

克
必
隆
系
列

CAT#:140390-10
干冰运输、-80℃保存

TIANDZ

酿酒酵母 Y2HGold 感受态细胞

S. cerevisiae Y2HGold Competent Cell

使用手册 V1.0

北京天恩泽基因科技有限公司

北京市海淀区上地信息路 26 号北京市留学人员海淀创业园中关村创业大厦 506 网
址: www.tiandz.com; 电话: 010-62200278; 电邮: order@tiandz.com

产品及特点

酿酒酵母 Y2HGold 是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统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 Y187 通过 mating 操作进行蛋白互作验证或筛选库试验。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。正常情况下, 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 感受态细胞经特殊工艺制作, -80 $^{\circ}$ C 可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率 > 10⁴ cfu/ μ g DNA。

Y2Hgold 的基因型是: MAT α , *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1UAS-Gal1TATA-His3*, *GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2*
URA3::MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1

规格及成分

成分	编号	包装
Y2Hgold 感受态细胞	140390A	0.1 mL \times 10
PGADT7, 10 ng/ μ L	140390B	10 μ L
Carrier DNA, 5 μ g/ μ L	140390C	100 μ L
PEG/LiAc	140390D	5 mL
使用手册	1 份	

运输及保存

感受态细胞干冰运输、-80 $^{\circ}$ C 保存, Carrier DNA -20 $^{\circ}$ C 保存; PEG/LiAc 4 $^{\circ}$ C 保存; 有效期半年。

自备试剂	目的 DNA、YPDA、SD 培养基等
使用方法	<ol style="list-style-type: none"> 1. 取感受态细胞置于冰浴中。一次转化感受态细胞的建议用量为 50-100 μL，可以根据实际情况分装使用。 以下实验以 100 μL 感受态细胞为例。 2. 待感受态细胞融化后，向感受态细胞悬液中依次加入 2-5 μg 预冷的目的质粒、10μL Carrier DNA (95-100$^{\circ}\text{C}$ 5 分钟，快速冰浴，重复一次)、500 μL PEG/LiAc，吹打混匀，30$^{\circ}\text{C}$水浴 30 分钟（15 分钟时翻转 6-8 次混匀）。 3. 42$^{\circ}\text{C}$水浴 15 分钟（7.5 分钟时翻转 6-8 次混匀）。 4. 5000 rpm 离心 40 秒，弃上清。取 400 μL ddH₂O 重悬沉淀，5000 rpm 离心 30 秒，弃上清。 5. 取 50 μL ddH₂O 重悬沉淀，涂板，29$^{\circ}\text{C}$培养 48-96 小时。
注意事项	<ol style="list-style-type: none"> 1. 酵母菌株对高温敏感，最适生长温度为 27-30$^{\circ}\text{C}$；高于 31$^{\circ}\text{C}$，生长速度和转化效率呈指数下降。 2. 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。 3. 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$^{\circ}\text{C}$，48h 培养可见直径 1mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29$^{\circ}\text{C}$，48-60h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29$^{\circ}\text{C}$，60-80h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板 29$^{\circ}\text{C}$，80-90h 培养可见直径 1mm 克隆。 4. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。 5. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
关联产品	EGY48 酵母感受态细胞 (CAT#: 140387)