



## R5421 Chemically Competent Cell 产品说明书

### 产品规格 (CAT#: YC510)

R5421 Competent Cell:	100μl/支	保存: -80°C (3个月)
pGADT7 (control vector, 10 ng/μl)	10μl	保存: -20°C (12个月)
Carrier DNA (10 μg/μl)	100μl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAC:	5ml	保存: -20°C (12个月)

### 产品介绍

R5421 酿酒酵母菌株为  $K^+$ /钾离子缺陷型菌株, 在文献中也称为 CY162,  $MAT\alpha$ 型, 多用于  $K^+$ /钾离子转运蛋白的鉴定试验中, 也可用于  $K^+$ /钾离子通道或钠钾离子泵的鉴定试验。Transformation marker 为: *ura3*, *leu2*, 该菌株可以在含有 100mM KCl 的培养基中正常生长, 在含有 5-10mM KCl 的培养基中生长缓慢, 当培养基中 KCl 浓度低于 0.5mM, R5421 (CY162) 细胞停止生长。R5421 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率  $>10^3$  cfu/μg DNA。

**基因型:**  $MAT\alpha$  *ura3-52 leu2 trk1Δ his3Δ200 his4-15 trk2Δ1::pCK64*

### 操作方法

1. Carrier DNA 在每次使用前要通过加热处理使其变性为单链状态, 步骤如下: Carrier DNA 放 95°C 水浴或金属浴 3 min, 快速插入冰中, 静置 3 min, 再次放 95°C 水浴或金属浴 3 min, 快速插入冰中, 静置 3 min 以上。
2. 取 100 μl 冰上融化的 R5421 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 0.5-3 μg, 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, 29°C 培养 48-96 h。

### 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。
3. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
4. R5421 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