

7、試薬とその調整法

ホルトフレーター液

我々の研究室では、イモリ用の生理的食塩水としてホルトフレーター液 (Holtfreter's solution) を使用しています。これ以外にも、両生類（カエル）用の生理的食塩水であれば使用可能です。

- ・ 10×ホルトフレーター液：1× および 0.25×を作製するための原液です。

	1 L 中	(最終濃度)
NaCl	35 g	(600 mM)
KCl	0.5 g	(7 mM)
NaHCO ₃	2 g	(24 mM)

純水を加えて 1 L とした後、オートクレーブ処理する。

- ・ 1×ホルトフレーター液（100% ホルトフレーター液）

	1 L 中	(最終濃度)
10×HF	100 ml	(1×HF)
1M HEPES (pH 7.6) 溶液	5 ml	(5 mM)
1M CaCl ₂ 溶液	1 ml	(1 mM)
1M MgSO ₄ 溶液	1 ml	(1 mM)

純水 900 ml を加えて 1 L とする。オートクレーブ後、残りの溶液を加えて、冷蔵庫で保存します。

- ・ 0.25×ホルトフレーター液（25% ホルトフレーター液）：

	1 L 中	(最終濃度)
10×HF	25 ml	(1×HF)
1M HEPES (pH 7.6) 溶液	5 ml	(5 mM)
1M CaCl ₂ 溶液	1 ml	(1 mM)
1M MgSO ₄ 溶液	1 ml	(1 mM)
10 mg/ml ゲンタマイシン溶液	1 ml	(10 µg/ml)

純水 900 ml を加えて 1 L とする。オートクレーブ後、残りの溶液を加えて、冷蔵庫で保存します。

麻酔液

3-アミノ安息香酸エチル メタンスルホン酸塩（別名：MS-222、TS 222、トリカイン、メタンスルホン酸トリカイン）の粉末を、ホルトフレーター液や水道水に溶かして使用します。水道水を使う場合は、1/10 量程度の 1×ホルトフレーター液を加えると、麻酔液の効果が安定します。

麻酔の濃度

成体：0.1～0.4%

幼体：0.05～0.1%

幼生：0.05%

幼生の場合は、あらかじめ 0.2%の麻酔液（1×ホルトフレーター液に溶かすこと）を原液として作製して、冷蔵庫に保存しておくとう便利です。この原液を必要に応じて、幼生の飼育水に加えて行くことで麻酔できます。

ゴナドトロピン（動物用ゴナドトロピン）

産卵を促すために使用します。1 unit/ 1 ul の濃度で 100%ホルトフレーター液に溶かし、使用時まで-20℃で保存します。複数回の凍結融解をしても大丈夫です。

27-31G の針がついた注射器を用いてアゴの下、または腰の皮下に注射します。

1 回の注射量は、個体当たり 100～300 unit です。

*ゴナドトロピンの購入方法

ゴナドトロピンは指示薬に指定されているので、許可を得た業者さんしか販売することができません。一般の試薬屋さんに注文をすると、「規制のある試薬なので（あなたのラボには）販売できません」という趣旨の返事をうけることがありますが、これは不正確です。実際には許可を得た業者さんから普通に購入できます。いずれの試薬屋さんから購入できるかは、ゴナドトロピンの製造元に問い合わせると教えてくれます。

脱ゼリー液（0.5% システイン溶液）

0.5g の L-システイン（L-Cysteine）を 100 ml の 0.25×ホルトフレーター液に加えます。スターラーやプラスチックピペットでかき混ぜて、素早く溶かして下さい。使用する直前に調整を行い、溶かした後はすぐに使用します。

システインには様々な等級の製品がありますが、細胞培養用（suitable for cell culture）の使用が安心です。製品によっては、胚が全て奇形になった経験があります。

液体塩素中和剤

塩素中和剤は液体の製品が便利ですが、市販の製品は高価なので、自分で作製することを勧めます。

準備するもの

- ・ハイポ（チオ硫酸ナトリウム）：塩素を中和するための薬品です。ペットショップやホームセンターで粒状の製品を購入できます。試薬として購入する場合は、「チオ硫酸ナトリウム 5 水和物」です。500 g で 2000 円程度と、単価はペット用よりも安いです。
- ・蒸留水 滅菌の必要はありません。
- ・保存用ボトル 醤油やケチャップの容器が便利です。（商品名「さじかげん」という製品は、ワンプッシュで 10 ml が計れるので便利です。）

作り方

保存用ボトルに蒸留水を 300 ml 注ぎ、チオ硫酸ナトリウムを 1 粒（小さめの粒は 2 個）加える。良く振って溶かしたら完成です。この溶液を水道水に 10 L に対して、約 10 ml 使用します。中和剤の使用量はたまかな軽量で大丈夫です。仮に、この 10 倍以上の量を入れても問題は起こりません。



© 広島大学両生類研究センター
器官再生メカニズム研究グループ
バージョン Ver_20200624

注）本資料は広島大学が運用する公式なマニュアルではありません。