

pHY300PLK DNA

Code No. 3060 **Size:** **10 µg**
Conc.: 300 - 800 µg/ml

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

Supplied Reagent:

Host strain *Bacillus subtilis* ISW 1214 (glycerol stock)

100 µl

Host strain is shipped separately.

Host strain *Bacillus subtilis* ISW 1214

Form : glycerol stock (50% glycerol)

Storage : -80°C

Genotype : *hsr M1, leuA8, metB5, tet^s*

Description:

pHY300PLK is a shuttle vector functioning in *E. coli* and *B. subtilis*, which is constructed with a plasmid pACYC177 of *E. coli* and DNA derived from plasmid pAM α 1 of *Streptococcus faecalis*.

This DNA can transform both *E. coli* and *B. subtilis*. pHY300PLK has ampicillin resistant gene and tetracycline resistant gene as selective markers. This vector expresses both genes in *E. coli*, but only tetracycline resistant gene in *B. subtilis*.

Form:

10 mM Tris-HCl, pH 7.4
0.1 mM EDTA

Storage: -20°C

Preparation:

Purification of cccDNA by CsCl-EtBr ultracentrifugation

Base pairs: 4,870 bp

Quality Control Data:

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

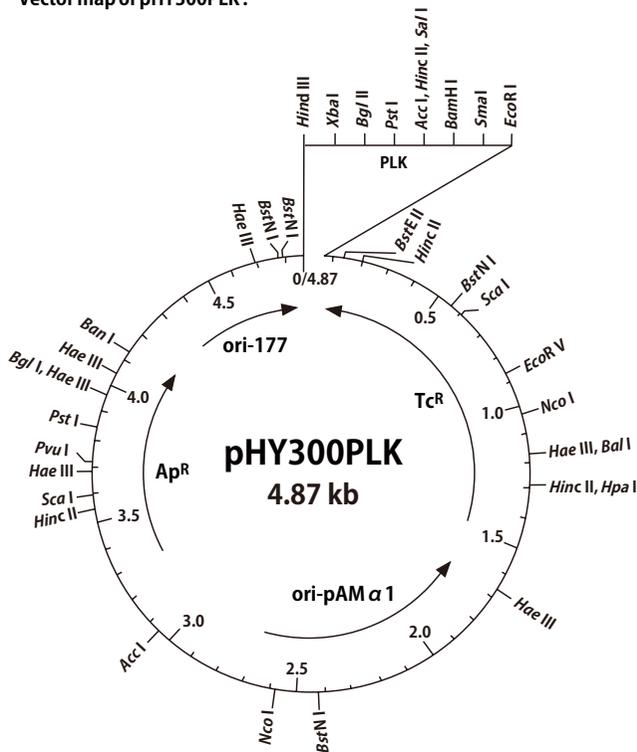
Transformation Efficiency:

E. coli ≥ 2 × 10⁵ / µg DNA

B. subtilis ≥ 2 × 10⁷ / µg DNA*

* The transformation efficiency by electroporation.

Vector map of pHY300PLK:



References:

- 1) Anagnostopoulos C and Spizizen J. *J Bacteriol.* (1961) **81**: 741-746.
- 2) Ikawa S, Shibata T, Matsumoto K, Iijima T, Saito H, and Ando T. *Mol Gen Genet.* (1981) **183**: 1-6.
- 3) Sadaie Y and Kada T. *J Bacteriol.* (1983) **153**: 813-821.
- 4) Ishiwa H and Tsuchida N. *Gene.* (1984) **32**: 129-134.
- 5) Ishiwa H and Shibahara H. *Jpn J Genet.* (1985) **60**: 235-243.

Manufactured by Yakult Co., LTD

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 6973 or from our website at www.takara-bio.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.

pHY300PLK DNA

Code No. 3060

<Transformation procedure into *Bacillus subtilis* ISW1214>

In case of the transformation into *B. subtilis* by Method A using competent cells, the plasmid DNA should be amplified with *E. coli recA*⁺ cells, as the transformation efficiency is much dependent on the ratio of dimer plasmid.

On the other hand, in case of the transformation into *B. subtilis* by electroporation (Method B), monomer plasmid amplified with *E. coli recA*⁻ cells is effective for transformation.

[Method A] Transformation using competent cells

(1) Preparation of Competent cell

SP I medium		SP II medium	
(NH ₄)SO ₄	0.2%	(NH ₄)SO ₄	0.2%
K ₂ HPO ₄	1.4%	K ₂ HPO ₄	1.4%
KH ₂ PO ₄	0.6%	KH ₂ PO ₄	0.6%
Na-Citrate-2H ₂ O	0.1%	Na-Citrate-2H ₂ O	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%
*Glucose	0.5%	*Glucose	0.5%
*Casamino acid	0.02%	*Yeast extract	0.02%
*Yeast extract	0.1%	*MgCl ₂	5 mM
*L-Leucine	50 μg/ml	*L-Leucine	5 μg/ml
*L-Methionine	50 μg/ml	*L-Methionine	5 μg/ml

*They must be autoclave individually.

1. First Culture

- Inoculate *B. subtilis* ISW 1214 in 5 ml of L-broth and culture at 37°C with shaking overnight.
- The following morning, inoculate the overnight culture of ISW1214 into fresh SP1 medium (inoculation volume is about 1%) and culture at 37°C with shaking.
- When cells have grown to the end of log phase, add glycerol to the culture to the final concentration of 12.5%.
- Dispense a 400 μl of aliquot of the culture into microcentrifuge tubes and freeze quickly in a ethanol-dry ice bath.
- Keep the frozen cells at -70°C until use.

2. Second culture

- Liquefy the frozen culture at 37°C.
- Dilute it to 7.5X volume with SP1I medium.
- Culture it for 90 minutes at 37°C with shaking. Use this culture of ISW1214 as competent cells.

(2) Transformation

- Mix 50 μl of competent cells solution and 50 μl of plasmids solution (10 - 100 ng DNA).
- Shake at 37°C for 30 minutes.
- Add 100 μl of L-broth, and shake for 60 minutes at 37°C.
- Spread the aliquot on L-plate containing 20 μg/ml tetracycline.*1
- Incubate the plate at 37°C overnight.

[Method B] Transformation by electroporation

(1) Preparation of cells for electroporation

- Inoculate *B. subtilis* ISW1214 in L-broth and culture at 37°C with shaking overnight.
- The following morning, inoculate 2 ml of preculture into 32 ml of fresh medium (L-broth+0.5 M sorbitol) and culture at 37°C with shaking.
- When cells have grown to A₆₆₀=0.85 - 0.95, stop the culture. (about 2.5 hours)
- Keep the culture on ice for 10 min.
- Centrifuge at 5,000 *g* for 5 min.
- Wash the cells 4 times with chilled Solution A (0.5 M sorbitol, 0.5 M mannitol, 10% glycerol).
- Suspend the cells with 0.8 ml of Solution A.
- Dispense in 60 μl each and store at -80°C. Use these cells for electroporation.

(2) Electroporation

- Thaw the cells (60 μl) on ice and add 1 μl of DNA solution (50 ng/ml).
- Transfer the mixture of cells and DNA into a chilled cuvette (0.1 cm) and keep it for 1 - 1.5 min on ice.
- Pulse*2 it, add 1 ml of Solution B (L-broth + 0.5 M sorbitol + 0.38 M mannitol) and culture at 37°C for 3 hours.
- Spread the aliquot on L-plate containing 30 μg/ml tetracycline*1 and incubate the plate at 37°C overnight.

Notes:

- *1 The ampicillin resistant gene of pHY300PLK can be expressed in *E. coli*, but cannot be expressed in *B. subtilis*. So the antibiotics resistance gene markers is the tetracycline resistant gene only in *B. subtilis*.
- *2 The pulse condition of Gene Pulser (BIO-RAD Inc.): 2 kV, 25 μF, 200 Ω (Time constant=4.5 - 5.0)

pHY300PLK DNA

Code No. 3060

容量: 10 μ g
濃度: 300 ~ 800 μ g/ml

●pHY300PLK DNA のベクターマップ

※適切に保存し、受取り後 2 年を目途にご使用ください。

添付試薬:

Host strain *Bacillus subtilis* ISW 1214 (glycerol stock)

100 μ l

別途お届けしています。

● Host strain *Bacillus subtilis* ISW 1214

形状: グリセロールストック (50% glycerol)

保存: -80°C

Genotype: *hsrM1, leuA8, metB5, tet^s*

●製品説明

プラスミド pHY300PLK は、*Escherichia coli* と *Bacillus subtilis* の両方へ DNA を形質転換できるシャトルベクターで、*E. coli* のプラスミド pACYC 177 と *Streptococcus faecalis* のプラスミド pAM α 1 由来の DNA より構築されている。薬剤耐性マーカーは ampicillin 耐性遺伝子と tetracycline 耐性遺伝子であり、*E. coli* 中で両者が発現するが、*B. subtilis* 中では tetracycline 耐性遺伝子のみが発現する。

●形状

10 mM Tris-HCl (pH7.4)
0.1 mM EDTA

●保存

-20°C

●調製

CsCl-EtBr 超遠心により cccDNA を精製

●鎖長

4,870 bp

●品質管理

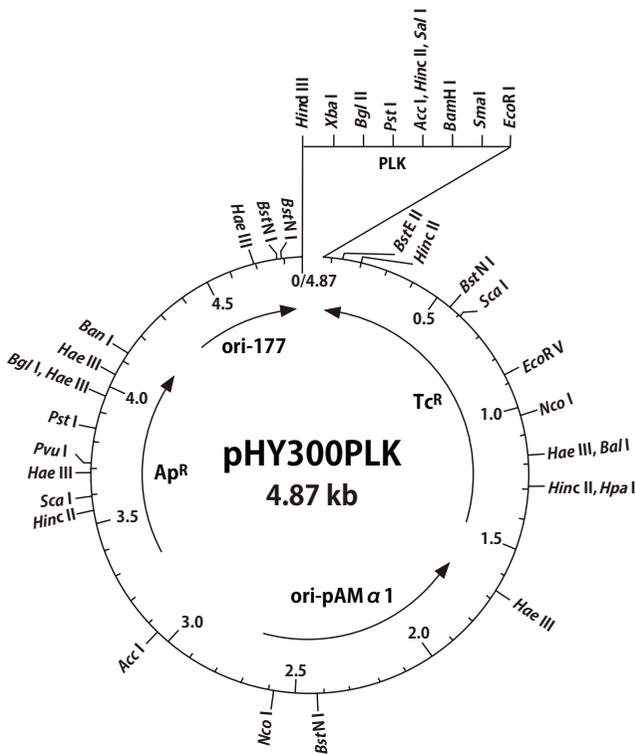
性能試験結果については、各ロットの Certificate of Analysis (CoA) をご覧ください。CoA はタカラバイオウェブサイトからダウンロードできます。

●形質転換効率

E. coli $\geq 2 \times 10^5 / \mu\text{g DNA}$

B. subtilis $\geq 2 \times 10 / \mu\text{g DNA}^*$

*: エレクトロポレーション法による形質転換効率



●参考文献

- 1) Anagnostopoulos C and Spizizen J. *J Bacteriol.* (1961) **81**: 741-746.
- 2) Ikawa S, Shibata T, Matsumoto K, Iijima T, Saito H, and Ando T. *Mol gen Genet.* (1981) **183**: 1-6.
- 3) Sadaie Y and Kada T. *J Bacteriol.* (1983) **153**: 813-821.
- 4) Ishiwa H and Tsuchida N. *Gene.* (1984) **32**: 129-134.
- 5) Ishiwa H and Shibahara H. *Jpn J Genet.* (1985) **60**: 235-243.

本製品は株式会社ヤクルトで製造されたものです。

●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。

v201810

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

pHY300PLK DNA

Code No. 3060

<Bacillus subtilis ISW 1214 株への形質転換>

シャトルベクター pHY300PLK に DNA フラグメントを挿入し、通常の方法で *E. coli* に形質転換を行う。アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性コロニーをシャーレ上で形成させ、コロニーを L-broth 培地に植菌後、6～10 時間培養を行い、プラスミド DNA を調製する。

なお、*B. subtilis* への形質転換をコンピテントセル法 (方法 A) で行う場合、形質転換効率はダイマーの含有量に大きく依存するので、必ず *E. coli* *recA*⁺ 株を用いてプラスミド調製を行う必要がある。

エレクトロポレーション法 (方法 B) で形質転換する場合には、*E. coli* *recA*⁻ 株で調製したプラスミドモノマーでも形質転換が可能である。

[方法 A] コンピテントセルを用いる形質転換

(1) コンピテントセルの調製

(i) 第 1 培養

- 1) *B. subtilis* ISW 1214 株を 5 ml の L-broth に接種。37°C で一晩振とう培養する。
- 2) 一晩培養液を SPI 培地に植菌後 (接種量約 1%)、37°C で振とう培養する。
- 3) 生育が対数増殖期後期に達した時点で、培養液にグリセロールを終濃度 12.5% になる様、添加する。
- 4) マイクロチューブ (ポリプロピレン) に 400 μ l ずつ分注後、ドライアイス-エタノールで急速凍結し、-70°C で保存する。

(ii) 第 2 培養

- 1) 保存しておいた培養液を 37°C ですみやかに融解する。
- 2) SPII 培地で 7.5 倍に希釈する。
- 3) 37°C で 90 分間振とう培養を行い、その培養液を competent cell として用いる。

SPI 培地		SPII 培地	
(NH ₄)SO ₄	0.2%	(NH ₄)SO ₄	0.2%
K ₂ HPO ₄	1.4%	K ₂ HPO ₄	1.4%
KH ₂ PO ₄	0.6%	KH ₂ PO ₄	0.6%
Na-Citrate-2H ₂ O	0.1%	Na-Citrate-2H ₂ O	0.1%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02%
*Glucose	0.5%	*Glucose	0.5%
*Casamino acid	0.02%	*Yeast extract	0.02%
*Yeast extract	0.1%	*MgCl ₂	5 mM
*L-Leucine	50 μ g/ml	*L-Leucine	5 μ g/ml
*L-Methionine	50 μ g/ml	*L-Methionine	5 μ g/ml

* 別滅菌

(2) 形質転換

- 1) Competent cell 液 50 μ l にプラスミド DNA 溶液 50 μ l (10～100 ng DNA) を加える。
- 2) 37°C で 30 分間振とうする。
- 3) 100 μ l の L-broth を加え、さらに 37°C で 60 分間振とうする。
- 4) テトラサイクリンを 20 μ g/ml 含む L-broth のプレート上に塗布し、37°C で一晩培養する*1。

[方法 B] エレクトロポレーション法による形質転換

(1) エレクトロポレーション用セルの調製

- 1) *B. subtilis* ISW1214 株を L-broth で 37°C、一晩前培養する。
- 2) 前培養液 2 ml を本培養液 (L-broth + 0.5 M sorbitol) 32 ml に加え、37°C で本培養を行う。
- 3) A₆₆₀ = 0.85～0.95 で本培養を止める (約 2.5 時間)。
- 4) 氷中に 10 分間放置する。
- 5) 5,000 $\times g$ で 5 分間遠心する。
- 6) 氷冷した Solution A (0.5 M sorbitol, 0.5 M mannitol, 10% glycerol) で菌体を 4 回洗浄する。
- 7) 菌体を 0.8 ml (培養液の 1/40 量) の Solution A に懸濁する。
- 8) 60 μ l ずつ分注し、-80°C で保存する。これをエレクトロポレーション用セルとする。

(2) エレクトロポレーション

- 1) エレクトロポレーション用セル (60 μ l 分) を氷中で溶解し、1 μ l の DNA 溶液 (50 ng/ μ l) を加える。
- 2) 氷冷しておいた 0.1 cm cuvette に、セルおよび DNA の混合液を移し、1～1.5 分間放置する。
- 3) パルス*2 をかけた後、Solution B (L-broth + 0.5 M sorbitol + 0.38 M mannitol) を 1 ml 加え、37°C で 3 時間培養する。
- 4) テトラサイクリン (30 μ g/ml) を含む L-broth のプレートに適量を塗布し*1、37°C で一晩培養する。

● 使用上の注意

*1 : pHY300PLK プラスミドのアンピシリン耐性遺伝子は *E. coli* 中では発現するが、*B. subtilis* 中では発現しない。*B. subtilis* での薬剤マーカーはテトラサイクリンのみである。

*2 : Bio Rad 社製の Gene Pulser の場合、2 kV, 25 μ F, 200 Ω に設定してパルスを加える。その際の time constant は 4.5 から 5.0 である。

v201810