

### EBY100 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: YC1110)

EBY100 Competent Cell	100μl /支	保存: -80°C (3个月)
pGBKT7 (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 AGA1::GAL1-AGA1::URA3 *ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL*

#### ● 产品说明

EBY100 菌株是 Invitrogen 公司开发的酵母展示用菌株, MATa 型, 与 pYD1 质粒配套使用, 可直接转化质粒进行蛋白展示试验; Transformation marker 为: *leu2, trp1*。EBY100-pYD1 酵母展示系统通过酿酒酵母的 a 凝集素受体 (a-agglutinin receptor) 将目标蛋白展示在细胞表面, 方便后期筛选。其基本原理为: a 凝集素受体由 AGA1 和 AGA2 两个亚基组成, AGA1 蛋白(725 个氨基酸)由 EBY100 细胞合成, 分泌到细胞外, 在细胞外基质中与酵母细胞壁的 β-葡聚糖共价结合, AGA2 蛋白(69 个氨基酸)可以通过两个二硫键结合到 AGA1 蛋白上; 将目标蛋白构建到 pYD1 质粒上, 与 AGA2 蛋白融合表达, AGA2 蛋白在 N 端, 目标蛋白在 C 端, 当含有 pYD1 质粒的 EBY100 酵母菌在含有半乳糖, 同时不含葡萄糖的培养基中诱导表达时可以表达出 AGA2-target protein 融合蛋白, 该融合蛋白通过 AGA2 结合到 EBY100 酵母细胞表面的 AGA1 蛋白上进而将目标蛋白展示在酵母表面。EBY100 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGBKT7 质粒 (7303bp, Kan<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 EBY100 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。

### ● 培养基配制

#### ① YPD (1L)(唯地 CAT#: YM1010):

Peptone 20g  
Yeast extract 10g  
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 YNB-CAA Medium (1L)

0.67% YNB (with ammonium sulfate, without amino acids)  
0.5% Casamino acids (-ade, -ura, -trp)  
2% glucose or galactose

### ● 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。
2. EBY100 菌株内源 Trp1 基因是功能缺失的, 但其为点突变, 功能回复突变的概率约百万分之一, 一管感受态涂 SD/-Trp 平板, 有长出假阳性菌落的概率(0-10 个), 这种概率很低, 一般不影响试验。
3. 在进行 EBY100 酵母菌的诱导表达时, 要去除培养基中的葡萄糖, 加入 2%的半乳糖。
4. 转化 pYD1 质粒到 EBY100 菌株后的筛选平板可以用 SD/-Trp/-Ura, 也可以用 Minimal Dextrose Plates (with Amino Acids); 诱导目的蛋白表达, 可以用 SG/-Trp/-Ura, 也可以用 YNB-CAA Medium(with galactose)。
5. EBY100 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。
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。