



# Pyrithiamine-resistant Transformation Systems

## Transformation of *A. oryzae* through Protoplast-PEG method

Sterilize all instruments and solutions to be used, before starting the protocol.

All operations must be performed under sterile condition.

### [Preparation]

• Spore suspension :

Collect the spores of *A. oryzae* on a plate and suspend in 10 ml of 0.1% Tween 80 and 0.8% NaCl. Filter the suspension with a glass filtration (3G2) to remove the hypha and the agar debris, and recover the filtered spore solution.

Centrifuge at 3,000 rpm for 5 min to collect the spores, and discard the supernatant. Wash the spores with 10 ml of 0.1% Tween 80 twice. Suspend the spores in a proper amount of sterile purified water.

• CD medium (per 1 liter) :

NaNO <sub>3</sub>	6.0 g
KCl	0.52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.52 g
Glucose	10.0 g *1
1 M MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2 ml *2
Trace elements solution *3	1 ml
Agar	20.0 g)

Adjust to pH 6.5 with 1 N KOH.

- \* 1 MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O should be autoclaved separately and mixed later.
- \* 2 When a strain shows very bad growth, culture at the higher glucose concentration around up to 20.0 gram.
- \* 3 Trace elements solution (per 1 liter)
 

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

• CD selective medium :

CD medium added with 0.8 M NaCl and 0.1 μg/ml Pyrithiamine (PT).

• CD soft agar selective medium :

CD selective medium having 0.5% agar.  
Keep it at approximately 50°C.

• Protoplast forming solution : Sterilize by filtering.

20 mg/ml Yatalase (Cat. #T017), 0.8 M NaCl,  
10 mM Na phosphate buffer (pH 6.0).

• Protoplast washing solution : 0.8 M NaCl

• Solution 1 :

0.8 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)

• Solution 2 : Sterilize by filtering.

40% (w/v) PEG4000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)

### [Protocol]

- 1) Inoculate the spore suspension of *A. oryzae* in 100 ml of CD liquid medium. \*4 Culture by shaking at 30°C for 20 hours. \*5 (Shake vigorously in a triangle flask with baffle.)
  - 2) Filter with a glass filtration (3G1) to collect the hypha. Wash with sterile purified water and remove water from the hypha fully by pressing with a spatula.
  - 3) Suspend proper amount of hypha in protoplast forming solution contained in a 50 ml polypropylene centrifuge tube.
  - 4) Shake gently at 30°C and form protoplast. Confirm the formation of protoplast by observing the status with a microscope every 30 min. (Usually the reaction is completed within 2 hours.)
  - 5) Filter with a glass filtration (3G2). Centrifuge the filtered solution at 2,000 rpm for 5 min to collect protoplast.
  - 6) Wash the protoplast twice with 0.8 M NaCl.
  - 7) Suspend the protoplast in Solution 1 to have the concentration of  $2 \times 10^8$ /ml. Then add the 20% volume of Solution 2 and suspend gently. As Solution 2 has high viscosity, suspend the solution fully.
  - 8) Add plasmid (in less than 20 μl) into 0.2 ml of protoplast suspension contained in polypropylene centrifuge tube (larger than 10 ml). Plasmid can be added at maximum 20 μg.
  - 9) Leave to stand on ice for 30 min.
  - 10) Add 1 ml of Solution 2. Suspend gently.
  - 11) Leave to stand at room temperature for 15 min.
  - 12) Add 8.5 ml of Solution 1. Suspend gently.
  - 13) Centrifuge the solution to collect the protoplast. Discard the supernatant as much as possible. Suspend the collected protoplast in 0.2 ml of Solution 1.
  - 14) Mix the protoplast suspension in 5 ml of CD soft agar selective medium. \*4 Quickly overlay the protoplast/soft agar on CD selective plate (90 mm-diameter) \*4 to be spread uniformly.
  - 15) Culture at 30°C for 5 - 7 days.
- \* 4 Use CD medium without thiamine. Under the existence of thiamine, the selection efficiency by PT drastically decreases.
  - \* 5 Some strains may allow good results after cultured for 40 - 48 hours by shaking.

# pPTR II DNA

Code No. 3622

容量： 20  $\mu$ g  
濃度： 1  $\mu$ g/ $\mu$ 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

pPTRII は *Aspergillus* 属糸状菌内でプラスミド状態で維持できる自律複製型ベクターである。大腸菌での選択マーカーとしてアンピシリン耐性遺伝子 *Amp<sup>r</sup>* を、また、*Aspergillus* での選択マーカーとして Pyrithiamine 耐性遺伝子 *ptrA* を含んでいる。クローニングサイトとして、*Hind* III、*Sma* I、*Kpn* I の 3 種類の制限酵素切断部位が使用できる。また *lacZ* 領域にクローニングサイトを持っており、IPTG と X-Gal を含むプレートで、外来 DNA の挿入の有無を容易に判別できる。

●形状 10 mM Tris-HCl, pH8.0  
1 mM EDTA

●保存 - 20°C

●調製 カラム処理によりプラスミド DNA を精製

●鎖長 10,031 bp

## ●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のドキュメントセンターからダウンロードできます。

## ●pPTRII のクローニングサイト図

→ *lacZ*  
5'-GCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTC-3'  
*Hind* III *Sma* I *Kpn* I

本製品は白鶴酒造株式会社よりライセンスを受けてタカラバイオ株式会社が販売しています。

## ●用途

チアミンの代謝拮抗アナログである Pyrithiamine を利用した *A. oryzae*、*A. niger*、*A. terreus*、*A. fumigatus* などアスペルギルス属糸状菌の形質転換のためのベクター。

本ベクターはアスペルギルス内でプラスミド状態で維持される。

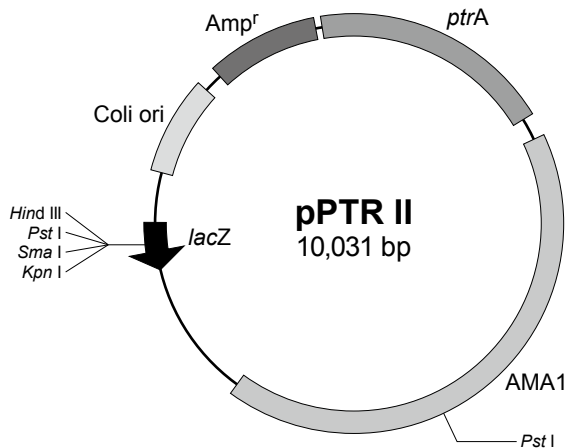
## ●参考文献

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

## ●注意

チアミン存在下では Pyrithiamine の選択圧が激減するので本ベクターを用いる形質転換には、必ずチアミンを含まない培地・試薬を使用する。

## ●pPTRII のベクターマップ



*ptrA* : *A. oryzae* の Pyrithiamine 耐性遺伝子  
*AMA1* : *A. nidulans* での複製起点  
*lacZ* : *E. coli* の  $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子  
*Amp<sup>r</sup>* : *E. coli* での選択マーカー  
*Coli ori* : *E. coli* での複製起点

## ●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。

v201905Da

タカラバイオ株式会社

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

製品についての技術的なお問い合わせ先

テクニカルサポートライン

Tel 077-565-6999

Fax 077-565-6995

# Pyriithiamine 耐性ベクターシステム

## プロトプラスト-PEG 法による *A. oryzae* の形質転換

器具および溶液はすべて滅菌し、操作は無菌的に行ってください。

### <準備>

#### ・孢子懸濁液：

プレート上の *A. oryzae* の孢子を 10 ml の 0.1% Tween 80, 0.8% NaCl に懸濁し、ガラスろ過器 (3G2) でろ過し、ろ液を集める。3,000 rpm、5 分間遠心して分生子を沈澱させ、上清を捨てる。10 ml の 0.1% Tween 80 で分生子を 2 回洗浄した後、適量の滅菌精製水に懸濁し、孢子懸濁液とする。

#### ・CD 培地 (1 L 当たり)：

NaNO <sub>3</sub>	6.0 g
KCl	0.52 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.52 g
1 M MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 ml * 1
Glucose	10.0 g * 2
Trace elements solution * 3	1 ml
(Agar	20.0 g)
1 N KOH で pH6.5 に調整する。	

\* 1：MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O は別にオートクレーブして、後で混合する。

\* 2：著しく生育が悪い菌株の場合には、20.0 g 程度まで Glucose 濃度を上げて培養する。

\* 3：Trace elements solution (1 L 当たり)：

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

#### ・CD 選択培地：

CD 培地に 0.8 M NaCl, 0.1 μg/ml Pyriithiamine (PT) を添加したもの。

#### ・CD 軟寒天選択培地：

CD 選択培地の agar を 0.5% にしたもの。約 50°C で保温しておく。

#### ・プロトプラスト化溶液：ろ過滅菌して使用する。

20 mg/ml Yatalase (製品コード T017), 0.8 M NaCl, 10 mM Na phosphate buffer (pH6.0)

#### ・プロトプラスト洗浄液：0.8 M NaCl

#### ・Solution 1：

0.8 M NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl (pH8.0)

#### ・Solution 2：ろ過滅菌して使用する。

40% (w/v) PEG4000, 50 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl (pH8.0)

### <プロトコール>

- 1) 100 ml の CD 液体培地\* 4 に *A. oryzae* の孢子懸濁液を植菌し、30°C で 20 時間\* 5 振盪培養する (バツフル付き三角フラスコで激しく振盪する)。
- 2) ガラスろ過器 (3G1) でろ過して菌糸を集める。滅菌精製水で洗浄後、スパーテル等で押さえて菌糸から水分を十分に除く。
- 3) 適量の菌糸を、50 ml ポリプロピレン製遠心管中のプロトプラスト化溶液に加えて懸濁する (加える菌糸の量は、溶液中で菌糸がサラサラ動く程度)。
- 4) 30°C で穏やかに振盪し、プロトプラスト化する。30 分毎に顕微鏡で状態を確認し、適当なところで反応をとめる (通常 2 時間以内)。
- 5) ガラスろ過器 (3G2) でろ過し、ろ液を 2,000 rpm で 5 分間遠心してプロトプラストを集める。
- 6) プロトプラストを 0.8 M NaCl で 2 回洗浄する。
- 7) プロトプラストを  $2 \times 10^8$ /ml となるように Solution 1 に懸濁し、0.2 容量の Solution 2 を加えて穏やかに懸濁する (Solution 2 は粘性が高いので、十分に懸濁する)。
- 8) 0.2 ml のプロトプラスト懸濁液 (10 ml 以上のポリプロピレン製遠心管に入れる) にプラスミド (20 μl 以下) を加える (プラスミドは最大 20 μg までにする)。
- 9) 水中で 30 分間静置する。
- 10) 1 ml の Solution 2 を加え、穏やかに懸濁する。
- 11) 室温で 15 分間静置する。
- 12) 8.5 ml の Solution 1 を加え、穏やかに懸濁する。
- 13) 遠心してプロトプラストを集める。上清をできるだけ除き、プロトプラストを 0.2 ml の Solution 1 に懸濁する。
- 14) プロトプラスト懸濁液を 5 ml (90 mm 径シャーレ当たり) の CD 軟寒天選択培地\* 4 に懸濁し、CD 選択プレート\* 4 にプロトプラストが均一に分散するように素早く重層する。
- 15) 30°C で 5 ~ 7 日間培養する。

\* 4：必ずチアミンを含まない CD 培地を使用する (チアミン存在下では PT の選択圧が激減する)。

\* 5：菌株によっては、40 ~ 48 時間の振盪培養で良好な結果が得られる場合がある。

v201905Da