

AH109 Chemically Competent Cell 使用说明书

产品编号: CC300

产品储存: -80 °C保存, 6个月有效。

产品组成:

产品组成	规格	温度
AH109 Competent Cell	10×100μl /支	-80°C (6 个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	-20°C (24 个月)
PEG/LiAC	5ml	4°C (24 个月)
说明书	1 份	

基因型:

MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ

产品说明:

AH109 菌株来源于 PJ69-2A 酵母菌株, 将 lacZ 报告基因引入 PJ69-2A 诞生了 AH109, 此菌株是 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, 报告基因为: lacZ, HIS3, ADE2, MEL1。AH109-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。

AH109 有四个报告基因: lacZ, HIS3, ADE2, MEL1, 分别由三种不同的启动子 (GAL1, GAL2, MEL1)启动,这三种启动子只有 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。AH109 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存六个月, pGADT7 质粒检测转化效率 $>10^4$ cfu/ μ g DNA。

使用方法:

1. 取 100 μ l 冰上融化的 AH109 感受态细胞,依次加入预冷的目的质粒 2-5 μ g, Carrier DNA (95-100°C, 5 min, 快速冰浴,重复一次) 10 μ l, PEG/LiAc 500 μ l 并吸打几次混匀,30°C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 μ l 重悬,离心 30s 弃上清。
4. ddH₂O 50 μ l 重悬,涂板,29°C培养 48-96 h。
5. 筛选培养基可选本公司 SD 系列产品,产品链接

(http://www.coolaber.com/Column_Content.asp?Column_ID=48766)

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，80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。