



## Y1HGold Chemically Competent Cell 产品说明书

### 产品规格 (CAT#: YC501)

Y1HGold Competent Cell:	100 $\mu$ l/支	保存: -80 $^{\circ}$ C ( 3 个月)
pGADT7 (control vector, 10 ng/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l	保存: -20 $^{\circ}$ C ( 12 个月)
Carrier DNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)	100 $\mu$ l	保存: -20 $^{\circ}$ C ( 12 个月)
PEG/LiAC:	5ml	保存: -20 $^{\circ}$ C ( 12 个月)

### 产品介绍

Y1HGold 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4-AbA 酵母单杂系统用菌株, MAT $\alpha$ 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  $\mu$ 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 感受态细胞经特殊工艺制作, -80 $^{\circ}$ C可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率 $>10^4$  cfu/ $\mu$ g DNA。

**基因型:** MAT $\alpha$ , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 $\Delta$* , *gal80 $\Delta$* , *met-*, MEL1

### 操作方法

1. 取 pBait-AbAi 质粒 5 $\mu$ g, BstBI 或 BbsI 酶切 1 小时, 回收。
2. 取 100  $\mu$ l 冰上融化的 Y1HGold 感受态细胞, 依次加入预冷的线性 pBait-AbAi 质粒 1-5  $\mu$ g ( 体积不高于 15  $\mu$ l ), Carrier DNA (95-100 度 5 min,快速冰浴, 重复一次) 10  $\mu$ l, PEG/LiAc 500  $\mu$ l 并吸打几次混匀, 30度水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42 $^{\circ}$ C水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 400  $\mu$ l 重悬, 离心 30s 弃上清。
5. ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ l 重悬, 涂 SD/-Ura 平板, 29 $^{\circ}$ C培养 72 h。
6. 挑取 5-10 个克隆, 用 PCR 方法确定 pBait-AbAi 整合到 Y1HGold 基因组中, PCR 阳性菌株在 SD/-Ura 平板划线, 29 $^{\circ}$ C培养 72 h, 4 $^{\circ}$ C保存, 此菌株即是 Y1HGold[Bait/AbAi] 菌株。

## 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化。
2. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
3. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
4. Y1HGold 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。
5. 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。
6. 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℃，48 h 培养可见直径 1 mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板 29℃，80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。