



## イトマキヒトデの受精法

### ■はじめに

イトマキヒトデの受精法を 1) 精子の単離、2) 卵の単離、3) 受精の 3 項目に分けて記述する。

### ■材料

- ・イトマキヒトデ (*Asterina pectinifera*)

### ■試薬

- ・ 1 mM 1-methyladenine : 分子量 149.15

1 mM 1-methyladenine 溶液	100 ml
1-methyladenine	15mg
蒸留水	100 ml

- ・ 海水、または人口海水 (マリンアート MARINEART®SF-1) 300~500ml 程度

### ■器具

- ・ ハサミ
- ・ ピンセット
- ・ パスツールピペット
- ・ ビーカー
- ・ 直径 9cm ガラスシャーレ
- ・ 15ml 試験管
- ・ 手回し遠心機

### ■手順

#### (1) イトマキヒトデの精子の単離

- ①オスのヒトデの腕の外皮にハサミを入れ、ピンセットで挟みだすようにして精巢を取り出す。  
(ヒトデは、雌雄異体で、その生殖巣は各腕の体腔に 1 対ずつ存在する。)
- ② 3 ml の海水が入った試験管に、取り出した精巢の一部を入れる。
- ③②の海水をパスツールピペットで懸濁することで、精子を海水中に遊離させる。

## (2) イトマキヒトデの卵の単離

- ①メスのヒトデの腕にハサミを入れ、オスの精巣と同様に卵巣を取り出す。
- ②2腕分の卵巣を10 mlの海水が入った50ml ビーカーに入れる。
- ③上清が濁っていた場合、上清を捨て新たな海水に変える。<sup>注1</sup>
- ④③のビーカーに1 mM 1-methyladenine を10  $\mu$ l 加え、良く攪拌し、15-20分処理する。
- ⑤海水が入った9 cmシャーレに卵巣をピンセットで移し、ハサミを用いて細かく切断する。
- ⑥卵巣から出てきた卵を観察し、卵核胞がなくなっている事をチェックする。
- ⑦卵懸濁液を試験管に移し、手回し遠心機を用いて卵を集める。
- ⑧⑦の上清を捨て、新たな海水10 ml で未受精卵を懸濁した後、500ml ビーカーに移す。

## (3) 受精法

- ①(1)の作業で得た精子数滴(1-4滴)を(2)で準備した未受精卵懸濁液に加え、よく攪拌する。
- ②受精膜を確認した後、未受精卵の体積1 ml あたり<sup>注2</sup>、200-300mlの海水を加えて懸濁し、攪拌培養する(20  $^{\circ}$ C, 30 rpm)。
- ③20 $^{\circ}$ Cの温度条件で、64細胞期は4時間、胞胚は16時間、中期原腸胚は24時間、後期原腸胚は36時間、ビピンナリア幼生は60時間インキュベートすると、目的の発生ステージのサンプルが得られる。

### ■ポイントとトラブルシューティング

<sup>注1</sup> : 濁ったまま作業を進めると、発生がうまく進まないことがあるので、濁った場合は、かならず海水を入れ替える。

<sup>注2</sup> : 本作業を実施するにあたっては、卵巣が十分に成熟した親個体を準備する必要がある。具体的には、5~7月は東京湾、9~12月は青森県陸奥湾産のイトマキヒトデが実験に使用できる。