

Y1HGold 酵母感受态细胞

Y1HGold Chemically Competent Cell

产品规格: 10×100 μl

保存条件: -80℃

Y1HGold	10×100μl	保存条件: -80℃
Carrier DNA	5ug/μl; 100 μl	保存条件: -20℃
PEG/LiAc	5 ml	保存条件: 4℃

基 因 型

MAT α , *ura3-52*, *his3-200*, *ade2-101*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *gal4 Δ*, *gal80 Δ*, *met -* , MEL1

简 要 说 明

Y1HGold 菌株是 GAL4-AbA 酵母单杂系统用菌株, MATα型, 可直接转化质粒进行筛库试验。Transformation marker 为: *ura3*, *leu2*; 报告基因为: AbAr。Y1HGold-GAL4-AbA 酵母单杂系统需要两种质粒配套使用: pAbAi 和PGADT7。质粒pAbAi 的筛选标志为URA, 用于表达pBait-AbAi construct (1~3 个 bait DNA 序列重复串联后克隆到 pAbAi 中); 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。此外 AbAr 与营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点, 可降低酵母单杂假阳性发生的概率。Y1HGold 感受态细胞经特殊工艺制作, -80℃可保存三个月, pGADT7 质粒检测转化效率>10⁴ cfu/μg DNA。

操 作 说 明

1. 取 pBait-AbAi 质粒 5μg, BstBI 或 BbsI 酶切 1h, 回收;
2. 取一支无菌的 1.5ml EP 管, 依次加入预冷的预冷的线性 pBait-AbAi 质粒 1-5 μg (体积不高于 15 μl) , Carrier DNA (95-100 度 5min 快速冰浴, 重复一次)10μl, 100μl 冰上融化的 Y1HGold 感受态细胞, PEG/LiAc 500μl, 轻轻翻转混匀 6-8 次;
3. 30℃水浴 30min, 每 10min 轻轻翻转混匀 6-8 次;

4. 每支加入 20 μ l 的二甲基亚砷（用以提高转化效率）；
5. 42℃水浴 15min，每 5min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
6. 12000rpm 瞬时离心弃上清，每支加入 1ml 的 YPD Plus (YPDA) 于 30℃复苏 1h（用以提高转化效率）；
7. 12000rpm 瞬时离心弃上清，用 100 μ l 0.9% NaCl 重悬，涂板，30℃培养 48-96h。

注 意 事 项

1. PEG 在低温下易析出，请在常温下完全溶解后使用。
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. Y1HGold 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，Y1HGold 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℃，48h 培养可见直径 1mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板 29℃，80-90h 培养可见直径 1mm 克隆。