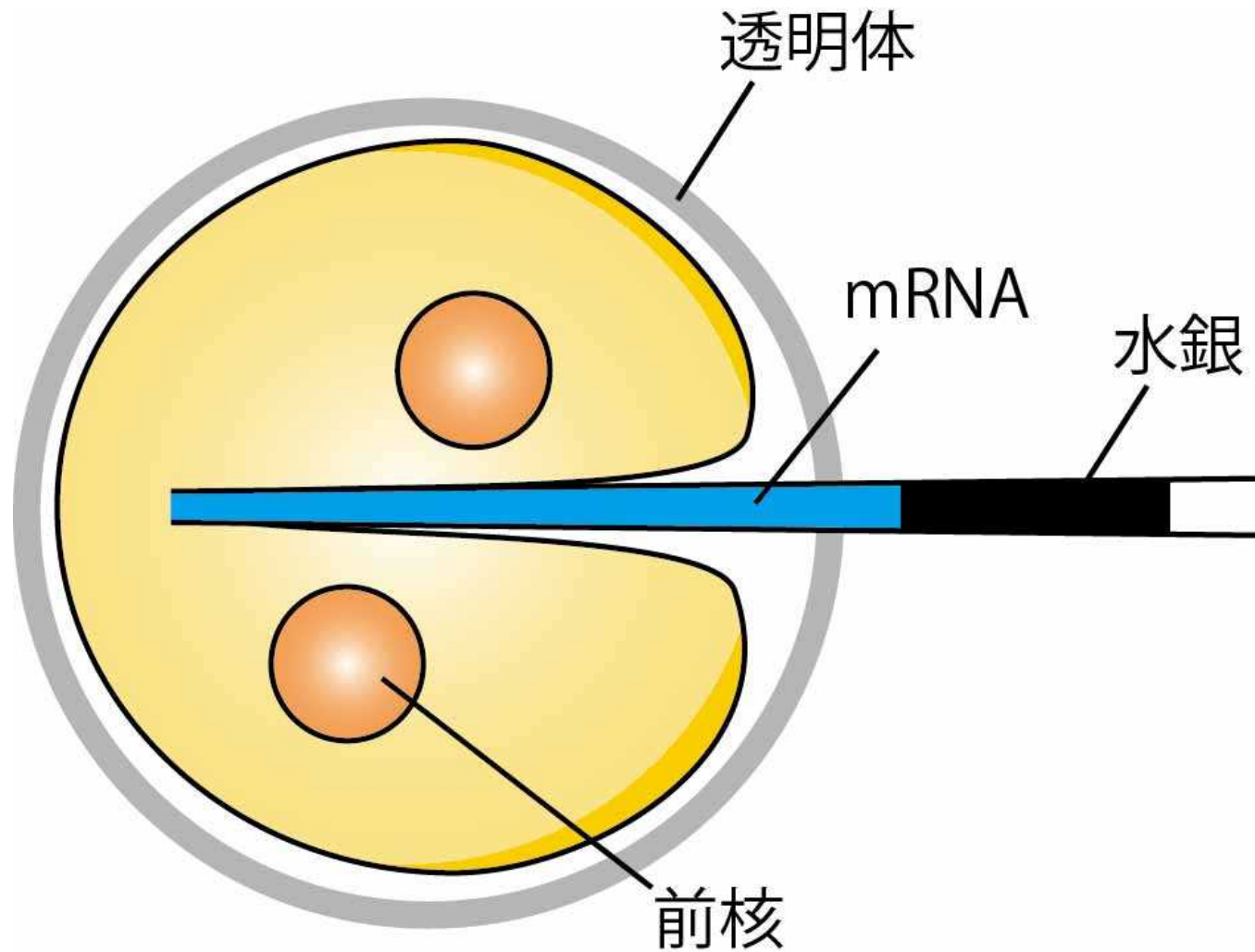


受精胚・クローン胚への mRNA注入法

バイオリソース研究センター
遺伝工学基盤技術室プロトコール #1

2020/05/20

Graphical Abstract



目次

- 説明
- 試薬
- 機器
- 方法
 1. 培養液およびmRNAの準備
 2. インジェクション用ピペットの作製
 3. インジェクション用ディッシュの準備
 4. 受精胚・クローン胚の準備
 5. mRNAの注入
 6. 胚の培養
- 参考文献
- 補足
- 作成者

説明

目的

受精胚およびクローン胚にmRNAを注入して強制発現させる。

説明

1細胞期の受精卵もしくはクローン胚に、目的のmRNAをマイクロマニピュレーターを用いて顕微注入する。

試薬と機器

ガラスピペット	Sutter Instrument Drummond	B100-75-10 1-000-0500
プーラー	Sutter Instrument	P-97/IVF
マイクロフォージ	NARISHIGE	MF-900
ピエゾ付きマイクロマニピュレーター	Nikon、Prime techなど	
胚操作用ディッシュ	顕微鏡のシステムに応じて用意	
胚培養用ディッシュ	IWAKI	1010-060 1000-035
胚培養用培養液（KSOM、CZBなど）	自作	自作
胚操作用培養液（Hepes-KSOM, Hepes-CZB、M2 mediumなど）	自作もしくは MERCK	自作もしくは MR-015-D
10%PVP	自作もしくは Irvine Scientific	自作もしくは 90123

方法

1. 培養液およびmRNAの準備

- 培養液

長期培養用：KSOM、CZBなど

胚操作用：Hepes-KSOM, Hepes-CZB、M2など

ピペット洗浄用：10%PVP

- mRNA

mRNAの合成についてはプロトコール#Xを参照。ヌクレアーゼフリー水で溶解したものを分注し、-80°Cで保存。使用直前に溶解。

*顕微注入用のmRNAの精製法については、通常はLiClを用いたエタ沈で問題無いが、胚がmRNAの純度などに感受性が高い場合（マーモセットなど）ではMEGA clear kitなどでカラム精製したほうが良い。

方法

2. インジェクション用ピペットの作製

ガラスピペットをプーラーで引き、先端の外径が4-5 μm になるようにカットする。その後、フォージで先端を熱して（ガラス玉にギリギリまで近づける）、できるだけ丸くスムーズにする。水銀もしくはその代替物（フロリナートなど）をピペット内に注入する（長さ1-2mm程度）。



丸くしたガラスピペット先端



水銀を充填したガラスピペット

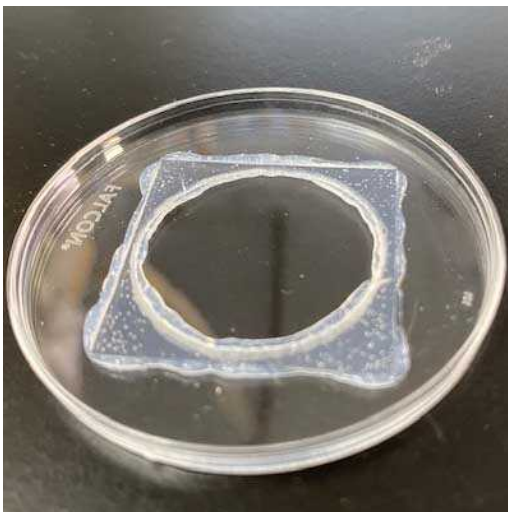
方法

3. インジェクション用ディッシュの準備

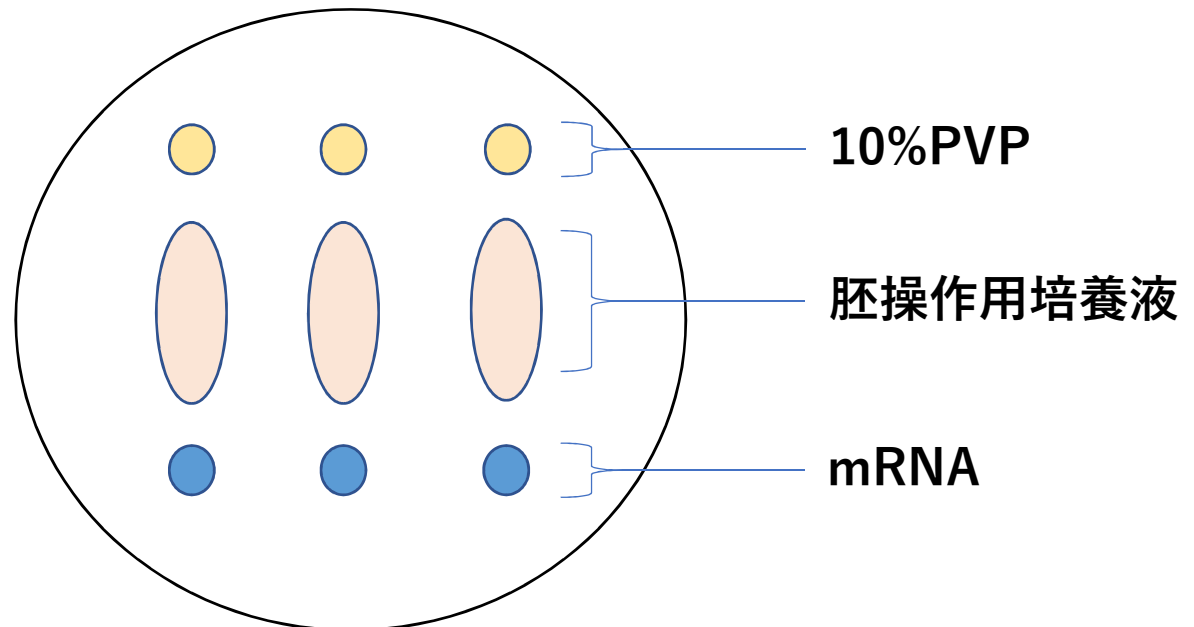
ディッシュは使用する顕微鏡のシステムに合わせて用意する。（なお、ガラスボトムディッシュを自作している。）

ピペット洗い用の10%PVP、インジェクションを実際に行う胚操作培養液、mRNAの3種類のドロップを図のように並べる。

最後にミネラルオイルでドロップをカバーする。



自作ガラスボトムディッシュ



方法

4. 受精胚・クローン胚の準備

受精胚・クローン胚は、それぞれ受精後もしくは活性化後5～6時間の前核期胚を用意する。この時期は恣意的なものであり、未受精卵およびさらに後期の胚（2細胞期の割球など）でも注入可能である。ただし、未受精卵よりも活性化後の胚のほうがピエゾによるダメージに強いいため、注入後の生存率が高い。

方法

5. mRNAの注入

まず、胚を胚操作作用培養液に移す。マイクロマニピュレーターに付けたガラスピペットを10%PVPおよび水銀で洗う。水銀をピペット先まで充填している状態で、mRNAドロップに移動。mRNAを適量ピペット中に吸う（通常5-10回の注入に相当する量を吸う）。胚操作作用培養液に戻り、ホールディングピペットで胚をホールドする。透明体に強めのピエゾで穴をあける。その後、ピペットで細胞膜を押し込む。この際、前核を避けて押し込むこと。ピペットの先端がもう一方の細胞膜の近くに達したら、弱いピエゾで細胞膜を破る。mRNAを細胞質中に適量注入する（前核1個分程度の量を注入すると約10plである）。そのままゆっくり引き抜く。5-10回注入したら、もう一度mRNAを吸い、注入を繰り返す。

6. 胚の培養

注入の終わった胚は、10-15分程度は胚操作作用培養液の中で休ませる（注入直後にインキュベーターに戻すと生存率が下がる）。その後、胚を通常の培養液の入ったディッシュに移動させて長期培養する。

参考文献

- Matoba S, Nakamuta S, Miura K, Hirose M, Shiura H, Kohda T, Nakamuta N, Ogura A. [Paternal knockout of *S/c38a4*/SNAT4 causes placental hypoplasia associated with intrauterine growth restriction in mice.](#) Proc Natl Acad Sci U S A. 2019 Oct 15;116(42):21047-21053.
- Miura K, Matoba S, Ogonuki N, Namiki T, Ito J, Kashiwazaki N, Ogura A. [Application of auxin-inducible degron technology to mouse oocyte activation with PLC \$\zeta\$.](#) J Reprod Dev. 2018 Aug 20;64(4):319-326.
- Matoba S, Liu Y, Lu F, Iwabuchi KA, Shen L, Inoue A, Zhang Y. [Embryonic development following somatic cell nuclear transfer impeded by persisting histone methylation.](#) Cell. 2014 Nov 6;159(4):884-95.
- Inoue K, Matoba S, Ogura A. [Somatic Cell Nuclear Transfer in Mice: Basic Protocol and Its Modification for Correcting X Chromosome Inactivation Status.](#) Methods Mol Biol. 2018;1861:55-65.

補足

- 特になし

作成者

- 遺伝工学基盤技術室
- 質問などの連絡先
的場章悟：shogo.matoba@riken.jp