AH109 酵母感受态细胞

AH109 Chemically Competent Cell

产品规格:10×100μl　　保存条件：　-80℃

AH109	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

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

简　要　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 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，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 17bp 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。AngYuBio High5TM 系列 AH109 感受态细胞经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月，经 PGADT7 质粒检测转化效率>10_4cfu/μg DNA 。

操　作　说　明

1. 取一支无菌的 1.5ml EP 管，依次加入预冷的目的质粒 1-3μg，

Carrier DNA 10μl，100μl 冰上融化的 AH109 感受态细胞，PEG/LiAc 500μl，轻轻翻转混匀 6-8 次；

2. 30℃水浴 30min，每 10min 轻轻翻转混匀 6-8 次；

3. 每支加入 20μl 的二甲基亚砜；（用于提高转化效率）

4. 42℃水浴 15min，每 5min 轻轻翻转混匀 6-8 次；

5. 12000rpm 瞬时离心弃上清，每支加入 1ml 的 YPD Plus 于 30℃复苏 1h；（用于提高转化效率）

6. 12000rpm 瞬时离心弃上清，用 100μl 0.9% NaCl 重悬，涂板，30℃培养 48-96h。

注 意 事 项

1. 感受态细胞最好在冰上融化,PEG 溶液在低温环境下会析出，请于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. AHA109 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，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℃，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 三缺或四缺平板平板 29℃，80-90h 培养可见直径 1mm 克隆。