

Y1HGold 酵母感受态细胞说明书

产品规格 (Cat.Y0037)

Y1HGold Chemically Competent Cell	100 μ l/支	-80°C (3 个月)
Carrier DNA (10 μ g/ μ l)	10 μ l/支	-20°C (12 个月)
PEG/LiAc	6.5ml	4°C (12 个月)

基因型:

MAT α , ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4 Δ , gal80 Δ , met-, MEL1

产品简介:

Y1HGold 菌株是 GAL4-AbA 酵母单杂系统用菌株, MAT α 型, 可直接转化质粒进行筛库试验。Transformation marker 为: ura3, leu2; 报告基因为: AbAr。Y1HGold-GAL4-AbA 酵母单杂系统需要两种质粒配套使用: pAbAi 和 PGADT7。质粒 pAbAi 的筛选标志为 URA, 用于表达 pBait-AbAi construct (1~3 个 bait DNA 序列重复串联后克隆到 pAbAi 中); 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-AbA 酵母单杂系统原理: Aureobasidin A (AbA) 是一种环酯肽抗生素, 在低浓度 (0.1-0.2 μ g/ml) 下即可对酵母产生毒性。基因组中整合了 pBait-AbAi 的酵母菌株 (Bait-Reporter Yeast Strains), 当猎物蛋白 (Prey) 结合到诱饵序列 (Bait DNA) 上, GAL4 AD 就会激活 AbAr 的表达, 从而能够在含有抗生素 AbA 的培养基上生长。AbAr 与营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点, 可以降低酵母单杂假阳性发生的概率。Y1HGold 感受态细胞经 pGADT7 质粒 (7988bp, AmpR) 检测转化效率 >10⁴ cfu/ μ g DNA。

使用方法:

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 5 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 μ l 冰上融化的 Y1HGold 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°C 水浴摇床 60min。

3. 将管放 42°C 水浴 17 min，冰浴 5min，5000rpm 离心 5min。
4. 弃上清，加 1ml YPD 重悬，30°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°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°C 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°C-30°C，温度超过 31°C 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。