

NMY51 Elec-Library Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: YEL1040)

内容名称	包装含量	货号	包装数量	保存条件, 时间
NMY51 Elec-Library Cell	400µl /支	YEL1002S/M	5 支/20 支	-80°C (3 个月)
pGADT7 (control vector, 10ng/µl)	10µl	YEL1002S/M	1 支	-80°C (12 个月)
YB 溶液 (0.45um 过滤除菌)	50ml	YEL1002S/M	1 瓶/4 瓶	4°C (3 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。INMY51 Elec-Library Cell 为构建酵母文库用电感受态细胞, 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 >1×10⁶ 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°C 保存的 Y2HGold 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 μ l 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 μ F, 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°C 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°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#: YM3101-3611):

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 (1L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 2g; 补水到 1L; 溶解后高压灭菌或 0.22 μ m 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. 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。
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°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。