EGY48 酵母感受态细胞

EGY48 Chemically Competent Cell 产品说明书

保存条件： -80℃

产品规格:

EGY48	10×100μl	保存条件： -80℃
PGBKT7（control vector）	10ng/μl；10μl	保存条件： 4℃
Carrier DNA	5ug/μl；100 μl	保存条件： -20℃
PEG/liAC	3.5 ml	保存条件： 4℃

基 因 型

MATα, *ura3, his3, trp1,* LexAop (x6)-*LEU2*

简 要 说 明

EGY48 菌株是 Clontech 公司开发的 LexA 系统酵母双杂实验用菌株，MATa 型，可直接转化质粒进行蛋白互作验证或筛库试验；Transformation marker 为: his3, trp1, ura3，报告基因为：LEU2；报告基因 UAS（上游激活序列）来源于 LexA op(x6)，只有当 Bait 和 Prey 互作时才能启动 LEU2 表达。EGY48-LexA 酵母双杂系统系统需要三种质粒配套使用：pLexA、pB42AD、p8op-LacZ。质粒 pLexA 的筛选标志为 HIS3，用于表达 DNA-BD(来自原核的 202 个氨基酸残基组成的 LexA 蛋白)与目标蛋白(Bait)的融合蛋白；质粒 pB42AD 的筛选标志为 TRP1，用于表达 AD(来自疱疹病毒的 88 个氨基酸残基组成的 B42AD 蛋白)与目标蛋白（Prey）的融合蛋白；报告质粒 p8op-LacZ 的筛选标志为 URA3，报告基因为 LacZ，报告基因 UAS 来源于 LexA op(x8)，只有当 Bait 和 Prey 互作时才能启动 LacZ 表达。EGY48 感受态细胞经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月，经 PGBKT7 质粒检测转化效率>10^4cfu/μg DNA 。

操 作 说 明

1. 取 100 μl 冰上融化的 EGY48 感受态细胞，依次加入预冷的目的质粒 2-5 μg，Carrier DNA (95-100 度 5 min,快速冰浴，重复一次) 10 μl，PEG/LiAc 500μl 并吸打几次混匀，30 度水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
2. 将管放 42℃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℃培养 48-96 h。

Preparation of Media:

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 度，15 分钟高压灭菌，待培养基温度降到 55 度时，加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml

0.2% adenine(1L)

Adenine 2g

补水 到 1L，溶解后高压灭菌或 0.22um 滤膜过滤除菌

注 意 事 项

5. 感受态细胞最好在冰上融化。
6. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
7. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
8. EGY48 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。
9. 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。