

## Y2HGold 酵母感受态细胞

### Y2HGold Chemically Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G2044

保存条件: -80°C

产品规格: 10×100μl 50×100μl

产品介绍

基 因 型

**MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4 Δ, gal80 Δ, LYS2 : :  
GAL 1UAS - Gal1TATA - His3, GAL2UAS - Gal2TATA - Ade2 URA3 : :  
MEL1UAS - Mel1TATA AUR1-C MEL1**

简 要 说 明

Y2HGold 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统酵母双杂实验用菌株，MAT $\alpha$  型，可直接转化质粒或与 MAT $\alpha$  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 17bp 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。MLBio High5TM 系列 Y2HGold 感受态细胞经特殊工艺制作，-80 °C 可保存三个月，经 PGADT7 质粒检测转化效率 >104cfu/  $\mu$ g DNA。

操 作 说 明

- 1.取 100  $\mu$ 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  $\mu$ g，Carrier DNA (95-100 度 5 min,快速冰浴，重复一次) 10  $\mu$ l，PEG/LiAc 500 $\mu$ 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 $^{\circ}$ 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，ddH<sub>2</sub>O 400  $\mu$ l 重悬，离心 30s 弃上清。
- 4.ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ l 重悬，涂板，29 $^{\circ}$ C 培养 48-96 h。

### 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 0.22 $\mu$ m 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. Y2HGold 感受态细胞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. 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。