



Y187 Chemically Competent Cell 产品说明书

产品规格 (CAT#: YC503)

Y187 Competent Cell:	100μl/支	保存: -80°C (3个月)
pGADT7 (control vector, 10 ng/μl)	10μl	保存: -20°C (12个月)
Carrier DNA (10 μg/μl)	100μl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAC:	5ml	保存: -20°C (12个月)

产品介绍

Y187 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统酵母单杂, 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 (Y2HGold, AH109等)通过 mating 操作进行筛库试验。Transformation marker 为: trp1, leu2, 报告基因为: lacZ, MEL1。Y187-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。Y187 有两个报告基因: lacZ, MEL1, 分别由两种不同的启动子 (G1, M1)启动, 这两种启动子只有 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。Y187 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率 > 10⁴ cfu/μg DNA。

基因型: MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade 2-101*, *trp 1-901*, *leu 2-3, 112*, *gal4 Δ* , *met-*, *gal80 Δ* ,
URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1

1. 取 100 μl 冰上融化的 Y187 感受态细胞 依次加入预冷的目的质粒 2-5 μg, Carrier DNA (95-100 度 5 min, 快速冰浴, 重复一次) 10 μl, PEG/LiAc 500μl 并吸打几次混匀, 30 度水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
2. 将管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH₂O 400 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
4. ddH₂O 50 μl 重悬, 涂板, 29°C 培养 48-96 h。

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. Y187 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。