

本書の構成と使い方

本書の構成

1章 戦略を立てる

機能解析のために必要かつ十分な実験デザイン法とは？ 蛍光タンパク質の選び方とは？ 目からウロコがきつとある、遺伝子導入の基礎を紹介。

2, 3章 抑制実験に強くなる

RNAiを中心とした遺伝子抑制実験の原理から、その使い分けまで。特徴を比較し、デザインや修飾といった実験のコツまで具体的に解説。目的と対象にあった抑制実験を選択するための知識を伝授。

4章 実験をする

さまざまな導入法を、さまざまな対象ごとに徹底解説。イメージしやすいよう、具体的な使用機器、試薬を列挙し、ポイントとなる操作方法をビジュアル化。注意点、コツはもちろん、実験の「なぜ？」がみえてくるため、トラブルに強くなる。

5章 ルールを知る

組換え実験をするには、守らなければいけないルールがある。関係する法律や省令を具体例を挙げて解説。

プロトコルの使い方


プロトコル

▶ 1) プラスミド調製と胎仔の準備

① 1回分に分注したプラスミドDNA溶液（ $100\mu\text{L}$ など）に、1/10量の0.1% FastGreenを加える。

② インジェクション用の針の先端をガラス管（ 1mm 程度）で適当な太さになるように削り、顕微鏡下で斜めに折って先端を鋭くすると、刺しやすくなる。

③ プラスミドDNA溶液は、例えばCAGプロモーターによるGFP発現ベクターで神経細胞を標識するためには、 $0.5\sim 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 程度。通常の機能タンパク質を発現させる場合には $1\sim 5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ が適当である。



希釈したネブナル注射液を体重 10g 当 $1\mu\text{L}$ の割合で、腹腔内に投与する

プロトコルの左段に実際の操作を記述。注意点や補足がある場合「①」などを付けていますので、対応する右段の解説を参照。

プロトコルの右段には、実験操作の注意点や根拠、コツなどを解説。

トラブルの「原因」と「原因の究明と対処法」の数字は対応しています。

神経細胞へのエレクトロポレーション法 **トラブルシューティング**

⚠ 胎仔の致死率が高い、もしくは流産してしまう

原因

- ① 手術時間が長い
- ② 操作中に胎仔をつぶしている

原因の究明と対処法

- ① 手術時間はなるべく30分以内に留める。手技に慣れないうちは、無理にすべての胎仔に導入しようとせず、やりやすい胎仔を選んで、操作する。
- ② 個々の胎仔は羊膜で包まれており、羊水中に浮かんでいるため、簡単に方向を変えることができない。

▶ 遠心操作について

本書では、回転数(rpm)と重力加速度(G)を併記しています。使用するローターに応じて、適宜重力加速度の数値から回転数を求め、遠心操作を行ってください。

▶ “水”について

本書では、特に断わらない限り下のいずれかの水を使用しています。

脱イオン水: 逆浸透膜やイオン交換膜により塩、イオンを除去した一次純水

超純水: 一次純水を超純水用イオン交換樹脂に通し、殺菌、濾過後、比抵抗が $18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$ を超える水