

## RNAi ~injection version

Hiroshi Qadota <qadota@zoology.ubc.ca>  
2002/10/10

すべてオリジナルは Craig Mello lab の方法である。

### 1 RNA 合成

yk clone または pBluescript にクローニングしたプラスミドからの RNA 合成を記す。

#### 1-1. PCR reaction

Template*	1 uL
Primers**	
CMo24, CMo422	each 1 uL
x10 Buffer	10 uL
dNTP mix (2.5 mM)	8 uL
DW	78.5 uL

#### Cycle (DNA engine)

95. C 4 min	
ExTaq	0.5 uL
94. C 30 sec	
60. C 30 sec	
72. C 4 min	
30 cycle <繰り返す	
72. C 15 min	
4. C forever	

\* Template は mini prep を 1 / 1 0 0 程度にうすめたもの、100 ng/ul が適当

\*\*Primer のシーケンスは、

CMo24 5'-TTGTAAAACGACGGCCAG-3'

CMo422 5'-GCGTAATACGACTCACTATAGGGAACAAAAGCTGGAGCT-3'

(Craig Mello, personal communication)

#### 1-2. in vitro transcription\*

DNA (PCR product)	20 uL	
5 x Transcription Buffer	20 uL	
20 mM ATP, CTP, GTP, UTP	each 10 uL	
1 M DTT	1 uL	
DW	20 uL	
T7 RNA polymerase (100U/uL)	1 uL	
37. C 2 hr		
add DNase I (1 U/uL)	5 uL	
37. 20 min		
Phenol	vortex 30 sec	Spin 3 min
Phenol/Chl	vortex 30 sec	Spin 3 min
Chl	vortex 30 sec	Spin 4 min
3 M Sodium Acetate (pH 5.2)	10 uL add, isopropanol 60 uL add	
Spin 7 min		
70 % EtOH rinse**		
Spin 3 min		
20 uL Sterile water (nuclease free)	suspend	

## Agarose gel electrophoresis check

Filtration\*\*\*して、そのままインジェクションに用いる\*\*\*\*

\*Novagen Large scale T7 transcription kit を使用する。70% Ethanol を除きすべての試薬揃っている。70% Ethanol は専用のもので用意すればよい

\*\*乾かし過ぎると溶けなくなる

\*\*\*Filtration は TAKARA Suprec<sup>TM</sup>-1 を用いる。

\*\*\*\*Filtration 後に分注し、-80 度に保存すれば 1 ~ 2 年は保存できる。

### 1-3. 2 ハイブリッドスクリーニングとの組み合わせ

2 ハイブリッドスクリーニングと組み合わせる場合は、PCR reaction のプライマーを以下のものにする。ただし、このプライマーは、Bob Barstead の作成したライブラリー (pACT ベース) に対応させている。

T7-GAD 5'-gCgTAATACgACTCACTATAgggCAAACCCAAAAAAAgAgATC-3'  
GAD-T7 5'-CgC TAATACgACTCACTATAggg gTTGAAGTgAACTTgCgggg-3'

2 ハイブリッドスクリーニングで取れて来たクローンを Template に上記のプライマーで増幅し、両端に T7 プロモーターのついたフラグメントを作成可能である。

## 2 インジェクション&チェック

### Day 1: インジェクション

young adult の線虫を用意しておく。野生型 20 度の培養ならば、3 ~ 4 日前に 3 匹の虫を植えておけば、ちょうどよい。線虫をオイルをのせたアガロースパッドの上に乗せ、乾ききらないうちに、インジェクションする。インジェクションする場所は、どこでも構わない。インジェクション後は、OP50 を塗ってあるプレートに移す。多数の線虫を一枚のプレートに移して構わない。

### Day 2: pick up

一晩、20 度で放置した線虫を新しい OP50 を塗ってあるプレートに移す。一晩放置の間に生まれた卵は、RNAi が効いていないものも含まれるので、チェックしない。ここから、1 匹の線虫を一枚のプレートに移しておく。embryonic lethal を調べたい場合は、OP50 を塗ってある場所を限っておく (中央にスポットする、など) と卵を産む場所が限られるため調べやすい。8 ~ 10 時間後に、線虫を同様に新しいプレートに移す。この 8 ~ 10 時間に生まれた卵に RNAi の効果が現われる。

### Day 3: pick up & check phenotype

線虫を同様に新しいプレートに移す。Day 2 から Day3 の間に生まれた卵に RNAi がよく効くこともあるので、チェックする。Day 2 に生まれた卵がハッチしているかどうか、をここでチェックする。

### Day 4: check phenotype

Day 2 から Day3 の間に生まれた卵をチェックする。Day 2 に生まれた卵の larva および adult の phenotype をチェックする。

## 3 おまけ / エッチングのプロトコール

RNAi の場合に限らず、インジェクションに使用する針は、エッチングすると細くて、出がよいものが作成できる。

針は、少し細め\*に作る。

HF 15 ul\*\* + 水 40~45 ul の水滴と水のみ水滴を 10 cm プレート上に作る。

インジェクターに針をセットし、通常インジェクションをする時よりも少し高め\*\*\*の圧をかける。実体顕微鏡でみながら、HF 入りの水滴に針を入れ、細かい泡が出て来たら\*\*\*\*、水のみ水滴に針を移す。針を軽く水で洗ったら、圧を下げ、エッチング終了。針はたくさん引いておいて、使用する前に使う分だけ、エッチングをしています。

\*ナリシゲのニードルプラーPN-3 を使った場合、条件は、Heater 19, Sub Magnet 10, Main Magnet 10 です。

\*\*劇薬なのでドラフトで扱っています。薄めた後は、普通の実験室で使っています。

\*\*\*低い圧でエッチングすると穴が大きすぎて使えません。

\*\*\*\*大きな泡が出て来た失敗です。