



NMY51 Chemically Competent Cell

产品货号： JMC601

产品规格：

NMY51 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:	5ml	保存： 4℃ (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*

产品介绍：

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℃可保存三个月。

操作方法：

1. 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，Carrier DNA (95-100 度 5 min, 快速冰浴，重复一次) 10 μl，PEG/LiAc 500μl 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. NMY51 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。