

### $\Delta$ smf1 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: YC1091)

$\Delta$ smf1 Competent Cell	100 $\mu$ l /支	保存: -80 $^{\circ}$ C (3个月)
pYES2 (control vector, 10ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l	保存: -80 $^{\circ}$ C (12个月)
Carrier DNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l	保存: -20 $^{\circ}$ C (12个月)
PEG/LiAC	5ml	保存: 4 $^{\circ}$ C (12个月)

#### ● 基因型

MATa *his3 $\Delta$ 1 leu2 met15 $\Delta$  ura3-52  $\Delta$ smf1*

#### ● 产品说明

$\Delta$ smf1 菌株来源于酿酒酵母 BY4741, 为配子 MATa 型, 主要应用于锰离子转运蛋白的研究中。SMF1(Suppressor of Mitochondria import Function)基因是二价金属离子转运蛋白, 参与铜、铁、锰和镉离子的运输;  $\Delta$ smf1 突变体中 SMF1 基因的整个编码区被删除, 转运锰离子的能力降低, 在 SD/-Ura 基础培养基 (唯地货号: YM3104S) 上可以正常生长, 在含有高浓度二价阳离子螯合剂 EGTA 的 SD/-Ura 培养基上生长势变弱, 是发现和研究锰离子或其他二价金属离子转运蛋白的高效试验平台。 $\Delta$ smf1 酿酒酵母为组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、尿嘧啶缺陷型菌株, 可直接通过 PEG/LiAc 将 pYES2、pDR195、pDR196 等质粒转化进入  $\Delta$ smf1 细胞内, 筛选标志为 URA, 可用 SD-URA 平板进行筛选。唯地生物生产的  $\Delta$ smf1 感受态细胞经特殊工艺制作, -80 $^{\circ}$ 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/ $\mu$ g DNA。

#### ● 操作方法

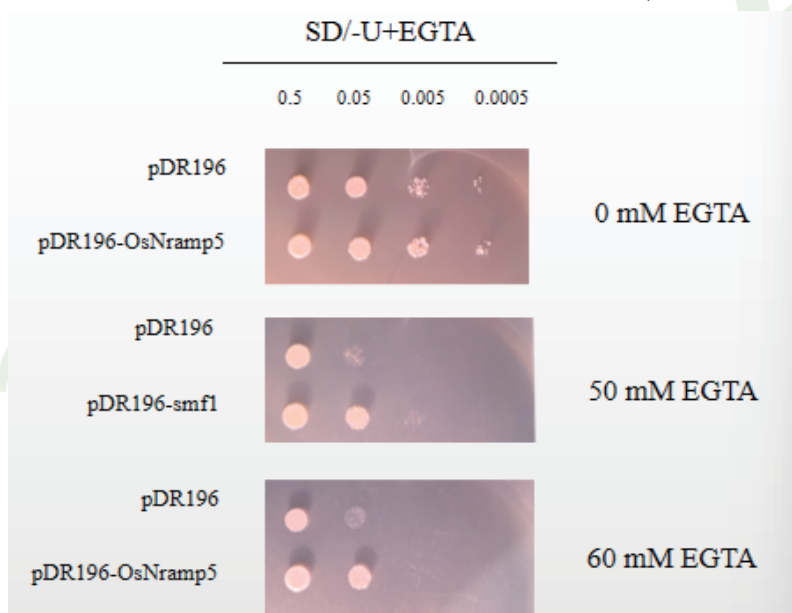
1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95 $^{\circ}$ C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100  $\mu$ l 冰上融化的  $\Delta$ smf1 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 1-3  $\mu$ g, 预处理后的 Carrier DNA 10  $\mu$ l, PEG/LiAc 500  $\mu$ l 并吸打几次混匀, 30 $^{\circ}$ C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将感受态移到 42 $^{\circ}$ 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  $\mu$ l 重悬, 离心 30s 弃上清。
5. ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ l 重悬, 涂板, 29 $^{\circ}$ C 培养 48-96 h。

### ● 锰离子转运试验示例/唯地生物验证试验

空载体 pDR196 为阴性对照； pDR196-smf1(表达酵母 SMF1 蛋白)为阳性对照； pDR196-OsNramp5(表达水稻 OsNramp5 蛋白)为试验组；这三个质粒分别转化  $\Delta$ smf1 酵母细胞，点板做表型分析。结果如图一所示：在 SD/-Ura 基础培养基中酵母菌落正常生长，在 SD/-Ura+50/60 mM EGTA 的培养基中， $\Delta$ smf1(含 pDR196-OsNramp5)菌株的生长势与阳性菌株 $\Delta$ smf1(含 pDR196-smf1)一样，明显强于阴性菌株 $\Delta$ smf1(含 pDR196)，说明 OsNramp5 基因具有转运锰离子的功能。

补充说明：

1. 酵母体内转运锰离子的基因有很多，所以阴性对照在含有高浓度的 EGTA 培养基中也可缓慢生长；
2. 螯合剂 EGTA 的浓度需要实验者摸索，可配置不同 EGTA 浓度(10 20 30 40 50 60mM)的梯度平板。



图一：酵母 SMF1 基因及水稻锰离子转运蛋白 OsNramp5 在 $\Delta$ smf1 酵母突变体中的表型分析

### ● 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. 酵母为真核生物，不易长期保存，建议保存时间不超过 90 天。
3.  $\Delta$ smf1 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。
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。