



## Y190 Chemically Competent Cell 产品说明书

### 产品规格 (CAT#: YC509)

Y190 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

Y190 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统酵母双杂实验用菌株, *MATa* 型, 可直接转化质粒或与 *MATα* 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*, *cyh2*; 报告基因为: *lacZ*, *HIS3*, *MEL1*。Y190-GAL4 酵母双杂系统需要两种质粒配套使用: (pGB 和 pACT2) 或 (pGBKT7 和 pGADT7)。质粒 pGB 由 pGBKT7 改造而来, 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 pACT2 与 pGADT7 的结构和功能类似, 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。Y190 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 > 10<sup>4</sup> cfu/μg DNA

**基因型:** *MATa*, *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *lys2-112*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *cyh2*, *LYS2::GAL1*

*UAS-HIS3TATA-HIS3*, *MEL1 URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ lys2-801*, *trp1-901*, *leu2-3*

## 操作方法

1. Carrier DNA 在每次使用前要通过加热处理使其变性为单链状态，步骤如下：Carrier DNA 放 95°C 水浴或金属浴 3 min，快速插入冰中，静置 3 min，再次放 95°C 水浴或金属浴 3 min，快速插入冰中，静置 3 min 以上。
2. 取 100  $\mu$ l 冰上融化的 Y190 感受态细胞，依次加入预冷的目的质粒 0.5-3  $\mu$ g，Carrier DNA 10  $\mu$ l，PEG/LiAc 500  $\mu$ l 并吸打几次混匀，30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42°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 种质粒时应增加质粒的用量。
4. Y190 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 29°C，80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。