

pPTR II DNA

Code No. 3622

包装量: 20 µg
浓度: 1 µg / µl

* 自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。

制品说明:

pPTR II 是一种可以在 *Aspergillus* 属真菌内进行自主复制的穿梭载体。pPTR II 在 *E. coli* 中的选择标记为 Ampicillin 抗性基因; 在 *Aspergillus* 中, 选择标记为 Pyriithiamine 抗性基因 *ptrA*。另外, 在 *lacZ* 基因中, 含有多克隆位点 *Hind* III、*Sma* I、*Kpn* I, 用 IPTG 和 X-gal 的平板筛选, 可以很容易筛选到含有外源基因的克隆。

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

保存: -20°C

链长: 10,031 bp

制备: 柱层析纯化。

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:

http://catalog.takara-bio.co.jp/search/doc_index.php。

用途:

利用 Thiamine 的代谢竞争类似物 Pyriithiamine 的筛选, 转化 *Aspergillus* 属真菌 (如: *A. oryzae*, *A. niger*, *A. terreus*, *A. fumigatus*)。pPTR II 以质粒的形式驻留在 *Aspergillus* 中。

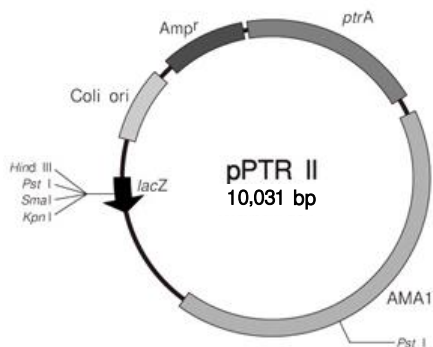
参考文献:

Kubodera T, Yamashita N, and Nishimura A.
Biosci Biotechnol Biochem. (2000) **64**: 1416-1426.

注意:

当有 Thiamine 存在的时候, 将会影响 Pyriithiamine 选择效率, 因此, 使用 pPTR II 进行转化时, 培养基、试剂中不能含有 Thiamine。

pPTR II DNA载体图谱



ptrA: *A. oryzae* 的 Pyriithiamine 抗性基因

lacZ: *E. coli* 的 β -半乳糖苷酶基因

Amp^r: *E. coli* 的选择标记

Coli ori: *E. coli* 的复制起点

AMA1: *A. nidulans* 的复制起点

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.takara-bio.com。

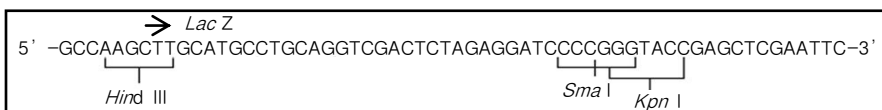
您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

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。

v201908Da

pPTR II DNA 多克隆位点



Pyrithiamine抗性载体转化系统 原生质体-PEG法转化*A.oryzae*

器具以及溶液全部要求灭菌，同时需要无菌化操作。

准备

孢子悬浊液：

用10 ml的0.1% Tween 80, 0.8% NaCl溶液收集平板上的*A.oryzae*孢子。然后，用玻璃过滤器(3G2)过滤悬浊液，去除菌丝和凝胶碎片，收集过滤溶液。3,000 rpm, 5分钟离心，收集孢子，弃去上清液，用10 ml 0.1% Tween 80溶液清洗孢子两次，用适量灭菌水悬浮孢子。

CD培养基 (配制1 L)

NaNO ₃	6.0 g
KCl	0.52 g
KH ₂ PO ₄	1.52 g
1M MgSO ₄ · 7H ₂ O	2 ml ^{*1}
Glucose	10.0 g ^{*2}
Trace elements solution ^{*3}	1 ml
(Agar	20 g)

1 N KOH调整pH值至6.5。

*1: MgSO₄ · 7H₂O单独灭菌后混合。

*2: 当菌株生长很差的时候，可以在约20 g的高浓度的葡萄糖下培养。

*3: Trace elements solution (1 L配制)

FeSO ₄ · 7H ₂ O	1.0 g
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.8 g
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.4 g
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	0.1 g
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4H ₂ O	0.05 g

CD选择培养基：

CD培养基加入0.8 M NaCl和0.1 μg/ml Pyrithiamine。

CD软琼脂选择培养基：

含有0.5% agar的CD选择培养基，约50°C保温。

原生质体化溶液：

20 mg/ml Yatalase™ phosphate (Code No. T017), 0.8 M NaCl, 10 mM Na phosphatase buffer (pH6.0), 过滤除菌。

原生质体清洗液：0.8 M NaCl

Solution1：

0.8 M NaCl, 10 mM CaCl₂, 10 mM Tris-HCl (pH8.0)

Solution2：

40% (w/v) PEG4,000, 50 mM CaCl₂, 50 mM Tris-HCl (pH8.0) 过滤除菌。

【操作流程】

- 1) 接种*A.oryzae*孢子悬浮液于100 ml的CD液体培养基^{*4}中，用三角培养瓶，30°C充分振荡培养20小时^{*5}。
- 2) 用玻璃过滤器(3G1)过滤收集菌丝，灭菌水清洗后，然后用药勺等尽可能除去菌丝中的水分。
- 3) 在50 ml聚丙烯离心瓶中，用原生质体化溶液悬浮适量的菌丝。
- 4) 30°C轻轻振荡，使其形成原生质体。每30分钟用显微镜确认状态，通常在2小时内完成反应。
- 5) 用玻璃过滤器(3G2)过滤。2000 rpm 5 min 离心过滤液，收集原生质体。
- 6) 用0.8 M NaCl清洗原生质体两次。
- 7) 用Solution 1悬浮原生质体，使其终浓度为2 × 10⁸/ml。然后加入20%体积的Solution2，轻轻悬浮，当Solution2具有很高的粘度时，用力充分悬浮。
- 8) 取0.2 ml原生质体，转移到聚丙烯离心瓶(大于10 ml)里，然后加入质粒(不到20 μl)。质粒最多可以加到20 μg。
- 9) 冰中静置30分钟。
- 10) 加入1 ml Solution2，轻轻悬浮。
- 11) 室温静置15分钟。
- 12) 加入8.5 ml的Solution1，轻轻悬浮。
- 13) 离心溶液，收集原生质体，尽可能弃净上清液。用0.2 ml Solution1悬浮原生质体。
- 14) 原生质体悬浮液与5 ml CD软琼脂选择培养基^{*4}混合。快速将原生质体/软琼脂平铺到CD选择平板上(90 mm-直径)^{*4}。
- 15) 30°C培养5-7天。

*4: 确认使用不含有thiamine的CD培养基，含有thiamine的情况下，PT的选择效率急剧下降。

*5: 振荡培养40-48小时以后，一些菌株可以获得很好的结果。