

Y2HGold Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1002)

Y2HGold Competent Cell	100μl /支	保存: -80°C (3个月)
pGADT7 (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80°C (12个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LiAc	5ml	保存: 4°C (12个月)

● 基因型

MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4Δ*, *gal80Δ*, *LYS2::GAL1UAS-Gal1TATA-His3*, *GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2* *URA3::MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1*

● 产品说明

Y2HGold 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 MAT α 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: *AbAr*, *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*。Y2HGold-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。正常情况下, 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。Y2HGold 有四个报告基因: *AbAr*, *HIS3*, *ADE2*, *MEL1*, 分别由三种不同的启动子 (G1, G2, M1) 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。此外新报告基因 *AbAr* 与以前的营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点, 也可以降低酵母双杂假阳性发生的概率。Y2HGold 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>10⁴cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. 取 100 μl 冰上融化的 Y2HGold 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 μg, Carrier DNA (95-100°C, 5 min, 快速冰浴, 重复一次) 10 μl, PEG/LiAc 500 μl 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 μl 重悬, 离心 30s 弃上清。
4. ddH₂O 50 μl 重悬, 涂板, 29°C培养 48-96 h。

● 培养基配制

① YPDA (1L):

Tryptone	20g
Yeast extract	10g
0.2% adenine	15ml

补水到 950ml, 用盐酸调 PH 到 6.5;

Agar 20g(for plates only)

121°C, 15 min 高压灭菌;

待培养基温度降到 55°C 时, 加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml。

② SD medium (1L):

Yeast Nitrogen base	6.7g
葡萄糖	20g
Dropout	适量 (按说明书)

补水到 1L, 调 PH 至 5.8;

Agar 20g(for plates only)

121°C, 15 min 高压灭菌。

③ 0.2% adenine (1L)

Adenine 2g; 补水到 1L; 溶解后高压灭菌或 0.22μm 滤膜过滤除菌。

● 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. Y2HGold 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。