

2nd Lab[®]
For a Better Lab

您身边的感受态专家！

唯地生物

EBY.VW4000 酵母己糖转运活性检测试剂盒用户手册

试剂盒货号 CAT#: YCK7140

版号: SA-EX25211-2

2025-03-07

上海唯地生物技术有限公司，专注成就卓越。

电话：021-34790199

网址：www.weidibio.com

邮箱：sales@weidibio.com

EBY.VW4000 酵母己糖转运活性检测试剂盒

产品内容

组分类别	组分名称	规格	货号	储存温度
培养基	SM/-Ura with Agar (含麦芽糖)	55 g×1 瓶	YM5104S-2L	RT
	SD/-Ura with Agar (含葡萄糖)	0.5 L×1 袋	YM3104S	RT
	SF/-Ura with Agar (含果糖)	55 g×1 瓶	YM6104S-2L	RT
	SM/-Ura Broth (含麦芽糖)	15 g×1 瓶	YM5104L-2L	RT
质粒	pDR196 质粒	50 μL×1 支	PS2011	-20°C
	pDR196-AtSWEET4 质粒	50 μL×1 支	PS2012	-20°C
酵母感受态	EBY.VW4000 Chemically Competent Cell	100 μL×20 支	YC1140	-80°C
	pYES2 (control vector, 10 ng/μl)	10 μL×1 支		-20°C
	Carrier DNA (10 μg/μl)	100 μL×2 支		-20°C
	PEG/LiAC	5 mL×2 支		4°C
说明书	/	1 份	/	/

产品说明

EBY.VW4000 菌株来源于 CEN.PK2-1C 酵母菌株, MATa 型, Transformation marker 为 ura3, 可用于筛选标记为 URA3 的质粒的转化, 比如 pYES2/NT、pYC2/NT、pDR196、p416GDP、pESC-URA 等质粒。酿酒酵母含有大量严格控制的具有不同特征的己糖转运蛋白, 这些己糖转运蛋白有转运葡萄糖的潜力, 大部分酵母中含有 17 个己糖转运蛋白(Hexose transporter)HXT1-HXT17, CEN.PK2-1C 只含有 16 个己糖转运蛋白(Hexose transporter) HXT1-HXT16; GAL2: 半乳糖渗透酶基因, 为半乳糖利用所必须, 同时具有运输葡萄糖的功能; 还有三个麦芽糖转运蛋白家族成员(Agt1、Ydl247、Yjr160)能够运输己糖; 此外, STL1 (Sugar Transporter-Like protein) 为质膜甘油质子同向转运体, 也被认为参与到葡萄糖的转运代谢过程中。为了消除 CEN.PK2-1C 酵母对葡萄糖的摄取能力, 利用 Cre/LoxP 系统将 HXT1-HXT16、GAL2、AGT1、YDL247w 和 YJR160c 这些能够运输己糖的基因, 加上 STL1 共 21 个基因全部删除, 即是 EBY.VW4000。EBY.VW4000 作为己糖转运蛋白缺陷酵母菌株, 其葡萄糖的吸收和转运活性被完全消除, 其他己糖的吸收和转运能力也被消除, 是发现和天然或异源(其他物种)己糖转运蛋白的高效试验平台。EBY.VW4000 不能同化葡萄糖或其他己糖作为碳源, 在含有 2%麦芽糖的培养基中生长正常。

pDR196 是酿酒酵母蛋白高效表达载体, 筛选标记为 Ura3。将己糖转运蛋白编码的基因 X 构建到 pDR196 载体中(pDR196-X), 将其转化 EBY.VW4000 感受态细胞, 蛋白就会促进酵母吸收利用培养基中的己糖, 进而使得 EBY.VW4000 酵母菌能够在只含己糖培养基中正常生长。

产品特点

本试剂盒可用于检测蛋白是否具有己糖转运活性, 简单高效。包含了己糖转运活性检测所需的全部试剂、菌株和载体。

操作步骤

一、培养基配制 (试剂盒中的培养基为预混培养基, PH 值固定为 5.8 ± 0.1 , 不用实验者调 pH 值)

SM/-Ura 液体培养基: 取 SM/-Ura Broth 培养基 3.75 g, 加蒸馏水 400 mL 搅拌溶解后 (Agar 不溶), 定容到 0.45 L, 121°C -15min 高压灭菌, 灭菌后补加 20% 麦芽糖溶液 50 mL, 温度降到 30°C 以下使用。

SD/-Ura with Agar 固体培养基: 取 SD/-Ura with Agar 培养基一袋, 加蒸馏水 450 mL 搅拌溶解后 (Agar 不溶), 定容到 0.5 L, 121°C -15min 灭菌, 温度降到 55°C 以下倒平板即可。

SM/-Ura 固体培养基: 取 SM/-Ura Broth 培养基 13.75 g, 加蒸馏水 400 mL 搅拌溶解后 (Agar 不溶), 定容到 0.45 L, 121°C -15min 高压灭菌, 灭菌后加 20% 麦芽糖溶液 50 mL, 温度降到 55°C 以下倒平板即可。

SF/-Ura 固体培养基: 取 SF/-Ura Broth 培养基 13.75 g, 加蒸馏水 400 mL 搅拌溶解后 (Agar 不溶), 定容到 0.45 L, 121°C -15min 高压灭菌, 灭菌后补加 20% 果糖溶液 50 mL, 温度降到 55°C 以下倒平板即可。

二、实验方法

1. 载体构建

将目的基因 X 的 CDS 构建到 pDR196 载体中, 即为实验组 pDR196-X。pDR196 载体信息参考本公司官网。

2. 酵母转化

(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 EBY.VW4000 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), 29°C 培养 48-96 h。

按表 2 将各个质粒分别转入酵母 EBY.VW4000 感受态细胞。

表 2 酵母转化质粒

质粒	培养基
pDR196	SM/-Ura with Agar
pDR196-AtSWEET4	同上
pDR196-X	同上

3. 阳性克隆鉴定 (选做)

此步骤可选做, 也可忽略不做, 鉴定引物可使用 M13 F: TGTAACGACGGCCAGT 和 T7 R: CCTATAGTGAGTCGTATTA, 实际扩增条带大小为 383 bp。

4. 己糖转运活性检测

(1) 在每个平板中挑取新鲜单菌落, 用 SM/-Ura Broth (含麦芽糖) 液体培养基过夜培养, OD₆₀₀ 为 1-2 之间。

(2) 6000g 离心 1 min, 弃上清。用灭菌 ddH₂O 洗涤三次, 并稀释至 OD₆₀₀ 为 0.5。

(3) 用 ddH₂O 依次稀释 10 倍, 100 倍, 1000 倍, 10000 倍 (即 OD₆₀₀=0.5, 0.05, 0.005, 0.0005, 0.00005)。

(4) 按照先后顺序, 分别取 5 μL 在含不同糖的平板 (SM/-Ura、SD/-Ura、SF/-Ura) 上点板。

(5) 28-30°C培养 2-5 d, 观察每个样品在不同筛选平板上的生长状况, 确定目标蛋白是否具有糖转运活性。

【注意: 应挑中等大小的菌落, 不要挑过大或过小的菌落, 不同菌落得到的结果会有差异, 所以对选中的菌落应做好标记或保种, 以备下次使用; 平板要事先倒好, 打开盖子在超净台吹 1 小时后点板, 每个位置点 5ul, 不可点样过多, 菌液过多或平板不干会导致菌液不易干, 相邻位置的菌液扩散后容易连成片或菌液扩散形状不规则, 一般点样后 2 分钟内干燥为宜。】

5. 示例结果分析

将阳性对照 (pDR196-SWEET4)、阴性对照 (pDR196) 载体分别转化 EBY.VW4000 感受态细胞。EBY.VW4000 (pDR196-SWEET4)、EBY.VW4000 (pDR196) 在 SM/-Ura (含麦芽糖) 培养基均能够正常生长; 在 SD/-Ura (含葡萄糖) 培养基、SF/-Ura (含果糖) 培养基中, EBY.VW4000 (pDR196-SWEET4) 可以正常生长, 而 EBY.VW4000 (pDR196) 的生长受到抑制, 因为 SWEET4 具有己糖转运活性, SWEET4 的表达促进了酵母吸收、利用葡萄糖和果糖 (如图 1)。

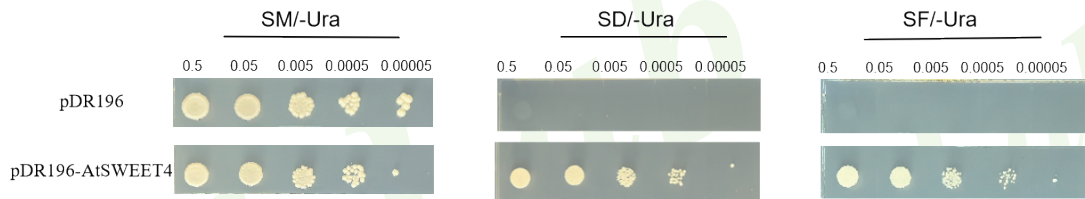


图 1 AtSWEET4 己糖转运活性检测 (本公司验证结果)

6. 若没有观察到预期表型, 可能原因分析如下:

- (1) 目标基因无相关功能;
- (2) 目标基因功能较弱, 需要优化糖浓度, 或其他试验条件;
- (3) 目标基因无表达, 或表达量弱, 可 western blot 检测目标基因是否表达, 若没有表达, 需要重新优化密码子构建酵母表达质粒。

注意事项:

1. 点板之前, 阴性对照、阳性对照, 试验组的 OD 值要调一致; 起始 OD₆₀₀ 值一般为 0.5, 根据实验结果也可以调整为 0.05-1.0 之间, 但阴性对照、阳性对照与试验组的 OD 值一定要调一致。
2. 稀释倍数可根据实验调整, 可按 10 倍稀释也可按 5 倍稀释, 设置 3-5 个梯度均可。

参考文献:

- [1]Xiaozhu L ,Yan Z ,Chao Y , *et al.* AtSWEET4, a hexose facilitator, mediates sugar transport to axial sinks and affects plant development. [J]. Scientific reports, 2016, 6 (1): 24563.
- [2]Daniel S ,Marcel B D V ,A G N K , *et al.* The genome sequence of the popular hexose-transport-deficient *Saccharomyces cerevisiae* strain EBY.VW4000 reveals LoxP/Cre-induced translocations and gene loss. [J]. FEMS yeast research, 2015, 15 (2):
- [3]Li-Qing C ,Bi-Huei H ,Sylvie L , *et al.* Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogenic fungi. [J]. Nature, 2010, 468 (7323): 527-32.