

### YM4271 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 ( CAT# : YC1090 )

YM4271 Competent Cell	100μl /支	保存条件: -80℃
pGADT7 (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存条件: -80℃
Carrier DNA (5μg/μl)	100μl	保存条件: -20℃
PEG/LiAc	5ml	保存条件: 4℃

#### ● 基因型

MATa, *ura3-52*, *his3-Δ200*, *ade2-101*, *ade5*, *lys2-801*, *leu2-3,112*, *trp1-901*, *tyr1-501*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *ade5::hisG*

#### ● 产品说明

YM4271 菌株, MATa 型, 可直接转化质粒或与 MATα 型酵母菌株 EGY48、Y187 等通过 mating 操作进行蛋白互作验证或筛库试验。Transformation marker 为: *trp1*, *leu2*, *ura*, 报告基因为: *HIS3*。可用于酵母双杂, 酵母单杂或异源蛋白表达等试验。YM4271 感受态细胞经特殊工艺制作, -80℃可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率>10<sup>4</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. 取 100 μl 冰上融化的 YM4271 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 μg, Carrier DNA (95-100℃, 5 min, 快速冰浴, 重复一次) 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)。
2. 将管放 42℃水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 400 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
4. ddH<sub>2</sub>O 50 μl 重悬, 涂板, 29℃培养 48-96 h。

### ● 培养基配制

#### ① YPDA (1L):

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.

#### ② SD medium (1L):

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.

#### ③ 0.2% adenine (1L)

Adenine 2g; 补水到 1L; 溶解后高压灭菌或 0.22μm 滤膜过滤除菌。

### ● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
4. YM4271 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。
5. 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。
6. 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。