

NMY51 二代甘油菌种说明书

● 产品规格 (CAT#: Bsa-1040)

NMY51 二代甘油菌	400 μ l / 1 支	保存: -80°C/大于 10 年
YPDA 平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	——

● 基因型

MATa, his3 Δ 200, 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) 进行选择性地生长筛选, 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 (Nubl 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 (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。本产品为二代甘油菌株(一代种扩增两个世代后保种), 未经过大量扩繁, 核 DNA 及表型稳定, 菌落表型及生长曲线与原种匹配度大于 99.5%。

● 操作方法

1, 客户收到菌株后, 不可直接吸取菌液接种扩繁。应先对菌种进行复壮, 待长出单菌落后挑单菌落接菌扩繁; 复壮方法如下: 在超净台打开盖子, 用接种环沾取少量甘油菌液采用交叉划线法 (图 1) 在 YPDA 平板表面轻轻划线 (注意: 不要刺破培养基), 将平板封口后放 30 度培养 3-5 天, 即可长出单菌落。

2, 交叉划线法: 划线的目的是经过几次不连续划线达到梯度稀释菌液的效果, 保证能长出单菌落。具体步骤如下: A, -80 度取出的甘油菌应在超净台打开盖子, 立即在表面挑取菌液/菌块划线, 不用等融化后划线, 固体状态时即可用接种环挑取划线, 操作要点是“快速操作, 立即划线”, 目的是最大限度减少温度波动对菌种造成的“冷休克”和冰晶物理损伤; 如果收到的是液体甘油菌, 可直接划线, 在超净台打开盖子用接种环沾取少量甘油菌液划线。

B, 取出无菌接种环, 注意不要污染, 图 1 所示为标准的五段交叉划线法, 分五个区, 每个区划三条直线, 第 1、2 区可共用一个接种环, 划好 1、2 区后换一个新接种环划第 3 区, 再换一个新接种环划第 4 区, 再换一个新接种环划第 5 区, 每一次换接种环划线要经过前面划线区的划线痕迹, 这样就相当于对菌种进行稀释。简易划线法也可只划 3 个区或 4 个区。

C, 客户也可用金属接种环灼烧后划线; 本公司提供的接种环为 ABS 材质, 不可灼烧。

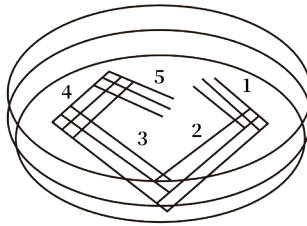


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 注意事项

- 1, 客户收到二代甘油菌株后, 应立即放-80 度保存, 不可放-20 度保存。
- 2, 应减少甘油菌冻融的次数, 冻融的次数越多, 菌种的活力越低;
- 3, 若扩繁菌种, 注意一次扩繁不要超过四个世代, 以保证菌种基因组的稳定; 扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证, 所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。