

Y2HGold Chemically Competent Cell 使用说明书

产品编号: CC309

产品储存: -80 °C保存, 6 个月有效。

产品组成:

产品组成	规格	温度
Y2HGold Competent Cell	10×100μL /支	-80°C (6 个月)
Carrier DNA (10μg/μL)	100μL	-20°C (24 个月)
PEG/LiAC	5mL	4°C (24 个月)
说明书	1 份	

基因型:

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-Gal1_{TATA}-His3, GAL2_{UAS}-Gal2_{TATA}-Ade2 URA3::MEL1_{UAS}-Mel1_{TATA} AUR1-C MEL1

产品说明:

Y2HGold 菌株是 GAL4 系统酵母双杂实验用菌株, MATa 型, 可直接转化质粒或与 MATα 型酵母菌株 Y187 通过 mating 操作进行蛋白互作验证或筛库试验。Transformation marker 为: *trp1, leu2*, 报告基因为: *AbAr, HIS3, ADE2, MEL1*。Y2HGold-GAL4 酵母双杂系统需要两种质粒配套使用: pGBKT7 和 pGADT7。质粒 pGBKT7 的筛选标志为 TRP1, 用于表达 DNA-BD (来自酵母转录因子 GAL4N 端 1~174 位氨基酸)与目标蛋白 (Bait)的融合蛋白; 质粒 pGADT7 的筛选标志为 LEU, 用于表达 AD(GAL4 C 端 768~881 位氨基酸)与目标蛋白 (Prey)的融合蛋白。

GAL4 系统原理: 一个完整的酵母转录因子 GAL4 可分为功能上相互独立的两个结构域: 位于 N 端 1~174 位氨基酸区段的 DNA 结合域 (DNA-BD)和位于 C 端 768~881 位氨基酸区段的转录激活域 (AD)。DNA-BD 能够识别 GAL4-responsive gene 的上游激活序列 UAS, 并与之结合。而 AD 可以启动 UAS 下游的基因进行转录。BD 和 AD 单独存在不能激活转录, 但当二者接近时, 则呈现完整的 GAL4 活性, 使含

有 UAS 的启动子下游基因转录表达。正常条件下，BD 不与 AD 结合，将要检测的蛋白质分别与 BD 和 AD 融合，形成 bait 融合蛋白 (bait-BD)和 prey 融合蛋白 (prey-AD)，如果 bait 和 prey 发生相互作用，就会促使 BD 和 AD 的相互接近，形成完整的 GAL4，从而激活报告基因的转录。

Y2HGold 有四个报告基因：AbAr，HIS3，ADE2，MEL1，分别由三种不同的启动子 (G1，G2，M1) 启动，这三种启动子只有 GAL4 识别的 17 bp 核心区相同，其余部分均不同，大大降低了酵母双杂假阳性发生的概率。此外新报告基因 AbAr 与以前的营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点，也可以降低酵母双杂假阳性发生的概率。Y2HGold 感受态细胞经特殊工艺制作，-80°C可保存六个月，pGADT7 质粒检测转化效率 $>10^4$ cfu/ μ g DNA。

使用方法：

1. 取 100 μ l 冰上融化的 Y2HGold 感受态细胞，依次加入预冷的目的质粒 2-5 μ g，Carrier DNA (95-100 度 5 min,快速冰浴，重复一次) 10 μ l，PEG/LiAc 500 μ l 并吸打几次混匀，30 度水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
2. 将管放 42°C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，ddH₂O 400 μ l 重悬，离心 30s 弃上清。
4. ddH₂O 50 μ l 重悬，涂板，29°C培养 48-96 h。
5. 筛选培养基可选本公司 SD 系列产品，产品链接
(http://www.coolaber.com/Column_Content.asp?Column_ID=48766)

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. Y2HGold 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，80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。