

SUSY7/ura3 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1130)

SUSY7/ura3 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

MATa, *ura3-52*, *trp1-92*

● 产品说明

SUSY7/ura3 菌株来源于 YSH 酵母菌株, MATa 型, Transformation marker 为 *ura3*, *trp1*, 可用于筛选标记为 URA3、TRP 的质粒的转化, 比如 pYES2/NT、pYC2/NT、pDR196、p416GDP、pESC-URA、pESC-TRP 等质粒。野生型酿酒酵母具有吸收、转运蔗糖的功能, SUSY7/ura3 为蔗糖酶(invertase)缺陷菌株, 在只含有蔗糖作为唯一碳源的培养基上无法生长, 是发现和研究天然或异源(其他物种)蔗糖转运蛋白的高效试验平台, 通过功能互补试验可以找到新的蔗糖运输蛋白。SUSY7/ura3 在含有 2%葡萄糖的培养基中生长正常, 培养 SUSY7/ura3 酵母细胞推荐使用 YPD/YPDA 培养基; 筛选含有质粒的 SUSY7/ura3 酵母细胞推荐使用 SD 培养基。SUSY7/ura3 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 SUSY7/ura3 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, 29°C 培养 48-96 h (若用筛选标记为 URA3 的质粒, 涂 SD/-URA 平板, 唯地 CAT#: YM3104S)。

● 培养基配制

① YPD (1L) (唯地 CAT#: YM1010S):

Tryptone 20g

Yeast extract 10g

补水到 950ml, 用盐酸调 PH 到 7.0;

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/-URA with Agar (1L) 唯地 CAT#: YM3104S:

Yeast Nitrogen base 6.7g

DO Supplement -Ura 0.78g

补水到 1L, 调 PH 至 5.8;

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。

● 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. SUSY7/ura3 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。