



EBY.VW4000 感受态细胞

EBY.VW4000 Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1623

感受态组成	保存	ZC1623-1
EBY.VW4000 Chemically Competent Cell	-80°C (3 个月)	100µl×10 支
Carrier DNA (10 µg/µl)	-20°C (12 个月)	50µl
PEG/LiAC	-20°C (12 个月)	5ml

产品介绍:

本公司生产的 EBY.VW4000 感受态细胞经特殊工艺制作, 可用于 DNA 的化学转化, pYES2 质粒检测转化效率高达 10^4 cfu/µg DNA, -80°C可保存三个月。

基因型: CEN.PK2-1C, MATa, hxt13Δ::loxP, hxt15ΔloxP, hxt16Δ::loxP, hxt14Δ::loxP, hxt12Δ::loxP, hxt9Δ::loxP, hxt11Δ::loxP, hx10Δ::loxP, hxt8Δ::loxP, hxt4-1-5Δ::loxP, hxt2Δ::loxP, hxt3-6-7Δ::loxP, gal2Δ::(ura3/FOA), stl1Δ::loxP, agt1Δ::loxP, mph2(ydl247w)Δ::loxP, mph3(yjr160c)Δ::loxP

产品特点:

EBY.VW4000 菌株来源于 CEN.PK2-1C 酵母菌株, MATa 型, Transformation marker 为 ura3, 可用于筛选标记为 URA3 的质粒的转化, 比如 pYES2/NT、pYC2/NT、pDR196、p416GDP、pESC-URA 等质粒。酿酒酵母含有大量严格控制的具有不同特征的己糖转运蛋白, 这些己糖转运蛋白有转运葡萄糖的潜力, 大部分酵母中含有 17 个己糖转运蛋白 (Hexose transporter) HXT1 - HXT17, CEN.PK2-1C 只含有 16 个己糖转运蛋白 (Hexose transporter) HXT1-HXT16; GAL2: 半乳糖渗透酶基因, 为半乳糖利用所必须, 同时具有运输葡萄糖的功能; 还有三个麦芽糖转运蛋白家族成员 (Agt1、Ydl247、Yjr160) 能够运输己糖; 此外, STL1 (Sugar Transporter-Like protein) 为质膜甘油质子同向转运体, 也被认为参与到葡萄糖的转运代谢过程中。为了消除 CEN.PK2-1C 酵母对葡萄糖的摄取能力, 利用 Cre/LoxP 系统将 HXT1 - HXT16、GAL2、AGT1、YDL247w 和 YJR160c 这些能够运输己糖的基因, 加上 STL1 共 21 个基因全部删除, 即是 EBY.VW4000。EBY.VW4000 作为己糖转运蛋白缺陷酵母菌株, 其葡萄糖的吸收和转运活性被完全消除, 其他己糖的吸收和转运能力也被消除, 是发现和研究天然或异源 (其他物种) 己糖转运蛋白的高效试验平台。EBY.VW4000 不能同化葡萄糖或其他己糖作为碳源, 在含有 2% 麦芽糖的培养基中生长正常, 培养 WT 细胞推荐使用 YPM 培养基; 筛选含有质粒的酵母细胞推荐使用 SM 培养基。

操作方法:

1. 取 100µl 冰上融化的 EBY.VW4000 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5µg, Carrier DNA (Carrier DNA 须提前变性处理: 95-100°C 5min, 快速冰浴, 重复一次) 10µl, PEG/LiAc 500µl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30min (15min 时翻转 6-8 次混匀)。
2. 将管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 5000rpm 离心 40s 弃上清, ddH₂O 400µl 重悬, 离心 30s 弃上清。
4. ddH₂O 50µl 重悬, 涂板, 29°C 培养 48-96h。

注意事项：

1. 感受态细胞最好在冰上融化。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. EBY.VW4000 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, 48h 培养可见直径 1mm 克隆; 涂 SD 单缺平板 29°C, 48-60h 培养可见直径 1mm 克隆, 涂 SD 双缺平板 29°C, 60-80 h 培养可见直径 1mm 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。