

マイクロツールの作製方法

マイクロツールの作製方法

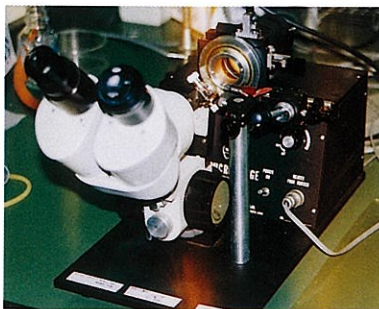
核移植の操作はマイクロマニピュレーターを用いて行われるので、各々の作業に用いるマイクロツールの出来具合によって、操作性の良し悪しが大きく左右される。このため、いかにして上手くマイクロツールを作製するかが重要なポイントとなる。

ここで紹介する方法は、家畜改良センターにおけるマイクロツールの作製方法である。

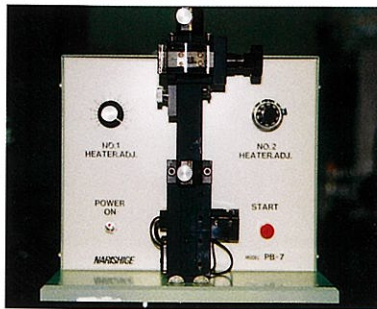
★作製するマイクロツール

- ホールディングピペット : 卵子(レビエント卵子)を吸引して保定するピペット。外径を卵子とほぼ同径(100~150 μ m)になるよう作製する。
- カッティングニードル : 卵子の透明帯を切開する。ガラスキャピラリーを針状に引き伸ばして作製する。
- インジェクションピペット : ドナー細胞(割球)を吸引して、レビエント卵子に注入するピペット。内径をドナー細胞(10~30 μ m)に合わせ、先端を斜めに削って(または垂直に割って)作製する。
- 除核用スティック : レビエント卵子の除核の際に用い、インジェクションピペットの先端を丸く閉じて作製する。

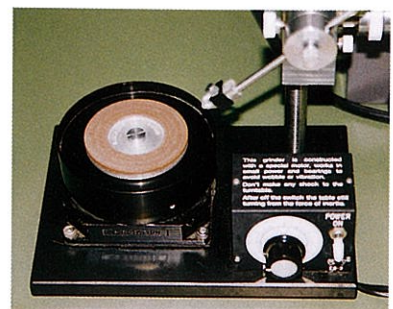
準備 : マイクロフォーger, マイクロプーラー, ピペット研磨機, ガラスキャピラリー, 25%フッ化水素, ガスパワー, 超純水, シリコンチューブ付シリジ, ヤスリ, ピンセット



マイクロフォーger (ナリク MF-79)



マイクロプーラー (ナリク PB-7)



ピペット研磨機 (ナリク EG-3)

写真1. 家畜改良センターにおけるマイクロツール作製用機器

☆ホールディングピペット

- ① ガスパナーを用いて、ガラスキャピラリーを真っ直ぐに細く引き伸ばす。
- ② マイクロフォーシにセットし、卵子の直径とほぼ同径(約100~150 μ m)のところに印を付けて、ヤスリで切断面が水平かつフラットとなるよう切断する。
※切断面に凹凸があると卵子を上手く保定できない。
- ③ 再びマイクロフォーシに、ガラスキャピラリーを下向き(垂直)の状態セットする。
- ④ マイクロフォーシの白金線の先端部が、ガラスキャピラリーの先端の中心部にくるようにセットする。
※白金線は熱膨張により伸長するので、それを考慮してセットする。
- ⑤ ガラスキャピラリーの先端部に熱をかけ、内径が外径の約1/5~1/10となるように口径を細める。
- ⑥ ガラスキャピラリーを右斜め上向きになるようにセットする。
- ⑦ 白金線をガラスキャピラリーの先端部から約5mmのところに位置し、熱をかけて約45度になるようにゆっくり曲げる。曲げる部位は、内径を極力細くしてオイルの流動性が小さくなるよう調整する。

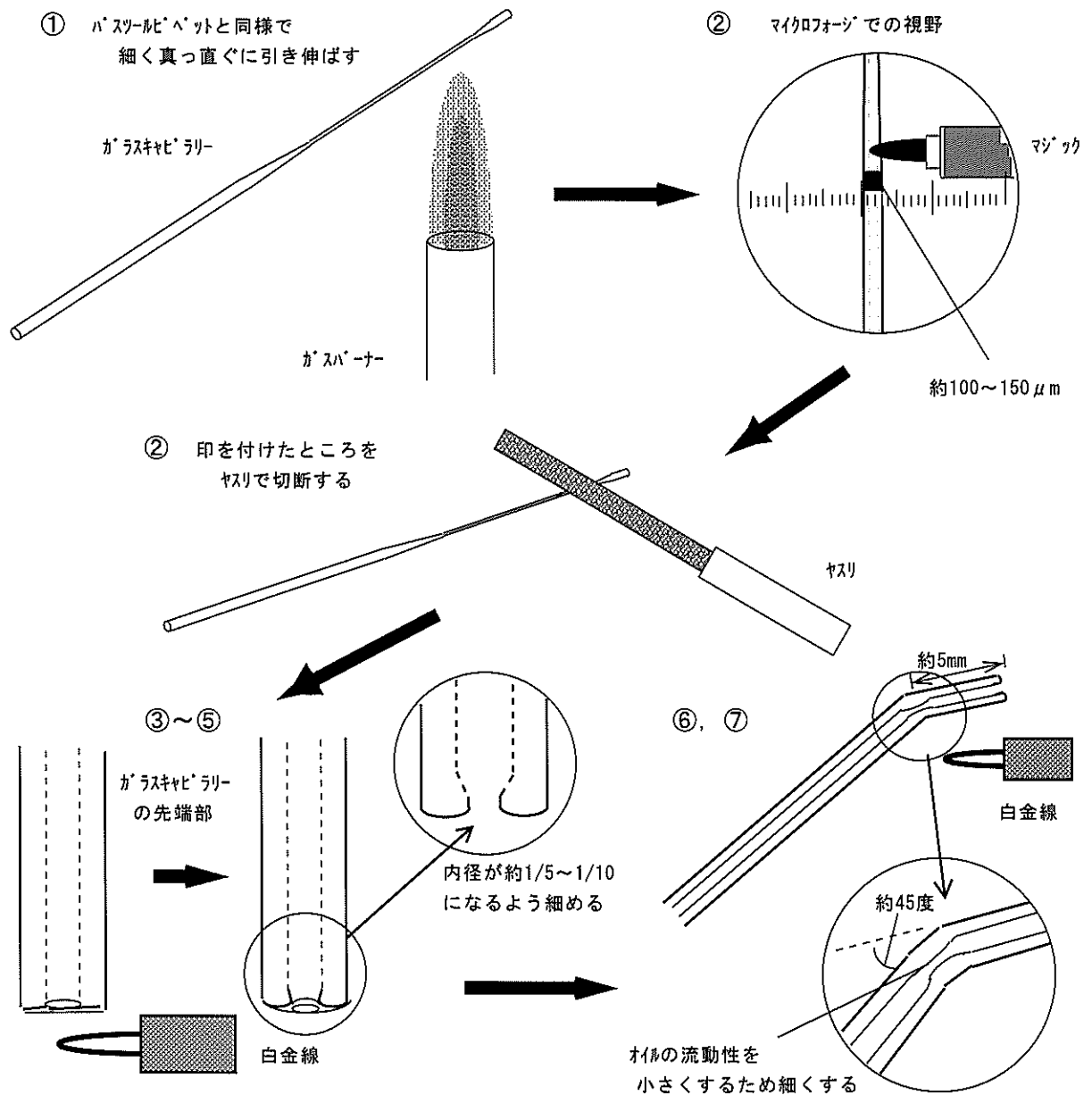
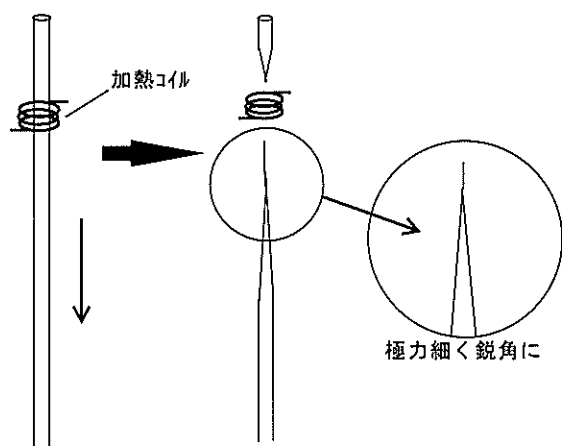


図2. ホールディングピペットの作製

☆カッティングニードル

- ①ガラスキャピラリーをマイクロフーラーにセットする。
※ここでは二段引き法を行う。（詳細についてはマイクロフーラーの取り扱い説明書参照）
- ②加熱コイルは最上部にセットし、一段目ヒーターの熱量と一段目ヒーター用ストップを設定して引き伸ばす。
- ③ガラスキャピラリーの一番細くなった部分に加熱コイルを移動し、一段目ヒーター用ストップを解除する。
- ④二段目ヒーターの熱量を設定して、先端が針状になるよう引き伸ばす。
- ⑤マイクロフォースで、先端部から約5mmの部分を約45度になるように曲げる。

①～④



フーラーで先端が針状になるように引く

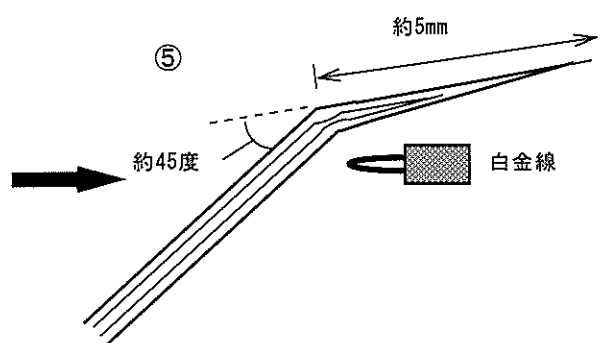


図 3. カッティングニードルの作製

☆インジェクションピペット

- ①ガラスキャピラリーをマイクロフーラーにセットして、細く引き伸ばす。
※ここでは一段引き法を行う。（詳細についてはマイクロフーラーの取り扱い説明書参照）
- ②マイクロフォーシにセットし、口径が約 $20\sim 30\mu\text{m}$ のところに印を付け、ヤスリまたはピンセットで切断する。 ※マイクロフォーシを用いた切断方法もある。
- ③ピペット研磨機にセットして、先端角が $40\sim 50$ 度になるように研磨する。（約15分）
- ④研磨後、ガラスキャピラリーをシリコンチューブ付シリジに接続し、先端部のみを25%フッ化水素に浸けて、内筒部を20回程度洗浄し、その後すぐ超純水で同様に30回程度洗浄する。
- ⑤ガラスキャピラリーの先端部の向きを考慮しながらマイクロフォーシにセットし、口径が（肉厚が）薄くなったのを確認してから、先端部から約10mmのところを約45度になるようにゆっくり曲げる。曲げる部分は、内径を小さくしオイルの流動性が小さくなるよう調整する。

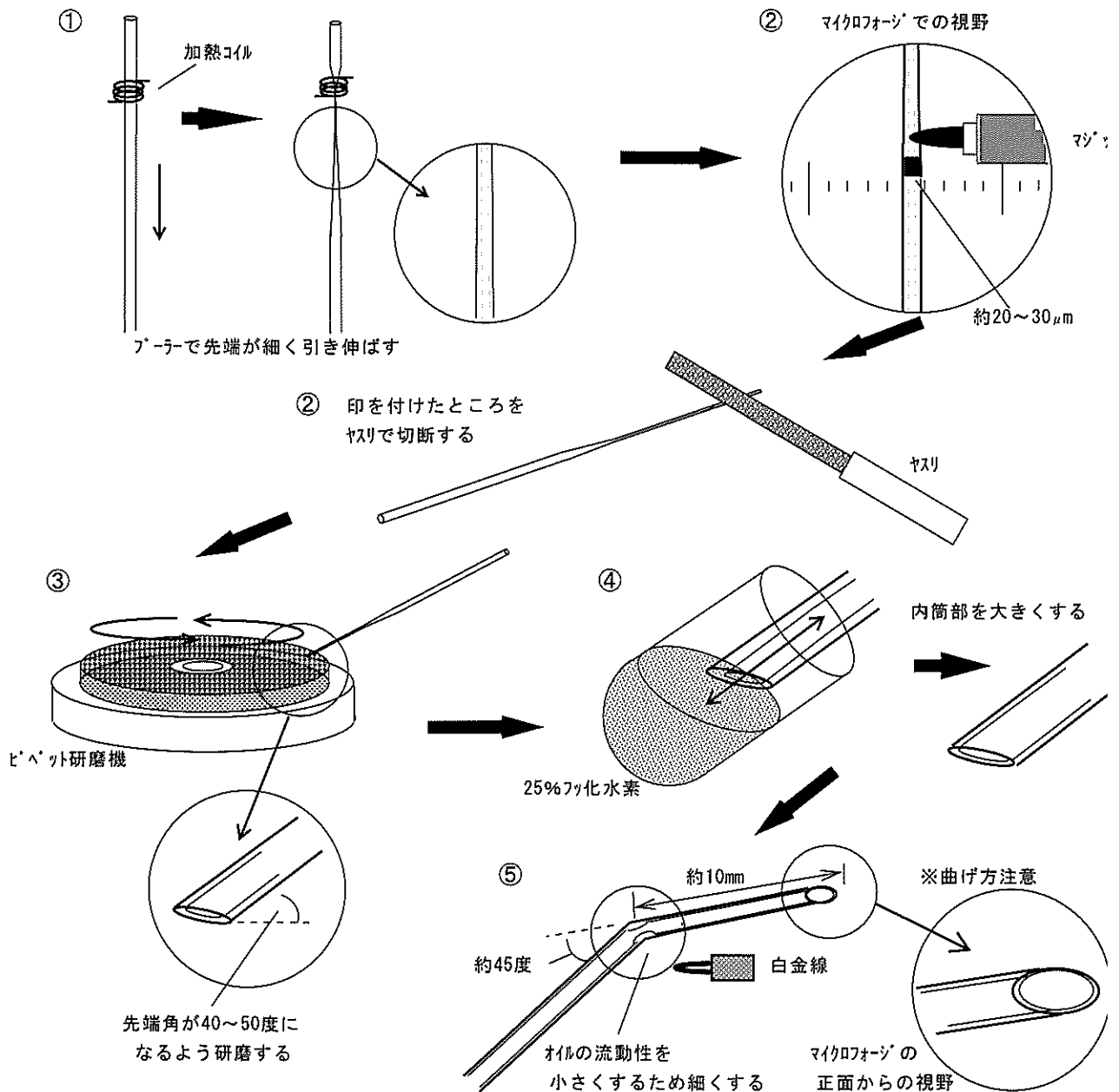


図4. インジェクションピペットの作製

☆除核用スティック

- ①～②は、前述の「☆インジエクションビペット」と同様。
(省略)
- ③マイクロフォーgerにセットして先端部を丸く閉じ、先端部から約5mmのところまで約45度になるようにゆっくり曲げる。

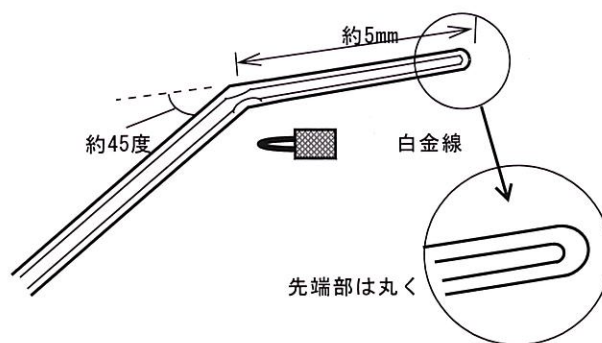


図5. 除核用スティックの作製

★マイクロツールのセッティング

マイクロツールのセッティングは、マイクロマニピュレーターのタイプ(平行型, L字型)により異なる。ここでは平行型について記述する。

- ①作製したマイクロツールは、ガスバーナーを用いて先端部と平行になるよう加工する。
- ②ビペットホルダーに装着する。
- ※ホルディングビペットとインジエクションビペットは、マイクロインjekターに連結されているため、吸引や注入がスムーズに行えるよう接続する。
- ③マイクロマニピュレーターに一直線になるよう取り付ける。

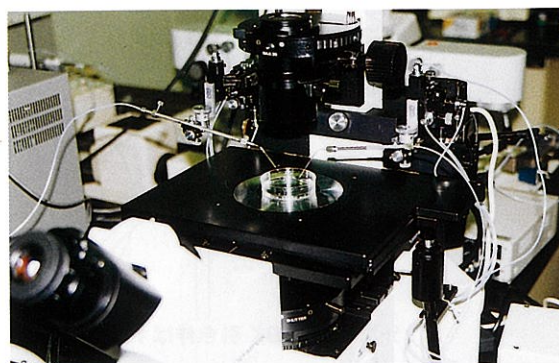


写真2. マイクロマニピュレーター

◎平行型のマイクロマニピュレーターの場合

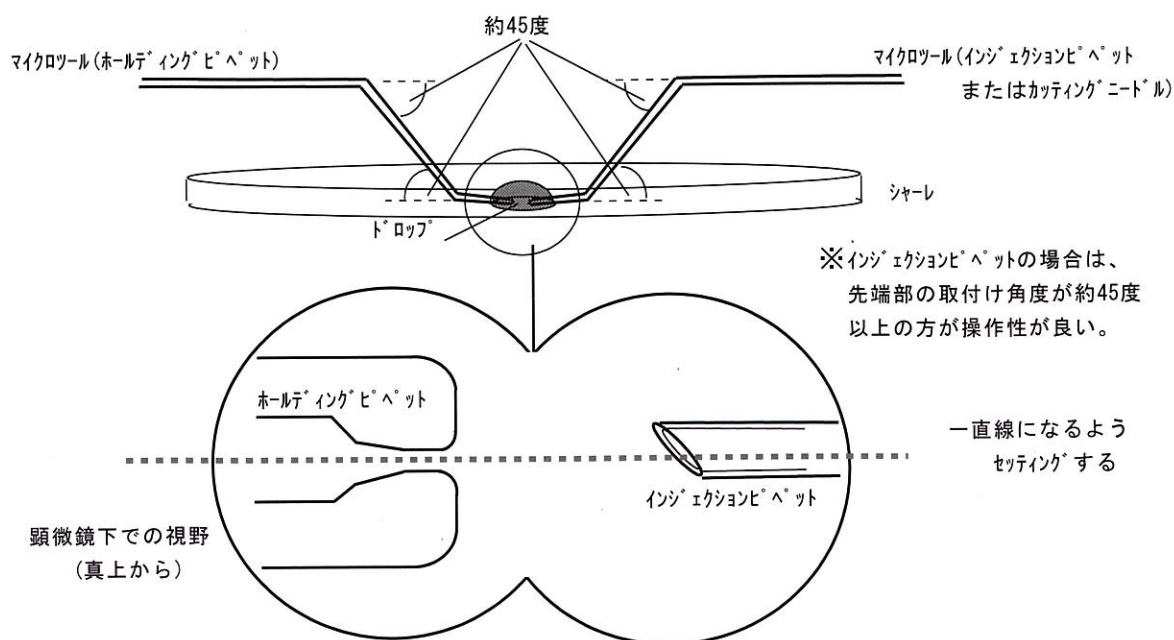


図6. マイクロツールのセッティング