



コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO., LTD.

取扱い説明書

ブタ体外受精卵生産用培養基本キット

製品番号 : CK029

-本品は、研究目的にのみご使用ください。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないでください。-

- 本マニュアルをご精読のうえ、研究目的にのみご使用ください。 -

www.cosmobio.co.jp

本キットは、卵子・胚回収液(POE-CM)、卵子成熟用基本培地(POM)、媒精液(PFM)、培養胚発生用培地(PZM-5)、dbcAMP濃縮液、リプロプレートから成るブタ体外受精卵生産用培養基本セットです。

低酸素培養(5%O₂/5%CO₂/90%N₂、39°C)のもと、卵丘/顆粒膜細胞との共培養を必要としない条件(裸化胚)で、移植可能胚(胚盤胞)を効率よく生産できます。

《 I . キット内容 》

- 1) ブタ卵子・胚回収液: POE-CM(CK020), 100 ml×3 本
- 2) ブタ卵子成熟用基本培地: POM(CK021), 25 ml×2 本
- 3) ブタ媒精液: PFM(CK023), 100 ml×1 本
- 4) ブタ培養胚発生用培地: PZM-5(CK024), 25 ml×1 本
- 5) dbcAMP濃縮液(100 倍液): dbcAMP-100×(CK027), 0.3 ml×1 本
- 6) リプロプレート(CK028), 10 枚×3 パック

〈その他必要器材〉

- 1) PBS(-)または滅菌生理食塩水(0.9%)
- 2) ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン(eCG): エール薬品、ピーメックス(1,000 IU)
- 3) ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG): エール薬品、プベローゲン(5,000 IU)
- 4) 流動パラフィン(ミネラルオイル): メルク(107162)
- 5) パーコール: GEヘルスケア バイオサイエンス(17-0891-02)
- 6) 媒精用精液希釈液(5 倍液): SEM-5×(CK026,コスモ・バイオ)
- 7) 培養ディッシュ
 - ・ 35 mm 培養ディッシュ: greiner bio-one(627160)
 - ・ ペトリディッシュ: FALCON(1112)
- 8) 遠心管(15 ml, 50 ml)
- 9) ディスポーザブルシリンジ(10 ml)
- 10) 注射針(18G)
- 11) ピペット
- 12) ガラスキャピラリーピペット
- 13) 吸引チューブ
- 14) ストローカッター
- 15) トーマ血球計算盤
- 16) 実体顕微鏡
- 17) マルチガスインキュベーター
- 18) クリーンベンチ
- 19) 遠心機
- 20) 恒温槽
- 21) マイクロウォームプレート
- 22) ボルテックスミキサー
- 23) その他

《Ⅱ. 試薬の調製法》

☆ 性腺刺激ホルモンストック液(eCG, hCG 各 1,000 IU/ml)の調製(100×)

- 1) 2,000 IU/ml eCG
eCG(1,000 IU/管)を1管あたり0.5 mlのPOM培地で溶解する。
- 2) 2,000 IU/ml hCG
hCG(5,000 IU/管)を1管あたり2.5 mlのPOM培地で溶解する。
- 3) eCG, hCG(各 1,000 IU/ml)
2,000 IU/ml eCGと2,000 IU/ml hCGを等量混合し、70 ulずつ分注して、-30°Cで保存する。

☆ 媒精用精液希釈液(5倍液): SEM-5×*

組成	SEM-5×
Glucose	137.50 g/L
Na-citrate・2H ₂ O	34.50 g/L
Citric acid・H ₂ O	14.50 g/L
NaHCO ₃	5.00 g/L
EDTA・2Na・2H ₂ O	11.75 g/L
Tris (TRIZMA BASE)	28.25 g/L
Gentamicin	0.05 g/L

0.22 um フィルターで濾過滅菌後、分注して、-30°Cで保存する。

*別売製品<媒精用精液希釈液(5倍液/SEM-5X)品番:CK026>は滅菌済みですので、すぐご利用になれます。

☆ 等張パーコール液

組成	80%パーコール液	50%パーコール液
パーコール	1.6 ml	1 ml
ミリQ水	-	0.6 ml
SEM-5×	0.4 ml	0.4 ml

要時調製。

《Ⅲ. 培地の調製》

☆ ブタ卵子成熟用基本培地(POM)の調製

- ・ 1st POM 培地: POM+1 mM dbcAMP+10 IU/ml eCG+10 IU/ml hCG

1st POM 培地(要時調製)

- 1) POM 培地 4.95 ml に dbcAMP 濃縮液(100 倍液) 50 ul を添加して 1 mM dbcAMP 溶液を調製する(全量 5 ml)。
- 2) 1)で調製した 1 mM dbcAMP 溶液から 50 ul を除去する(全量 4.95 ml)。
- 3) 2)で調製した 1 mM dbcAMP 溶液 4.95 ml に性腺刺激ホルモンストック液 50 ul を添加する(1st POM 培地)。

①卵子洗浄用: 1st POM(200 ul) + ミネラルオイル(約 100 ul)

②成熟培養用: 1st POM(150 ul) + ミネラルオイル(約 150 ul)

- ・ 2nd POM 培地: POM 培地(基本培地)

③卵子洗浄用: POM(200 ul) + ミネラルオイル(約 100 ul)

④成熟培養用: POM(150 ul) + ミネラルオイル(約 150 ul)

☆ ブタ媒精液(PFM)の調製

⑤卵子洗浄用: PFM(200 ul) + ミネラルオイル(約 100 ul)

⑥媒精用: PFM(50 ul) + ミネラルオイル(約 200 ul)

☆ ブタ培養胚発生用培地(PZM-5)の調製

⑦胚洗浄用: PZM-5(200 ul) + ミネラルオイル(約 100 ul)

⑧胚発生培養用: PZM-5(50 ul) + ミネラルオイル(約 200 ul)

※ 必要数のドロップをリプロプレートに作成し、あらかじめインキュベーター内(39°C, 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂)で気相平衡しておく。

《IV. ブタ胚の体外生産法》

1. 卵子の採取と成熟培養法

- 1) 屠場で採取したブタ卵巣を室温(約 25°C)の PBS(-)または滅菌生理食塩水で数回洗浄し、直径 3~6 mm の卵胞から卵子を吸引採取する。
- 2) 吸引した卵子を含む卵胞液は、遠心管中に集めて 20 分間静置する。
- 3) 上清を取り除き、室温に戻した POE-CM 培地で沈査を希釈してペトリディッシュに分注し、実体顕微鏡下で卵丘細胞が 2~3 層以上付着した卵子を回収・選抜する(写真 1)。
- 4) 選抜した卵子は、リッププレートに調製しておいた 1st POM 培地(①)で 2 回洗浄し、培養用の 1st POM 培地(②)に 1 ドロップあたり 15~20 個ずつ入れて 20~22 時間成熟培養する。
- 5) 成熟培養開始 20~22 時間後、リッププレートに調製しておいた 2nd POM 培地(③)で卵子を 3 回洗浄し、成熟培養用 2nd POM 培地のドロップ(④)に移してさらに 22~24 時間成熟培養する。

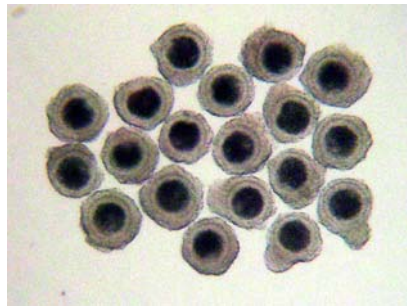


写真 1: 回収直後の卵丘-卵子複合体

2. 精子の処理と体外受精法

- 1) PFM 培地(約 20 ml)、80%および 50%等張パーコール液を 38°Cの恒温槽で保温する。
- 2) 凍結精液*1 のストローを 38°Cの温水で融解し、50%パーコール液中に懸濁する。
- 3) 懸濁した精液は 80%パーコール液の上に静かに重層し、遠心機で 700 × g、20 分間遠心する(35°Cまたは室温でも可)。
- 4) 下部の精子を残して上清をアスピレーターで除去した後、約 7 ml の PFM 培地を加えて軽く転倒混和し、遠心機で 500 × g、5 分間遠心する。
- 5) 4)を繰り返す。
- 6) 上清を除去し、約 0.5~1 ml の PFM 培地を加えて懸濁後、血球計算盤等で精子数を計測する。
- 7) 精子濃度が $2\sim 20 \times 10^6/\text{ml}^{*2}$ になるように PFM 培地で希釈する。
- 8) リッププレートに調製し、気相平衡しておいた PFM 培地のドロップ(⑥)に、濃度調整した精子懸濁液を 50 ul ずつ加える(最終精子濃度 $1\sim 10 \times 10^6/\text{ml}^{*2}$)。
- 9) 体外成熟後の卵子は、リッププレートに調製しておいた PFM 培地(⑤)で 2 回洗浄後、精子を含むドロップに 15~20 個ずつ導入し、10~20 時間*2 媒精する。

*1 液状精液を使用する場合の精子の調整法については、弊社までお問い合わせください。

*2 精子によって受精に至適な精子濃度および媒精時間は異なります。予備試験を行い、適切な条件を確認してください。

3. 胚の体外発生培養法

- 1) 媒精後の胚は、38°Cに保温した POE-CM 培地で 1 回洗浄した後、POE-CM 培地(1 ml)の入った 15 ml 遠心管に移し、ボルテックスミキサーで 4 分間攪拌混合することにより卵丘細胞を除去する。
- 2) 遠心管から裸化胚(写真 2)を回収する。卵丘細胞が強固に付着している胚や細胞質が変性した胚は取り除く。
- 3) 選抜した胚は、POE-CM 培地で 2 回洗浄後、リプロプレートに調製しておいた PZM-5 培地(⑦)で 2 回洗浄する。
- 4) リプロプレートに調製しておいた PZM-5 培地のドロップ(⑧)に胚を 20~30 個ずつ入れて培養すると、媒精後 4~5 日で桑実胚~胚盤胞へ発育する(写真 3)。

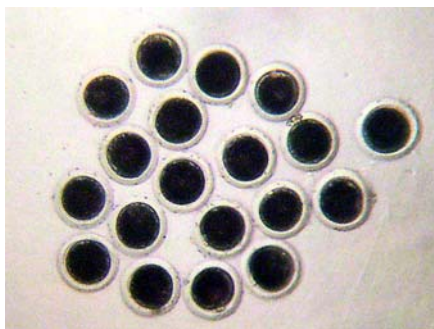


写真 2: 裸化後の胚

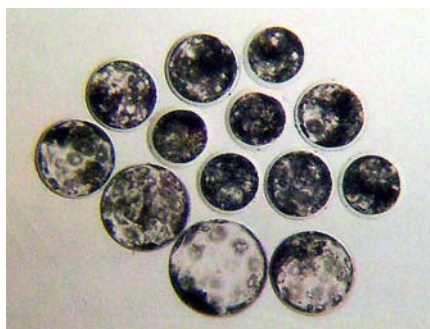
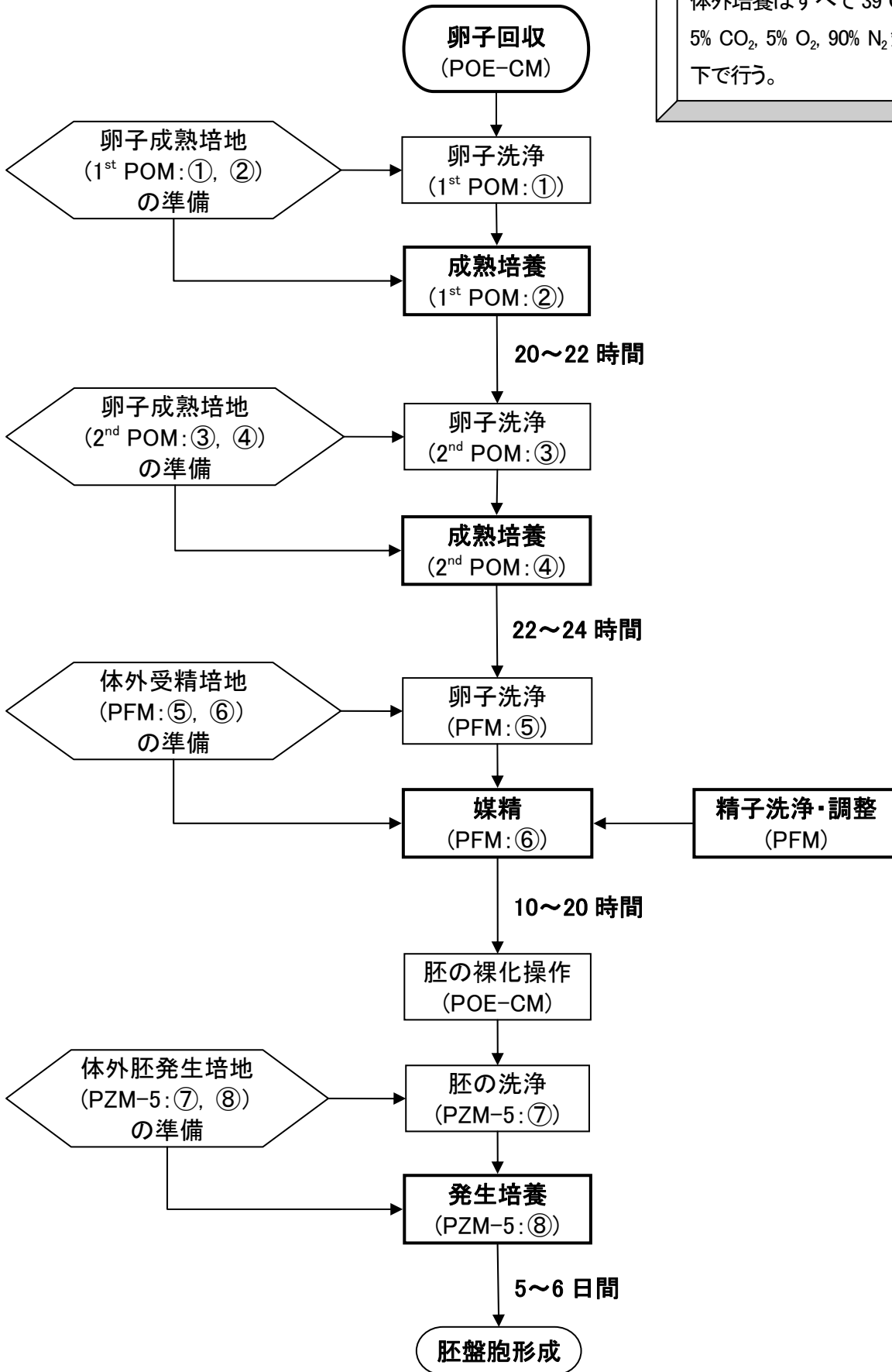


写真 3: 胚盤胞

ブタ体外生産胚の作製工程

体外培養はすべて 39°C,
5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂ 気相
下で行う。



〈 培地使用上の注意 〉

1. 培地はブタ卵子又は胚の体外培養専用です。他の動物では試験を行っておりません。
2. ヒト体外受精には絶対に使用しないでください。
3. 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4ヶ月間。使用期限厳守。
6. 万一、製造過程での不備がありました場合には、代替品とお取替え致します。それ以外の責はご容赦
お願い致します。
7. 本品の使用により、必ずしも一定以上の胚発生率を保障するものではありません。

〈 参考文献 〉

- 1) 曾根勝, 知久幹夫, 吉田光敏, 番場公雄, 小笠晃. 各種希釈保存液を用いた豚液状精液の長期保存試験.
日豚会誌 1992; 29: 41-50.
- 2) Mito T, Yoshioka K, Nagano M, Suzuki C, Yamashita S, Hoshi H. Transforming growth factor- α in a defined medium during in vitro maturation of porcine oocytes improves their developmental competence and intracellular ultrastructure. Theriogenology 2009; 72: 841-850.
- 3) Suzuki C, Yoshioka K. Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. Reprod Fertil Dev 2006; 18: 789-795.
- 4) Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, Takahashi M. Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and in vitro development of porcine preimplantation embryos. Zygote 2007; 15: 317-324.
- 5) Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. Biol Reprod 2002; 60: 112-119.
- 6) Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. Biol Reprod 2003; 69: 2092-2099.
- 7) Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. J Reprod Dev 2008; 54: 208-213.
- 8) Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Hoshi H. Recombinant human follicle-stimulating hormones and transforming growth factor-alpha enhance in vitro maturation of porcine oocytes. Mol Reprod Dev 2013; 80: 549-560.



〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

● 営業部 (お問い合わせ)
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620



Basic Culture Kit for Porcine Embryos in vitro

Catalog No. : CK029

For research use only, Not for diagnostic use.

- Please read this manual thoroughly before use -

www.cosmobio.co.jp

This kit is a basic culture kit for porcine embryos in vitro containing porcine oocyte/embryo collection medium (POE-CM), basic medium for porcine oocyte maturation (POM), porcine fertilization medium (PFM), defined medium for porcine embryos (PZM-5), dbcAMP concentrated solution-100X (dbcAMP-100X) and Reproplate.

This kit can efficiently produce transferable embryos (blastocysts) under a low oxygen condition (5%O₂/5%CO₂/90%N₂, 39°C) without the coculture of cumulus/granulose cells.

《I. Kit components 》

- 1) Porcine oocyte/embryo collection medium : POE-CM(Cat.# CK020), 100 ml x 3
- 2) Basic medium for porcine oocyte maturation : POM(Cat.# CK021), 25 ml x 2
- 3) Porcine fertilization medium : PFM(Cat.#CK023), 100 ml
- 4) Defined medium for porcine embryos : PZM-5(Cat.# CK024), 25 ml
- 5) dbcAMP concentrated solution-100X : dbcAMP-100X(Cat.# CK027), 0.3 ml
- 6) Reproplate : (Cat.# CK028), 10 plates x 3

〈Necessary Equipments and Reagents〉

- 1) Sterile PBS (-) or saline solution (0.9%)
- 2) Equine chorionic gonadotropin (eCG; 1,000IU): Yell pharmaceutical co., Ltd.
- 3) Human chorionic gonadotropin (hCG; 5,000IU): Yell pharmaceutical co., Ltd.
- 4) Paraffin liquid reagent(Mineral oil): Merk chemicals (Cat. No.: 107162)
- 5) Percoll: GE Healthcare UK Ltd. (17-0891-02)
- 6) Sperm diluent for in vitro fertilization (SEM-5X): COSMO BIO Co., Ltd (Cat. No.: CK026)
- 7) Culture dish
 - 35 mm culture dish: Greiner bio-one (627160)
 - Petri Dish: FALCON (1112)
- 8) Centrifuge tube (15 ml, 50 ml)
- 9) Disposable syringe (10 ml)
- 10) Syringe needle (18 G)
- 11) Pipette
- 12) Glass capillary pipette
- 13) Aspiration tube
- 14) Straw cutter
- 15) Hemacytometers, Thoma
- 16) Stereomicroscope
- 17) Multi-gas incubator
- 18) Clean bench
- 19) Centrifuge
- 20) Thermostat bath
- 21) Micro thermo plate
- 22) Vortex mixer
- 23) Others

〈Storage〉

Stored at 4°C in a dark room. Do not freeze.

〈Expiration date〉

The expiration date is shown on the label of the box (4 months after the preparation).

《 II . Reagent preparation 》

☆ Preparation of Gonadotropin stock solutions (100X) (eCG, hCG each 1,000 IU/ml)

1) 2,000 IU/ml eCG solution

Add and dissolve eCG powder (1,000 IU/tube) in 0.5 ml POM medium.

2) 2,000 IU/ml hCG solution

Add and dissolve hCG powder (5,000 IU/tube) in 2.5 ml POM medium.

3) eCG and hCG (each 1,000 IU/ml) mixed solution

Mix equivalent of 2,000 IU/ml eCG and 2,000 IU/ml hCG and then, dispense 70 ul each and store at - 30°C.

☆ Sperm diluent for in vitro fertilization (SEM-5X*)

Composition	SEM-5X
Glucose	137.50 g/L
Na-citrate · 2H ₂ O	34.50 g/L
Citric acid · H ₂ O	14.50 g/L
NaHCO ₃	5.00 g/L
EDTA · 2Na · 2H ₂ O	11.75 g/L
Tris (TRIZMA BASE)	28.25 g/L
Gentamicin	0.05 g/L

Dispense and store at -30°C after filter sterilization with 0.22 um filter.

*“Sperm diluent for in vitro fertilization (SEM-5X) (Cat.No. : CK026)” is ready to use.

☆ Preparation of isotonic Percoll solution

Composition	80% Percoll solution	50% Percoll solution
Percoll	1.6 ml	1 ml
MilliQ water	-	0.6 ml
SEM-5x	0.4 ml	0.4 ml

Prepare just before use.

《 III. Medium preparation 》

☆ Preparation of basic medium for porcine oocyte maturation (POM)

- 1st POM medium : POM + 1 mM dbcAMP + 10 IU/ml eCG + 10 IU/ml hCG

1st POM medium (Prepare just before use)

- 1) Add 50 ul dbcAMP-100X to 4.95 ml POM medium (1 mM dbcAMP solution, Total 5 ml).
- 2) Remove 50 ul of 1 mM dbcAMP solution (Total 4.95 ml)
- 3) Add 50 ul Gonadotropin stock solution to 4.95 ml, 1 mM dbcAMP solution (1st POM medium, Total 5 ml).

- ① Oocyte washing : 1st POM (200 ul) + Mineral oil (about 100 ul)
- ② Oocyte maturation : 1st POM (150 ul) + Mineral oil (about 150 ul)

• 2nd POM medium : POM medium (Basic medium)

- ③ Oocyte washing : POM (200 ul) + Mineral oil (about 100 ul)
- ④ Oocyte maturation : POM (150 ul) + Mineral oil (about 150 ul)

☆ Preparation of porcine fertilization medium (PFM)

- ⑤ Oocyte washing : PFM (200 ul) + Mineral oil (about 100 ul)
- ⑥ In vitro fertilization : PFM (50 ul) + Mineral oil (about 200 ul)

☆ Preparation of defined medium for porcine embryos (PZM-5)

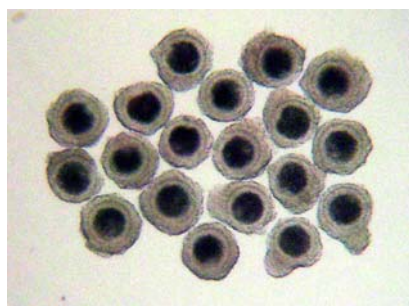
- ⑦ Embryo washing : PZM-5 (200 ul) + Mineral oil (about 100 ul)
- ⑧ Embryo culture : PZM-5 (50 ul) + Mineral oil (about 200 ul)

* Prepare the given number of medium drops in the Replate and set the gas-phase equilibrium in a incubator (39°C, 5%CO₂,5%O₂,90%N₂) before the culture.

《IV. In vitro production of porcine embryos》

1. Oocyte collection and oocyte maturation culture

- 1) Wash porcine ovaries several times with PBS (-) or saline at room temperature (about 25°C) and collect cumulus-oocyte complexes (COCs) by aspirating from ovarian follicles (diameter=3-6 mm).
- 2) Transfer the follicular fluid containing COCs to centrifuge tube and stand it for 20 min.
- 3) Remove the supernatant and dilute the precipitation with POE-CM medium at room temperature. Dispense the precipitate to Petri dish. Harvest and select the oocytes that the cumulus cells adhere to more than two or three layers (cumulus-oocyte complexes;COCs) under the stereomicroscope (Picture 1).
- 4) Wash the selected COCs twice with 1st POM medium (①) prepared in Reproplate. Put 15-20 COCs in one drop of 1st POM medium (②) and then, incubate for 20-22 hours.
- 5) Wash the COCs three times with 2nd POM medium (③) prepared in Reproplate after 20-22 hours of the maturation culture. Transfer the COCs into the drop of 2nd POM medium (④) and incubate for additional 20-24 hours.



Picture 1 : Cumulus-oocyte complexes (COCs) just after the collection

2. Sperm preparation and in vitro fertilization

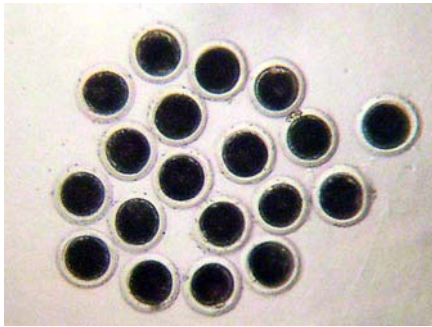
- 1) Keep warm PFM medium (about 20 ml) and 80% and 50% isotonic Percoll solution in a thermostat bath at 38°C.
- 2) Thaw frozen sperm*1 in the straw with warm water at 38°C. Suspend them into 50% Percoll solution.
- 3) Overlay the sperm suspension gently on the top of 80% Percoll solution. Then, centrifuge at 700 x g for 20 min (35°C or room temperature).
- 4) Aspirate the supernatant and add about 7 ml PFM medium to it and gently mix. Centrifuge it at 500 x g for 5 min.
- 5) Repeat 4).
- 6) Aspirate the supernatant and add 0.5-1 ml PFM medium to it and mix. Count the numbers of sperm with a hemacytometer.
- 7) Dilute sperm suspension with PFM medium at the concentrations of 2-20×10⁶/ml*2.
- 8) Prepare the drops of gas-phase equilibrated PFM medium (⑥) in the Reproplate and add 50 ul of sperm suspension (final sperm concentrations: 1-10×10⁶/ml*2) in each drop.
- 9) Wash the COCs twice with PFM medium (⑤) in the Reproplate after the in vitro maturation. And then, transfer 15-20 COCs into the drop containing sperm suspension and incubate for 10~20 hours*2.

*1 Please contact us if you would like to use fresh spermatozoa.

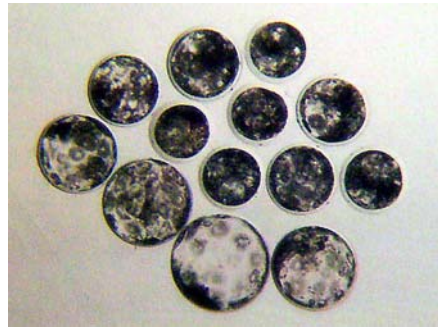
*2 The optimal sperm concentration and the incubation time of insemination are variable for different sperm preparation. Please make sure to determine these appropriate conditions before the experiments.

3. Embryo culture in vitro

- 1) Wash fertilized oocytes once with POE-CM medium at 38°C after in vitro fertilization. Transfer them into 1ml POE-CM medium of 15 ml centrifuge tube and remove cumulus cells of them by mixing with vortex mixer for 4 min.
- 2) Collect the denuded embryos (Picture 2) from centrifuge tube. Remove the fertilized oocytes with strongly attached cumulus cells and/or with degenerated cytoplasm.
- 3) Wash the selected fertilized oocytes twice with POE-CM medium. Wash them twice with PZM-5 medium (⑦) in the Reproplate.
- 4) Transfer 20-30 embryos into each drop of PZM-5 medium(⑧) in the Reproplate and incubate them. They develop to morula and blastocyst after 4-5 days after in vitro fertilization (Picture 3).

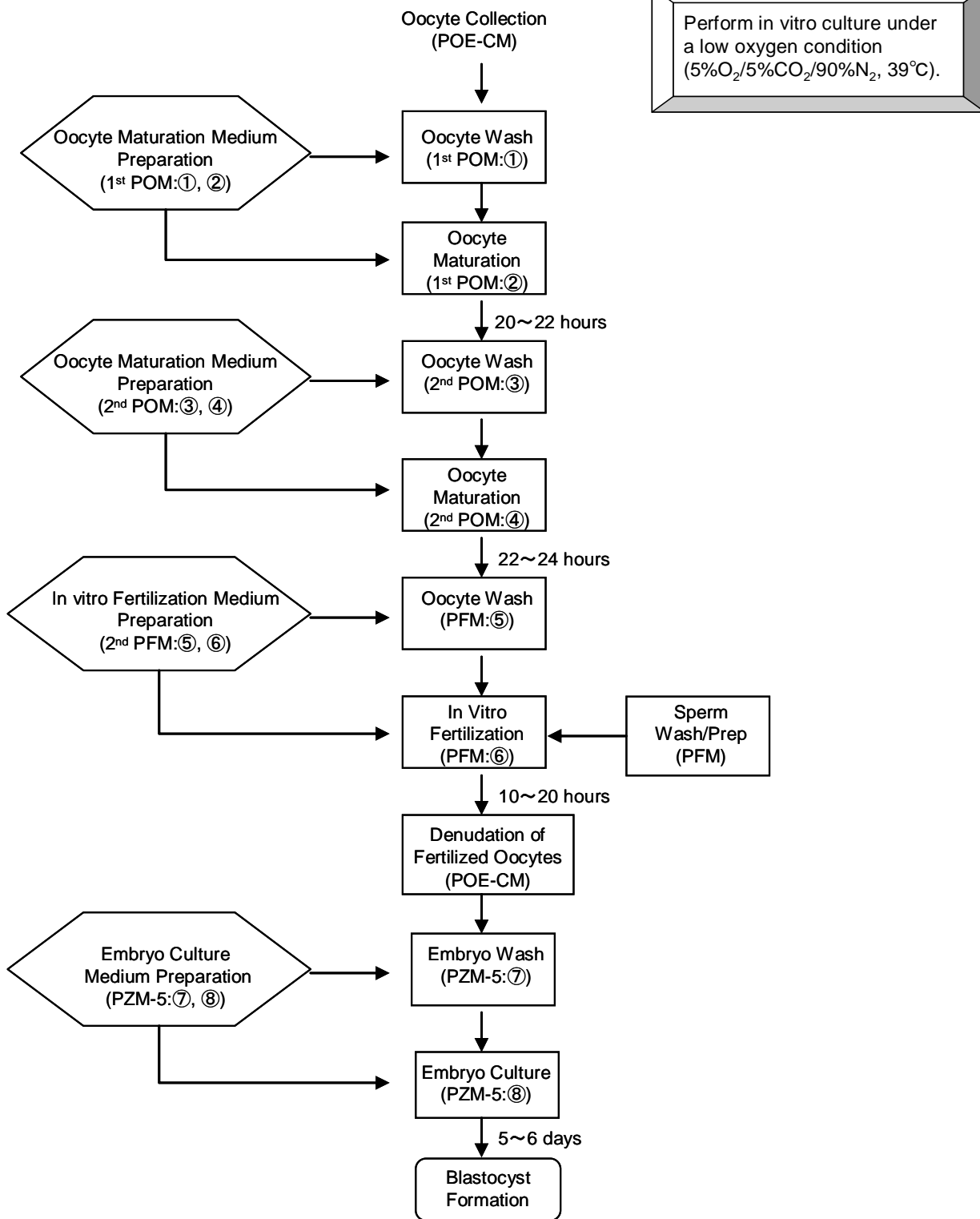


Picture 2 : Denuded embryos



Picture 3 : Blastocysts

Process of porcine embryo culture in vitro



< Reference >

- 1) Mito T, Yoshioka K, Nagano M, Suzuki C, Yamashita S, Hoshi H. Transforming growth factor- α in a defined medium during in vitro maturation of porcine oocytes improves their developmental competence and intracellular ultrastructure. *Theriogenology* 2009; 72: 841-850.
- 2) Suzuki C, Yoshioka K. Effects of amino acid supplements and replacement of polyvinyl alcohol with bovine serum albumin in porcine zygote medium. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18: 789-795.
- 3) Suzuki C, Yoshioka K, Sakatani M, Takahashi M. Glutamine and hypotaurine improves intracellular oxidative status and in vitro development of porcine preimplantation embryos. *Zygote* 2007; 15: 317-324.
- 4) Yoshioka K, Suzuki C, Tanaka A, Anas IMK, Iwamura S. Birth of piglets derived from porcine zygotes cultured in a chemically defined medium. *Biol Reprod* 2002; 60: 112-119.
- 5) Yoshioka K, Suzuki C, Itoh S, Kikuchi K, Iwamura S, Rodriguez-Martinez H. Production of piglets derived from in vitro-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during in vitro fertilization. *Biol Reprod* 2003; 69: 2092-2099.
- 6) Yoshioka K, Suzuki C, Onishi A. Defined system for in vitro production of porcine embryos using a single basic medium. *J Reprod Dev* 2008; 54: 208-213.
- 7) Mito T, Yoshioka K, Noguchi M, Yamashita S, Hoshi H. Recombinant human follicle-stimulating hormones and transforming growth factor-alpha enhance in vitro maturation of porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 2013;80: 549-560.

For research use only, Not for diagnostic use.



COSMO BIO CO., LTD.

Inspiration for Life Science

TOYO 2CHOME, KOTO-KU, TOKYO, 135-0016, JAPAN

URL: <http://www.cosmobio.co.jp> e-mail: export@cosmobio.co.jp

[Outside Japan] Phone : +81-3-5632-9617 [国内連絡先] Phone : +81-3-5632-9610

FAX : +81-3-5632-9618

FAX : +81-3-5632-9619