

Comments on tunicamycin selection with pGWB7xx (Pnos:GPT marker) by Dr. Yuji Tanaka.

Tunicamycin stock solution.

Add 1 mL of H₂O to 10 mg of tunicamycin powder. Sterilize by filtration, divide to 100 μ L for stock (10 mg/mL) at -20 °C.

Tunicamycin medium.

Add 900 μ L of H₂O to 100 μ L stock of tunicamycin. It makes 1 mg/mL tunicamycin solution.

Add 15 μ L of 1mg/mL tunicamycin solution to 100 mL of MS medium. It makes MS medium containing 0.15 mg/L tunicamycin (concentration we reported in publication).

- (1) Make selection plate with not so thick medium.
- (2) Do NOT sow seeds densely as usual.
- (3) If 0.15 mg/L tunicamycin is not effective, use 0.25 mg/L tunicamycin.
- (4) Even resistant plants (transgenic plants) are damaged by tunicamycin. Pick up plants seem to be (slightly) healthy compared to others, transfer to non-selection plate to make them vital, and check reporter expression (or check transgene by PCR).
- (5) Tunicamycin selection is maybe available only for *Arabidopsis thaliana*.

pGWB7xx (Pnos:GPT marker)でのツニカマイシン選抜に関するコメント (田中優史博士)

中川研のツニカマイシン溶液はツニカマイシン粉末, 10 mg に milli Q, 1mL を加え、フィルター滅菌したものです。現在保管しているものはストックとして 100 μ L ずつ分注したもので、使用する際はこれに 900 μ L の滅菌水を加えて、1 mg/mL に希釈して使用します。培地に加えるツニカマイシンの終濃度は、論文の通り 0.15 mg/L です。1 mg/mL ツニカマイシン溶液を MS 培地, 100 mL あたり 15 μ L 加えると終濃度 0.15 mg/L になります。

ツニカマイシン培地を用いた選抜に関しては、自分で行ったときは問題なかったのですが、他のラボでは難しいこともあるようです。少し薄めの (厚めでない) 培地を用い、種をまく際に密にまかないようにするとよいかもかもしれません。また、終濃度 0.15 mg/L では上手くいかない場合は終濃度 0.25 mg/L でも試してみることをお勧めします。

選抜培地に生える形質転換体はダメージを受けています。見た目が他の芽生えと違って少しでも元気そうなものは全て抗生物質を含まない培地に植え替え、元気にしたところで別の方法 (蛍光観察など) で二次スクリーニングを行って、形質転換体を得るのが確実だと思います。