NMY51 酵母感受态细胞

NMY51 Chemically Competent Cell

保存条件： -80℃

产品规格:

NMY51	10×100μl	保存条件：- 80℃
PGADT7（control vector）	10ng/μl；10μl	保存条件： 4℃
Carrier DNA	5ug/μl；100 μl	保存条件： -20℃
PEG/LiAc	3.5 ml	保存条件： 4℃

基 因 型

MATahis3200trp1-901leu2-3,112ade2LYS2::(lexAop)4-HIS3ura3::(lexAop)$_8$-lacZade2::(lexAop)$_8$-ADE2 GAL4

简 要 说 明

DUALmembrane 系统是 DUALsystems 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 76aa 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（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。High5TM 系列 NMY51 感受态细胞经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月，经 PGADT7 质粒检测转化效率>10^4cfu/μg DNA 。

操 作 说 明

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。

Preparation of Media:

YPDA (1L):

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 度，15 分钟高压灭菌，待培养基温度降到 55 度时，加入已过滤的 40% 葡萄糖 50 ml

0.2% adenine(1L)

Adenine 2g

补水到 1L，溶解后高压灭菌或 0.22um 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℃；高于 31℃，生长速度和转化效率呈指数下降。

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℃，48h 培养可见直径 1mm 克隆；涂 SD 单缺平板 29℃，48-60h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 双缺平板 29℃，60-80h 培养可见直径 1mm 克隆，涂 SD 三缺或四缺平板平板 29℃，80-90h 培养可见直径 1mm 克隆。