

○ヤマトヒメミミズの基本的な飼育方法（一部の図は北大栃内研より）

1. 寒天培地(Holt,1%)の作り方

φ 100mm～

三角フラスコ(プラスチック)に Holtfreter 液※  
を 100ml と寒天を 1g 入れる



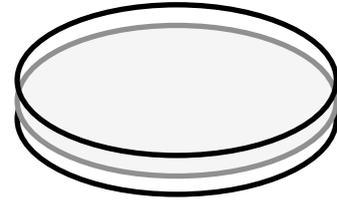
レンジで温め、液が透明になったら冷やす



手で持てるくらいの温度になったらシャーレに移す



完全に固まったら出来上がり



寒天培地(Holt,1%agar)

※Holtfreter 液の組成  
純水…1000ml  
NaCl…3.5g  
KCl…0.05g  
CaCl<sub>2</sub>…0.05g  
NaHCO<sub>3</sub>…0.2g

2. 飼育方法(無性生殖)

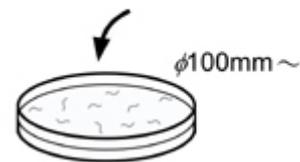
寒天培地(Holt,1%agar)にミミズを数匹入れる



3日に1回程度エサ(オートミール※)を与え、インキ  
ュベーター(23℃)内で飼育する。乾燥に注意。



2週間に1回培地交換を行う



※オートミールはコーヒーマイルで粉  
砕後,オートクレーブ滅菌して使用

○ヤマトヒメミミズの有性化方法

ヤマトヒメミミズを4週間飢餓状態にする



15cm ディッシュに寒天培地  
(Holt,1%agar)を入れミミズを10匹入れ



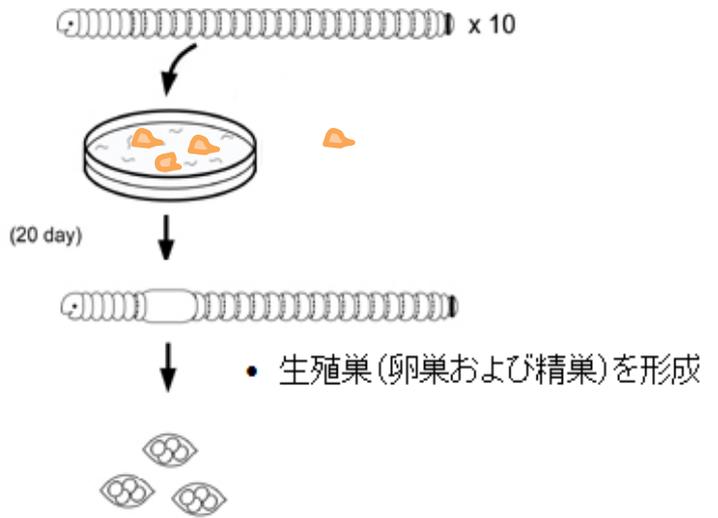
寒天で固めたエサを刻んで入れる※



インキュベーター(23°C)で約20日程度  
置く(餌を食べ成長、フルサイズになると自切、その後生殖巣形成)。

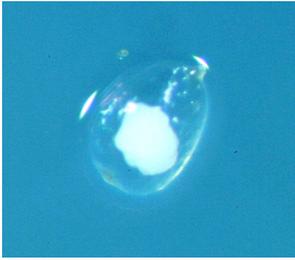


生殖巣を形成したミミズは2,3日で卵を産む  
(約6日で孵化)



※寒天で固めたエサの作り方

寒天培地(Holt,1%)をレンジで温め、チューブに10ml入れ、オートミール粉末を0.5g入れる(5%)。混ぜながら水で冷やして固める。



ヤマトヒメミミズの卵  
コクーンに包まれた卵



#### 有性化誘導したヤマトヒメミミズ

有性化を誘導すると、白矢頭で示すように小さな細胞塊が頭部から 7, 8 体節に出現した。性成熟が進むにつれて細胞塊は大きくなって、最終的に生殖巣を形成する。

○インジェクション

微細ガラス針を Fig.1 の機械を用いて作製する



微細ガラス針を研磨器により研磨する



ヤマトヒメミミズ卵のコクーンを切断し、  
中身を取り出す



微細ガラス針を用いて卵にプラスミド溶液  
を注入する



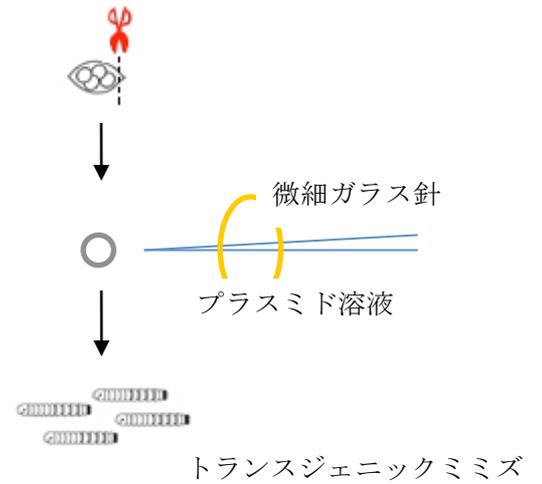
遺伝子導入した卵は別のディッシュに移す



Fig.1 プーラー

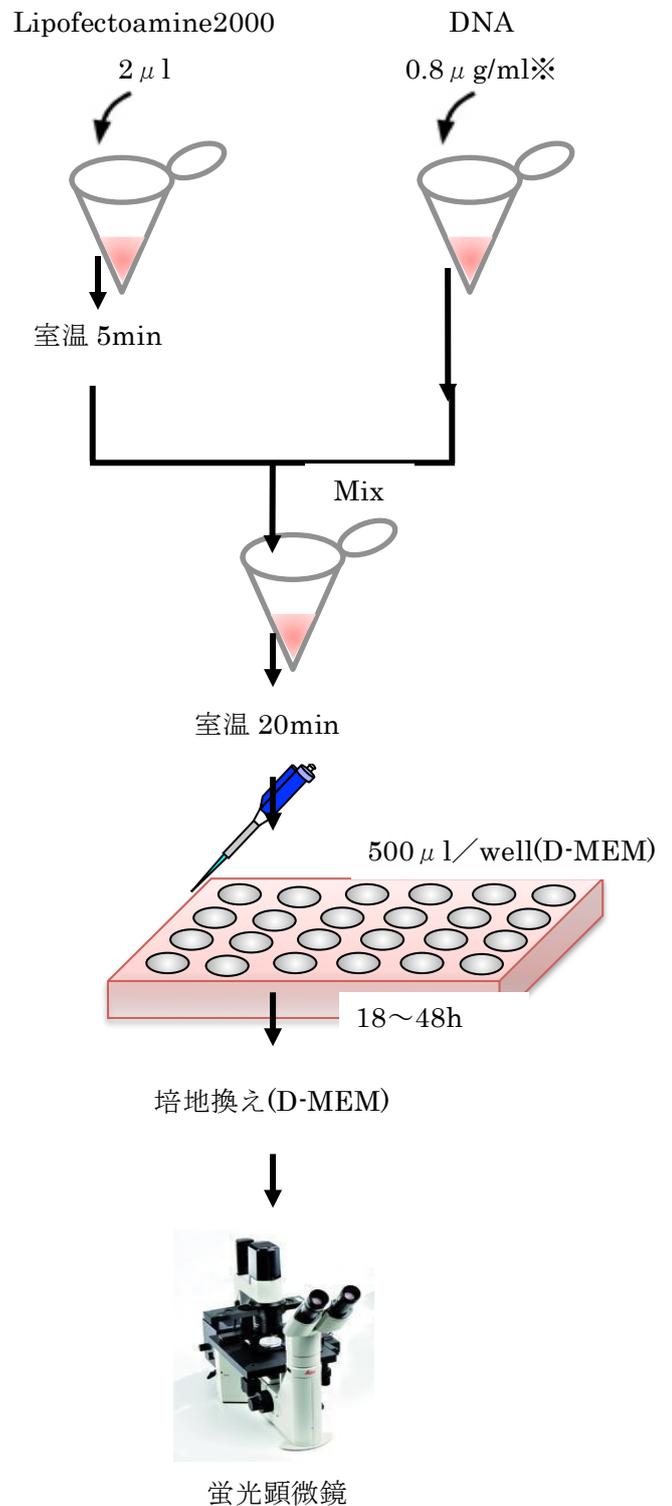
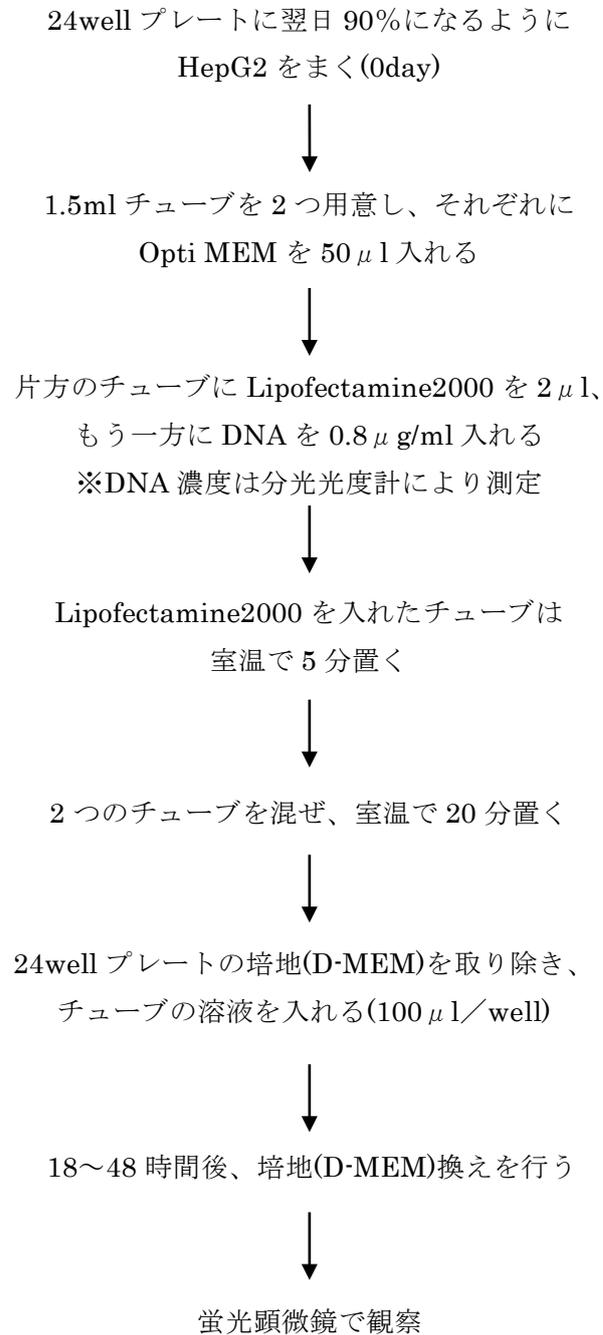


Fig.2 研磨器



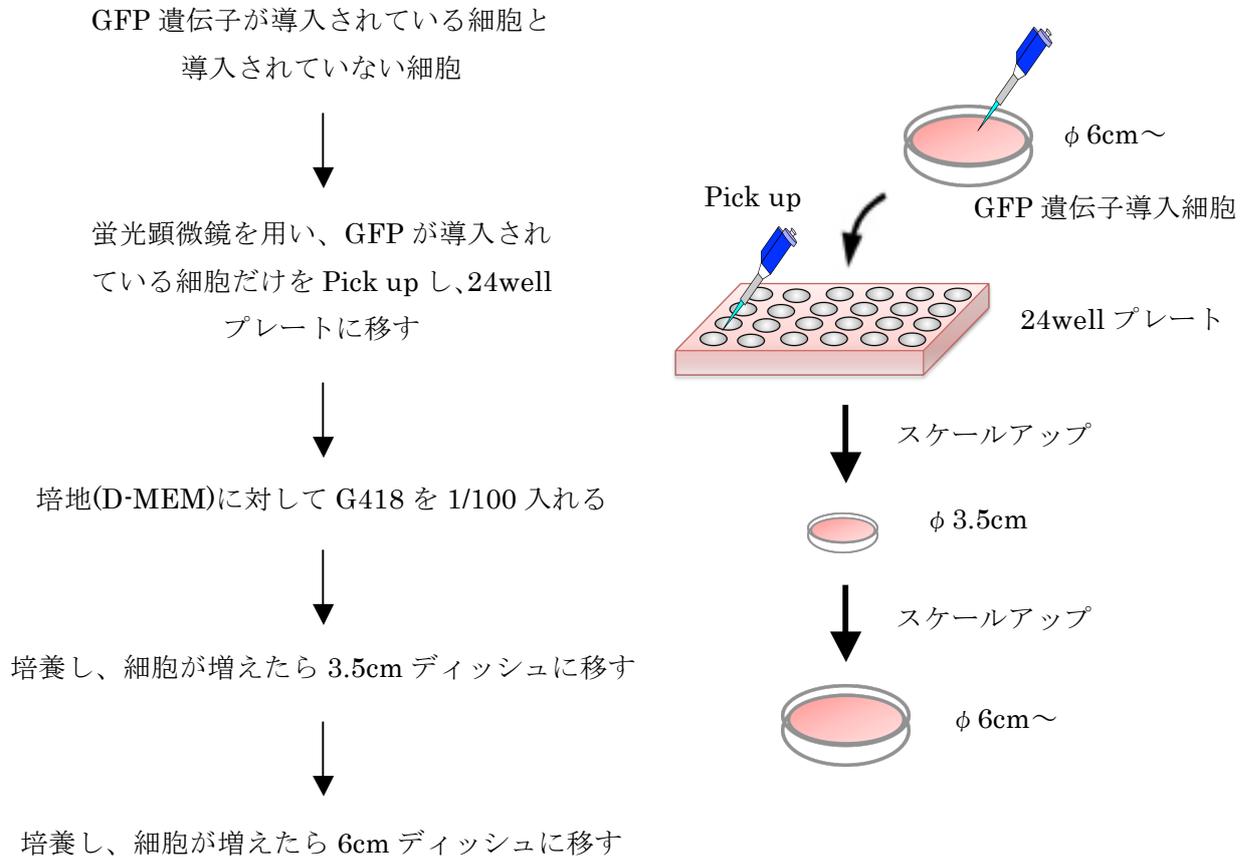
○細胞への遺伝子導入

用意するもの：HepG2(ヒト肝癌由来細胞株)、DNA(GFP 遺伝子)、Lipofectamine 2000(脂質親和性試薬)、Opti MEM、D-MEM(10%FBS、1%PS)



○遺伝子導入細胞のクローニング

用意するもの：GFP 遺伝子導入細胞、G418(抗生物質)



○蛍光顕微鏡の使い方

1. 蛍光顕微鏡本体と光源の電源を入れる

※光源の電源を入れてから 10 分待つ

2. 細胞を置き、ピントを合わせる

3. フィルターをセットし、ライトを切る

※上部にあるつまみを右にスライドさせると完全に光を  
さえぎることができる

4. 後ろにあるレバーを下げると励起光が照射される



Fig.1 蛍光顕微鏡



Fig.2 光源