

### MaV203 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT# : YC1100)

MaV203 Competent Cell	100µl /支	保存条件: -80°C
pGADT7 (control vector, 10ng/µl)	10µl	保存条件: -80°C
Carrier DNA (10µg/µl)	100µl	保存条件: -20°C
PEG/LiAC	5ml	保存条件: 4°C

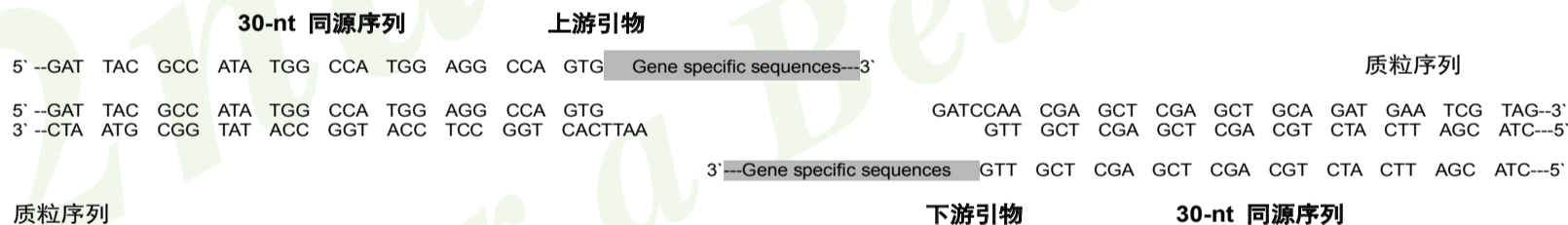
#### ● 基因型

MAT α, *leu2-3,112*; *trp1-901*; *his3Δ 200*; *ade2-101*; *cyh2<sup>R</sup>*; *can1<sup>R</sup>*; *gal4Δ*; *gal80Δ*; *GAL1::lacZ*; *HIS3<sub>UASGAL1</sub>::HIS3*  
*LYS2*; *SPAL10<sub>UASGAL1</sub>::URA3*

#### ● 产品说明

MaV203 菌株是利用酵母体内重组酶构建质粒的菌株, MATα 型, 可直接转化线性化质粒和基因片段; 可以用于筛选标记为 TRP, LEU, URA 的酵母质粒的转化。MaV203 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>6</sup> cfu/µg DNA。

#### ● PCR 引物设计方法 (例: PGADT7 质粒 Ecor1/Bamh1 酶切线性化质粒)



#### ● 操作方法

- 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。
- 取 100 µl 冰上融化的 MaV203 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)。
- 将离心管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
- 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 400 µl 重悬, 离心 30s 弃上清。
- ddH<sub>2</sub>O 50 µl 重悬, 涂相应的 SD-/氨基酸缺陷型板, 29°C 培养 48-96 h。
- 平板长出的菌落做菌落 PCR (为提高成功率, 菌落 PCR 产物最好控制在 300-500bp), PCR 正确的菌落接菌提质粒, 酵母提取的质粒转化高效率的商业化大肠杆菌化学感受态 (比如 DH5a, TOP10 等), 再从大肠杆菌中提质粒酶切或测序鉴定, 鉴定正确的质粒放 -20 度可长期保存。

### ● 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 (1L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 2g; 补水到 1L; 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. MaV203 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。