

WAT11 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : YC1120)

WAT11 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

MAT α , *ade2-1*, *his3-11,-15*, *can1-100*, *leu2-3,-112*, *ura3-1*, *trp1-1*, GAL10-CYC1:: ATR1

● 产品说明

WAT11 菌株来源于 W303-1B 酵母菌株, 将酵母菌内源的细胞色素 P450 还原酶替换成拟南芥的细胞色素 P450 还原酶 (Arabidopsis thaliana NADPH-cytochrome P-450 reductase / ATR1) 即是 WAT11, 此菌株可诱导表达拟南芥 P450 还原酶, 具有更高的 P450 还原酶活性和更加完善的电子传递系统, 广泛用于各种代谢途径的研究或 P450 参与的通路研究。筛选标记(Transformation marker)为: *trp1*, *leu2*, *his3*, *ura3*, 可配合诱导型质粒 pYES2、pESC-HIS/LEU/TRP/URA 或组成型表达质粒 pGBKT7/ pGADT7 等使用。WAT11 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pYES2 质粒 (5857bp, Amp^R) 检测转化效率 >10⁴ 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 WAT11 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, 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°C 培养 48-96 h。

● P450 还原酶的诱导表达

1. WAT11 菌株中的 P450 还原酶由 GAL10-CYC1 启动子驱动, 在进行诱导表达时, 要去除培养基中的葡萄糖, 加入 2% 的半乳糖或同时分别加入 2% 的半乳糖和 1% 棉子糖。两种碳源配方都可以诱导 P450 还原酶的表达, 但在只添加半乳糖的培养基中酵母生长缓慢, 蛋白表达量低; 同时添加棉子糖可提高 P450 还原酶的表达量。
2. 半乳糖的诱导时间以至少 12 小时为宜, 不同的实验要求, 实验者可根据需要确定诱导时间。

● 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。

④ pYES2 蛋白诱导用诱导培养基: SGR/-Ura (唯地 CAT#: YEM3134):

pESC-HIS/LEU/TRP/URA 蛋白诱导分别用诱导培养基: SGR/-His、SGR/-Leu、SGR /-

Trp、SGR/-Ura(唯地 CAT#: YEM3131/3132/3133/3134), 1L 配方如下:

Yeast Nitrogen base 6.7g

Dropout (对应的氨基酸混合物) 适量 (按说明书)

补水到 800ml, 调 PH 至 5.8, 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 carbon source: 100 ml 20% 半乳糖, 100 ml 10% 棉子糖。

● 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. WAT11 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。
3. 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。
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°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。