

NMY51 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YC1040)

NMY51 Competent Cell	100µl /支	保存: -80°C (3个月)
pGADT7 (control vector, 10ng/µl)	10µl	保存: -80°C (12个月)
Carrier DNA (10µg/µl)	100µl	保存: -20°C (12个月)
PEG/LIAC	5ml	保存: 4°C (12个月)

● 基因型

MATa, *his3Δ200, trp1-901, leu2-3, 112, ade2, LYS2::(lexAop)4-HIS3, ura3::(lexAop)8-lacZ, ade2::(lexAop) 8-ADE2, GAL4*

● 产品说明

DUAL membrane 系统是 DUAL systems BioTech 公司开发的专门筛选跨膜蛋白间相互作用的检测技术, 它利用分离的泛素系统 (split-ubiquitin) 直接检测天然状态下膜蛋白间的相互作用, 是目前市面上唯一检测膜蛋白间相互作用的酵母双杂系统。此系统采用 NMY51 酵母菌株, 可直接转化质粒进行蛋白互作验证或筛库试验; 此菌株 Transformation marker 为: *trp1, leu2-3*, 报告基因为: *HIS3, ADE2* 和 *lacZ*, 第一步通过营养缺陷型报告基因 (*HIS3, ADE2*) 进行选择生长筛选, 进一步通过 *LacZ* 报告基因进行 β-半乳糖分析显色的定量或半定量筛选, 三个独立的报告基因, 受不同启动子的调控, 降低假阳性几率。原理: 泛素 (ubiquitin) 分子量很小, 由 76 aa 残基组成; 泛素作为降解信号分子, 可以连接另外一种蛋白质的 N 端, 然后被泛素专一性蛋白酶 (UBPs) 识别, 从而导致与泛素相连的蛋白被酶解。泛素可以人为分成两部分: N 端 (Nub), C 端 (Cub)。首先, 人为地将泛素 Nub 的 3 位异亮氨酸突变为甘氨酸 (NubI 突变为 NubG)。这样与 Cub 的亲合力大大降低, 避免了 Cub 和 Nub 自我结合或接近的可能性。其次, 将 Cub 部分与人工合成的 LexA-VP16 转录激活因子融合成一个融合蛋白 Cub-LexA-VP16。正常条件下 NubG 不与 Cub 结合, UBPs 也不能识别分离的泛素, 转录激活因子也不会被切下来。最后, 将要检测的蛋白质分别与 NubG 和 Cub 融合, 形成 bait 融合蛋白 (bait-cub-LexA-VP16) 和 prey 融合蛋白 (prey-NubG)。如果 bait 和 prey 发生相互作用, 就会促使 NubG 和 Cub 的相互接近, 被 UBPs 识别, 导致 LexA-VP16 的解离, 进入核内, 从而激活报告基因的转录。此系统可使用四种 Bait 质粒: pBT3-N, pBT3-SUC, pBT3-STE, pBT3-C, 筛选标志均为 LEU; 三种 Prey 质粒: pPR3-C, pPR3-SUC, pPR3-STE, 筛选标志均为 TRP。NMY51 感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, pGADT7 质粒 (7988bp, Amp^R) 检测转化效率 > 10⁴ cfu/µg DNA。

● 操作方法

1. Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95°C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95°C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 100 µl 冰上融化的 NMY51 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5 µg, 预处理后的 Carrier DNA 10 µl, PEG/LiAc, 500 µl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 将管放 42°C 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。
5. ddH₂O 50 µl 重悬, 涂板, 29°C 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°C, 15 min 高压灭菌;

待培养基温度降到 55°C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°C, 15 min 高压灭菌。

③ 0.2% adenine (0.5L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 1g; 补水到 0.5L; 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。
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. NMY51 酵母菌株对高温敏感, 最适生长温度为 27-30°C; 高于 31°C, 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°C, 48 h 培养可见直径 1 mm 克隆; 涂 SD 单缺平板 29°C, 48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 双缺平板 29°C, 60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 三缺或四缺平板 29°C, 80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。