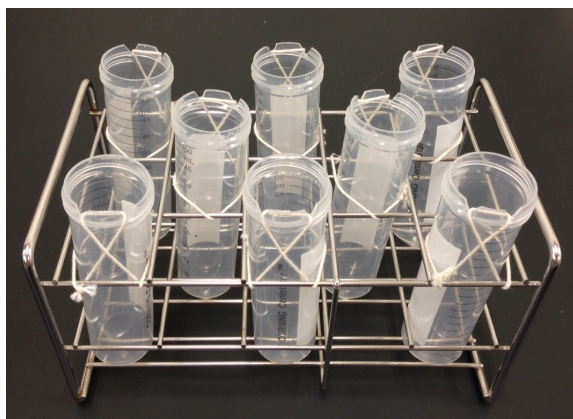
凍結液は、凍結する雄魚の数に合わせて作成する。

雄魚

- ・ 凍結保存予定日の一週間前に雌魚から隔離する。

手順

- (1) 液体窒素に入れた時に 50ml 遠沈管が浮かないように、ステンレス製チューブ立てに糸でくくりつける (図 1)。ライフロンチューブを長さ 4cm にカットする。室温は 20 $^{\circ}$ C 前後にする。

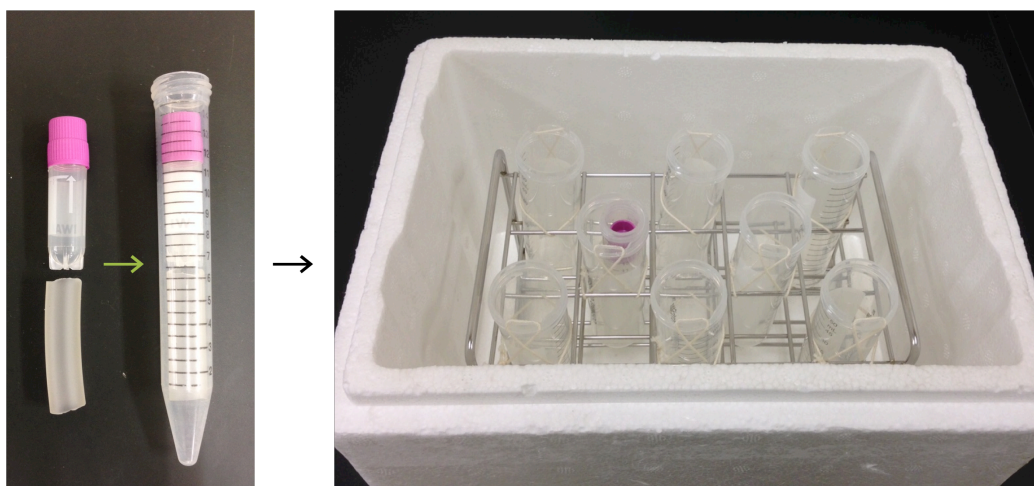


(図 1)

- (2) 発泡スチロール箱にチューブ立て (図 1) を入れ、液体窒素を入れる。この時、50ml 遠沈管に液体窒素が入らないように気をつける。発泡スチロールのフタを閉め、フタの上に重り (約 2 kg) をおく。重りを置くことにより液体窒素の冷気の漏れを防ぐ。20 分以上静置し、50ml 遠沈管を冷やす。
- (3) 雄魚を麻醉液に入れ、麻醉をかける。
- (4) 麻醉液から魚を出し、キムワイプで体表を拭く。解剖台に魚を置き、顕微鏡下にてはさみで正中線に沿って開腹する。魚の体を注射針で固定し、ピンセットで精巣を

摘出する。この時、水の混入による精子の活性を防ぐ為、前もってピンセットの先端を10%DMF-FBSで共洗いしておく。摘出した精巢を凍結液にいれ、ホモジナイザーペッスルで破碎し(精巢懸濁液)、氷上に置く。

- (5) 精巢懸濁液を10 μ l ずつガラスキャピラリー9本に分注する。分注したキャピラリーは懸濁液注入側を上にして2ml セラムチューブに入れる。注入側を下にすると懸濁液が漏れてしまうので注意する。
- (6) ライフロンチューブを入れた15ml 遠沈管に2ml セラムチューブを入れ、その15ml 遠沈管を液体窒素で冷やしておいた50ml 遠沈管に入れる(図2)。発泡スチロールのフタを閉め、冷気の漏れを防ぐため、フタに重り(約2kg)を置く。なお、衝撃により懸濁液がガラスキャピラリーから漏れるのを防ぐため、全ての作業を優しく行うこと。



(図2)

- (7) 液体窒素の気相中で20分冷却し、凍結終了となる。液体窒素保存容器またはフリーザー(-150 $^{\circ}$ C)で保存する。

*10%DMF-FBSには精子の動きを完全に止める作用はない為、(4)~(7)の作業は速やかに行うこと。また、サンプルを発泡スチロール箱に入れたら凍結完了(20分間)までフタをあげないこと。

in Vitro Fertilization

準備するもの

- ・凍結精子サンプル
- ・シャーレ(φ90×15mm)
- ・プラスチックスプーン
- ・マイクロピペット

試薬

- ・Hank's 液(0.137M NaCl, 5.4mM KCl, 0.25mM Na₂HPO₄, 0.44mM KH₂PO₄, 1.3mM CaCl₂, 1.0mM MgSO₄, 4.2mM NaHCO₃)
- ・麻酔薬¹⁾
- ・メチレンブルー液
飼育水 500ml +メチレンブルー 約 30μl (スポイト一滴、水溶液が色づく程度)

雌魚

- ・人工受精予定日の一週間前に雄魚から隔離する。

手順

- (1) 麻酔液に雌魚を入れ、麻酔をかける。
- (2) 麻酔液から魚を出し、キムワイプで優しく拭く。(拭いているときに卵が出てしまう事がある為優しく拭く事。)
- (3) 魚を Hank's 液にくぐらせ、再度キムワイプで優しく拭く。特に産卵口はよく拭くこと。未受精卵に水が触れると卵膜があがり受精を妨げるので注意する。
- (4) シャーレ上で雌魚のお腹を胸びれから尾に向かって、指で優しく押し、卵を出す。この時、指を Hank's 液で少し湿らせておくと指の滑りがよく、魚を傷つけにくい。魚のお腹に卵の準備ができていれば軽く押しただけで卵が出てくる。軽く押ししても卵が出てこない場合は魚を傷つける危険性があるので作業を止める。
- (5) 受精可能な卵が出てきたら、プラスチックスプーンで卵を傷つけないように集め、

雌魚を水槽に戻す。液体窒素中にある 2ml セラムチューブの中からガラスキャピラリー 1 本を取り出し自然解凍する。精巢懸濁液が溶けたら、マイクロピペットで吸い出し、卵にかける。

(6) メチレンブルー液 800 μ l を卵と精子にかけ、精子を活性化させ、受精を促す。

(7) 卵膜が膨らんできたらシャーレの半分程度メチレンブルー液を加え、28 $^{\circ}$ Cインキュベーターに入れる。

(8) 数時間後、受精を確認し、受精卵を回収する。

* 卵が乾燥するのを防ぐ為、(5)(6)の作業を速やかに行うこと。

参考文献

1) Westerfield, M, (2000)

“The zebrafish book” 4th ed., Univ. of Oregon Press, Eugene.

2) Aoki K., Okamoto M., Tatsumi K. and Ishikawa Y. (1997) ZOOLOGICAL SCIENCE 14: 641-644

Cryopreservation of Medaka Spermatozoa