

Y187 酵母感受态细胞

Y187 Chemically Competent Cell 说明书

产品货号: ML-G2043

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, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4 Δ , met $-$, gal80 Δ , URA3 : : GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ, MEL1

简 要 说 明

Y187 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统酵母单杂，双杂实验用菌株，

MAT α 型，可直接转化质粒或与 MAT α 型酵母菌株（Y2HGold，AH109 等）通过 mating 操作进行筛库试验。Transformation marker 为: trp1, leu2，报告基因为: lacZ, MEL1。Y187 -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。Y187 有两个报告基因：lacZ, MEL1，分别由两种不同的启动子（G1，M1）启动，这两种启动子只有 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。MLBio High5TM 系列 Y187 感受态细胞经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月，经 PGADT7 质粒检测转化效率>104cfu/ μ g DNA。

操作说明

1.取 100 μ l 冰上融化的 Y187 酵母感受态细胞，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℃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 μl 重悬，离心 30s 弃上清。

4.ddH₂O 50 μl 重悬，涂板，29℃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 0.22um 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.Y187 酵母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。