

Δfet3Δfet4 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1101)

Δfet3Δfet4 Competent Cell	100μl /支	保存: -80℃ (3 个月)
pYES2(control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80℃ (12 个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	保存: -20℃ (12 个月)
PEG/LiAc	5ml	保存: 4℃ (12 个月)

● 基因型

MATa *his3Δ1 leu2 met15Δ ura3-52 Δfet3 Δfet4*

● 产品说明

Δfet3Δfet4 菌株来源于 BY4741, 为配子 MATa 型, 主要应用于二价铁离子转运蛋白的研究。Fet3p 蛋白是多铜亚铁氧化酶, 为单次跨膜蛋白, 负责高亲和铁摄取通路; Fet4p 蛋白是二价金属通透转运蛋白, 为多次跨膜蛋白, 负责低亲和铁摄取通路。FET3、FET4 主要定位于细胞质膜, Δfet3Δfet4 同时敲除高亲和通路关键酶 FET3, 低亲和主转运蛋白 FET4, 酵母两条主流质膜铁摄取通路完全失活, 仅存微弱辅助铁吸收, 是经典铁摄取完全缺陷模式菌株, 是发现和研究铁离子转运蛋白的高效试验平台。Δfet3Δfet4 突变体中 FET3、FET4 两个基因的编码区均被删除, 转运二价铁离子的能力降低, 双敲后, 细胞游离 Fe²⁺/游离 Fe³⁺ (需先还原为 Fe²⁺) 几乎无法从胞外吸收, 仅剩余铁载体螯合 Fe³⁺ (Arm 家族) 一条次要通路, 其表型: 无铁或低铁培养基严重生长缺陷, 几乎不长、菌落极小、生长极慢; 野生型正常生长。Δfet3Δfet4 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 Δfet3Δfet4 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 Δfet3Δfet4 感受态细胞经特殊工艺制作, -80℃ 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℃ 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95℃ 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 μl 冰上融化的 Δfet3Δfet4 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℃ 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42℃ 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 SD 缺陷型平板), 29℃ 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-OsNramp5(表达水稻 Nramp5 基因)为阳性对照; 这两个质粒分别转化 $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$ 酵母细胞, 点板做表型分析。结果如下图所示: $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$ (含 pDR196)菌株在 SD-U-Fe (含 $10\mu\text{M}$ Fe-EDTA) 基础培养基中正常生长, 在 SD-U (含 $20\mu\text{M}$ BPDS+ $100\mu\text{M}$ L-抗坏血酸) 的培养基中不生长; $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$ (含 pDR196-OsNramp5)菌株在 SD-U-Fe (含 $10\mu\text{M}$ Fe-EDTA) 的培养基中正常生长, 在 SD-U (含 $20\mu\text{M}$ BPDS+ $100\mu\text{M}$ L-抗坏血酸) 基础培养基中生长受抑制(但能长出菌落), 且菌落呈现粉紫色; 说明 OsNramp5 基因具有转运铁离子的功能。

补充说明:

1. BPDS (4,7-Diphenyl-1,10-phenanthrolinedisulfonic acid disodium salt hydrate) 仅与 Fe^{2+} 特异性结合, 不能整合三价铁离子;
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, 所以不同 $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$ (含 pDR196-OsNramp5) 菌落在 SD-U (含 $20\mu\text{M}$ BPDS+ $100\mu\text{M}$ L-抗坏血酸) 基础培养基中的表型有差异。



● 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, 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
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. $\Delta\text{fet3}\Delta\text{fet4}$ 酵母菌株对高温敏感, 最适生长温度为 $27-30^{\circ}\text{C}$; 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 , 80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。