



NMY51 膜系统酵母双杂互作验证试剂盒 使用说明书

产品编号: YH3021-10T

产品组成:

组成	产品	产品货号	产品名称	规格
成份一	培养基	PM2221	SD/-Leu/-Trp Broth	0.5 L×1
		PM2222	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3
		PM2152	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×1
		PM2112	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3
成份二	筛选剂	SL3800	X-gal (20mg/mL, 过滤除菌)	5×1 mL
		SL0930	3-AT (2.5 M, 过滤除菌)	5×5 mL
	质粒	--	请备注一个质粒	10 µg
		VT026	pPR3-N 质粒	10 µg
		VT030	pOST1-NubI	10 µg
	对照菌株	YS3041	NMY51[pTSU2-APP+pPR3-N]冻干粉	0.2 mL
YS3042		NMY51[pTSU2-APP+pNubG-Fe65] 冻干粉	0.2 mL	
成份三	感受态细胞	CC304	NMY51 感受态细胞	20×100 µL/支

注:

1. 本试剂盒提供的产品以**产品组成**为准, 大概能用于 10 对双杂互作验证 (质粒除外)。
2. 各组分需按照标签温度储存, 感受态细胞务必-80 °C 保存。
3. 0.5L×2 表示: 2 个包装, 每个包装 0.5L; 5×1mL 表示: 1 个包装, 含 5 个 1mL。
4. 感受态细胞 CC304 配带有 Carrier DNA 和 PEG/LiAc。
5. 载体序列, 在我司网站可以下载。

产品说明:

膜系统酵母双杂的原理: 基于分离的泛素(split-ubiquitin)介导的膜蛋白酵母双杂交系统可用于膜蛋白-膜蛋白或膜蛋白-可溶性蛋白之间的互作检测, 也可以进行文库筛选。泛素分子被分为 Cub 和 NubG 两个结构域, 各自连接一个已知诱饵蛋白和猎物蛋白且在膜上正常表达, Cub 另一端连接转录激活因子 LexA-VP16 处于细胞质侧, 当已知诱饵蛋白和猎物蛋白存在相互作用时, 由于互作蛋白的靠近使 NubG 和 Cub 在空间上接近, 从而合成一个完整的泛素分子, 导致细胞质侧的转录激活因子 LexA-VP16 被 UBPs 切割, 游离的 LexA-VP16 进入细胞核, 激活 His3 和 LacZ 表达, 可在缺失培养基筛选有互作功能的蛋白。DUALmembrane 系统的一个最基本的要求就是 bait(Cub-LexA-VP16)和 prey(NubG)必需位于胞浆中, 整个系统才能正常运行。因此需要对诱饵蛋白精确定位后选择合适的载体, 载体选择参考表 1。

功能验证: NubI 为野生型的 ubiquitin 的 N 端结构, 保留了原始的三个 I 氨基酸结构, 可以在不需要两个蛋白产生相互作用的情况下两个 C 端和 N 端的 ubiquitin 结构域结合在一起产生具有功能的 ubiquitin,



从而激活下游的报告基因。如果，将 pBT3-N-Bait 和 pOST1-Nubi 质粒共转化 NMY51，涂布平板 DDO、TDO 和 QDO，结果平板 DDO 有菌落生长，说明共转化成功；平板 TDO 和 QDO 均有菌落生长，说明 bait 质粒能够适应 ubiquitin 系统，功能验证通过，可以进行下一步验证实验。如果功能验证结果为阳性，可以排除由于诱饵 bait 蛋白造成的空间位阻而产生假阴性，同时能说明 Bait-Cub 跨膜蛋白正常表达，因此能够确认 bait 蛋白可以用于下游的文库筛选。

自激活检测: pTSU2-APP Control Vector 和 pNubG-Fe65 Control Vector 共转化 NMY51，涂布平板 DDO、TDO、QDO 培养基中都有克隆生长，阳性对照实验成功。pTSU2-APP Control Vector 和 pPR3-N Control Vector 共转化 NMY51，于 DDO 培养基上生长但在 TDO 和 QDO 培养基上无克隆生长，阴性对照实验成功。NMY51[pBT3-N-Bait+pPR3-N] 在 DDO 上生长，说明 pBT3-N-Bait 质粒成功转入酵母菌株中，在 TDO 有轻微生长 QDO 培养基上不生长，说明 pBT3-N-Bait 在 NMY51 酵母菌株中有轻微激活活性，也可以进行后续筛选。

表 1 膜系统酵母双杂交诱饵载体选择

诱饵 N 端	诱饵 C 端	诱饵质粒
胞外且含信号肽	胞内	pBT3-SUC (货号 VT024)
胞内	胞外	pBT3-N (货号 VT023)
胞内	胞内	
胞外不含信号肽	胞内	pBT3-STE (货号 VT025)
胞内	胞内	

注: 若蛋白 N 端和 C 端都位于胞外或细胞器内，需要对诱饵进行截断，使其中一个末端暴露在细胞质一侧，再选择相应载体。不含信号肽，N 端在膜内，C 端在膜内，中间存在跨膜结构，建议选择 pBT3-STE 载体。

目录

一、实验耗材和试剂.....	3
二、菌株使用与保存.....	3
三、实验方法.....	4
3.1 转化酵母 NMY51 感受态细胞.....	4
3.2 重组诱饵载体的功能验证.....	4
3.3 互作验证.....	5
四、互作验证分析.....	6
4.1 互作/无互作.....	6
4.2 Bait 蛋白有自激活.....	7
4.3 Prey 蛋白有毒性.....	7
五、注意事项.....	8



一、实验耗材和试剂

本试剂盒提供的产品以**产品组成**为准，部分试剂和耗材需要自备，也可以在本公司单独购买。

1. 灭菌的枪头（1000 μ L、200 μ L、10 μ L）、涂布棒或玻璃珠， Φ 90 mm、 Φ 150 mm 培养皿，备用。
2. Carrier DNA 在 95-100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，后快速冰浴，可再重复一次，备用。
4. 自备 0.9% 生理盐水，可用 ddH₂O 无菌水代替，备用。
5. 普通平板制备

将 1 条培养基溶于 0.5 L 去离子水中，无需调节 pH 值，高压灭菌（如，115 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min）。液体培养基 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存；固体培养基，20-25 mL/块倒平板（ Φ 90 mm），或 70-75 mL/块倒平板（ Φ 150 mm），凝固后 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

6. 特殊平板制备

SD/-His/-Leu/-Trp with Agar (3-AT)：将一条 SD/-His/-Leu/-Trp with Agar 培养基溶于 500 mL 去离子水，无需调节 pH 值，高压灭菌（如，115 $^{\circ}$ C 灭菌 20 min），冷却至 50 $^{\circ}$ C 左右，参照表 2 加入 3-AT，倒平板 25 mL/块（ Φ 90 mm），凝固后于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

表 2 不同浓度 3-AT 平板

培养基体积 (mL)	25	25	25	25	25	25
3-AT (2.5M) 加入量 (μ L)	50	100	300	500	800	1000
3-AT 终浓度 (mM)	5	10	30	50	80	100

二、菌株使用与保存

2.1 冻干粉溶解

可选择将冻存管中冻干粉全部溶解或部分溶解

1. 全部溶解

取一整管冻干粉，加入 200 μ L 无菌水或无菌培养基溶解，重悬后即可得 200 μ L 菌悬液，直接用于菌株活化，剩余菌液-80 $^{\circ}$ C 冰箱保存（建议分装保存，注意避免反复冻融）。

2. 部分溶解

用枪头刮取管中冻干粉，用无菌水或无菌培养基溶解，直接用于菌株活化，剩余冻干粉-80 $^{\circ}$ C 保存。

2.2 菌株活化

取 2.1 中冻干粉溶解得到的菌液 10-50 μ L 至 SD/-Leu/-Trp 培养基（平板）上进行划线。置于培养箱 28-30 $^{\circ}$ C 培养 3-5 d。培养出来的单菌落可直接用于互作验证实验。



2.3 菌株保存

挑取上述单菌落于 SD/-Leu/-Trp 液体培养基中，200 r/min、28-30°C 振荡过夜培养，OD₆₀₀ 应大于 1，取 1 mL 菌液集菌，弃上清，加入 0.2 mL 15% 甘油，-80°C 可长期保存。

三、实验方法

3.1 转化酵母 NMY51 感受态细胞

- 1 取 100 μL 冰上融化的 NMY51 感受态细胞，依次加入预冷的质粒 BD plasmid (2-5 μg, 约 5 μL), AD plasmid (2-5 μg, 约 5 μL), Carrier DNA (95-100 °C, 5 min, 快速冰浴, 重复一次) 10 μL, PEG/LiAc 500 μL 并吸打几次混匀, 30 °C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
- 2 将管放 42 °C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
- 3 10,000 rpm 离心 30 s, 弃上清, ddH₂O 400 μL 重悬, 5000 rpm 离心 30 s, 弃上清。
- 4 ddH₂O 50 μL 重悬, 涂布于 SD/-Leu/-Trp 平板, 30 °C 培养 48-96 h。

注: 按表 3, 将各质粒转入酵母 NMY51 感受态细胞中, 阳性和阴性对照菌株冻干粉溶解后于 SD/-Leu/-Trp 平板划线活化。

表 3 酵母转化反应

BD plasmid	AD plasmid	备注
pTSU2-APP	pPR3-N	阴性对照
pTSU2-APP	pNubG-Fe65	阳性对照
Bait construct	pOST1-NubI	功能验证、毒性检测
Bait construct	pPR3-N	自激活检测、毒性检测、对照组*
Bait construct	pPR3-N-Prey	实验组

注: 对照组*可以更好的体现实验组是否有互作。

3.2 重组诱饵载体的功能验证

1. 阳性对照为两个互作的蛋白, 表达载体为 pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65, 阴性对照为两个没有互作的蛋白, 表达载体为 pTSU2-APP 和 pPR3-N。
2. 功能验证菌株为 NMY51[Bait construct+pOST1-NubI], 阴阳性菌株为对照组。上述转化成功的每个样品挑取新鲜单菌落 (2-3mm) 于 1 mL 0.9% 氯化钠溶液中重悬, OD₆₀₀ 调至 0.002 (也可以用 SD/-Leu/-Trp 液体培养基培养至 OD₆₀₀=0.002), 然后取 100 μL 涂板 SD/-Leu/-Trp, SD/-His/-Leu/-Trp 和



SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 这三种固体选择培养基上。

3. 功能验证菌株于平板 DDO、TDO 和 QDO 均有菌落生长，说明共转化成功，bait 质粒能够适应 ubiquitin 系统，功能验证通过，可以进行下一步验证实验。

注：

- a. 本方案不在单独比较 NMY51[Bait construct]和 NMY51[Empty BD]生长状况以确定诱饵载体是否具有毒性。如果重组诱饵载体如果具有毒性，在 SD/-Leu/-Trp 平板上，NMY51[Bait construct+pOST1-NubI]比 NMY51[pTSU2-APP+pNubG-Fe65]的克隆要小的多。酵母杂交实验，不适于毒性很强的蛋白。
- b. 选做，功能验证：平板 DDO、TDO 和 QDO 均有菌落生长，TDO 生长率应该是 10%-100% (TDO 生长率=TDO 转化子/DDO 转化子*100%)。

3.3 重组诱饵载体的自激活（筛选诱饵酵母菌株的 3-AT 最佳使用浓度）

1. 自激活菌株为 NMY51[Bait construct+pPR3-N]，阴阳性菌株为对照组，每个样品挑取新鲜单菌落（2-3mm）于 1 mL 0.9%氯化钠溶液中重悬，OD600 调至 0.002（也可以用 SD/-Leu/-Trp 液体培养基培养至 OD600=0.002），然后取 100 μL 涂板 SD/-Leu/-Trp，SD/-Leu/-Trp/X-Gal 和 SD/-His/-Leu/-Trp/X-Gal/3-AT 这三种固体选择培养基上。
2. 将培养皿置于 30 °C 恒温培养箱中培养 3-5 d，直至长出克隆。
3. 观察诱饵酵母在不同 3-AT 浓度平板上的生长状况，确定 3-AT*最佳使用浓度。

注：

- a. 在不同浓度 3-AT 平板上（0, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM），出现的酵母菌斑最少或完全没有，即为 3-AT 最佳使用浓度（最佳抑菌浓度、最小抑菌浓度、本底表达浓度、自激活浓度）。一般情况下筛库自激活 3-AT 浓度不宜超过 80mM。
- b. 如果是做筛库，重组诱饵载体的自激活必须预先完成。如果是点对点互作验证实验，自激活可以选做，因为本方案的互作验证 NMY51[Bait construct+pPR3-N]可以体现是否具有自激活。

3.3 互作验证

1. 上述的转化成功之后，每个样品挑取新鲜单菌落（2-3 mm）于 1 mL 0.9%氯化钠溶液中重悬，OD₆₀₀ 调至 0.2（也可以用 SD/-Leu/-Trp 液体培养基培养至 OD₆₀₀=0.2）。
2. 用 ddH₂O 依次稀释 10 倍，100 倍，1000 倍（即 OD₆₀₀=0.2、0.02、0.002、0.0002）。
3. 按照先实验组后对照组的顺序，分别点 10 μL 菌悬液于 SD/-Leu/-Trp、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-gal 平板（如果已知自激活浓度，需加入 3-AT）。
4. 30 °C 培养 2-3 d，观察每组重组酵母在对应的自激活 3-AT 浓度平板上生长状况，从而确定是否互作。

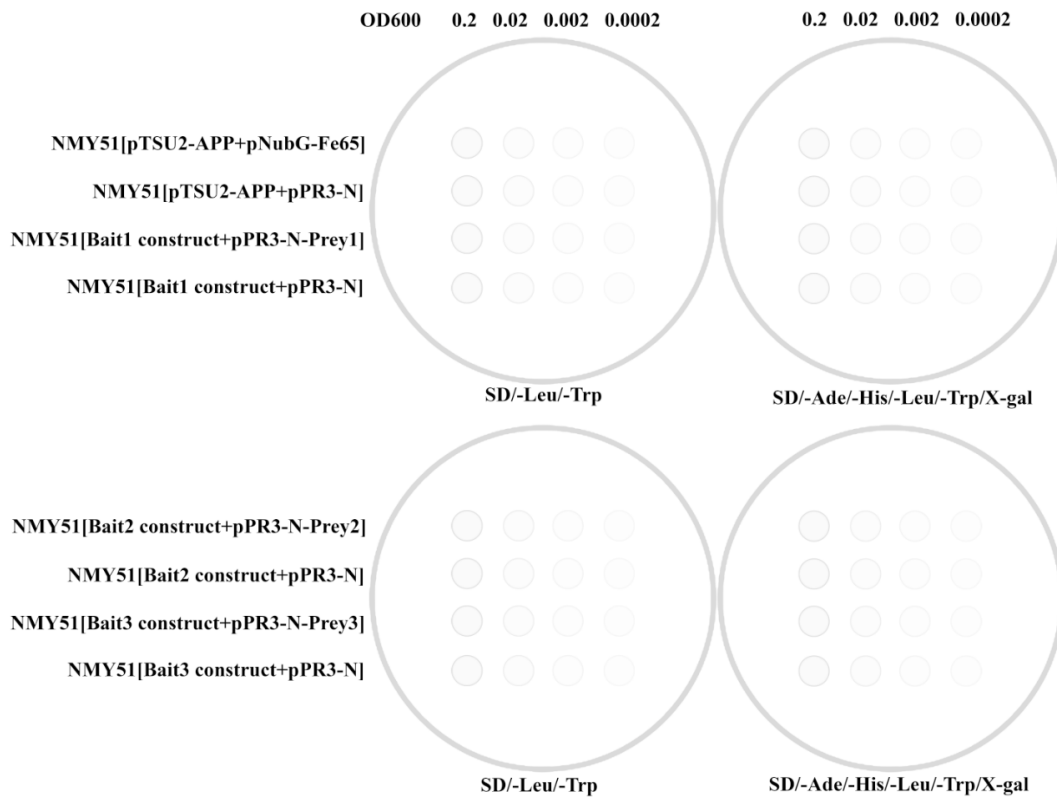


图 1. 梯度稀释点板示意图

四、互作验证分析

4.1 互作/无互作

由图 2 可知, 对照组 NMY51[pTSU2-APP+pNubG-Fe65] 和 NMY51[pTSU2-APP+pPR3-N] 在 SD/-Leu/-Trp 板上长势相同; NMY51[pTSU2-APP+pNubG-Fe65] 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/-X-gal 板上显蓝色, 且长势同 SD/-Leu/-Trp 板; 而 NMY51[pTSU2-APP+pPR3-N] 在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/-X-gal 板上不生长且不显色, 所以, pTSU2-APP 和 pNubG-Fe65 有互作。

同理, Bait1 和 Prey1 有互作, Bait1 construct 和 pPR3-N 无互作 (即 Bait1 construct 无自激活)。



4.2 Bait 蛋白有自激活

NMY51[Bait2 construct+pPR3-N-Prey2]和 NMY51[Bait2 construct+pPR3-N]，在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-gal 板上显蓝色，且长势同 SD/-Leu/-Trp 平板，所以 Bait2 construct 具有自激活。解决自激活：在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/-X-gal 板中加入梯度浓度的(3-AT)，重做互作验证实验即可。（更多问题解答可参考 http://coolaber.com/Column.asp?Model=Content_Detail&Column_ID=29596&C_ID=273086949）。

4.3 Prey 蛋白有毒性

在 SD/-Leu/-Trp 平板上 NMY51[Bait3 construct+pPR3-N-Prey3]长势明显弱于 NMY51[Bait3 construct+pPR3-N]，但是在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/-X-gal 板上 NMY51[Bait3 construct+pPR3-N-Prey3]能够显蓝色（虽然长势弱），NMY51[Bait3 construct+pPR3-N]不能生长或生长较弱，同样能够证明 Bait3 construct 与 pPR3-N-Prey3 有互作，Bait3 construct 与 pPR3-N 无互作（即 Bait3 construct 无自激活）。

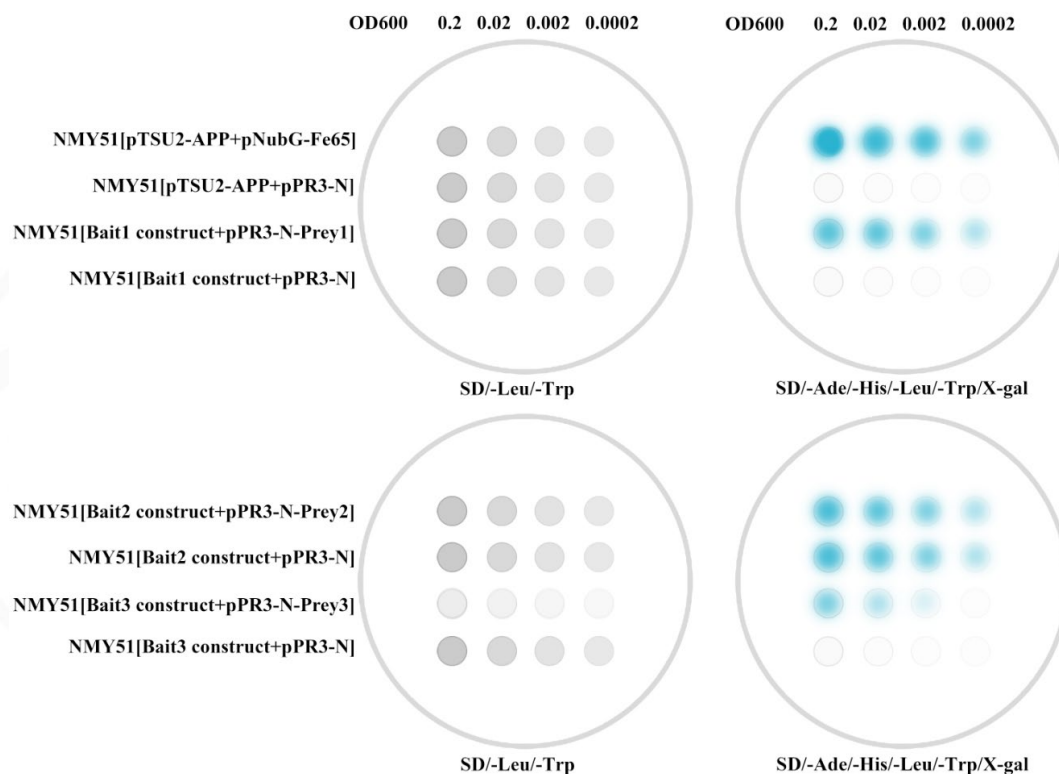


图 2. 互作验证结果示意图



五、注意事项

载体注意事项:

1. 建议收到质粒后请先转化感受态（克隆菌株），再挑选单菌落重新提取后使用。
2. 转化前请准确查找该质粒对应的抗生素、抗生素浓度、感受态（克隆菌株）和培养温度。
3. 如有必要请测序后使用，我司网站检索对应货号可下载质粒图谱。

培养基注意事项:

1. 一般情况下 pH 值不必调节，建议测定一下 $\text{pH}5.8 \pm 0.2$ 即可。
2. SD 培养基可能溶解不彻底或灭菌后有少量沉淀，不影响实验进行。
3. SD 培养基灭菌后，颜色为白色至浅黄色。

感受态注意事项:

1. 一支感受态不建议分成两份使用。
2. 如果转化效率低，只有几个单克隆，建议做 PCR 鉴定。
3. 筛选出来的单克隆，一般是圆形凸起、边缘整齐、表面光滑湿润、不透明、乳白色-浅黄-浅粉色的菌落，有酵母气味。

本试剂盒注意事项:

1. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
3. 请注意无菌操作，避免微生物污染。
4. 此方案仅供参考，如有疑问请致电咨询 400-878-6800。

20240607 版