

EBY100 酵母感受态细胞说明书

产品规格 (Cat.Y0060)

EBY100 Chemically Competent Cell	100μl/支	-80°C (3 个月)
Carrier DNA (10 μg/μl)	10μl/支	-20°C (12 个月)
PEG/LiAC	6.5ml	4°C (12 个月)

基因型:

MATa AGA1::GAL1-AGA1::URA3 ura3-52 trp1 leu2-delta200 his3-delta200 pep4::HIS3 prbd1.6R can1 GAL

产品简介:

EBY100 菌株是酵母展示用菌株, MATa 型, 与 pYD1 质粒配套使用, 可直接转化质粒进行蛋白展示试验; Transformation marker 为: leu2、trp1。EBY100-pYD1 酵母展示系统通过酿酒酵母的 α 凝集素受体 (α -agglutinin receptor) 将目标蛋白展示在细胞表面, 方便后期筛选。其基本原理为: α 凝集素受体由 AGA1 和 AGA2 两个亚基组成, AGA1 蛋白(725 个氨基酸)由 EBY100 细胞合成, 分泌到细胞外, 在细胞外基质中与酵母细胞壁的 β -葡聚糖共价结合, AGA2 蛋白(69 个氨基酸)可以通过两个二硫键结合到 AGA1 蛋白上; 将目标蛋白构建到 pYD1 质粒上, 与 AGA2 蛋白融合表达, AGA2 蛋白在 N 端, 目标蛋白在 C 端, 当含有 pYD1 质粒的 EBY100 酵母菌在含有半乳糖, 同时不含葡萄糖的培养基中诱导表达时可以表达出 AGA2-target protein 融合蛋白, 该融合蛋白通过 AGA2 结合到 EBY100 酵母细胞表面的 AGA1 蛋白上进而将目标蛋白展示在酵母表面。EBY100 感受态细胞经 pGBKT7 质粒 (7303bp, Kan^R) 检测转化效率 $>10^4$ cfu/ μ g DNA。

使用方法:

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 5min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 μ l 冰上融化的 EBY100 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 μ g, 预处理后的 Carrier DNA 10 μ l, PEG/LiAc 640 μ l 并吸打几次混匀, 30°C 水浴摇床 60min。
3. 将管放 42°C 水浴 17 min, 冰浴 5min, 5000rpm 离心 5min。
4. 弃上清, 加 1ml YPD 重悬, 30°C 恒温摇床 1h。
5. 5000rpm 离心 5min 去上清, 1ml 无菌水洗 2 次, 离心去上清。
6. 加 100ul 无菌水重悬, 涂相应缺陷型平板。30°C 培养 3-4 天。

注意事项:

1. 初次使用 Carrier DNA, 请把装有 Carrier DNA 的管子在沸水中煮沸 5 min, 然后立即放在冰上, 用后放在 -20°C 储存备用。下次使用前请于冰上解冻 Carrier DNA。反复冻融 3-5 次后需重新变性 Carrier DNA。
2. 感受态细胞最好在冰上融化。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 酿酒酵母对温度敏感, 适宜的生长温度是 28°C-30°C, 温度超过 31°C 影响酵母生长。
5. 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。