

pAUR135 DNA

Code No. 3604

Size: 20 μ g

Conc.: 0.5 μ g/ μ l

* 2 years from date of receipt under proper storage conditions.

Description:

pAUR135 is a shuttle vector including DNA sequence to remove the vector region containing selectable marker *AUR1-C* from transformants of *Saccharomyces cerevisiae* by this vector. Selection of marker-removed clones is easy and efficient, and so pAUR135 vector is available repeatedly for transformation. The vector contains *AUR1-C* gene that confers Aureobasidin A (AbA)-resistance on yeast cells and GIN11M86 DNA under the control of GAL10 promoter. Overexpression of GIN11M86 causes growth inhibition of host cells.

Most of AbA-resistant transformants by pAUR135 vector, when shifted onto galactose medium which induce overexpression of GIN11M86 controlled by GAL10 promoter, show lethal-phenotype. But, only pAUR135 vector-removed clones as a result of low-efficient homologous recombination can grow on galactose medium preferentially. These galactose-growing clones consist of expected-phenotype ones and reverted ones, which are AbA-sensitive. So, pAUR135 is available for retransformation of these clones.

pAUR135 is effective for introduction of mutation into yeast genome and disruption of gene function. In case of transformation of industrial yeast strains, usage of pAUR135 decreases troubles with unnecessary DNA sequence.

Form: 10 mM Tris-HCl, pH 8.0
1 mM EDTA

Storage: -20°C

Preparation: cccDNA was purified by CsCl-EtBr ultracentrifugation.

Quality Control Data:

Please see the Certificate of Analysis (CoA) for each lot. You can download the CoA on Takara Bio website.

Vector of pAUR135:

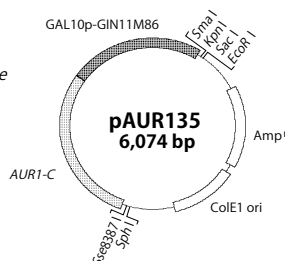
AUR1-C: AbA resistant gene in *S. cerevisiae*

GAL10p-GIN11M86:

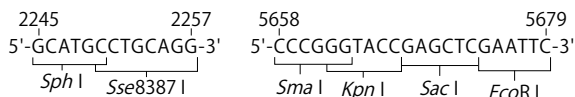
DNA sequence related to galactose-inducible growth inhibition in *S. cerevisiae*

Amp^r: Selective marker in *E. coli*

ColE1 ori: Replication origin in *E. coli*



Cloning site of pAUR135:



Protocol (disruption of gene function):

- (1) Insertion of DNA fragment for disruption into pAUR135 vector
 1. Prepare DNA fragment, whose region has a unique restriction enzyme site which pAUR135 does not, containing a longer part of the objective gene by PCR etc.
 2. Design to disrupt the targetted gene after removing pAUR135 vector with introduction of stop codons or deletion into the DNA fragment.
 3. Insert the DNA fragment to cloning site of pAUR135 and purify the plasmid vector.
 4. Linearize the plasmid vector by cutting unique site on insertion fragment.

(2) Transformation of *S. cerevisiae*

1. Transform yeast cells by acetate-lithium method.
2. Culture in 2 - 5 ml of YPD medium for more than 6 hours and then spread onto YPD selective medium plate containing AbA.
3. Confirm the disruption of targetted gene function of AbA-resistant transformants by examination of phenotype or Southern hybridization.

(3) Selection of marker (pAUR135 vector)-removed clones

1. Streak 10 - 50 clones of disruptants on YPGal plate and then isolate single colonies which can grow on galactose medium. (YPGal; 2% galactose, 2% polypeptone, 1% yeast extract)
2. Examine 10 - 100 colonies growing on YPGal plate in the AbA sensitivity and the disruption of targetted gene function.

References:

- 1) Hashida-Okado T, Ogawa A, Kato I, and Takesako K. *FEBS Letters*. (1998) **425**: 117-122.
- 2) Hashida-Okado T, Ogawa A, Endo M, Takesako K, and Kato I. *Mol Gen Genet*. (1996) **251**: 236-244.
- 3) Akada R, Yamamoto J, and Yamashita I. *Mol Gen Genet*. (1997) **254**: 267-274.
- 4) Kawahata M, Amari S, Nishizawa Y, and Akada R. *Yeast*. (1999) **15**: 1-10.

Attention:

1. This marker removing system using pAUR135 is dependent on overexpression of GIN11M86 controlled by galactose-inducible GAL10 promoter. Consequently, the galactose assimilation of host strains is required for efficient marker removal. Before using the strain for transformation by pAUR135, examine it in galactose assimilation.
2. Within marker-removed clones, ratio of expected-phenotype ones is extremely influenced by the position of introduction of mutation or deletion.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takarabio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

pAUR135 DNA

Code No. 3604

容量： 20 μ g
濃度： 0.5 μ g/ μ l

※適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

●製品説明

pAUR135 は、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の形質転換体から、選択マーカー *AUR1-C* を含む不要な配列を除去するための DNA 配列を組み込み、簡単な方法でマーカー除去クローンを優先的に選別できるよう構築されたシャトルベクターである。pAUR135 には、形質転換体選択マーカーとして *AUR1-C* 遺伝子と、マーカー除去株選別用として GAL10 プロモーターに連結した GIN11M86 配列が含まれている。*AUR1-C* は、実験室酵母、野生型酵母、実用酵母を問わず、*S. cerevisiae* にオーレオバシジン A 耐性を付与する遺伝子である。GIN11M86 は高発現にすると生育阻害を引き起こす自殺活性を有している。pAUR135 による形質転換で得られたオーレオバシジン A 耐性の形質転換体をガラクトース培地に移すと、GAL10 プロモーター活性が誘導されて GIN11M86 が高発現となる。このとき、GIN11M86 を含むほとんどの形質転換体が生育阻害を受けるが、低頻度の相同組換えにより生じた *AUR1-C* マーカーを含むベクター領域が除去された株のみが優先的に生育してくる。これには、オーレオバシジン感受性の目的形質転換体と元に復帰した株とが含まれる。したがって、pAUR135 は再び形質転換に使用できる。また、*AUR1-C* マーカーだけでなくベクター配列も除かれるため、実用酵母の育種において不要配列が残る不安を軽減できる。pAUR135 は、変異導入や遺伝子機能の破壊などに使用できる。

●形状 10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA

●保存 - 20°C

●調製 CsCl-EtBr 超遠心により cccDNA を精製

●品質管理データ

性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

●pAUR101 のベクターマップ

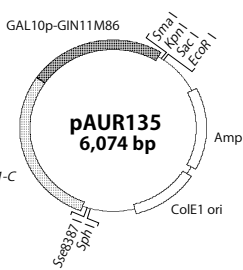
AUR1-C: *S. cerevisiae* の AbA 耐性遺伝子
Amp^r: *E. coli* での選択マーカー
ColE1 ori: *E. coli* での複製起点
GAL10p-GIN11M86: ガラクトース誘導性生育阻害 DNA 配列

<pAUR135 を切断しない制限酵素 (タカラバイオ製品)>

Acc III, Aff II, Aor51H I, Bal I, Bgl II, Bln I, Bpu1102 I, BspT104 I, BssH II, BstX I, Cla I, Cpo I, Eco52 I, Eco81 I, Fba I, Hind III, Mlu I, Nae I, Not I, Nru I, PmaC I, PshA I, Sac II, Sal I, Sfi I, SnaB I, Spe I, Van91 I, Xba I, Xho I

●pAUR101 クローニングサイト図

2245 2257 5658 5679
5'-GCATGCCTGCAGG-3' 5'-CCCGGGTACCGAGCTCGAATTC-3'
Sph I Sse8387 I Sma I Kpn I Sac I EcoR I



●使用法 (遺伝子の機能破壊の場合)

- (1)機能破壊用断片の pAUR135 への挿入
1. 破壊したい遺伝子の一部領域 (pAUR135 を切断しない制限酵素で一カ所切断できるもの) を PCR 等で準備する。
(組換え効率を上げるため、なるべく長い断片を使用してください。)
2. ストップコドンの導入や一部を欠失させることなどにより、マーカー除去後に目的遺伝子の機能が破壊される形に設計する。
3. pAUR135 のクローニングサイトに挿入し、プラスミドを精製する。
4. プラスミドを破壊用断片の一カ所切断サイトで切断し、直鎖状にする。
(2)出芽酵母の形質転換
1. 酢酸リチウム法により形質転換を行う。
2. YPD 培地 2 ~ 5 ml で 6 時間から一晩培養した後、適宜、オーレオバシジンを含む YPD 選択プレートに塗布する。
3. 取得した形質転換体の遺伝子機能の破壊を、形質の変化やゲノムのチェック等により確認する。
(3)マーカー除去株の選別
1. 遺伝子破壊された形質転換体、数 ~ 10 数クローンをそれぞれ YPGal プレート上にストリークし、シングルコロニーを分離する。
(YPGal; 2% Galactose, 2% Polypeptone, 1% Yeast extract)
2. YPGal プレート上に生育してきたコロニー 10 ~ 数 10 個について、オーレオバシジン感受性の確認および遺伝子機能の破壊の確認を行い、マーカー除去された遺伝子機能破壊株を選別する。

●注意

1. マーカーが除去されたクローンのうちの目的形質転換体の割合は、変異や欠失の導入位置によってかわります。また、形質転換に用いた宿主株によっても差が見られます。
2. 通常、ガラクトース資化性の高い一倍体の出芽酵母ではこの方法で効率よくマーカー除去されたクローンが得られます。ガラクトース資化性が非常に弱い株では、GAL10 プロモーターによる誘導発現が十分にはおこらず、マーカー除去が得られないことがありますので、宿主株のガラクトース資化性を確認してご使用ください。
3. 二倍体酵母の場合にも、やはり、ガラクトース資化性が重要です。特に実用酵母の場合、ガラクトースプレート上のコロニー生育にバラツキの出る株が多く、それも影響することがあります。例えば、ガラクトース資化能の強い焼酎酵母協会 2 号の場合は、一倍体酵母とほぼ同様にガラクトースプレート上で生育阻害が起こり、マーカーの除去が期待できますが、細かいバックグラウンドコロニーが出やすいので十分なシングルコロニー分離が必要です。また、バラツキが非常に大きい台研協会 396 号では、ガラクトース資化性のよいコロニーでだけ、生育阻害 ~ マーカー除去がおこる傾向が見られますので、多めの形質転換体で検討することが必要です。一方、資化能の弱い清酒酵母協会 7 号などでは、生育阻害に至らない弱い生育抑制が全体にあらわれる傾向がみられます。そのため、形質転換体を YPGal の液体培地で 1 ~ 3 日振とう培養し、いったん宿主株との生育の差が確認された後、相同組換えによるマーカー除去株が生育を始めた時点で YPGal プレートでコロニー分離すると、マーカー除去体を得やすくなります。

●参考文献

- 1) Hashida-Okado T, Ogawa A, Kato I, and Takesako K. *FEBS Letters*. (1998) **425**: 117-122.
- 2) Hashida-Okado T, Ogawa A, Endo M, Takesako K, and Kato I. *Mol Gen Genet*. (1996) **251**: 236-244.
- 3) Akada R, Yamamoto J, and Yamashita I. *Mol Gen Genet*. (1997) **254**: 267-274.
- 4) Kawahata M, Amari S, Nishizawa Y, and Akada R. *Yeast*. (1999) **15**: 1-10.
- 5) 赤田倫治 醸協 (1998) **93**: 113-119.

●注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。