



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号: 2026-03-18

NMY51 膜系统酵母双杂互作验证试剂盒

Membrane Yeast Two-Hybrid Interaction Kit (NMY51)

目录号: ZC1909

产品组成	产品货号	产品组分	规格	保存温度
培养基	ZC1705	SD/-Leu/-Trp Broth	0.5 L×1	-20°C
	ZC1808	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3	-20°C
	ZC1801	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×1	-20°C
	ZC1793	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3	-20°C
筛选剂	ZCS122	β-半乳糖苷酶显色试剂盒	50 mL	-20°C
	ZCS102	3-AT (2.5M, 过滤除菌)	25 mL	-20°C
质粒	--	请备注一个质粒	1 μg	-20°C
	ZK987	pPR3-N 质粒	1 μg	-20°C
	ZK1883	pOST1-Nubl 质粒	1 μg	-20°C
对照菌株	ZCS316	NMY51 阴性菌 (甘油菌)	0.3 mL	-80°C
	ZCS315	NMY51 阳性菌 (甘油菌)	0.3 mL	-80°C
感受态细胞	ZC1606	NMY51 感受态细胞	20×100 μL/支	-80°C

运输及储存条件:

培养基系列保质期2年, 显色试剂盒、甘油菌保质期1年, 感受态保质期3个月; 感受态干冰运输, 其余产品冰袋运输; 各类产品按照标签所示温度进行储存。

注:

1. 本试剂盒提供的产品以产品组成为准, 一般可用于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 ZC1606 配带有 Carrier DNA 和 PEG/LiAc。
5. 相关载体序列, 可在我司网站下载。
6. NMY51 阴性菌和阳性菌可供点板验证使用。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co., Ltd.

产品说明

膜系统酵母双杂交原理：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 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，由于蛋白互作使NubG 和 Cub 在空间上接近，从而形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、Ade2 与 LacZ 表达，可用相应的缺陷培养基和 β-半乳糖苷酶显色试剂盒筛选有相互作用的蛋白。UBPs 作为泛素化蛋白降解系统的重要组分，仅存在于细胞质中。DUAL membrane 系统依赖于 bait (Cub-LexA-VP16) 和 prey (NubG) 在细胞质被 UBPs 识别。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：Nubl 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，Nubl 可以不依赖蛋白的互作能够直接与 Cub 结合，从而激活下游的报告基因。将 pBT3-Bait 和 pOST1-Nubl 质粒共转化NMY51，涂布 DDO、TDO 和 QDO 平板。在 DDO 平板有菌落生长，说明两个质粒共转成功；在 TDO 和QDO 平板有菌落生长，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。如果功能验证结果不通过，则需要重新更换 bait 载体。

自激活检测：NMY51[pBT3-N-Bait+pPR3-N]在 DDO 上生长，说明两个质粒均成功转入酵母菌株中，在 TDO 有轻微生长，在 QDO 培养基上不生长，说明 pBT3-N-Bait 在 NMY51 酵母菌株中有轻微自激活活性，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 (ZK9855)
胞内	胞外	pBT3-N (ZK1695)
胞内	胞内	
胞外不含信号肽胞内	胞内	pBT3-STE (ZK1713)
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。

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。

1. 灭菌的枪头（1000 μL 、200 μL 、10 μL ）、涂布棒或玻璃珠， $\Phi 90\text{ mm}$ 、 $\Phi 150\text{ mm}$ 培养皿。

2. Carrier DNA 在 95-100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，快速冰浴，可再重复一次，备用。

3. 自备 0.9% 生理盐水，可用 ddH₂O 无菌水代替，备用。

4. 普通平板制备

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

5. 特殊平板制备

SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar（3-AT）：将一条 SD/-Ade/-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 $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min），冷却至 50 $^{\circ}\text{C}$ 左右，参照表 2 加入 3-AT，倒平板 25 mL/块（ $\Phi 90\text{ mm}$ ），凝固后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 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	25	25
3-AT (2.5 M) 加入量(μL)	100	200	300	400	500	600	700	800
3-AT 终浓度 (mM)	10	20	30	40	50	60	70	80

二、菌株使用与保存

2.1 菌株活化

取甘油菌液 10-50 μL 至 SD/-Leu/-Trp 培养基（平板）上进行划线。置于培养箱 28-30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5d。培养出来的单菌落可直接用于互作验证实验。

2.2 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 80% 甘油，-80 $^{\circ}\text{C}$ 可长期保存。

三、实验方法

3.1 转化酵母 NMY51 感受态细胞

1. 将 Carrier DNA 在 95-100 °C 水浴 5 min 或金属浴 100 °C 处理 10 min，立即放在冰上 5 min，再次重复一次。
2. 取 100 μL 冰上融化的 NMY51 感受态细胞，依次加入预冷的 BD plasmid (1 μg, 约 5 μL)，AD plasmid (1 μg, 约 5 μL)，Carrier DNA 10 μL，PEG/LiAc 500 μL 并吸打几次混匀。
3. 于 30 °C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)；42 °C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 10,000 rpm 离心 30 s，弃上清，400 μL ddH₂O 重悬，5000 rpm 离心 30 s，弃上清。
5. 200 μL ddH₂O 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。感受态细胞中，阳性和阴性对照菌株于 SD/-Leu/-Trp 平板划线活化。

表 3 酵母转化反应

BD plasmid	AD plasmid	备注
Bait construct	pOST1-Nubl	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。

6. (可选步骤) PCR 鉴定阳性克隆。详细步骤可参考酵母阳性克隆快速鉴定试剂盒 (直扩) (ZC221A)，引物需要根据实际情况设计。

3.2 重组诱饵载体的功能验证

1. 步骤 2.2 中活化好的 NMY51 阴性菌与阳性菌可以直接进行稀释点板实验。
2. 功能验证菌株为 NMY51[Bait construct+pOST1-Nubl]。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 涂布 SD/-Leu/-Trp，SD/-His/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 这三种固体选择培养基上。

- 功能验证菌株于平板 DDO、TDO 和 QDO 均有菌落生长，说明共转化成功且 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：本方案不再单独比较 NMY51[Bait construct] 和 NMY51[Empty BD] 生长状况以确定诱饵蛋白是否具有毒性。如果重组诱饵蛋白具有毒性，在 SD/-Leu/-Trp 平板上，NMY51[Bait construct+pOST1-Nub1] 比 NMY51 阴性菌株与阳性菌株的克隆要小的多。酵母杂交实验，不适用于毒性很强的蛋白。

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）

- 自激活组菌株为 NMY51[Bait construct+pPR3-N]，阴性菌株为对照组，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 μ L 涂板 SD/-Leu/-Trp，SD/-Leu/-Trp/-His，SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/3-AT 这三种固体选择培养基上。
- 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。
- 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：

- ①在不同浓度 3-AT 平板上（0，10 mM，20 mM，30 mM，40 mM，50 mM，60 mM，70 mM，80 mM），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 80 mM。
- ②筛库实验，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] 可以体现是否有自激活。

3.4 互作验证

- 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）。
- 用 ddH₂O 依次稀释 10 倍，100 倍，1000 倍（即 OD600=0.2、0.02、0.002、0.0002）。
- 将实验组和对照组分别点 10 μ L 菌悬液于 SD/-Leu/-Trp、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板（如果已知自激活浓度，需加入 3-AT）。
- 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。

四、互作验证分析

4.1 互作/无互作

为了检测 LacZ 报告基因是否被激活，需要用 β -半乳糖苷酶显色试剂盒(ZCS122)进行显色，具体显色方法参照说明书进行。

若 NMY51 阳性对照和 NMY51 阴性对照菌株在 SD/-Leu/-Trp 板上长势相同；阳性对照在SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上有生长，且影印的滤纸上显蓝色；而阴性对照在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 板上不生长且不显色，可以证明本实验体系是正确的。同理，也能够证明 Bait 和 Prey 有互作，Bait construct和 pPR3-N 无互作（即 Bait construct 无自激活）

注：若对照组在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板上不生长，而实验组生长但是不显蓝色，也能说明两蛋白有互作，只是互作较弱而已。

4.2 Bait 蛋白有自激活

在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade 平板上 NMY51[Bait construct+pPR3-N-Prey] 和 NMY51[Bait construct+pPR3-N]生长且在影印的滤纸上显蓝色，说明 Bait construct 具有自激活。解决自激活：在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp板中加入梯度浓度的(3-AT)，重做互作验证实验即可。

4.3 Prey 蛋白有毒性

在 SD/-Leu/-Trp 平板上 NMY51[Bait construct+pPR3-N-Prey] 长势明显弱于 NMY51[Bait construct+pPR3-N]，说明Prey 蛋白有毒性。但是在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp 平板影印的滤纸上，NMY51[Bait construct+pPR3-N-Prey]仍然能够显蓝色（虽然长势弱），NMY51[Bait construct+pPR3-N]不能生长或生长较弱。同样能够证明 Bait construct 与 pPR3-N-Prey 有互作，Bait construct 与 pPR3-N 无互作（即 Bait construct 无自激活）。

五、注意事项

5.1 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。

5.2 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。

5.3 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。

5.4 产品注意事项:

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。



扫描二维码关注公众号