



KM71H 感受态细胞

KM71H Chemically Competent Cell

Cat.NO. ZC1656

感受态组成	保存	规格
KM71H Chemically Competent Cell	-80°C (6 个月)	100μl×10 支
Carrier DNA (酵母促转化剂)	-20°C (12 个月)	100μl
B 液 (转化液)	-20°C (12 个月)	15ml
C 液 (悬浮液)	-20°C (12 个月)	18ml

产品介绍:

KM71H 是毕赤酵母菌株, 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, 来抑制细菌菌的污染和生长。毕赤酵母适宜的生长温度是 28 至 30°C, 温度超过 32°C 对蛋白的表达是有害的, 并可能导致细胞的死亡。KM71H 毕赤酵母被推荐用来表达含有 Zeocin 抗性的载体载体重组质粒, 例如 pPICZ A,B,C 系列的载体。在筛选 KM71H 重组转化菌株时, Zeocin 抗生素的工作浓度是 100μg/ml。

KM71H 宿主菌中的 AOX1 基因含有一个片段缺失, 当 pPICZ A,B,C 或者 pPICZα A,B,C 转化到 KM71H 中时只能产生出 MutS 转化株, 不必在进行 Mut 基因型的筛选了。KM71H 的来源母细胞在精氨酸琥珀酸裂解酶基因 (arg4) 含有一个突变, 这使得菌株无法在不含有精氨酸的培养基中生长。而 KM71H 酵母细胞中在 AOX1 基因处插入了一个正常的 arg4 基因, 从而形成了 KM71H 的 MutS, Arg⁺ 表型。将约 2kb 的 Arg4 基因克隆出来后插入到 KM71H 来源菌株内的野生型的 AOX1 基因的 BamH I (16 bp) 和 Sal I (227 bp) 中间, 从而构建成功 KM71H。ARG4 基因直接替换了 AOX1 基因的 16-227 片段序列。KM71H 毕赤酵母细胞的优点是不需要利用甲醇 minimal media 筛选菌株的 Mut 基因型, 因为所有的转化株都是 MutS 菌株。另外, AOX1 基因并没有被完全删除, 理论上你可以用自己的基因替换其中的 Arg4 基因, 从而生成 MutS, Arg⁻ 的转化株, 但是由于实验表明该基因型酵母菌株在含有精氨酸的 minimal media 上并不能很好的生长, 所以并不鼓励大家进行这种基因替换尝试。

基因型: aox1::ARG4, arg4, 表型: MutS, Arg⁺。

操作方法:

1. 取需转化质粒 5μg, 酶切, 回收;
2. 取一支无菌的 1.5ml EP 管, 依次加入预冷的线性质粒 1-5μg (体积不高于 15μl), 酵母促转化剂 10μl, 100μl 冰上融化的 KM71H 感受态细胞, 加入 B 液 (转化剂) 1.4ml, 轻轻翻转混匀 6-8 次。
3. 30°C 水浴 60min, 每 30min 轻轻翻转混匀 6-8 次。
4. 42°C 水浴 20min, 每 10min 轻轻翻转混匀 6-8 次。
5. 12000rpm 瞬时离心弃上清, 每支加 1ml 的 YPG Plus (或 YPG) 于 30°C 复苏 1h (用于提高转化效率, 也可不做)。



ZOMANBIO

Order: 010-62617225
Technical: 010-62979301
Email: zomanbio@126.com

本产品仅供科研使用. 请勿用于医药、临床治疗、食品及化妆品等用途。

6. 12000rpm 瞬时离心弃上清, 加入 1ml C 液(悬浮剂)重悬。
7. 12000rpm 瞬时离心弃上清, 用 100 μ l C 液(悬浮剂)重悬, 涂板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3-7d。

注意事项：

1. 使用 Carrier DNA(酵母促转化剂)前, 请把管子在沸水中煮沸 5min 或金属浴 100 $^{\circ}$ C 处理 10min, 然后立即放在冰上 2-3min, 使用后于 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。
2. 转化液低温环境下会析出, 请于常温下完全溶解后使用。
3. Zeocin/ 博来霉素正常使用浓度为 100 μ g/ml(适当降低浓度至 70 μ g/ml 可增加菌落数并缩短筛选周期), 筛选高拷贝整合转化子可增加抗生素浓度。
4. 12000rpm 瞬时离心指离心速度升到 12000rpm 立即停止离心。

ZOMANBIO