

### W303-1A Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: YC1180)

W303-1A 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 *can1-100 ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1*

#### ● 产品说明

W303 系列是由 Rodney Rothstein 实验室在 20 世纪 80 年代通过 S288C 和 A364A 的杂交构建而成的, 目的是创建一套遗传背景清晰、携带多个常用选择标记、且适合进行遗传学操作(尤其是基因敲除和互补)的菌株系列。通过杂交和孢子分离, 获得了具有不同交配型的同基因型单倍体菌株: W303-1A: MATa (a 交配型单倍体)和 W303-1B: MATα (α 交配型单倍体)以及相应的二倍体 W303。W303-1A 是一个遗传背景经典、携带多个重要突变(尤其是 *ade2-1* 和隐含的 *rad5-535*)的单倍体实验室酵母菌株, 主要用于以下领域的研究: 1. 遗传学操作和分析; 2. 研究 DNA 修复、复制压力响应和基因组稳定性的不可或缺的标准模型; W303-1A 被发现对 DNA 损伤剂(如 UV, MMS, 羟基脲 HU)异常敏感, 这后来被追溯到其携带的一个隐性突变\*\**rad5-535*\*\* (有时在基因型中不会明确列出, 但存在于其 A364A 祖先血统中), *RAD5* 是 DNA 损伤耐受途径(模板转换)的关键基因。这种内在的 DNA 修复缺陷使得 W303 成为研究 DNA 损伤应答、复制压力、修复途径和基因组不稳定性的极其重要和独特的模型; 3. 进行细胞周期、染色体生物学等基础细胞过程研究的常用工具; 由于其清晰的遗传背景和易于操作, W303 被广泛用于研究细胞周期调控、染色体分离、纺锤体组装检查点、端粒维持等基本细胞过程。W303-1A 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。W303-1A 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<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 W303-1A 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(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。

#### 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。

#### 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。

### ● 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. W303-1A 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. 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。
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。