

Y1HGold Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1001)

Y1HGold Competent Cell	100μl /支	保存: -80°C (3个月)
pGADT7 (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80°C (12个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAC	5ml	保存: 4°C (12个月)

● 基因型

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

● 产品说明

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选试验。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 (0.1-0.2 μ g/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。Y1HGold 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C可保存三个月, pGADT7 质粒 (7988bp, Amp^R) 检测转化效率 >10⁴ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. 取 pBait-AbAi 质粒 5 μ g, BstBI 或 BbsI 酶切 1 小时, 回收。
2. 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 3 min, 加热后快速插入冰中
3. 取 100 μ l 冰上融化的 Y1HGold 感受态细胞, 依次加入预冷的线性 pBait-AbAi 质粒 1-5 μ g (体积不高于 15 μ l), 预处理后的 Carrier DNA 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)。
4. 将管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
5. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH₂O 400 μ l 重悬, 离心 30s 弃上清。
6. ddH₂O 50 μ l 重悬, 涂 SD/-Ura 平板, 29°C 培养 72 h。
7. 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°C 培养 72 h, 4°C 保存, 此菌株即是 Y1HGold[Bait/AbAi] 菌株。

● 培养基配制

① YPDA (1L) (唯地 CAT#: YM1020):

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°C, 15 min 高压灭菌;

待培养基温度降到 55°C时, 加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml。

② SD medium (1L)(唯地 CAT#: YM3101-YM3611):

Yeast Nitrogen base	6.7g
葡萄糖	20g

Dropout 适量 (按说明书)

补水到 1L, 调 PH 至 5.8;

Agar 20g(for plates only)

121°C, 15 min 高压灭菌。

③ 0.2% adenine (0.5L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 1g; 补水到 0.5L; 溶解后高压灭菌或 0.22µm 滤膜过滤除菌。

● 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. Y1HGold 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, 80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。