

Δalr1 Δalr2 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1283)

Δalr1 Δalr2 Competent Cell	100μl /支	保存: -80℃ (3 个月)
pYES2(control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80℃ (12 个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	保存: -20℃ (12 个月)
PEG/LiAc	5ml	保存: 4℃ (12 个月)

● 基因型

MATa his3Δ 1 leu2 met15Δ ura3-52 Δalr1 Δalr2

● 产品说明

Δalr1 Δalr2 菌株来源于 BY4741, 为配子 MATa 型, 主要用于镁离子转运蛋白的研究中。ALR1 (Aluminum Resistance 1)、ALR2 (Aluminum Resistance 2): 质膜 CorA 家族 Mg^{2+} 转运蛋白, 负责从胞外摄取镁离子; Alr1 是主效高活性镁转运, 优先转运 Mg^{2+} , 也可介导 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 进入细胞, 不转运 Al^{3+} , Al^{3+} 是它的竞争性抑制剂, 抑制镁摄取; ALR1 过表达提升酵母耐铝能力, 因此命名 Aluminum Resistance 1, Alr2 为同源蛋白, 但转运活性显著弱于 Alr1, 转运底物同样以 Mg^{2+} 为主, 可转运少量 Co^{2+} , 同样不转运 Al^{3+} 。Δalr1 Δalr2 菌株中 ALR1、ALR2 基因被完全敲除, 镁离子转运能力降低, 在低镁培养基无法生长, 是发现和研究镁离子转运蛋白的高效试验平台。Δalr1 Δalr2 酿酒酵母为组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、尿嘧啶缺陷型菌株。可直接通过 PEG/LiAc 将 pYES2、pDR195、pDR196 等质粒转化进入 Δalr1 Δalr2 细胞内, 筛选标志为 URA, 可用 SD/-URA 平板进行筛选。唯地生物生产的 Δalr1 Δalr2 感受态细胞经特殊工艺制作, -80℃ 可保存三个月, pYES2 质粒 (5857bp, Amp^R) 检测转化效率 > 10^4 cfu/μg DNA。

附言: ALR: Aluminum Resistance, 中文名铝抗性蛋白, 最初发现该基因过表达可以提高酵母对 Al^{3+} (铝离子) 的耐受能力, 因此命名; 后续才阐明它核心生理功能是质膜镁离子 (Mg^{2+}) 转运, 同时也介导铝、钴离子摄取。

● 操作方法

1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95℃ 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95℃ 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 μl 冰上融化的 Δalr1 Δalr2 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 0.1-2 μg (质粒体积不超过感受态体积的 10%), 预处理后的 Carrier DNA 10 μl, PEG/LiAc 500 μl 并吸打几次混匀, 30℃ 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42℃ 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, ddH₂O 400 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。

5. ddH₂O 50 μl 重悬，涂板（筛选平板可根据转化质粒的筛选标记选择 SD 缺陷型平板），29℃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，同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
2. 酵母为真核生物，感受态不能长期保存，建议保存时间不超过 90 天。
3. Δ alr1 Δ alr2 酵母菌株对高温敏感，最适生长温度为 27-30℃；高于 31℃，生长速度和转化效率呈指数下降。
4. 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℃，48 h 培养可见直径 1 mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板 29℃，80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。