

版本号: DE240226

Bimolecular Fluorescence Complementary Kit (Tobacco System)

双分子荧光互补瞬转试剂盒（烟草系统）

产品编号: MH201

产品内容:

编号	产品货号	产品内容	类型	50 T	储存条件
1	MH001-1	5×农杆菌侵染液	溶液	80 mL	4°C
2	SL9513	乙酰丁香酮（100 mM）	溶液	400 µL	-20°C, 避光
3	VT148	p1300-SCYNE	空载质粒	10 µg	-20°C
4	VT149	p1300-SCYCE	空载质粒	10 µg	-20°C
5	VT150	p1300-SCYNE-ATG8	阳性对照质粒	10 µg	-20°C
6	VT151	p1300-SCYCE-NBR1	阳性对照质粒	10 µg	-20°C
7		说明书		1 份	

运输及储存条件:

1. 本试剂盒中各组分均为蓝冰运输。
2. 各组分按照产品内容表中保存温度要求进行储存。

产品介绍:

双分子荧光互补实验 (Bimolecular fluorescence complementation, 简称 BiFC) 可以用于蛋白质-蛋白质相互作用的研究。荧光蛋白(YFP)被人为分为 N 端和 C 端两部分, 单独的两个片段不能自发地重组和发挥功能。只有当两片段分被融合到相互作用的两个目标蛋白上时, 会因目标蛋白的相互作用力而被拉近、发生互补从而重新构建成完整的具有活性的荧光蛋白分子并在激发光下产生荧光。在植物中, 通过农杆菌瞬时转化, 可以直观、快速在烟草、拟南芥等双子叶植物叶片中进行蛋白之间的互作检测。本试剂盒提供了一套简单高效, 适用于烟草的双分子荧光互补实验的瞬转方法。采用本公司独家研制的侵染缓冲液, 广泛适用的表达载体和阳性对照质粒, 可以快速通过 BiFC 实验检测蛋白之间的互作。

产品特点:

本试剂盒适用于在烟草叶片中利用双分子荧光互补技术进行蛋白质相互作用检测, 简单高效。包含了双分子荧光互补实验所需的载体和试剂并提供了试验全流程方案, 帮助研究人员方便、快捷的完成实验。

注意事项:

1. 本产品提供了双分子荧光互补实验的方案, 具体操作时可根据自己试验的实际情况对相关内容进行调整。
2. 本产品所需的感受态细胞及其它试剂可以在本司单独购买, 详情可见说明书最后的相关产品介绍。

操作步骤: (在开始操作前请先阅读注意事项)

一、载体构建

将所研究的两个目标蛋白 (蛋白 1、蛋白 2) 的 CDS 序列分别构建到 p1300-SCYNE 载体 (10359 bp、卡那抗性) 的 nYFP 区域的下游 MCS 处和 p1300-SCYCE 载体 (10098 bp, 卡那抗性) 的 cYFP 区域的下游 MCS 处 (载体构建示意图如图 1 所示)。构建完成后, 形成两个实验组质粒: p1300-SCYNE-蛋白 1、p1300-SCYCE-蛋白 2。

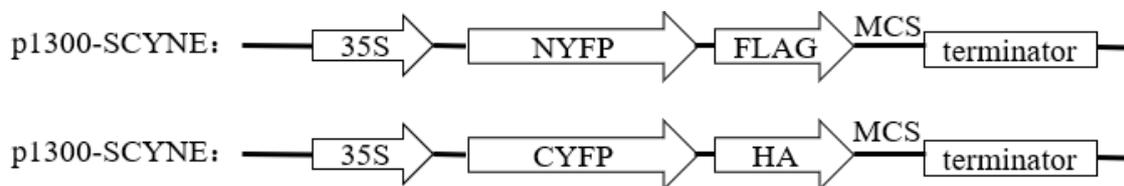


图 1 实验组载体构建示意图

注 1: 载体构建时要保证插入片段与 nYFP 或 cYFP 保持同一阅读框, 保证插入片段融合表达。

注 2: 有关 p1300-SCYNE 及 p1300-SCYCE 载体基本信息及序列请致电本公司客服获取。

二、瞬时转化

1. 转化农杆菌:

将构建好的 2 个实验组质粒、2 个空载质粒 (p1300-SCYNE、p1300-SCYCE) 以及 2 个阳性对照质粒 (p1300-SCYNE-ATG8、p1300-SCYCE-NBR1) 转化农杆菌感受态细胞 GV3101 (pSoup-p19), 涂布在含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan、25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rif 的 LB 平板上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养大约 2 天即可长出单菌落。

2. 摇菌:

从上一步培养后的平板上挑取单菌落到 5 mL 的 LB 液体培养基中 (含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Kan 和 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Rif), 过夜培养 14-18 h。

注 1: 实际操作时可根据后续试验组合需要, 扩大或缩小摇菌体积。

注 2: GV3101 (pSoup-p19) 菌株可以辅助异源蛋白在植物中的瞬时表达。在大部分实验中使用 GV3101 菌株也可取到良好的实验效果。

3. 配制 Activation Buffer:

在无菌条件下, 用无菌双蒸水将农杆菌侵染液稀释为 1x 工作液, 然后取 8 mL 的工作液加入 8 μL 乙酰丁香酮 (100 mM) 混匀备用。

注: Activation Buffer 需要现配现用, 根据第 3 步菌液的体积配置合适体积的 Activation Buffer。

4. 收集、重悬菌体:

取 2 mL 摇至浑浊的农杆菌菌液 (OD600 = 1.0~1.5), 5000 rpm/min 离心 5 min, 弃去上清, 用 Activation Buffer 重悬菌体, 调至 OD600 = 1.0。

5. 混菌:

实验一般设置四个组合 (如图 2), 在离心管中按 1: 1 体积混合两种菌体, 黑暗下静置 2-4 h。

6. 注射法侵染烟草叶片:

使用 2 mL 无菌注射器吸取上一步得到的重悬液; 避开烟草叶脉, 确认要注射的区域 (如图 2 所示), 先用注射器针头在要注射的区域中间轻微划一下, 造成“微创”, 注意不要划破叶片; 左手抵在叶片的正面, 右手将注射器 (不带针头) 垂直压在叶片的背面, 右手拇指慢慢推压注射器, 观察菌液在表皮下扩散到一定范围 (如图 2 圆圈所示区域, 具体范围视烟草叶片大小而定, 注射范围不必过大, 有一小片区域即可满足试验需求, 务必使 4 种处理组合在一片叶子上的扩散范围互不影响)。注射完毕后放在温室中培养 36-48 h, 根据实验需求进行后续实验。

每次试验建议将 4 种处理组合注射到同一片叶子上 (图 2)。同一株烟草选取 2-3 个叶片进行注射。同一批试验建议至少注射 3 株烟草。

注：最好选择 5-6 周龄健康的本氏烟进行注射（太小的叶片不容易注射，太老的叶片表达效率较低），单个组合 2 mL 菌液即可满足 9 块区域的注射要求，如注射范围较大，需额外多配制菌液。

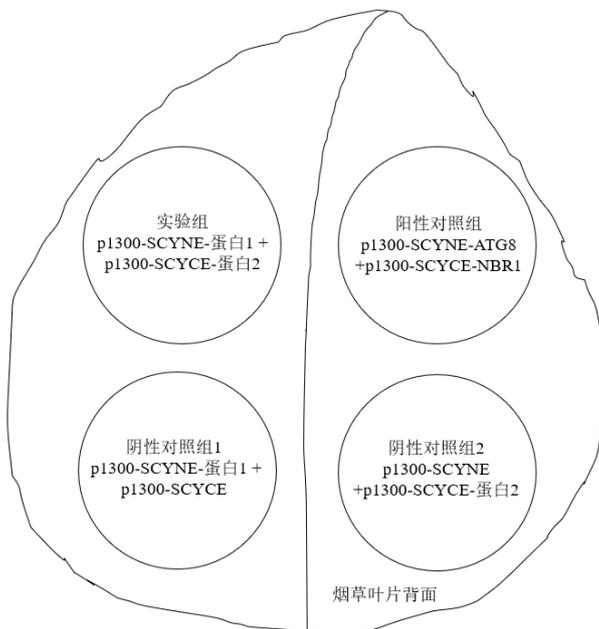


图 2 注射法侵染烟草示意图

三、结果观察

培养 36-48 h 后观察烟草注射农杆菌的区域有无荧光。使用打孔器取烟草叶片标记区域，叶片背面朝上放在载玻片上（叶片背面表皮细胞层较好观察），然后在叶片背面滴一滴灭菌双蒸水，盖上盖玻片（此步骤尽量减少气泡的产生），多余的水用吸水纸擦干，放在激光共聚焦显微镜下进行荧光的成像。

相关产品：以下产品均可单独在本公司订购，更多产品请关注公司官网查询。

产品名称	货号
农杆菌侵染液（烟草专用）	SL0911
100 mM 乙酰丁香酮	SL9513
200 mM 乙酰丁香酮	SL95131
乙酰丁香酮（粉末）	CA1061
DH5α 感受态细胞	CC501
GV3101 感受态细胞	CC405
EHA105 感受态细胞	CC403
GV3101（pSoup-p19）感受态细胞	CC407
卡那霉素储存液（100 mg/mL）	SL3820