

Δccc1 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1092)

Δccc1 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 *his3Δ1 leu2 met15Δ ura3-52 Δccc1*

● 产品说明

Δccc1 菌株来源于酿酒酵母 BY4741, 为配子 MATa 型, 主要应用于铁离子转运蛋白的研究中。CCC1 (Cross-Complements Ca(2+) phenotype of *csg1*) 基因是液泡 Fe²⁺/Mn²⁺ 转运蛋白, 参与铁、锰离子的运输; Δccc1 突变体中 CCC1 基因的整个编码区被删除, 转运铁离子的能力降低, 在 SD/-Ura 基础培养基 (唯地货号: YM3104S) 上可以正常生长, 在含有高浓度硫酸亚铁 (10mM) 的 SD/-Ura 培养基上无法生长, 是发现和研究铁离子转运蛋白的高效试验平台。Δccc1 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 Δccc1 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 Δccc1 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 >10⁴ cfu/μg DNA。

● 操作方法

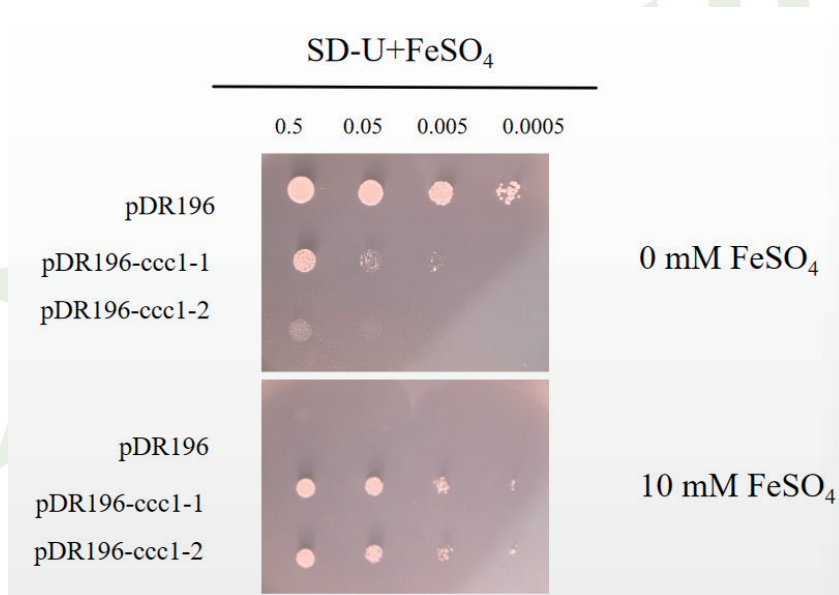
1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95°C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95°C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 μl 冰上融化的 Δccc1 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 1-3 μg, 预处理后的 Carrier DNA 10 μl, PEG/LiAc 500 μl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将感受态移到 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH₂O 400 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
5. ddH₂O 50 μl 重悬, 涂板, 29°C 培养 48-96 h。

● 亚铁离子转运试验示例/唯地生物验证试验

空载体 pDR196 为阴性对照； pDR196-ccc1(表达酵母 CCC1 蛋白, -1、-2: 独立的两个菌落)为阳性对照；这两个质粒分别转化 Δ ccc1 酵母细胞, 点板做表型分析。结果如图一所示: Δ ccc1(含 pDR196)菌株在 SD/-Ura 基础培养基中正常生长, 在 SD/-Ura+10 mM FeSO₄ 的培养基中不生长; Δ ccc1(含 pDR196-ccc1)菌株在 SD/-Ura 基础培养基中生长受抑制, 在 SD/-Ura+10 mM FeSO₄ 的培养基中正常生长; 说明 CCC1 基因具有转运亚铁离子的功能。

补充说明:

1. 在 SD/-Ura 基础培养基中, 酵母全长 CCC1 的组成型表达比 WT 高很多, 这种全长蛋白的高表达是有毒的, 所以 Δ ccc1(含 pDR196-ccc1)菌株在 SD/-Ura 基础培养基中生长受抑制;
2. 酵母的不同菌落中目的蛋白的表达会表现出不同表达量的差异, 所以 Δ ccc1(含 pDR196-ccc1)-1 与 -2 菌落在 SD/-Ura 基础培养基中生长受抑制的表型有差异。



● 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. Δ ccc1 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。