



EBY100 感受态细胞

EBY100 Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1616

感受态组成	保存	规格
EBY100 Chemically Competent Cell	-80°C (6 个月)	100μl×10 支
Carrier DNA (10 μg/μl)	-20°C (12 个月)	100μl
PEG/LiAC	-20°C (12 个月)	5ml

产品介绍:

EBY100 菌株是 Invitrogen 公司开发的酵母展示用菌株, MATa 型, 与 pYD1 质粒配套使用, 可直接转化质粒进行蛋白展示试验; Transformation marker 为: leu2, trp1. EBY100-pYD1 酵母展示系统通过酿酒酵母的 a 凝集素受体 (a-agglutinin receptor) 将目标蛋白展示在细胞表面, 方便后期筛选。其基本原理为: a 凝集素受体由 AGA1 和 AGA2 两个亚基组成, AGA1 蛋白 (725 个氨基酸) 由 EBY100 细胞合成, 分泌到细胞外, 在细胞外基质中与酵母细胞壁的 β- 葡聚糖共价结合, AGA2 蛋白 (69 个氨基酸) 可以通过两个二硫键结合到 AGA1 蛋白上; 将目标蛋白构建到 pYD1 质粒上, 与 AGA2 蛋白融合表达, AGA2 蛋白在 N 端, 目标蛋白在 C 端, 当含有 pYD1 质粒的 EBY100 酵母菌在含有半乳糖, 同时不含葡萄糖的培养基中诱导表达时可以表达出 AGA2-target protein 融合蛋白, 该融合蛋白通过 AGA2 结合到 EBY100 酵母细胞表面的 AGA1 蛋白上进而将目标蛋白展示在酵母表面。EBY100 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率 >10⁴ cfu/μg DNA。

基因型: MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL

操作方法:

1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95°C 金属浴 5min 或插入浮漂中 95°C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100μl 冰上融化的 EBY100 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5μg, 预处理后的 Carrier DNA 10μl, PEG/LiAc 500μl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将离心管放 42°C 水浴 15min (7.5min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000rpm 离心 40s 弃上清, ddH₂O 400μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
5. ddH₂O 50μl 重悬, 涂相应的 SD-/ 氨基酸缺陷型板, 29°C 培养 48-96 h。

注意事项:

1. 感受态细胞最好在冰上融化, 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
2. 在进行 EBY100 酵母菌的诱导表达时, 要去除培养基中的葡萄糖, 加入 2% 的半乳糖。
3. EBY100 酵母菌株对高温敏感, 最适生长温度为 27-30°C; 高于 31°C, 生长速度和转化效率呈指数下降。



4. 菌落变粉不是污染, 是酵母细胞生长中一个常见现象。当细胞在平板培养几天后, 平板上的 Adenine 被酵母消耗完毕, 酵母试图通过自身代谢途径合成 Adenine 以供利用, 然而, 有些菌株的 ADE2 基因被破坏, Adenine 合成途径受阻; 又由于其 ADE4,5,6,7,8 基因均正常, 所以造成中间产物 P-ribosylamino imidazole (AIR) 在细胞中积累而使菌落变为粉红色。

5. 酵母在缺陷培养基中生长速度比 YPDA 培养基慢, 培养基中缺陷成分越多, 生长越慢, 以转化涂板为例: 涂 YPDA 平板 29°C, 48 h 培养可见直径 1 mm 克隆; 涂 SD 单缺平板 29°C, 48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 双缺平板 29°C, 60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 三缺或四缺平板 29°C, 80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。

ZOMANBIO