

カエル卵抽出液

～費用概算～

品名	1匹分の経費	最小購入単位
カエル	2000円弱	
ホルモンA(PMSG)	35円	7,000円(200匹分)
ホルモンB(hCG)	100円	3,000円(30匹分)
Cystein	250円	3,000円(12匹分)
サイトカラシンB	200円	5,700円(10匹分)
スポイト(3本)	50円	7,000円(500本)
フタ付コンテナ (5-8L)	~1000円	--
液体窒素	150円/L	--
他	--	--
	約4,000円	約4-5万円

* 価格は、購入サイズによっても変わります。また一般的試薬(Tris等)は省略してあります。全てのカエルが質の良い卵を産むことは稀です。最低でも1回の実験で2-3匹を準備することをお勧めします。

必要機器／器具

卓上冷却遠心機
冷却機能付きインキュベーター
シリンジ+注射針(27G)
-80℃冷凍庫／液体窒素タンク

～参考情報、資料～

動物、ホルモン等の購入先例

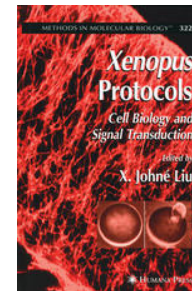
【カエル】

野生型成熟体♀ 120-160g程度、2千円弱/匹
購入先: ワタナベ増殖様、浜松生物教材様など

【試薬等】

ホルモンA = 性腺刺激ホルモン(商品名: 動物用セロトロピンなど)
ホルモンB = 胎盤性性腺刺激ホルモン(動物用ゴナトロピンなど)
購入先: あすか製薬(code 0999-800027, 0999-800027) 他
スポイト: ザルスタット社(86.1171J、口径約2mm) など

プロトコル紹介



Xenopus Protocol

(ISBN-13: 978-1588293626)

大隅圭太先生(名大)の項
アマゾン 中古で8000円程

※ web上でも Dr. Julian Blowや Dr. Andrew Murray などのプロトコルが多数 手に入ります。その詳細は、実験の目的や設備環境の違いによって一つとして同じものはありません。ですので、まずは単純なものから試されることをお勧めします。

Summary of *Xenopus* egg extract preparation

Stock solutions

XB (10x), filter	
Hepes pH7.8	0.1 M
Sucrose	0.5 M
CSF salt (20x, filter)	
KCl	2 M
EGTA	0.1 M
MgCl ₂	40 mM
Energy mix (50x)	
Creatine phosphate	375 mM
ATP	50 mM
EGTA	10 mM
MgCl ₂	50 mM
(pH to 7.5)	
Cytochalasins B	10 mg/ml (DMSO)
Sucrose (filter)	2 M

Prepare on day of use (Keep @ 20-23°C)

De-jellying sol. (0.5L for 5 frogs, pH7.8)

25 mL	20x Salts
10 g	Cysteine
0.9 L	D.W.

CSF-XB sol. (1L for 5 frogs)

100 mL	10x XB
50 mL	20x Salts
0.85 L	D.W.

Procedure

- 0', Collect eggs in 300-mL beaker,
Remove bad eggs and salt water
- 0', Add De-jellying sol.(20-23°C) 50~100ml & mix gently for ~5' (quick & gentle hereafter)
- 4', After checking them dejellied, remove sup & bad eggs
- 4', Wash w/ 30~50ml CSF-XB (20-23°C) 5 times **gently** while removing bad eggs
After de-jellying, pigments comes up so white-side-up eggs are bad
High population of bad eggs make its whole lot unavailable
- 13', Put them gently into 1.5-mL tubes
- 20, Cfg. 2 krpm for 1' @4°C/RT
- 23, Remove bad eggs and buffer on its top &
Add 1/1000 vol. of Cytochalasin B
- 25, Cfg. 14 krpm for 15'(10~20') @4°C
- 48, Retrieve cytoplasmic layer
Never take grey viscous layer on its bottom
- 52, Add 1/1000 vol. of Cytochalasin B
1/50 vol. of Energy mix
- 55', Mix gently
- 60', Cfg. 14 krpm for 10' @4°C
- 90', Remove lipid layer (top)
- 92', Retrieve cytoplasmic layer to a new tube, never get grey viscous material on bottom
- 95', Add 1/10 vol. of 2M Sucrose or final 1-3% glycerol
- 95', Mix gently
- 100', Freeze in liquid N. as 23µl beads
- 100', Stock them in Cryotube ==> liquid N₂ or @-80°C

