



Y2HGold Chemically Competent Cell

产品货号： JMC201

产品规格：

Y2HGold 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： *MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1UAS-Gal1TATA-His3, GAL2UAS-Gal2TATA-Ade2 URA3::MEL1UAS-Mel1TATA AUR1-C MEL1*

产品介绍：

Y2HGold 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：AbAr, HIS3, ADE2, MEL1。Y2HGold-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。Y2HGold 有四个报告基因：AbAr, HIS3, ADE2, MEL1，分别由三种不同的启动子（G1, G2, M1）启动，这三种启动子只有 GAL4 识别的 17 bp 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。此外新报告基因 AbAr 与以前的营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点，也可以降低酵母双杂假阳性发生的概率。Y2HGold 感受态细胞经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月。

操作方法：

1. 取 100 μl 冰上融化的 Y2HGold 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 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)。
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。

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. Y2HGold 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 29℃，80-90 h 培养可见直径 1 mm 克隆。