唯 地 生 物

Δfet3 Δfet4 酵母铁离子转运活性检测试剂盒用户手册

试剂盒货号 CAT#：YCK7101

2nd Lab® For a Better Lab

说明书版号：SA-EX25201-2
2026-06-07

Δfet3Δfet4 酵母铁离子转运活性检测试剂盒

产品内容

组分类别	组分名称	货号	储存温度	规格	保存时间
培养基	SD/-Ura Broth	YM3104L	RT	0.5L×1 袋	20 个月
	SD/-Ura with Agar	YM3104S	RT	0.5L×2 袋	20 个月
试剂	20 mM $FeCl_3$ 溶液	/	避光/2-8℃	10 mL	12 个月
	10 mM Fe-EDTA	/	避光/2-8℃	5 mL	12 个月
	100 mM BPDS	/	2-8℃	1 mL	12 个月
	100 mM L-抗坏血酸	/	-20℃	5 mL	2 个月
	0.5M MES Buffer	/	2-8℃	50 mL	12 个月
质粒	pDR196 质粒	PS2011	-20℃	50 μL×1 支	>24 个月
	pDR196-OsNramp5	PSP1101	-20℃	50 μL×1 支	>24 个月
酵母感受态	Δfet3Δfet4 Chemically Competent Cell	YC1101	-80℃	100 μL×20 支	3 个月
	pYES2 (control vector, 10 ng/μl)		-20℃	10 μL×1 支	12 个月
	Carrier DNA (10 μg/μl)		-20℃	100 μL×2 支	12 个月
	PEG/LiAC		4℃	5 mL×2 支	12 个月
说明书	/	/	/	1 份	/

本试剂盒分两部分运输：酵母感受态：干冰运输；其余组分：蓝冰运输（2~8℃冷链）

产品说明

Δfet3Δfet4 菌株来源于酿酒酵母 BY4741，将酵母菌内源的 fet3 以及 fet4 基因突变，即为Δfet3Δfet4（或称之为 DYE1453）。FET3（FErrous Transport 3）是一种铁氧氧化还原酶，将亚铁（Fe^{2+}）氧化为铁（Fe^{3+}），随后被跨膜渗透酶 Ftr1p 吸收，是高亲和力铁摄取所需；FET4（FErrous Transport 4）是一种低亲和力 Fe（II）质膜转运蛋白。Δfet3Δfet4 菌株中的 *fet3* 以及 *fet4* 两个基因全长被敲除，严重损害了其从环境中吸收铁的能力，并形成了铁离子吸收缺陷类型。该缺陷使得其生长高度依赖培养基中的铁浓度，在铁含量低的情况下生长受限。该菌株主要用于研究铁离子转运、铁代谢调控机制，并筛选具有铁转运功能的外来基因或化合物。BPDS（4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonic acid disodium salt hydrate）仅与 Fe^{2+}特异性结合，生成橙红色水溶性络合物。Δfet3Δfet4 酿酒酵母为组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、尿嘧啶缺陷型菌株。

pDR196 是酿酒酵母蛋白高效表达载体，筛选标记为 Ura3。将铁离子转运蛋白编码的基因 X 构建到 pDR196 载体中（pDR196-X），将其转化Δfet3Δfet4 感受态细胞，X 蛋白就会介导酵母细胞转运铁离子。

产品特点

本试剂盒可用于检测蛋白是否具有铁离子转运活性，简单高效。包含了全部试剂、菌株和载体。

Fe-EDTA 中的铁离子为三价铁离子，作用与 $FeCl_3$ 溶液作用类似，可选做一个即可。

BPDS 仅与 Fe^{2+}特异性结合，生成橙红色水溶性络合物，用来表征二价铁离子的存在。

L-抗坏血酸是还原剂，将三价铁还原成二价铁。所以在含有 L-抗坏血酸的培养基中铁离子以二价形式存在，在不含 L-抗坏血酸的培养基中铁离子以三价形式存在。

MES Buffer 用来稳定培养基 pH 值，添加后表型更明显、更稳定。

SD/-Ura 培养基中含 1.23 μM FeCl3，可模拟低铁环境，不需要额外添加，也不影响 0.1 mM FeCl3、20 μM Fe-EDTA 模拟的高铁环境，不需要使用去除铁元素的 SD/-Ura。

操作步骤

一、培养基配制

SD/-Ura Broth（含 0.1 mM $FeCl_3$）液体培养基：取 SD/-Ura Broth 培养基一袋，加蒸馏水 450 mL 搅拌溶解后，定容到 0.5 L（不用调 pH 值），121℃-15 min 高压灭菌，灭菌后温度降到 50℃加入 2.5 mL 20 mM $FeCl_3$ 溶液后使用。

SD/-Ura with Agar（含 0.1 mM $FeCl_3$）固体培养基：取 SD/–Ura with Agar 培养基 4.74g，加蒸馏水 90 mL 溶解（Agar 不溶），定容到 0.1L（不用调 pH 值），121℃-15 min 灭菌，灭菌后温度降到 55℃加入 0.5 mL 20 mM $FeCl_3$ 溶液后倒平板即可。

SD/-Ura with Agar（含 20 μM Fe-EDTA）固体培养基：取 SD/–Ura with Agar 培养基 4.74g，加蒸馏水 90 mL 溶解（Agar 不溶），定容到 0.1 L（不用调 pH 值），121℃-15 min 灭菌，灭菌后温度降到 55℃加入 0.2 mL 10 mM Fe-EDTA 溶液后倒平板即可。

SD/-Ura with Agar（含 20 μM BPDS+100 μM L-抗坏血酸）固体培养基：称取 SD/-Ura with Agar 培养基 4.74 g，加蒸馏水 90 mL 溶解（Agar 不溶），定容到 0.1L（不用调 pH 值），121℃-15 min 灭菌，灭菌后温度降到 55℃以下加入 100 mM BPDS 20 μL 以及 100 mM L-抗坏血酸 100 μL，混匀后倒平板即可。参考此培养基，不添加 BPDS 即为 SD/-Ura with Agar+100 μM L-抗坏血酸固体培养基。参考 SD/-Ura with Agar（含 20 μM BPDS+100 μM L-抗坏血酸），额外添加 50mM MES 即为 SD-U+20 μ M BPDS+100 μ M L-抗坏血酸+50 mM MES。（根据需要可适当提高 BPDS 浓度。）

二、实验方法

1. 载体构建

将目的基因 X 的 CDS 构建到 pDR196 载体中，即为实验组 pDR196-X。pDR196 信息参考本公司官网。

2. 酵母转化

（1）Carrier DNA 的预处理：将 Carrier DNA 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Δfet3Δfet4 感受态细胞，依次加入预冷的目的质粒 0.1-2 μg，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，ddH_2O 400 μL 重悬，离心 30 s 弃上清。

（5）ddH_2O 50 μL 重悬，涂板（筛选平板可根据转化质粒的筛选标记选择），29℃培养 48-96 h。

按表 1 将各个质粒分别转入酵母Δfet3Δfet4 感受态细胞。

表 1 酵母转化质粒

质粒	培养基
pDR196	SD/-Ura with Agar（含 0.1 mM $FeCl_3$）
pDR196-OsNramp5	同上
pDR196-X	同上

3. 阳性克隆鉴定（选做）

此步骤可忽略，鉴定引物可使用 T7-R：cctatagtgagtcgtatta 以及 M13 fwd：TGTAAAACGACGGCCAGT，实际扩增条带大小为 383 bp。

4. 铁离子转运活性检测

（1）在每个平板中挑取新鲜单菌落，用 SD/-Ura Broth（含 0.1 mM $FeCl_3$）液体培养基过夜培养，OD_{600} 为 1-2 之间。

（2）5000 rpm 离心 1 min，弃上清。用灭菌 ddH_2O 洗涤三次，并稀释至 OD_{600} 为 0.5。

（3）用 ddH_2O 依次稀释 10 倍，100 倍，1000 倍，10000 倍（即 OD_{600}=0.5，0.05，0.005，0.0005，0.00005）

（4）按照先后顺序，分别取 5 μL 点 SD-U+0.1mM FeCl3 平板、SD/-Ura with Agar（含 20μM Fe-EDTA）平板、SD-U+100 μM L-抗坏血酸平板、SD/-Ura with Agar（含 20 μM BPDS+100 μM L-抗坏血酸）平板以及 SD-U-Fe+20 μ M BPDS+100 μ M L-抗坏血酸+50 mM MES 平板。

【注意：应挑取大小适中的阳性单菌落，并对选中的菌落应做好标记或保种，以备下次使用；平板要事先倒好，打

开盖子在超净台吹 1 小时后点板，每个位置点 5ul，不可点样过多，菌液过多或平板不干会导致菌液不易干，相邻位置的菌液扩散后容易连成片或菌液扩散形状不规则，一般点样后 2 分钟内干燥为宜。】

（5）28-30℃培养 2-5 d，观察每个样品在不同筛选平板上的生长状况，从而确定目的蛋白是否具有铁离子转运活性。

5. 示例结果分析

将阳性对照 pDR196-OsNramp5 载体以及阴性对照 pDR196 载体分别转入Δfet3Δfet4 感受态细胞。Δfet3Δfet4（pDR196）与Δfet3Δfet4（pDR196-OsNramp5）均能在 SD-U+0.1mM FeCl3、SD-U（含 20μM Fe-EDTA）培养基上正常生长；在 SD-U+100 μM L-抗坏血酸、SD-U（含 20 μM BPDS+100 μM L-抗坏血酸）、SD-U-Fe+20 μ M BPDS+100 μ M L-抗坏血酸+50 mM MES 的平板上，阳性菌株Δfet3Δfet4（pDR196-OsNramp5）的生长势明显强于阴性菌株Δfet3Δfet4（pDR196）；且阳性菌株Δfet3Δfet4（pDR196-OsNramp5）的菌落在含 20 μM BPDS 的平板上呈现橙红色。说明 OsNramp5 基因具有转运铁离子的功能。

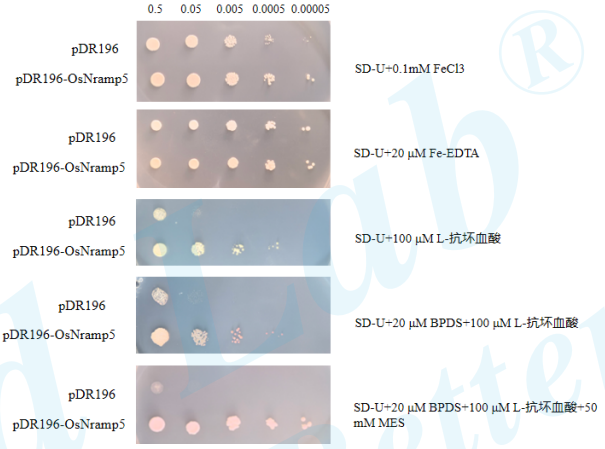


图 1 OsNramp5 铁转运活性验证（本公司验证结果）

6. 若没有观察到预期表型，可能原因分析如下：

（1）目标基因无相关功能；

（2）目标基因功能较弱，需要优化 BPDS 浓度，或其他试验条件；

（3）目标基因无表达，或表达量弱，可 western blot 检测目标基因是否表达，若没有表达，需要重新优化密码子构建酵母表达质粒。

注意事项

1. 点板之前，阴性对照、阳性对照，试验组的 OD 值要调一致；起始 OD_{600} 值一般为 0.5，根据实验结果也可以调整为 0.05-1.0 之间，但阴性对照、阳性对照与试验组的 OD 值一定要调一样。

2. 稀释倍数可根据实验调整，可按 10 倍稀释也可按 5 倍稀释，设置 3-5 个梯度均可。

参考文献

[1] Gong C, Yin X, Cheng L, *et al*. GmIRT1.1 from soybean (Glycine max L.) is involved in transporting Fe, Mn and Cd. Plant Physiol Biochem. 2024 Oct;215:109010.

[2] Zhang XN, Han ZH, Yin LL, *et al*. Heterologous functional analysis of the Malus xiaojinensis MxIRT1 gene and the His-box motif by expression in yeast. Mol Biol Rep. 2013 Feb;40(2):1499-504.

[3] Ishimaru Y, Takahashi R, Bashir K, *et al*. Characterizing the role of rice NRAMP5 in Manganese, Iron and Cadmium Transport. Sci Rep. 2012;2:286.