

### AXT3K Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: YC1083)

AXT3K 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

W303-1B (MAT $\alpha$   $\square$ ura3-1 leu2-3,112 his3-11,15 trp1-1 ade2-1 can1-100)  $\Delta$  ena1::HIS3::ena4  $\Delta$ nha1::LEU2  
 $\Delta$ nhx1::KanMX4

#### ● 产品说明

AXT3K 菌株来源于 W303-1B 酵母菌株, 将 W303-1B 酵母菌内源的钠离子外排蛋白 ENA1、ENA2、ENA3、ENA4, NHA1, Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>逆向转运蛋白 NHX1 六个钠离子相关转运蛋白突变, 即为 AXT3K。AXT3K 菌株为 Na<sup>+</sup>/钠离子转运缺陷菌株, 多用于 Na<sup>+</sup>/钠离子转运蛋白的鉴定试验, 也可用于 Na<sup>+</sup>/钠离子通道或钠钾离子泵的鉴定试验。Transformation marker 为: ura3, 可配合诱导型质粒 pYES2、pESC-URA 使用。该菌株对 Na<sup>+</sup>敏感, 在含有大于 50 mM Na<sup>+</sup>的培养基上生长时, 生长速度受到明显抑制; 在含有 10-50mM Na<sup>+</sup>的培养基中生长缓慢。AXT3K 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<sup>R</sup>) 检测转化效率>10<sup>4</sup> 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 AXT3K 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, 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 (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。

### ● 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。

#### ③ 0.2% adenine (1L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 2g; 补水到 1L; 溶解后高压灭菌或 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤除菌。

#### ② SD medium (1L)(唯地 CAT#: YM3101-3611):

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。

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

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. AXT3K 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。