

Pエレメントを用いた形質転換法 (2nd Version)

2000年12月19日松林宏

DNA試料調製

可能な限りきれいなDNAを用意する。多くの文献には塩化セシウムによる超遠心を2回繰り返すと書いてある。しかしキアゲンによるカラム精製で十分のよう。必要なDNA量は実験目的にもよるが、数系統の形質転換体を得るだけであれば10 μ g程度のDNAがあればいい。そこで3mlのLBによるオーバーナイトカルチャーよりキアゲンのキット（P20のカラム）を用いて精製。詳しくはキットの説明書を参照。

- 1, 3mlのオーバーナイトカルチャーよりエッペンチューブで2回の遠心を行い集菌する。
- 2, P 1 溶液（RNase入り、4度保存）300 μ lに溶解。300 μ l P 2 溶液を入れ室温で5分放置。
- 3, 冷えたP 3 溶液を入れ氷冷5分。15000rpm 10min 遠心し上清をカラムにかける。カラムはあらかじめ1 ml QBT Bufferで洗浄しておく。
- 4, 1 ml QC Bufferで4回洗った後0.8 ml QF Bufferで溶出、0.7 vol イソプロパノールを加え15000rpm 30min 遠心を行う。70%アルコールで洗浄後風乾。
- 5, 50 μ l程度のTEに溶解（なぜかいつも不溶の沈殿が残る）。1 μ l程度を泳動して量、質の確認をする。
- 6, 遠心し沈殿をとらないように上清を別のチューブに移し最終濃度0.2MとなるようにNaClを加えエタノール沈殿をする。この時ヘルパーDNA（phspi）も適当量加えておく。70%アルコールで洗浄後風乾。
- 7, インジェクションバッファに溶解。濃度は通常ベクター250ng/ μ l、ヘルパー50ng/ μ l程度。インジェクションバッファは0.1mM NaHPO₄ (pH6.8), 5mM KCl, 1%食用色素（赤）。完全に溶解後15000rpm 20min 遠心し上清をとりインジェクションに用いる。

採卵

- 1, 十分な卵を産めるだけのハエを用意しておく。通常はw¹¹¹⁸(CS)（生命研由来w¹¹¹⁸をCantonSに戻し交配したもの）。
- 2, 採卵用培地（アップルジュース培地）；17.5 g agarを500ml DWに入れオートクレーブ、250ml DWに12.5g sucroseを入れ電子レンジで加熱溶解したものに250mlアップルジュースと20ml ボーキニン（10% in 70%エタノール）を加えた後、溶けたagar溶液と混ぜる。固まる前に採卵用シャーレに分注。
- 3, 採卵用のチューブにハエを移し（数百〜千匹）採卵用培地上に乾燥イーストを極少量（数粒〜十粒程度）振りかけたものを被せ培地を下にして採卵開始。暗めの静かな場所に置く。イーストの量が多いと卵がイーストまみれになり両面テープに張り付きにくくなる。20分から40分間隔ぐらいで培地を交換し採卵を繰り返す。最初の一、二回めのはステージの進んだ卵が多いので捨てる。
- 4, 18mmX18mmのカバーガラスの上にスコッチの両面テープを貼りその上にembryoを並べていく。先端のとがったピンセットを用い培地から直接卵を移していく。コリオンをむく必要はない。後極（将来生殖細胞の元となる極細胞が出来る）の向きを揃える必要はあるが上下（背腹軸）に関しては特に気にしなくていい。テープのほぼ中央に20個程度並べる。軽く筆で

embryoを押さえつけ両面テープに密着さ流動パラフィンでembryoが覆われる程度かけ放置。次のカバーガラスへのembryoの移植を行い同様に流動パラフィンをかける。最初にオイルをかけた物からインジェクションを行い30分程度の採卵時間内に20個 x 2=40個のインジェクションが出来る（この数は慣れにより、人により変わるだろう）。また1回の操作を2セットに分けることによりオイルがembryoに馴染む時間がとれ中がよく見えるようになる。

Injection needleの作成

Drumond社製マイクロキャップ（25 μ l）を成茂のneedle pullerで引く。最近のマイクロキャップは汚れていることが多いので引く前によく洗っておく。一晚洗剤に付けた後よくすすぎエタノールを通し乾燥しておく。条件は、No. 1ヒーター80、No. 2ヒーター100、軽い重りを2個用い2段引き。一本のキャピラリーから上下ほぼ同じneedleが2本出来る。インジェクション時までこの状態で保存。このままでは先端が細すぎて試料が通らないがインジェクション時にサンプルを後ろから入れた後先をスリガラスにしたスライドの上で研ぎ使う。

Injection

マイクロマニピレーター、顕微鏡の操作に慣れておく。試料はneedleの後ろ側からエッペンドルフ社のマイクロローダーを用いて0.5-1 μ l先端に注入する。スリガラスにした厚手のスライドガラスをセットしこの表面に流動パラフィンを数滴たらししておく。ニードルをこのオイル中に付け、先端がスリガラスに軽く押し当るくらいまでステージを上げる。ステージ（=スライドガラス）をニードルと垂直に移動させ先端を欠く。慎重に一度研いだら、見た目折れて無くてもニードルを浮かせてシリンジより圧をかけてみる。試料が先端より出るようになれば多少とも折れてる証拠でインジェクションに移る。圧をかけても試料が出ないようなら更に慎重に研いで先をおり欠く。先端はなるべく細い方がエンブリオへのダメージも少ない。またインジェクションをしていない間は試料が乾かないようにキャピラリーの先端をこの流動パラフィンの中に浸けておく。Embryoを乗せたカバーガラスをスライドガラスの上に載せ（特に固定する必要はない）ステージにセットする。Embryo, needleの先端両方にピントが合うように調製し後極に注入していく。Needleはどうしても角度が付いているので後極の先端よりわずかに上側に刺すようにする。また後極先端は堅くneedleをさしづらい。試料を適量注入しneedleを素早く抜く（embryoが透明なら赤い色素が入っていくのが確認できる）。圧をかけないと細胞内容物がキャピラリー内を逆流してくるようなら圧をかけながら針を抜く。その点多少詰まりかけているキャピラリーの方が能率がいい（針の太さ、embryoの乾燥具合にもよる）。明らかに発生段階の進みすぎている物は打たない（細胞性胞胚以降）。ひととおりインジェクションが終わったら実体顕微鏡の下で発生段階の進んでいるembryoを柄付き針でつぶす。ニードルが折れて太くなり刺さりにくくなったら適宜交換する。

Post injection

インジェクション終了後embryoの載ったカバーガラスを垂直に傾けて柄付き針を使いオイルをある程度拭き去る。完全に拭き去るのは不可能だしその必要もないが、embryoが大量のオイル中に深く沈んでいるような状態だと孵化率が極端に低下する。シャーレに湿らせた濾紙をひいた中にカバーガラスを並べて入れる。そのシャーレをさらに湿らせた濾紙をひいたタッパーの中に入れ室温（25度）で一晩放置。翌日オイル中に孵化している幼虫を筆を用いてすく

い上げ、通常のショウジョウバエのエサ入りバイアルに移し室温で親が羽化してくるまで飼う。オイル中に長く放っておくと弱ってしまうので数時間置きにこまめに幼虫を回収する。受精から孵化まで25度で22-24時間程度。しかしこれより孵化が遅れることもあるので2日間位シャーレは保存し適宜出てきている幼虫を拾い上げる。オイルが少ないと這い出して遠くまで歩き出していることもあるので注意。通常20-30%は孵化するはず。またこのうち50%程度は成虫になる。羽化したハエはバージンで集め雄1または雌1で複数の雌雄と交配する。この交配からは出来るだけ沢山の子供（G1世代）を残せるようにする。G1世代の中に形質転換体が生じるので出てきた個体を注意深く観察する。mini-wのマーカータと眼色が極めてわずかにしか色の付かないことも多い。出てきた形質転換体を個別に交配し系統を確立する。

付記（2003/1/21）

インジェクションについては様々な方法があると思うし、慣れが大きいので、こういう方法もあるよという程度で見て下さい。特徴としては、コリオンを剥かずにインジェクションをしていることでしょうか？

通常インサートが10kb程度までのコンストラクトであれば、30 - 50 %程度の頻度で形質転換体を得られます。難点は出来の良いインジェクションニードルが再現性よくできない事、それと関連してembryoのハッチアビリティが低い事です。