

Y2HGold Elec-Library Competent Cell 产品说明书

● 产品规格和内容 (CAT#: YEL1002)

内容名称	包装含量	货号	包装数量	保存条件, 时间
Y2HGold Elec-Library Cell	400µl /支	YE1002S/M	5 支/20 支	-80°C (3 个月)
pGADT7 (control vector, 10ng/µl)	10µl	YE1002S/M	1 支	-80°C (12 个月)
YB 溶液 (0.45um 过滤除菌)	50ml	YE1002S/M	1 瓶/4 瓶	4°C (3 个月)

● 基因型

MATa, *trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-Gal1TATA-His3, GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2 URA3::MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1*

● 产品说明

Y2HGold 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统酵母双杂实验用菌株, MATa 型, 可直接转化质粒或与 MAT α 型酵母菌株 Y187 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: *AbAr, HIS3, ADE2, MEL1*。Y2HGold-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。Y2HGold 有四个报告基因: *AbAr, HIS3, ADE2, MEL1*, 分别由三种不同的启动子 (G1, G2, M1) 启动, 这三种启动子只有 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。此外新报告基因 *AbAr* 与以前的营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点, 也可以降低酵母双杂假阳性发生的概率。Y2HGold Elec-Library Cell 为构建酵母文库用电感受态细胞, 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 >1 × 10⁶ cfu/µg DNA。

● 操作方法

1. 取适量 YB 溶液 (0.45um 过滤除菌) 放 30 度预热, 每管感受态准备 10ml。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80°C 保存的 Y2HGold 电击感受态细胞插入冰中 2-5 分钟, 待其融化, 加入预冷的目的质粒 2-15ug (加入 DNA 的体积不超过 40ul, DNA 纯度越高越好, 保证尽可能低的离子含量)。

4. 用 200 μ l 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物缓慢吹打两次, 除去气泡, 快速转移到电击杯中(避免产生气泡), 轻轻晃动电击杯使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25 μ F, PC=200 Ω , V=2.5kV, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 10 秒内加入 1ml 预热的 YB 溶液, 转移到无菌的 50ml 离心管中, 再加入 1ml YB 溶液清洗电转杯并转移到离心管中, 补加 8ml YB 溶液, 30°C 250rpm 摇菌 1.5h。
6. 3000 rpm 离心 2 min 弃上清, 加入 1-10ml 0.9%的氯化钠重悬涂板, 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-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 0.22 μ m 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 40 μ l, 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, 但是由此计算的转化效率会下降。
3. Y2HGold 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。
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。