

# pAUR135 DNA

Code No. 3604

包装量: 20 µg

浓度: 0.5 µg / µl

\* 自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。

## 制品说明:

pAUR135 是一种穿梭载体, 可以利用载体本身的 DNA 序列将酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 转化子中的载体部分序列包括选择标记 AUR1-C 基因去除。选择标记被去除的克隆筛选更容易且高效。所以, pAUR135 载体可以反复转化。含有 AUR1-C 基因的载体在酵母细胞中具有 Aureobasidin A (AbA) 抗性和 GAL10 启动子调控的 GIN11M86 DNA。GIN11M86 基因的过表达可以抑制宿主细胞的生长。大部分因为 pAUR135 存在而具有 AbA 抗性的转化子在转移到半乳糖培养基中培养时, GIN11M86 基因可以在 GAL10 启动子和半乳糖作用下过表达, 从而表现出致死显型。但是只有那些低效重组获得的 pAUR135 载体被去除的克隆可以优先在半乳糖培养基中生长。这些能在含有半乳糖的培养基中生长的克隆包含目的表型的克隆和回复原状的克隆, 是 AbA 敏感的克隆。所以 pAUR135 可以对这些克隆再次转化。pAUR135 能够有效地在酵母中导入突变和破坏基因功能。假如工业酵母菌株发生了退变, 应用 pAUR135 可以减少不必要 DNA 序列引起的麻烦。

**贮存溶液:** 10 mM Tris-HCl, pH8.0  
1 mM EDTA

**保存:** -20°C

**制备:** CsCl-EtBr 超离心方法制备

## 质量标准:

请查阅各批次 Certificates of Analysis (CoA)。产品 CoA 请在 Takara Bio Inc. 网站中下载:

[https://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc\\_index.php](https://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc_index.php)。

## 使用方法 (基因功能破坏的应用):

- (1) 具有破坏基因功能的 DNA 片段插入 pAUR135:
  1. 通过 PCR 方法扩增靶基因的一部分片段, 该片段需要有一个 pAUR135 Vector 没有的单酶切位点。(为了获得较高的同源重组效率, 可以扩增较长的 DNA 片段)
  2. 通过导入终止密码子或者基因部分缺失的方法, 达到选择标记去除后破坏靶基因功能的作用。
  3. 在 pAUR135 DNA 的多克隆位点处插入所得 DNA 片段, 然后质粒提取。
  4. 提取的质粒利用靶 DNA 片段的单切点限制酶进行线性化处理。

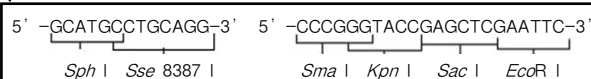
## (2) 酿酒酵母的转化

1. 利用醋酸锂方法转化酿酒酵母。
2. 在 2-5 ml 的 YPD 培养液中培养超过 6 小时, 然后涂布于含 AbA 的 YPD 选择培养基平板中。
3. 通过 Southern 杂交或表型检测确认靶基因功能的破坏情况。

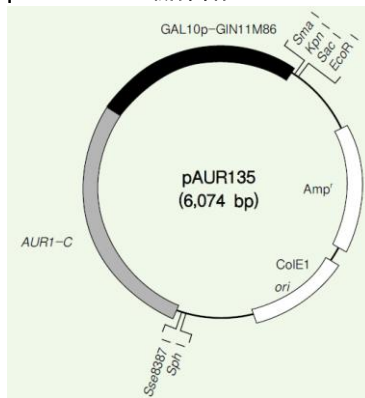
## (3) 选择标记去除型菌株的筛选

1. 基因功能被破坏的菌株 10-50 个划线到 YPGalactose 平板上进行单克隆分离。(YPGalactose: 2% Galactose, 2% Polypeptone, 1% Yeast extract)
2. 筛选 10-100 个单克隆, 确认其 AbA 的耐性和靶基因的功能缺失情况。

## pAUR135 DNA 多克隆位点



## pAUR135 DNA 载体图谱



AUR1-C: *S. cerevisiae* 的 AbA 抗性基因

GAL10p-GIN11M86: 半乳糖诱导的生长抑制基因

Amp<sup>r</sup>: *E. coli* 的选择标记基因

ColE1 ori: *E. coli* 复制子

## 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.

## 注意:

1. 在 pAUR135 中进行选择标记去除主要依靠 GIN11M86 的过表达, 而 GIN11M86 的过表达受半乳糖诱导的 GAL10 启动子控制。因此, 有效的标记去除需要宿主菌对半乳糖的消化作用, 实验前要先确认宿主的半乳糖营养性后再使用本系统。
2. 对于标记去除的克隆, 目的表型的比例受导入突变或缺失的位置的影响很大。

## 注意

本产品仅供科学研究使用, 不能用于人、动物的医疗或诊断程序, 不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经 Takara Bio Inc. 书面许可授权或批准, 不得制造、许诺销售、销售、进口 Takara 产品, 或者使用 Takara 产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权, 请联系我们, 或访问我们网站 [www.takarabio.com](http://www.takarabio.com)。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术(北京)有限公司翻译制作, 最新版本文件请参考 Takara Bio Inc. 网站。为正确使用 Takara 产品, 您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

v202208Da