Y187 Elec-Library Competent Cell 产品说明书

● 产品规格（CAT#：YEL1020）

Y187 Elec-Library Cell	400μl /支	保存： -80℃（3 个月）
pGADT7 (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存：-80℃（12 个月）
YB 溶液（0.45um 过滤除菌）	50ml	保存： 4℃（3 个月）

● 基因型

MATα, *ura3-52, his3-200, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4Δ, met-, gal80Δ,* URA3::*GAL1UAS -GAL1TATA-lacZ, MEL1*

● 产品说明

Y187 菌株是 Clontech 公司开发的 GAL4 系统酵母单杂，双杂实验用菌株，MATα 型，可直接转化质粒或与 MATa 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-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。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 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。Y187 Elec-Library Cell 为构建酵母文库用电转感受态细胞，经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月，pGADT7 质粒（7988bp，Amp^R）检测转化效率>1×10^6 cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. 取适量 YB 溶液（0.45um 过滤除菌）放 30 度预热，每管感受态准备 10ml。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分，正置 5 分钟，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取-80℃保存的 Y187 电击感受态细胞插入冰中 2-5 分钟，待其融化，加入预冷的目的质粒 2-15ug (加入 DNA 的体积不超过 40ul，DNA 纯度越高越好，保证尽可能低的离子含量)。

4. 用 200 μl 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物缓慢吹打两次，除去气泡，快速转移到电击杯中（避免产生气泡），轻轻晃动电击杯使液面保持水平状态，盖上杯盖，插入冰中。
5. 启动电转仪，设置参数：C=25 μF，PC=200 Ω，V=2.5kV，将电击杯从冰中拿出，用吸水纸擦拭吸干表面水渍，放入电转槽中，电击完成后拿出电转杯放室温，打开杯盖，10 秒内加入 1ml 预热的 YB 溶液，转移到无菌的 50ml 离心管中，再加入 1ml YB 溶液清洗电转杯并转移到离心管中，补加 8ml YB 溶液，30℃ 250rpm 摇菌 1.5h。
6. 3000 rpm 离心 2 min 弃上清，加入 1-10ml 0.9%的氯化钠重悬涂板，29℃培养 48-96 h。

● 培养基配制

① YPDA (1L) (唯地 CAT#：YM1020):

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℃，15 min 高压灭菌；
待培养基温度降到 55℃时，加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml。

② SD medium (1L)(唯地 CAT#：YM3101-YM3611):

Yeast Nitrogen base	6.7g
葡萄糖	20g
Dropout	适量（按说明书）

补水到 1L，调 PH 至 5.8；
Agar 20g(for plates only)
121℃，15 min 高压灭菌。

③ 0.2% adenine (1L) (唯地 CAT#：YC6030)
Adenine 2g； 补水到 1L；溶解后高压灭菌或 0.22μm 滤膜过滤除菌。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化，加入质粒 DNA 的体积不超过 40ul，文库质粒纯度越高越好。
2. 文库用酵母感受态的转化效率数据是在加入不超过 100ng 标准质粒的试验中获得，若加入质粒过多，虽然得到的菌落数会增加，但是由此计算的转化效率会下降。
3. 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。
4. 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。
5. 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℃，80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。