

天
净
沙
系
列

CAT#:140386-10
干冰运输、-80℃保存

TIANDZ

AH109 酵母感受态细胞

Yeast AH109 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: 400-6765278; 电邮: order@tiandz.com

<p>产品及特点</p>	<p>AH109 菌株来源于 PJ69-2A 酵母菌株，将 lacZ 报告基因引入 PJ69-2A 诞生了 AH109，此菌株是 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 MATa 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: lacZ, HIS3, ADE2, MEL1。AH109-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。</p> <p>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。AH109 有四个报告基因: lacZ, HIS3, ADE2, MEL1, 分别由三种不同的启动子 (GAL1, GAL2, MEL1) 启动, 这三种启动子只有 GAL4 识别的 17bp 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。</p> <p>本产品经特殊工艺制作而成, 经 PGADT7 质粒检测转化效率为 $> 10^4$ cfu/μg DNA。</p> <p>菌株基因型如下: MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</p>																				
<p>规格及成分</p>	<table border="1"> <thead> <tr> <th>成分</th> <th>编号</th> <th>包装</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>AH109 感受态细胞</td> <td>140386a</td> <td>0.1 mL \times 10</td> </tr> <tr> <td>PGADT7, 10 ng/μL</td> <td>140386b</td> <td>10 μL</td> </tr> <tr> <td>Carrier DNA, 5 μg/μL</td> <td>140386c</td> <td>100 μL</td> </tr> <tr> <td>PEG/LiAc</td> <td>140386d</td> <td>5 mL</td> </tr> <tr> <td>使用手册</td> <td>140386sc</td> <td>1 份</td> </tr> </tbody> </table>			成分	编号	包装	AH109 感受态细胞	140386a	0.1 mL \times 10	PGADT7, 10 ng/ μ L	140386b	10 μ L	Carrier DNA, 5 μ g/ μ L	140386c	100 μ L	PEG/LiAc	140386d	5 mL	使用手册	140386sc	1 份
成分	编号	包装																			
AH109 感受态细胞	140386a	0.1 mL \times 10																			
PGADT7, 10 ng/ μ L	140386b	10 μ L																			
Carrier DNA, 5 μ g/ μ L	140386c	100 μ L																			
PEG/LiAc	140386d	5 mL																			
使用手册	140386sc	1 份																			
<p>运输及保存</p>	<p>感受态细胞干冰运输、-80℃保存, Carrier DNA -20℃保存; PEG/LiAc 4℃保存; 有效期半年。</p>																				
<p>自备试剂</p>	<p>目的 DNA、YPDA、SD 培养基等</p>																				

<p>使用方法</p>	<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℃ 5 分钟，快速冰浴，重复一次)、500 μL PEG/LiAc，吹打混匀，30℃水浴 30 分钟（15 分钟时翻转 6-8 次混匀）。 3. 42℃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℃培养 48-96 小时。
<p>注意事项</p>	<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℃；高于 31℃，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℃，48h 培养可见直径 1mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板 29℃，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。
<p>关联产品</p>	<p>EGY48 酵母感受态细胞 (CAT#: 140387)</p>