[マウス凍結胚　融解プロトコル]

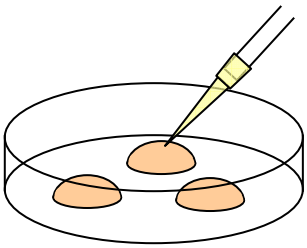
① 準備

融解液の準備 ：

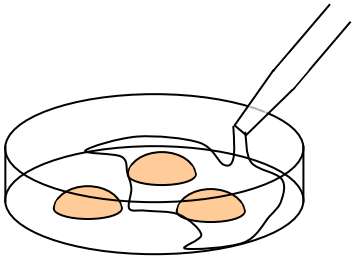
0.25M Sucrose 溶液を保温器やインキュベーター等で 37℃に加温しておく。

融解用ディッシュの作製 ：

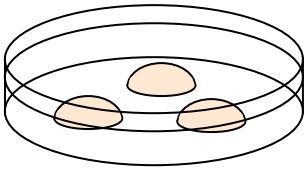
ディッシュに胚培養液（HTF、KSOM など）のドロップを 3 個（1 個 100μl 程度）作製し、流動パラフィンオイル（軽質）で覆う。融解用ディッシュを炭酸ガスインキュベーター（37℃、水蒸気飽和 5%CO_2）に 30 分～2 時間静置し、ガス平衡を行う。融解するチューブと同数の融解用ディッシュを準備する。



100μl の培地を 3 ドロップ、ディッシュ上に置く。



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、インキュベーター内で 30 分以上静置。ガス平衡後使用する。

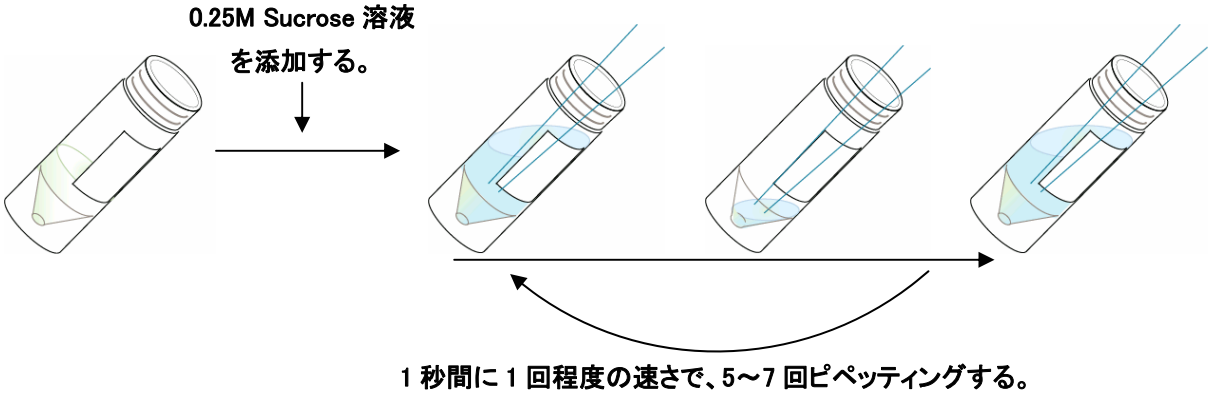
② 凍結胚が保存されたチューブを液体窒素容器から取りだした後（液体窒素が残っていたら捨てる）、直ちにフタをはずし、チューブ内の液体窒素を捨て、室温で 30 秒間、台に置いて静置（時間厳守）。

＊チューブの底は持たないようにし、体温等で内容物が溶けないようにする。

＊融解を始めたら、胚培養液に移すまでの作業をすばやく行う。ただし、ピペッティングはゆっくりやさしく。

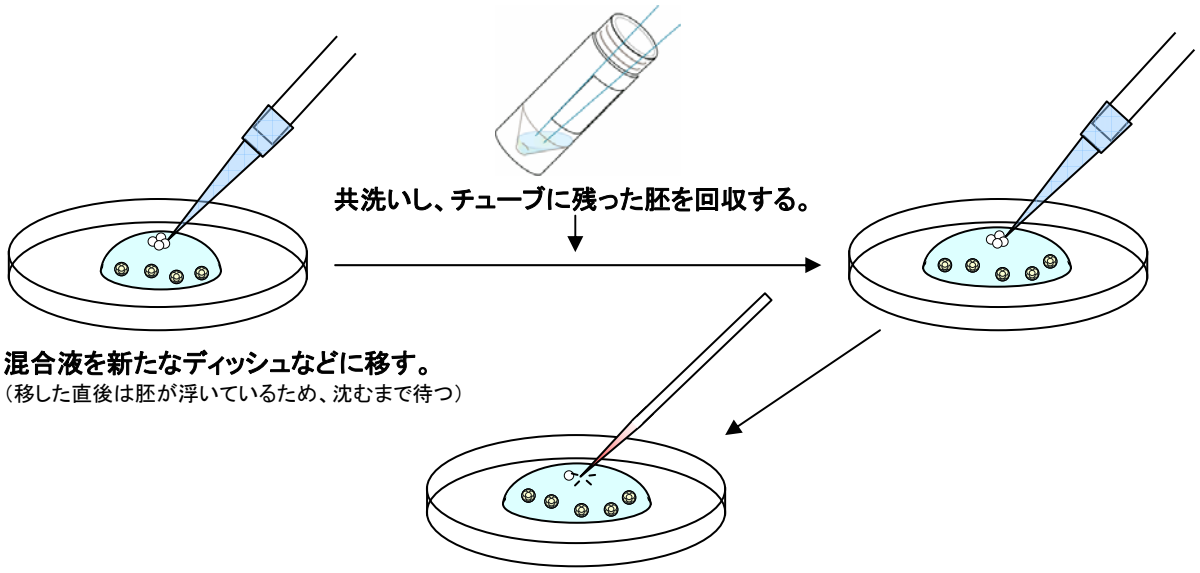
③ 37℃に加温しておいた 0.25M Sucrose 溶液を、マイクロピペットでチューブ内へ 0.9ml 添加し、完全に保存液が溶けるまで 1 秒間で 1 回となるようにゆっくりとピペッティング（5～7 回程度）する。

＊融解した保存液は、胚に対してきわめて毒性が強いため、チューブ内に Sucrose 溶液を添加してピペッティングする作業は迅速に行わなければならない。本工程は、良好な胚の生存性を維持するためにきわめて重要である。



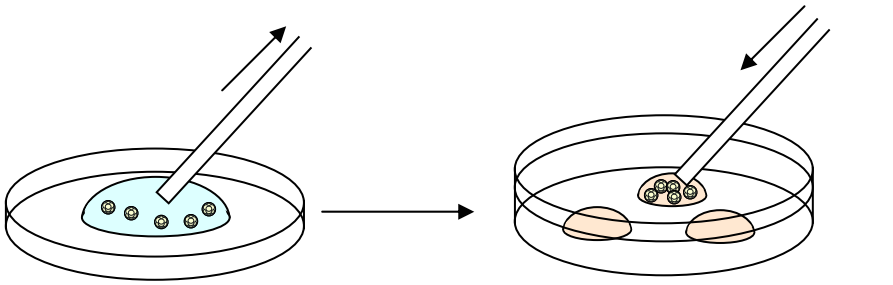
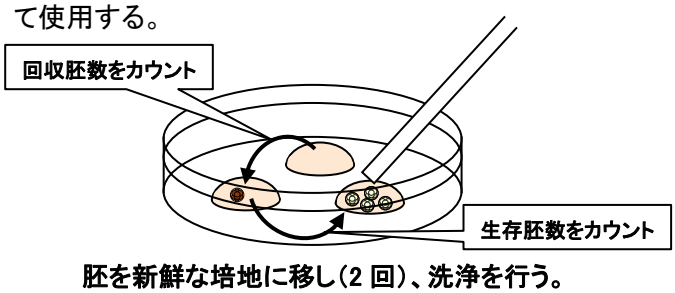
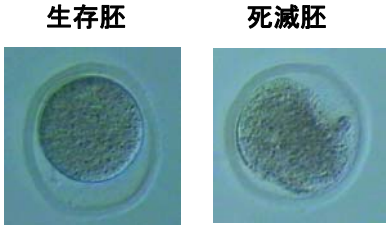
④ マイクロピペットを用いて、保存液と 0.25M Sucrose 溶液との混合液を新たなディッシュなどに移し（できるだけ泡が立たないようにする）、胚を回収する。さらに、チューブ内を 0.4～0.5ml の 0.25M Sucrose 溶液で共洗いし、先に移した混合液に加える。

＊溶解液をディッシュ等に移した際に液表面に泡沫ができてしまった場合は、胚を回収する際の妨げになるため、解剖針などの先端を熱したものをあてる、などの方法を用いて泡沫を消失させる（胚に熱が移らないよう、すばやく行う）。



⑤ 溶解液より胚を回収し、1 個の胚培養液ドロップに導入して、炭酸ガスインキュベーター内で 10 分間静置する。

＊胚の移動時は、胚のみを移動させるようにし、できるだけ保存液が次のドロップに移らないようにする。



⑥ 10 分後、胚を 1 個目のドロップから 2 個目のドロップに移し、さらに 2 個目のドロップから生存胚（死滅胚は割球の一部もしくは全てが褐色になっている）を 3 個目のドロップに移す。その後は研究目的に合わせて使用する。