

NMY51 酵母感受态细胞说明书

产品规格 (Cat.Y0028)

NMY51 Chemically Competent Cell	100μl/支	-80°C (3 个月)
Carrier DNA (10 μg/μl)	100μl/支	-20°C (12 个月)
PEG/LiAC	6.5ml	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

产品简介:

NMY51 是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) MATa 单倍体菌株, 专为 DUAL membrane 分离泛素膜酵母双杂交系统设计, 核心用于天然膜蛋白间相互作用的筛选与验证, 假阳性极低。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。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解离。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 pGADT7 质粒 (7988bp, AmpR) 检测转化效率 >10⁴ cfu/μg DNA。

使用方法:

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 5 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 640 μl 并吸打几次混匀, 30°C 水浴摇床 60 min。
3. 将管放 42°C 水浴 17 min, 冰浴 5 min, 5000rpm 离心 5 min。
4. 弃上清, 加 1ml YPD 重悬, 30°C 恒温摇床 1h。
5. 5000rpm 离心 5 min 去上清, 1ml 无菌水洗 2 次, 离心去上清。
6. 加 100ul 无菌水重悬, 涂相应缺陷型平板。30°C 培养 3-4 天。

注意事项:

1. 初次使用 Carrier DNA, 请把装有 Carrier DNA 的管子在沸水中煮沸 5 min, 然后立即放在冰上, 用后放在-20°C储存备用。下次使用前请于冰上解冻 Carrier DNA。反复冻融 3-5 次后需重新变性 Carrier DNA。
2. 感受态细胞最好在冰上融化。
3. 转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量。
4. 酿酒酵母对温度敏感, 适宜的生长温度是 28°C-30°C, 温度超过 31°C影响酵母生长。
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。