

RNAi ~feeding version

Hiroshi Qadota <qadota@zoology.ubc.ca> 2002/10/10

オリジナルは、Julie Ahringer lab の方法である。

Day 1: E. coli transformation

E. coli host: HT115(DE3)*
Backbone plasmid: pPD129.36 (L4440)
Plate: LB+Amp+Tet**
37 ° C overnight

* recA 変異が入っていないので組み換えを起こす可能性がある。よって、この株を用いてクローニングすることは避ける。また、フリージングストックを作成することも避けた方がよい。使用前に必ず、形質転換を行った方がよい。また、endA も入っていないので、この株からプラスミドを単離するのもやめた方がよい。

** Ampicilin 100 ug/ml, Tetracyclin 12.5 ug/ml

Day 2: E. coli preculture

LB+Amp+Tet 2 ml
(final concentration: Amp 100 ug/ml, Tet 12.5 ug/ml)
Shake at 37 ° C overnight

Day 3: Induction and start feeding RNAi

2xYT+Amp+Tet 1.2 ml + preculture 12 ul (1/100)***
(final concentration: Amp 100 mg/ml, Tet 12.5 mg/ml)
Shake at 37 ° C until OD=0.4 (2~2.5 hr)****
Add 100 mM IPTG 4 ul
Induction: 4 hr at 37 ° C
Add 100 mM IPTG 4 ul, 50 mg/ml Amp 2 ul, 5 mg/ml Tet 2.5 ul
Seed NGM plates (containing Amp and Tet)
9 plates/sample
Pick up 1 worm /plate, total 3 worms*****

*** この Volume で 20 枚ほどのプレートを用意することが出来る。

**** プラスミドによって増殖速度が違うので、きちんとチェックする。

*****野生型 20 度の培養ならば、3 匹の虫を 3 ~ 4 日前に植えておけばよい。

Day 4: Pick-up worms

Pick-up worms to new feeding plates: morning
eggs during this time are affected by RNAi
Pick-up worms to new feeding plates: afternoon or evening
until laying enough eggs (6~8 hr)

Day 5: Check embryonic phenotype

Pick-up worms to new normal plates: morning
Check embryonic phenotype

Day 6: Check larva and adult phenotype

Check larva and adult phenotype