

### EBY.VW4000 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 ( CAT# : YC1140 )

EBY.VW4000 Competent Cell	100µl /支	保存: -80°C (3个月)
pYES2 (control vector, 10ng/µl)	10µl	保存: -80°C (12个月)
Carrier DNA (10µg/µl)	100µl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAC	5ml	保存: 4°C (12个月)

#### ● 基因型

CEN.PK2-1C, MATa, *hxt13Δ::loxP*, *hxt15ΔloxP*, *hxt16Δ::loxP*, *hxt14Δ::loxP*, *hxt12Δ::loxP*, *hxt9Δ::loxP*, *hxt11Δ::loxP*, *hxt10Δ::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*

#### ● 产品说明

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 (*Ag1*、*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。EBY.VW4000 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pYES2 质粒 (5857bp, AmpR) 检测转化效率 >10<sup>4</sup> cfu/µg DNA。

#### ● 操作方法

1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95°C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95°C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 µl 冰上融化的 EBY.VW4000 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 µg, 预处理后的 Carrier DNA 10 µl, PEG/LiAc 500 µl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 400 µl 重悬, 离心 30s 弃上清。
5. ddH<sub>2</sub>O 50 µl 重悬涂板, 29°C 培养 48-96 h (若用筛选标记为 URA3 的质粒, 涂 SM/-URA 平板, 唯地 CAT#: YM5104S)

### ● 培养基配制

#### ① YPM (1L) (唯地 CAT#: YM1040):

Tryptone 20g  
Yeast extract 10g  
补水到 950ml, 用盐酸调 PH 到 6.5;  
Agar 20g(for plates only)  
121°C, 15 min 高压灭菌;  
待培养基温度降到 55°C时, 加入已过滤  
的 40% 麦芽糖 50 ml。

#### ② SM/-URA with Agar (1L)

唯地 CAT#: YM5104:  
Yeast Nitrogen base 6.7g  
DO Supplement -Ura 0.78g  
补水到 1L, 调 PH 至 5.8;  
Agar 20g(for plates only)  
121°C, 15 min 高压灭菌。  
待培养基温度降到 55°C时, 加入已过滤  
的 40% 麦芽糖 50 ml。

### ● 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. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
4. 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。
5. 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。
6. 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。