



PichiaPink-4 感受态细胞感受态细胞

PichiaPink-4 Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1661

感受态组成	保存	规格
PichiaPink-4 Chemically Competent Cell	-80℃ (6 个月)	100μl×10 支
酵母促转化剂	-20℃ (12 个月)	50μl
毕赤酵母转化液	-20℃ (24 个月)	5ml

产品特点：

PichiaPink-4 是毕赤酵母 Pink 菌株,属于真核细胞。一般的针对原核生物的抗生素例如卡那和氨苄对酵母是无效的, 因此为了防止大肠杆菌等原核生物对酵母培养菌株污染, 往往会在培养基中加入一些氨苄和卡那霉素的抗生素, 来抑制细菌的污染和生长。PichiaPink-4 酵母适宜的生长温度是 24-30℃, 温度超过 32℃对于细胞内的蛋白表达是毁灭性灾难, 可能导致细胞的死亡。ADE2 基因编码磷酸核糖甲酰胺咪唑羧化酶基因, 该基因能够催化嘌呤核苷酸合成的第六步反应。在酿酒酵母, 毕赤酵母, 或者其他酵母中, 这个基因的突变或缺失能够导致嘌呤前体在酵母细胞内液泡内的积累, 使得细胞呈现粉红色。Pink4 酵母菌株是 ade2 营养缺陷型, 细胞内的 ade2 基因被缺失, 部分 ade2 启动子也被缺失, 所以菌株在缺乏腺嘌呤(adenine)的培养基中无法生长, 而且在富培养基中生长缓慢。将含有 ade2 基因的表达质粒转化进入该菌株中后, 能够使得菌株获得在腺嘌呤缺乏的培养基中生长, 而且菌株颜色由 ade2 基因缺失时的粉红色恢复为白色。从而间接的指明那些克隆菌株转化质粒成功。PichiaPink-4 是 pep4 基因敲除酵母菌株。pep4 基因编码蛋白水解酶 A, 是细胞液泡内的天冬氨酸蛋白酶, 能够自激活。由于蛋白水解酶 A 对于细胞内液泡的其他蛋白水解酶类也起到很重要的作用, 所以 pep4 基因敲除的菌株, 其蛋白水解酶 B 活力也下降了, 而且细胞内的羧肽酶 Gama 活性也丧失, 这样可以保护表达产物免受降解, 促进表达量的提高。PichiaPink-4 是 prb1 基因敲除酵母菌株。prb1 基因编码蛋白水解酶 B, 是细胞液泡内的丝氨酸蛋白酶, 属于枯草杆菌蛋白酶家族。细胞内蛋白水解酶 B 的缺失可以保护 表达产物免受降解, 促进表达量的提高。PichiaPink-4 的蛋白水解 A 和 B 都被基因敲除了, 因此是 Pink 系列菌株中蛋白酶活性最低的一个宿主菌, 能够有效抑制和避免蛋白质的降解。

操作方法：

1. 取 0.1-5μg 质粒 DNA(线性化质粒加入量 5-50μg)和 10μL 预变性 Carrier DNA, 加入到未融化的 100-200μL 感受态细胞上, 置于 30℃水浴, 每隔 15S 颠倒混匀, 直至感受态细胞刚好完全融化(融化后及时取出)。
2. 加入 1.4 mL B2 溶液颠倒混匀。30℃水浴 60min, 每隔 20min 颠倒混匀。
3. 3000rpm 离心 3min 弃上清留菌体沉淀, 加入 1mL B3 溶液重悬菌体。
4. 3000rpm 离心 3min 弃上清留菌体沉淀, 加入 100μL B3 溶液重悬菌体。
5. 将 100μL 菌液全部涂布到相应的平板培养基, 30℃恒温培养 3-5 天, 直至平板出现酵母克隆。