

Y187 Chemically-Library Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : YCL1020)

Y187 Chemically-Library Competent Cell	600μl /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)	300μl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAc	15ml	保存: 4°C (12个月)

● 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

● 产品说明

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 (Y2HGGold, 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 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。Y187 Chemically-Library Competent Cell 为构建酵母文库用化转感受态, 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>0.5×10⁹ cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. 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。
2. 取 600 μl 冰上融化的 Y187 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-15 μg(加入 DNA 的体积不超过 50ul, DNA 纯度越高越好), 预处理的 Carrier DNA 60 μl, PEG/LiAc 1ml, 吸打几次混匀, 转移到事先准备好的 10ml 圆底离心管中, 补加 PEG/LiAc 2ml, 混匀, 30°C水浴 60 min (30 min 时翻转 6-8 次混匀)。

3. 将管放 42°C 水浴 20 min (10 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 2 min 弃上清, ddH₂O 10ml 重悬, 离心 2min 弃上清, ddH₂O 1-10ml 重悬, 涂板, 29°C 培养 48-96 h。
5. 为提高转化效率也可 5000 rpm 离心 2 min 弃上清后加入 3ml YPD Plus 重悬, 30°C, 200rpm 摇菌 1.5h。离心 2min 弃上清, 加入 1-10ml 0.9% 的氯化钠重悬涂板。

● 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 (1L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 2g; 补水到 1L; 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, 加入质粒 DNA 的体积不超过 50ul, 文库质粒纯度越高越好。
2. 文库用酵母感受态的转化效率数据是在加入不超过 100ng 标准质粒的试验中获得, 若加入质粒过多, 虽然得到的菌落数会增加, 但由此计算的转化效率会下降。
3. Y187 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下降。
4. 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。
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°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。