

Y187 酵母感受态细胞

Y187 Chemically Competent Cell

产品规格: 10×100 μl

保存条件: -80℃

Y187	10×100μl	保存条件: -80℃
Carrier DNA	5ug/μl; 100μl	保存条件: -20℃
PEG/liAC	5 ml	保存条件: 4℃

基 因 型

MAT α , ura3-52, his3-200, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4 Δ , met $^{-}$, gal80 Δ , URA3 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ, MEL1

简 要 说 明

Y187 菌株是 GAL4 系统酵母单杂，双杂实验用菌株，MAT α 型，可直接转化质粒或与 MAT α 型酵母菌株 (Y2HGold, AH109 等)通过 mating 操作进行筛库试验。Transformation marker 为: trp1, leu2, 报告基因为: lacZ, MEL1。Y187 有两个报告基因: lacZ, MEL1, 分别由两种不同的启动子 (G1, M1)启动, 这两种启动子只有 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。Y187 感受态细胞经特殊工艺制作, pGADT7 质粒检测转化效率>10⁴ cfu/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(95-100 度 5min 快速冰浴, 重复一次), 100μl 冰上融化的 Y187 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 的二甲基亚砷; (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 (或 YPDA) 于 30℃复苏 1h; (用于提高转化效率)

6. 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.Y187 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 29℃，80-90h 培养可见直径 1mm 克隆。