

EGY48 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1030)

EGY48 Competent Cell	100μl /支	保存: -80°C (3个月)
pGBKT7 (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

MATa, *ura3*, *his3*, *trp1*, LexAop (x6)-*LEU2*

● 产品说明

EGY48 菌株是 Clontech 公司开发的 LexA 系统酵母双杂实验用菌株, MATa型, 可直接转化质粒进行蛋白互作验证或筛库试验; Transformation marker 为: *his3*, *trp1*, *ura3*, 报告基因为: *LEU2*; 报告基因 *UAS* (上游激活序列)来源于 LexA op(x6), 只有当 Bait 和 Prey 互动时才能启动 *LEU2* 表达。EGY48-LexA 酵母双杂系统需要三种质粒配套使用: pLexA、pB42AD、p8op-LacZ。质粒 pLexA 的筛选标志为 HIS3, 用于表达 DNA-BD(来自原核的 202 个氨基酸残基组成的 LexA 蛋白)与目标蛋白 (Bait)的融合蛋白; 质粒 pB42AD 的筛选标志为 TRP1, 用于表达 AD(来自疱疹病毒的 88 个氨基酸残基组成的 B42AD 蛋白)与目标蛋白 (Prey)的融合蛋白; 报告质粒 p8op-LacZ 的筛选标志为 *URA3*, 报告基因为 *LacZ*, 报告基因 *UAS* 来源于 LexA op(x6), 只有当 Bait 和 Prey 互动时才能启动 *LacZ* 表达。EGY48 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGBKT7 质粒 (7303bp, Kan^R) 检测转化效率 >10⁴ 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 100 μl 冰上融化的 EGY48 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 μg, 预处理后的 Carrier DNA 10 μl, PEG/LiAc 500 μl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH₂O 400 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
5. ddH₂O 50 μl 重悬, 涂板, 29°C 培养 48-96 h。

● 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#: YM3101-3611):

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, 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
2. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
3. EGY48 菌株内源 Trp1 基因是功能缺失的, 但其为点突变, 功能回复突变的概率约百万分之一, 一管感受态涂 SD/-Trp 平板, 有长出假阳性菌落的概率(0-10 个), 这种概率很低, 一般不影响试验。
4. EGY48 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。