

材料與方法

一、構築線蟲 co-injection 用的質體

1. Etr-1

首先，將線蟲的 RNA 抽取出後進行 RT-PCR，設計一對含限制酶 (*Xba*I 和 *Nco*I) 的 primer 5' -GCTAGCCAGTTCGAGTGGTACCA-3' 及 5' -CCATGGGATACTTTTATCGATTG-3'，然後以 PCR 方式使其放大，條件如下：94°C 5 分(94°C 30 秒, 50°C 45 秒, 72°C 1 分, 35 次循環) 72°C 10 分。載體為只對線蟲具特殊作用含 heat shock promoter 的 49.78 及 49.83，以限制酶 *Xba*I 和 *Nco*I 切 insert 及 vector 再以連結酶粘合即構築好殖體。在 25°C 熱刺激下會表達下游基因，49.78 表達在神經及皮下組織，49.83 表達在腸胃道，以顯微注射方式將此兩種殖體同時注射在線蟲則會表現在腸、內臟、肌肉、神經和咽喉，造成全身性表達。

2. muscleblind

首先，將線蟲的 RNA 抽取出後進行 RT-PCR，設計一對含限制酶 (*Xba*I 和 *Nco*I) 的 primer 5' -GCTAGACGCCTGTAGCTTCATCG -3' 及 5' -CCATGGGGAGCTGTACCAATG -3'，然後以 PCR 方式使其放大，條件如下：94°C 5 分(94°C 40 秒, 53°C 40 秒, 72°C 1 分, 35 次循環) 72°C 10 分。

℃ 10 分。載體為只對線蟲具特殊作用含 heat shock promoter 的 49.78 及 49.83，以限制酶 *Xba*I 和 *Nco*I 切 insert 及 vector 再以連結酶粘合即構築好殖體。在 25℃ 熱刺激下會表達下游基因，49.78 表達在神經及皮下組織，49.83 表達在腸胃道，以顯微注射方式將此兩種殖體同時注射在線蟲則會表現在腸、內臟、肌肉、神經和咽喉，造成全身性表達。

二、構築線蟲 RNAi 的質體

1. Etr-1

首先，將線蟲的 RNA 抽取出後進行 RT-PCR，設計一對含限制酶 (*Eco*RI) 的 primer 5' -GGAATTCGAGGAGAATCTGCGTGAC-3' 及 5' -GGAATTCTGTTGATGATTGGCGAGCG-3'，然後以 PCR 方式使其放大，放大的範圍在 exon3 到 exon5，長度為 750 bp，條件如下：94℃ 5 分(94℃ 30 秒, 52℃ 45 秒, 72℃ 1 分，35 次循環) 72℃ 10 分。質體 (L4440) 含有 ampicillin resistant 及 T7 promoter，以限制酶 *Eco*RI 切 insert 及 vector 再以連結酶粘合即構築好殖體。

2. muscleblind

首先，將線蟲的 RNA 抽取出後進行 RT-PCR，設計一對含限制酶 (*Eco*RI) 的 primer 5' -CACCCTACTACAACGGCATG-3' 及 5' -CACTGCCGCTGCTGTATAAG-3'，放大的範圍在 exon1 到 exon3，

長度為 530 bp，然後以 PCR 方式使其放大，條件如下：94°C 3 分(94°C 30 秒, 55°C 45 秒, 72°C 1 分, 35 次循環) 72°C 10 分。質體(L4440)含有 ampicillin resistant 及 T7 promoter，以限制酶 *EcoR*I 切 insert 及 vector 再以連結酶粘合即構築好殖體。

三、以餵食的方式進行 RNAi (RNA interference)

將此構築好的質體轉殖到 HT115 菌株，HT115 菌株含有受 IPTG(1 mM)誘導產生 T7 polymerase 的質體，而驅動我們轉殖進去的質體產生 double strain RNA，所配製的 NGM plate 含有 1 mM 的 IPTG，並將 HT115 菌株塗抹在 NGM plate 上以餵食的方式讓線蟲吃入。將 N2 (wild type) L4 的線蟲挑到三種不同質體菌株 (vector only, muscleblind and Etr-1) 塗抹的 1 Mm IPTG NGM plate 上，在 23°C 下 24 小時後再將蟲挑起換到相同條件的培養基上，在繼續以 23°C 24 小時培養後觀察結果。影像擷取及分析係利用數位式低照度彩色攝影機(CCD)及 Media Cybernetics Image Pro Plus 4.1 (Axiocam, Carl Zeiss, Inc.)軟體處理。