

### R5421 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 ( CAT# : YC1080 )

R5421 Competent Cell	100μl /支	保存: -80°C (3个月)
pGADT7 (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

MAT $\alpha$  *ura3-52 leu2 trk1 $\Delta$  his3 $\Delta$ 200 his4-15 trk2 $\Delta$ 1::pCK64*

#### ● 产品说明

R5421 酿酒酵母菌株为 K<sup>+</sup>/钾离子缺陷型菌株, 在文献中也称为 CY162, MAT $\alpha$  型, 多用于 K<sup>+</sup>/钾离子转运蛋白的鉴定试验中, 也可用于 K<sup>+</sup>/钾离子通道或钠钾离子泵的鉴定试验。Transformation marker 为: *ura3, leu2*, 该菌株可以在含有 100mM KCl 的培养基中正常生长, 在含有 5-10mM KCl 的培养基中生长缓慢, 当培养基中 KCl 浓度低于 0.5mM, R5421 (CY162) 细胞停止生长。R5421 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGADT7 质粒 (7988bp, Amp<sup>R</sup>) 检测转化效率 > 10<sup>3</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. Carrier DNA 在每次使用前要通过加热处理使其变性为单链状态, 步骤如下: Carrier DNA 放 95°C 水浴或金属浴 3 min, 快速插入冰中, 静置 3 min, 再次放 95°C 水浴或金属浴 3 min, 快速插入冰中, 静置 3 min 以上。
2. 取 100 μl 冰上融化的 R5421 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 0.5-3 μg, 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。

### ● 培养基配制

#### ① YPDA (1L) (唯地 CAT#: YM1020):

Tryptone	20g
Yeast extract	10g
0.2% adenine	15ml

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% 葡萄糖 50 ml。

#### ② SD medium (1L)(唯地 CAT#: YM3101-YM3611):

Yeast Nitrogen base 6.7g

葡萄糖 20g

Dropout 适量 (按说明书)

补水到 1L, 调 PH 至 5.8;

Agar 20g(for plates only)

121°C, 15 min 高压灭菌。

#### ③ 0.2% adenine (0.5L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 1g; 补水到 0.5L; 溶解后高压灭菌或 0.22μm 滤膜过滤除菌。

### ● 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. R5421 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。