

THY.AP5 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1211)

THY.AP5 Competent Cell	100μl /支	保存条件: -80°C (3个月)
pGADT7 (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存条件: -80°C (12个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	保存条件: -20°C (12个月)
PEG/LiAC	5ml	保存条件: 4°C (12个月)

● 基因型

MAT α ;URA3,ade2-, his3-, leu2-, trp1-

● 产品说明

THY.AP5 菌株是 mbSUS assay 酵母双杂实验用菌株, MAT α 型, 可直接转化质粒或与 MAT α 型酵母菌株 THY.AP4 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: *lacZ, HIS3, ADE2*。mbSUS assay 系统需要 pNXgate、pXNgate 和 pMetYC gate 质粒配套使用。质粒 pNXgate/pXNgate 的筛选标志为 TRP1, 用于表达 Nub G 与目标蛋白 (Prey) 的融合蛋白; 质粒 pMetYC gate 的筛选标志为 LEU, 用于表达 Cub-PLV 与目标蛋白 (Bait) 的融合蛋白。mbSUS assay 系统原理: 自然状态的泛素的 N 端区域 Nub 和 C 端区域 Cub 能够自发组成完整的泛素蛋白, 而 Nub 的突变形式 NubG 与 Cub 不互作, 无法形成完整的泛素蛋白; 将要检测的蛋白分别与 NubG 和 Cub 融合, 形成 bait 融合蛋白 (bait-CubPLV) 和 prey 融合蛋白 (prey-Nub), 如果 bait 和 prey 发生相互作用, 就会促使 NubG 和 Cub 相互接近, 形成完整的泛素蛋白, 泛素蛋白能被 USP 识别, 释放融合在 Cub C 端的人工转录因子 PLV (protein A-LexA-VP16), PLV 能够进入细胞核中激活 *lacZ, HIS3, ADE2* 报告基因。唯地生物开发的 THY.AP5 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) 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 THY.AP5 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 500μl 并吸打几次混匀, 30 度水浴 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。
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. THY.AP5 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。