



## EGY48 Chemically Competent Cell 产品说明书

### 产品规格 ( CAT#: YC504 )

EGY48 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

EGY48 菌株是 Clontech 公司开发的 LexA 系统酵母双杂实验用菌株, MAT $\alpha$ 型, 可直接转化质粒进行蛋白互作验证或筛库试验; Transformation marker 为: *his3*, *trp1*, *ura3*, 报告基因为 :*LEU2*; 报告基因 *UAS* (上游激活序列) 来源于 LexA op(x6), 只有当 Bait 和 Prey 互作时才能启动 LEU2 表达。EGY48-LexA 酵母双杂系统系统需要三种质粒配套使用: pLexA、pB42AD、p8op-LacZ。质粒 pLexA 的筛选标志为 HIS3, 用于表达 DNA-BD(来自原核的 202 个氨基酸残基组成的 LexA 蛋白)与目标蛋白 (Bait)的融合蛋白; 质粒 pB42AD 的筛选标志为 TRP1, 用于表达 AD(来自疱疹病毒的 88 个氨基酸残基组成的 B42AD 蛋白)与目标蛋白 (Prey)的融合蛋白; 报告质粒 p8op-LacZ 的筛选标志为 *URA3*, 报告基因为 *LacZ*, 报告基因 *UAS* 来源于 LexA op(x6), 只有当 Bait 和 Prey 互作时才能启动 LacZ 表达。EGY48 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C可保存三个月, pGBKT7 质粒检测转化效率 $>10^4$  cfu/μg DNA。

**基因型:** MAT $\alpha$ , *ura3*, *his3*, *trp1*, LexAop (x6)-*LEU2*

### 操作方法

1. 取 100 μl 冰上融化的 AH109 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, ddH<sub>2</sub>O 400 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
4. ddH<sub>2</sub>O 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. AH109 酵母菌株对高温敏感,最适生长温度为 27-30°C ;高于 31°C ,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°C, 48 h 培养可见直径 1 mm 克隆;涂 SD 单缺平板 29°C, 48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆,涂 SD 双缺平板 29°C, 60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆,涂 SD 三缺或四缺平板平板 29°C, 80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。