



膜酵母双杂交点对点 试剂盒

Catalog#JKR23013-10T

Sufficient reagents for 10T Hybridization verification assays per kit.

目录

一、产品简介	02
二、产品组成	02
三、实验流程图	03
四、实验步骤	03
1. 载体构建	03
2. 质粒提取	04
3. 诱饵蛋白毒性检测和功能验证	05
4. 诱饵蛋白自激活及毒性检测	06
5. 共转化验证	07
6. 稀释点种	08
7. 结果分析	08
五、附录	09



一、产品简介

膜体系酵母双杂是基于分离的泛素(split-ubiquitin)介导的膜蛋白酵母双杂交系统,该系统可用于膜蛋白-膜蛋白或膜蛋白-胞质蛋白之间的互作检测。

泛素是一种含76个氨基酸的保守蛋白,它经常作为降解信号连接在蛋白质的N端。泛素能被其特异性的蛋白酶(ubiquitin-specific proteases, UBP)识别并从所连接的蛋白上切割下来,切割位点总是位于泛素蛋白的C端。在酵母细胞中,泛素可以分成两部分单独表达,即其N端部分(Nubl, 第1~34位氨基酸)和C端部分(Cub, 第35~76位氨基酸),后者融合有能启动核内报告基因表达的LexA-VP16蛋白。野生型Nubl和Cub具有高亲和力,并且可以自发重组形成同源二聚体。但是当野生型Nubl的第13位Ile被Ala或Gly取代后,Nubl和Cub就不能自发结合,因此,NubG(I13G)和Cub-LexA-VP16只有依靠bait和prey相互作用进行连接形成完整的泛素分子,然后诱导UBPs识别并于其C端进行剪切,从而释放出转录因子LexA-VP16,最终启动核内报告基因(HIS3、ADE2、LacZ)的转录。

二、产品组分

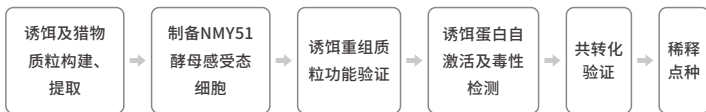
组成	产品	产品名称	规格	保存温度	备注
成分1	培养基	SD/-Leu/-Trp with Agar (DDO)	0.3 L×3	室温	/
		SD/-His/-Leu/-Trp with Agar (TDO)	0.3 L×5	室温	/
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar (QDO)	0.3 L×3	室温	/
成分2	转化与筛选剂	carrier DNA	300 μL	4°C	/
		TE/LiAc	20 mL	室温	/
		PEG/LiAc	20 mL	室温	/
		DMSO	1 mL	室温	/
		0.9% NaCl	50 mL	室温	/
		3-AT (3-氨基-1,2,4-三唑)	1 M×10 mL	4°C	/
成分3	质粒	pBT3-SUC	20 μL	-20°C	诱饵空载
		pBT3-STE	20 μL	-20°C	诱饵空载

组成	产品	产品名称	规格	保存温度	备注
成分3	质粒	pBT3-N	20 μ L	-20 $^{\circ}$ C	诱饵空载
		pPR3-N	20 μ L	-20 $^{\circ}$ C	猎物空载
		pTSU2-APP	20 μ L	-20 $^{\circ}$ C	诱饵阳性质粒
		pNubG-Fe65	20 μ L	-20 $^{\circ}$ C	猎物阳性质粒
		pOST1-NubI	20 μ L	-20 $^{\circ}$ C	功能验证质粒

自备材料与仪器

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 培养皿;
2. 恒温培养箱, 离心机, 水浴锅, 恒温振荡摇床, 超净台, 高温高压灭菌锅;
3. 收到质粒后请先转化大肠杆菌感受态, 再挑选单菌落摇菌, 重新提取质粒后使用, 质粒浓度需达到 200ng/ μ L。
4. 各种培养基配置方法见包装上的使用说明。

三、实验流程概要



四、实验步骤

1. 载体构建

1.1 诱饵质粒构建

膜蛋白酵母双杂交系统的一个最基本的要求就是Bait蛋白的表达必须在膜上准确定位, 而且Cub-LexA-VP16和Prey(NubG)必须位于胞浆中, 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, 载体选择参考下表:

表一 膜体系酵母双杂交诱饵载体选择

诱饵N端	诱饵C端	诱饵载体
胞外且含有信号肽	胞内	pBT3-SUC
胞内	胞外	pBT3-N
胞内	胞内	
胞外且不含有信号肽	胞内	pBT3-STE
胞内	胞内	

注：若N端和C端都位于胞外，可截短使得C端位于胞内段，再选择相应的载体。

1.2 猎物物质粒构建

确定猎物蛋白的序列，并构建到pPR3-N载体上，测序确认构建无误后再进行后续的实验。

1.3 预测蛋白质定位的相关网址如下：

CDS序列翻译为氨基酸序列：<https://web.expasy.org/translate/>

蛋白跨膜结构域预测：<https://www.detaibio.com/tools/transmembrane.html>

蛋白信号肽预测：<https://urgi.versailles.inra.fr/predotar/>

蛋白结构域预测：<http://smart.embl.de/>

2. 质粒提取

- 1) 将构建好的诱饵质粒pBT3- bait转化至TOP10菌株中，涂布于LB平板（卡那抗性）上，37 °C培养过夜；
- 2) 将构建好的猎物质粒 pPR3- prey转化至TOP10菌株中，涂布于LB平板（氨苄抗性）上，37 °C培养过夜；
- 3) 挑选含重组质粒的单菌落至3 mL LB液体培养基中，37 °C培养过夜；
- 4) 取700 μL菌液保种，剩余菌液接种于300 mL LB液体培养基中，37 °C培养过夜；
- 5) 收集菌体并进行质粒大量抽提。

注：抽提质粒浓度需达到200ng/μL。

3. 诱饵蛋白毒性检测和功能验证

3.1 制备NMY51酵母感受态细胞:

- 1) 将酵母NMY51划线于YPDA固体培养基, 30 °C倒置培养3 d;
- 2) 挑单菌落于10 mL YPDA液体培养基中, 30 °C, 220 rpm培养16 h;
- 3) 取1 mL菌液于100 mL YPDA中, 30 °C, 220 rpm培养8~12h至OD600值为0.4~0.6;
- 4) 700×g离心5 min, 弃上清;
- 5) 以30 mL预冷去离子水重悬菌体;
- 6) 700×g离心5 min, 弃上清, 以1.5 mL预冷的 TE/LiAc重悬菌体;
- 7) 高速离心15 s, 弃上清, 以600 μL预冷的 TE/LiAc重悬菌体, 分装后置于冰上备用。

3.2 诱饵重组质粒功能验证:

- 1) 将carrier DNA置于沸水中煮 5min, 立即置于冰上2min, 如此重复一次;
- 2) 按照以下组份, 分别配制转化体系:

诱饵重组质粒功能验证
4 μg pBT3-Bait诱饵质粒
4 μg pOst1-Nubi质粒
100μL NMY51酵母感受态细胞
10 μL carrier DNA

缓慢轻柔加入500 μL PEG/LiAc, 混匀颠倒;

- 3) 30°C水浴30min, 每10min轻柔混匀一次;
- 4) 加入20 μL DMSO, 轻柔混匀;
- 5) 42°C水浴15min, 每5min轻柔混匀一次;
- 6) 800g离心1min, 弃上清, 加入800 μL YPDA重悬, 封口膜封上;
- 7) 30°C, 150rpm, 振荡培养1.5h;
- 8) 800g离心5min, 弃上清, 加入1 mL 0.9% NaCl重悬, 分别涂150ul于DDO、TDO、QDO平板;

9) 30°C倒置培养3-5 d, 观察菌落数量及状态。DDO上有菌落生长, 说明重组诱饵质粒成功转入宿主菌且对宿主无毒性。在DDO上菌落生长正常的情况下, 观察TDO和QDO上菌落生长状况, 平板TDO和QDO均有菌落生长, 说明诱饵质粒能够适应 ubiquitin系统, 功能验证结果为阳性, 可以进行下一步实验。如果平板TDO和QDO上无菌落生长, 则诱饵载体构建有问题, 请重新检查蛋白定位情况, 选择合适的载体进行诱饵载体构建。

注:Nub I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-Bait和pOST1-Nubi 质粒共转化NMY51, 功能验证结果为阳性, 可以排除由于诱饵蛋白造成的空间位阻而产生假阴性, 同时能说明Bait(Cub-LexA-VP16)跨膜蛋白正常表达, 因此能够确认诱饵重组质粒可以应用于下游的点点对点验证。

注:良好的菌落生长状态一般是圆形凸起、边缘整齐且光滑湿润、不透明, 为乳白色偏浅黄的菌落, 其次有酵母气味。

4.诱饵蛋白自激活及毒性检测

- 1) 按上述步骤制备NMY51感受态细胞;
- 2) 将carrier DNA置于沸水中煮5min, 立即置于冰上2min, 如此重复一次;
- 3) 按照以下组份, 分别配制转化体系:

自激活及毒性检测
4 μg pBT3- bait诱饵质粒
4 μg pPR3-N质粒
100μL NMY51酵母感受态细胞
10 μL carrier DNA

- 4) 缓慢轻柔加入500 μL PEG/LiAc, 混匀颠倒;
- 5) 30°C水浴30min, 每10min轻柔混匀一次;
- 6) 加入20 μL DMSO, 轻柔混匀;
- 7) 42°C水浴15min, 每5min轻柔混匀一次;
- 8) 800g离心1min, 弃上清, 加入800 μL YPDA重悬, 封口膜封上;

- 9) 30°C, 150rpm, 振荡培养1.5h;
- 10) 800g离心5min, 弃上清, 加入1 mL 0.9% NaCl重悬, 分别涂150ul于DDO、TDO、TDO/ 3-AT 5 mM、TDO/ 3-AT 10 mM、TDO/ 3-AT 15 mM、QDO平板;
- 11) 30°C倒置培养3-5 d, 观察菌落数量及状态, DDO上有菌落生长, 说明重组诱饵质粒成功转入宿主菌且对宿主无毒性。在DDO上菌落生长正常的情况下, 观察TDO、TDO/ 3-AT 5 mM、TDO/ 3-AT 10 mM、TDO/ 3-AT 15 mM上菌落生长状况, 3-AT浓度越高, 抑制自激活的能力越强, 平板开始不长菌落则说明在该浓度下诱饵质粒不能自激活酵母细胞报告基因, 后续共转验证可用该浓度的3-AT。

5.共转化验证

- 1) 准备NMY51感受态细胞;
- 2) 将carrier DNA置于沸水中煮5min, 立即置于冰上2min, 如此重复一次;
- 3) 按照以下组份, 分别配制转化体系:

实验组	阳性对照	阴性对照
4 µg pBT3-bait 诱饵质粒	4 µg pTSU2-APP 诱饵质粒	4 µg pTSU2-APP 诱饵质粒
4 µg pPR3-prey 猎物质粒	4 µg pNubG-Fe65 猎物质粒	4 µg pPR3-N 猎物质粒
100 µL NMY51 酵母感受态细胞	100 µL NMY51 酵母感受态细胞	100 µL NMY51 酵母感受态细胞
10 µL carrier DNA	10 µL carrier DNA	10 µL carrier DNA

- 4) 缓慢轻柔加入500 µL PEG/LiAc, 混匀颠倒;
- 5) 30°C水浴30 min, 每10 min轻柔混匀一次;
- 6) 加入20 µL DMSO, 轻柔混匀;
- 7) 42°C水浴15min, 每5min轻柔混匀一次;
- 8) 800g离心1min, 去上清, 加入800 µL YPDA重悬, 封口膜封上;
- 9) 30°C, 150rpm, 振荡培养1.5h;
- 10) 800g离心5min, 弃上清, 加入1mL 0.9% NaCl重悬, 分别涂150ul于DDO、TDO/ 3-AT X mM(3-AT的浓度通过自激活验证获得) 以及QDO平板;
- 11) 30°C倒置培养3-5 d, 观察菌落数量及状态。

6. 稀释点种

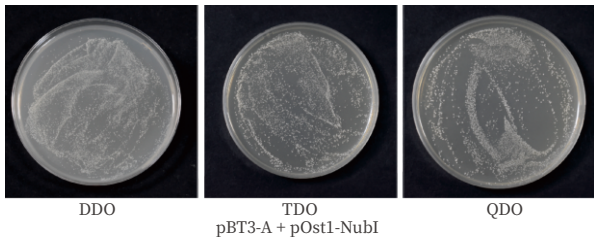
- 1) 依次从自激活、共转化实验组和共转化阴阳性对照组涂布的平板DDO上挑单菌落，分别接种于5mL DDO液体培养基，30℃ 250 rpm培养16 h；
- 2) 功能验证组、自激活组、实验组和阴阳对照组共5组，分别各取4个0.2ml PCR管，分别加入90μL 0.9% NaCl，依次编号为A、B、C、D；
- 3) 从1) 摇好的菌液中取10 μL菌液加入管A中混匀，从混匀的A中取10 μL菌液加入管B中混匀，从混匀的B中取10 μL菌液加入管C中混匀，从混匀的C中取10 μL菌液加入管D中混匀；
- 4) 从上述A、B、C、D管中各取10 μL菌液点种到平板DDO、TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上，30℃培养箱培养3-5d，观察菌斑生长情况。

7. 结果分析

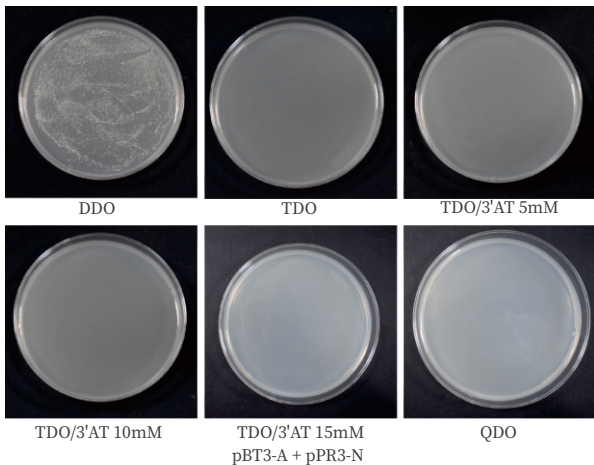
- 1) 阳性对照组NMY51[pTSU2-APP+pNubG-Fe65]在DDO、TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上均有菌落生长，阴性对照组NMY51[pTSU2-APP+pPR3-N]在DDO有菌落生长，在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上无菌落生长，则说明整套实验操作系统没有问题；
- 2) 自激活组NMY51[pBT3-A + pPR3-N]在DDO有菌落生长，在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上无菌落生长，则说明重组诱饵质粒成功转入宿主菌且对宿主无毒性；且在特定的3-AT浓度下，诱饵质粒不能激活酵母细胞报告基因的表达，可以进行下一步共转实验；若自激活组在TDO/ 3-AT 15 mM平板上仍然有菌落生长，则使用更高浓度的3-AT，一般情况下抑制自激活3-AT浓度不宜超过80mM。
- 3) 实验组NMY51[pBT3-A + pPR3-B]在DDO有菌落生长，说明诱饵A和猎物B共转化成功，在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上有菌落生长，说明诱饵A和猎物B有互作，在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)上有菌落生长、QDO上无菌落生长，说明诱饵A和猎物B有弱互作；在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上均无菌落生长，说明诱饵A和猎物B无互作。若实验组NMY51[pBT3-A + pPR3-B]在DDO无菌落生长，则说明转化失败，需要重新进行转化。

五、附录

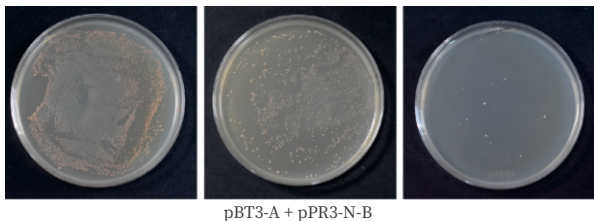
附录1: 诱饵A蛋白毒性检测和功能验证



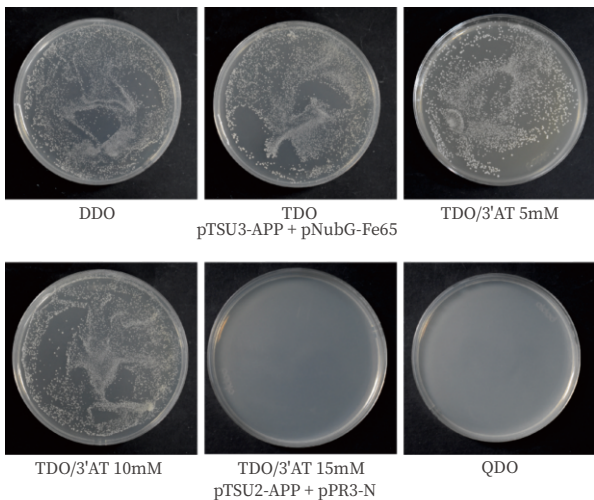
附录2: 诱饵A蛋白自激活检测



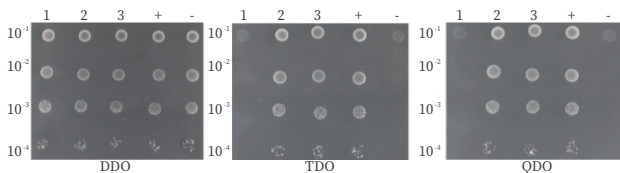
附录3: 诱饵A蛋白与猎物蛋白共转化验证



附录4: 阴、阳对照组共转化验证



附录5: 稀释点种验证



1: pBT3-A和pPR3-N(自激活)

2: pBT3-A和pOst1-NubI(功能验证)

3: pBT3-A和pPR3-N-B(实验组)

+: pTSU2-APP和pNubG-Fe65(阳性对照组)

-: pTSU2-APP和pPR3-N(阴性对照组)



武汉金开瑞生物工程有限公司

WUHAN GENE CREATE BIOLOGICAL ENGINEERING CO., LTD.

地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道666号生物城创新园B4栋二楼

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

