

CEN.PK2-1C Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1150)

CEN.PK2-1C 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 *his3D1 leu2-3_112 ura3-52 trp1-289 MAL2-8c SUC2*

● 产品说明

CEN.PK2-1C 属于著名的 CEN.PK 系列酿酒酵母菌株, 这个系列是由荷兰代尔夫特理工大学的 Jack T. Pronk 教授实验室主导开发的, 旨在创建一套遗传背景清晰、生理特性优良、适合进行代谢工程和生理学研究的实验室菌株, 以弥补当时常用菌株 S288C、BY4741 等在某些生理特性 (如生长速率、糖酵解、对营养限制的响应) 上的不足。CEN.PK 系列的祖先菌株复杂, 可以追溯到工业菌株和实验室菌株的杂交组合, 主要贡献者包括: 荷兰酵母菌种保藏中心 (CBS) 保藏的 CBS 6412 (一个用于烘焙或酿酒的菌株) 及实验室菌株: FL100 (一个常用于基础研究的菌株), 通过一系列精心设计的杂交、孢子分离和选择步骤, 最终建立了具有不同交配型和营养缺陷型的同基因型菌株组合, 包括 CEN.PK113 (MATa)、CEN.PK2-1C (MAT α)、CEN.PK122 (MATa/ α 二倍体) 等。CEN.PK2-1C 菌株的筛选标记为: *leu2*, *ura3*, *trp1*, *his3*, 可配合诱导型质粒 pYES2、pESC-LEU/URA/TRP/HIS 或组成型表达质粒 pGADT7 等使用。CEN.PK2-1C 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 >10³ 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 CEN.PK2-1C 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。

● 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#: YM3101-3611):

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。

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):

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. CEN.PK2-1C 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. 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, 80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。