

### YTK12 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: YC1170)

|                                 |          |                  |
|---------------------------------|----------|------------------|
| YTK12 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, *trp1-1, ade2-101, his3, ura3-1, suc2*

#### ● 产品说明

YTK12 菌株是一个蔗糖转化酶(SUC2)缺陷型酿酒酵母。酵母蔗糖转化酶(SUC2)可将蔗糖或棉子糖水水解成葡萄糖和果糖;参与碳水化合物分解代谢;可以两种不同的形式定位于细胞质并分泌到细胞外起作用,该基因的 N 端有一个外分泌信号肽,这个信号肽引导蔗糖转化酶分泌到细胞外起作用。YTK12 菌株中的 SUC2 基因被突变,无法合成蔗糖转化酶,通过酵母质粒:pSUC2 载体引入一个有功能的蔗糖转化酶基因,但是 pSUC2 空载体的 N 端信号肽被切除,无法分泌到胞外,把不同的待验证的多肽连接到 SUC2 蛋白的 N 端就可以验证连入的多肽是否有分泌功能。YTK12 酵母菌株为 SUC2 基因缺陷型菌种,无法在以棉子糖为单一碳源的 YPRAA 培养基上正常生长。只有将具有分泌活性的信号肽序列连接在 pSUC2 载体蔗糖酶基因 SUC2 的 N 端,转化入 YTK12 酵母菌株中,才能使蔗糖转化酶正常分泌,YTK12 酵母才能将棉子糖转化为葡萄糖,在 YPRAA 培养基上正常生长(Jacobs et al 1997, Oh et al 2009)。另外,蔗糖转化酶(SUC2)的水解产物葡萄糖可以将 2,3,5-三苯基四唑氯(TTC)还原为不溶的红色物质 1,3,5-三苯基甲酸(TPF),通过显色反应也可以判断待验证多肽是否有分泌功能。YTK12 菌株筛选标记(Transformation marker)为: *trp1, his3, ura3*; YTK12 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pYES2 质粒 (5857bp, AmpR) 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 YTK12 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, 29°C 培养 48-96 h。

### ● 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. YTK12 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。