Y1HGold Chemically Competent Cell

产品货号： JMC101

产品规格：

Y1HGold Competent Cell	**100μl/支**	**保存： -80℃（3 个月）**
pGADT7 (control vector, 10 ng/μl)	**10μl**	**保存：-80℃（12 个月）**
Carrier DNA (10 μg/μl)	**100μl**	**保存：-20℃（12 个月）**
PEG/LiAC:	**3ml**	**保存： 4℃（12 个月）**

基因型：*MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, met-, MEL1*

产品介绍：

Y1HGold 菌株是 Clontech 公司开发的 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。GAL4-AbA 酵母单杂系统原理：Aureobasidin A (AbA)是一种环酯肽抗生素，在低浓度(0.1-0.2 μg/ml)下即可对酵母产生毒性。基因组中整合了 pBait-AbAi 的酵母菌株 (Bait-Reporter Yeast Strains)，当猎物蛋白 (Prey)结合到诱饵序列 (Bait DNA)上，GAL4 AD 就会激活 AbAr 的表达，从而能够在含有抗生素 AbA 的培养基上生长。AbAr 与营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点，可以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>10^4 cfu/μg DNA。

操作方法：

1. 取 pBait-AbAi 质粒 5μg，BstBI 或 BbsI 酶切 1 小时，回收。
2. 取 100 μl 冰上融化的 Y1HGold 感受态细胞，依次加入预冷的线性 pBait-AbAi 质粒 1-5 μg（体积不高于 15 μl），Carrier DNA (95-100 度 5 min,快速冰浴，重复一次) 10 μl，PEG/LiAc 500 μl 并吸打几次混匀，30 度水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42℃水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 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 SD/-Ura 平板，29℃培养 72 h。
5. 挑取 5-10 个克隆，用 PCR 方法确定 pBait-AbAi 整合到 Y1HGold 基因组中，PCR 阳性菌株在 SD/-Ura 平板划线，29℃培养 72 h，4℃保存，此菌株即是 Y1HGold[Bait/AbAi] 菌株。

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. 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，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℃，48 h 培养可见直径 1 mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板平板 29℃，80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。