

Y2HGold 酵母感受态细胞说明书

产品规格 (Cat.Y0039)

Y2HGold Chemically Competent Cell	100 μ l/支	-80 $^{\circ}$ C (3 个月)
Carrier DNA (10 μ g/ μ l)	10 μ l/支	-20 $^{\circ}$ C (12 个月)
PEG/LiAC	6.5ml	4 $^{\circ}$ C (12 个月)

基因型:

MATa, 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

产品简介:

Y2HGold 菌株是 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 感受态细胞经 pGADT7 质粒 (7988bp, AmpR) 检测转化效率 $>10^4$ cfu/ μ g DNA。

使用方法:

1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95 $^{\circ}$ C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95 $^{\circ}$ C 水浴 5min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 μ l 冰上融化的 Y2HGold 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 μ g, 预处理后的 Carrier DNA 10 μ l, PEG/LiAc 640 μ l 并吸打几次混匀, 30 $^{\circ}$ C 水浴摇床 60min。
3. 将管放 42 $^{\circ}$ C 水浴 17 min, 冰浴 5min, 5000rpm 离心 5min。
4. 弃上清, 加 1ml YPD 重悬, 30 $^{\circ}$ C 恒温摇床 1h。
5. 5000rpm 离心 5min 去上清, 1ml 无菌水洗 2 次, 离心去上清。
6. 加 100ul 无菌水重悬, 涂相应缺陷型平板。30 $^{\circ}$ C 培养 3-4 天。

注意事项:

1. 初次使用 Carrier DNA, 请把装有 Carrier DNA 的管子在沸水中煮沸 5 min, 然后立即放在冰上, 用后放在-20℃ 储存备用。下次使用前请于冰上解冻 Carrier DNA。反复冻融 3-5 次后需重新变性 Carrier DNA。
2. 感受态细胞最好在冰上融化。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 酿酒酵母对温度敏感, 适宜的生长温度是 28℃-30℃, 温度超过 31℃ 影响酵母生长。
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。