

Y1HGold 酵母感受态细胞

Y1HGold Chemically Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G2046

保存条件: -80℃

产品规格: 10×100μl 50×100μl

产品介绍

基 因 型

MAT α , **ura3-52**, **his3-200**, **ade2-101**, **trp1-901**, **leu2-3, 112**, **gal4 Δ** , **gal80 Δ** ,
met $-$, **MEL1**

简 要 说 明

Y1HGold 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4-AbA 酵母单杂系统用菌株，MAT

α 型，可直接转化质粒进行筛库试验。Transformation marker 为: *ura3*, *leu2*; 报告基因为: *AbAr*。Y1HGold -GAL4-*AbA* 酵母单杂系统需要两种质粒配套使用: *pAbAi* 和 *PGADT7*。质粒 *pAbAi* 的筛选标志为 *URA*, 用于表达 *pBait-AbAi construct* (1~3 个 bait DNA 序列重复串联后克隆到 *pAbAi* 中); 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-*AbA* 酵母单杂系统原理: *Aureobasidin A (AbA)* 是一种环酯肽抗生素, 在低浓度(0.1-0.2ug/ml) 下即可对酵母产生毒性。基因组中整合了 *pBait-AbAi* 的酵母菌株 (*Bait-Reporter Yeast Strains*), 当猎物蛋白 (*Prey*) 结合到诱饵序列 (*Bait DNA*) 上, *GAL4 AD* 就会激活 *AbAr* 的表达, 从而能够在含有抗生素 *AbA* 的培养基上生长。*AbAr* 与营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点, 可以降低酵母单杂假阳性发生的概率。MLBio High5TM 系列 Y1HGold 感受态细胞经特殊工艺制作, -80℃可保存三个月, 经 *pAbAi* 质粒检测转化效率>103cfu/ μ g DNA。

操作说明

- 1.取 *pBait-AbAi* 质粒 5ug, *BstBI* 或 *BbsI* 酶切 1 小时, 回收。
- 2.取 100 μ l 冰上融化的 MLBio Y1HGold 感受态细胞, 依次加入预冷的线性 *pBait-AbAi* 质粒 1-5ug (体积不高于 15ul), *Carrier DNA* (95-100 度 5min, 快速冰浴, 重复一次) 10 ul, *PEG/LiAc* 500ul 并吸打几次混匀, 30 度水浴 30 分钟 (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
- 3.将管放 42 度水浴 15min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
- 4.5000 rpm 离心 40s 弃上清, ddH₂O 400ul 重悬, 离心 30s 弃上清。
- 5.ddH₂O 50ul 重悬, 涂 SD/-Ura 平板, 29℃培养 72h。

6.挑取 5-10 个克隆，用 PCR 方法确定 pBait-AbAi 整合到 Y1HGold 基因组中，PCR 阳性菌株在 SD/-Ura 平板划线，29℃培养 72h，4℃保存，此菌株即是 Y1HGold[Bait/AbAi]菌株。

Preparation of Media:

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 度，15 分钟高压灭菌，待培养基温度降到 55 度时，加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml

0.2% adenine(1L)

Adenine 2g

补水到 1L，溶解后高压灭菌或 0.22um 滤膜过滤除菌

注 意 事 项

1.MLBio 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.Y1HGold 酵母菌株对高温敏感，最适生长温度为 27-30℃；高于 31℃，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，Y1HGold 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℃，48h 培养可见直径 1mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板 29℃，80-90h 培养可见直径 1mm 克隆。