



核酵母双杂交点对点 试剂盒

Catalog#JKR23012-25T

Sufficient reagents for 25T Hybridization verification assays per kit.

目录

一、产品简介	02
二、产品组成	02
三、实验流程概要	03
四、实验步骤	03
1. 诱饵质粒、猎物质粒构建及提取	03
2. 诱饵蛋白毒性和自激活检测	04
3. 共转化验证	05
4. 稀释点种	06
5. 结果分析	06
五、附录	07



一、产品简介

酵母核体系双杂交技术是基于对真核细胞转录因子特别是酵母转录因子GAL4性质的研究，GAL4包括两个结构域，即DNA结合结构域（DNA-binding domain, BD）和转录激活结构域（Activating domain, AD）。BD能够识别位于GAL4效应基因（GAL4-responsive gene）的上游激活序列（Upstream activating sequence, UAS）并与之结合，AD可以启动UAS下游的基因进行转录。BD和AD分别单独作用并不能激活转录，但是当二者在空间上充分接近时，则呈现完整的GAL4转录因子活性并可激活UAS下游启动子，转录启动子下游报告基因his3和ADE2的表达。

Y2HGold菌株是GAL4系统酵母双杂实验用菌株，可直接转化质粒进行蛋白互作验证。Y2HGold-GAL4酵母双杂系统需要两种质粒配套使用：pGBKT7和pGADT7。质粒 pGBKT7的筛选标志为 TRP1，用于表达 BD（来自酵母转录因子GAL4 N端 1~147位氨基酸）与目标蛋白（Bait）的融合蛋白；质粒 pGADT7的筛选标志为LEU，用于表达AD（GAL4 C端768~881位氨基酸）与目标蛋白（Prey）的融合蛋白。本试剂盒提供的产品包含了酵母双杂验证过程中用到的各种培养基以及酵母转化试剂，操作简单，能用于10对双杂的互作验证（质粒需自行扩繁）。

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×8	室温	/
		SD/-His/-Leu/-Trp with Agar (TDO)	0.3 L×13	室温	/
		SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar (QDO)	0.3 L×8	室温	/
成分2	转化与筛选剂	carrier DNA	800 μL	-20℃	/
		TE/LiAc	50 mL	室温	/
		PEG/LiAc	50 mL	室温	/
		DMSO	3 mL	室温	/
		0.9% NaCl	50×3 mL	室温	/
		3-AT (3-氨基-1,2,4-三唑)	1 M×25 mL	4℃	/

组成	产品	产品名称	规格	保存温度	备注
成分3	质粒	pGADT7 质粒	20 μ L	-20°C	猎物空载
		pGBKT7 质粒	20 μ L	-20°C	诱饵空载
		pGBKT7-53质粒	20 μ L	-20°C	诱饵阳性质粒
		pGADT7-T质粒	20 μ L	-20°C	猎物对照质粒
		pGBKT7-Lam质粒	20 μ L	-20°C	诱饵阴性质粒

自备材料与仪器

1. 灭菌的去离子水、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. 诱饵质粒、猎物质粒构建及提取

- 1) 将构建好的诱饵质粒pGBKT7-bait转化至大肠菌株中，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pGADT7-prey转化至大肠菌株中，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 μ L菌液接种，剩余菌液接种于10 mL LB液体培养基中，37 °C培养过夜；
- 5) 收集菌体并进行质粒抽提。

注：诱饵质粒和猎物质粒需自行构建，抽提质粒浓度需达到200ng/ μ L。

2. 诱饵蛋白毒性和自激活检测

2.1 制备Y2H Gold酵母感受态细胞:

- 1) 将酵母Y2H Gold划线于YPDA固体培养基, 30 °C倒置培养3d;
- 2) 挑单菌落于10 mL YPDA液体培养基中, 30 °C, 220 rpm培养16h;
- 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。

2.2 诱饵重组质粒毒性和自激活检测:

- 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:

自激活及毒性检测
4 μg pGBKT7-Bait诱饵质粒
4 μg pGADT7质粒
100μL Y2H Gold酵母感受态细胞
10 μL carrier DNA

- 3) 缓慢轻柔加入500 μL PEG/LiAc, 混匀颠倒;
- 4) 30°C水浴30min, 每10min轻柔混匀一次;
- 5) 加入20 μL DMSO, 轻柔混匀;
- 6) 42°C水浴15min, 每5min轻柔混匀一次;
- 7) 800g离心1min, 弃上清, 加入800 μL YPDA重悬, 封口膜封上;
- 8) 150rpm, 振荡培养1.5h;
- 9) 800g离心5min, 弃上清, 加入1 mL 0.9% NaCl重悬, 分别涂150μL于DDO、TDO、TDO/ 3-AT 5 mM、TDO/ 3-AT 10 mM、TDO/ 3-AT 15 mM、QDO平板;

10) 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。

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。

3. 共转化验证

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) 制备Y2H Gold酵母感受态细胞, 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 μ g pGBKT7-Bait 诱饵质粒	4 μ g pGBKT7-53 诱饵质粒	4 μ g pGBKT7-lam 诱饵质粒
4 μ g pGADT7-prey 猎物质粒	4 μ g pGADT7-T 猎物质粒	4 μ g pGADT7-T 猎物质粒
100 μ L Y2H Gold 酵母感受态细胞	100 μ L Y2H Gold 酵母感受态细胞	100 μ L Y2H Gold 酵母感受态细胞
10 μ L carrier DNA	10 μ L carrier DNA	10 μ L carrier DNA

3) 缓慢轻柔加入500 μ L PEG/LiAc, 混匀颠倒;

4) 30°C水浴30 min, 每10 min轻柔混匀一次;

5) 加入20 μ L DMSO, 轻柔混匀;

6) 42°C水浴15min, 每5min轻柔混匀一次;

7) 800g离心1min, 弃上清, 加入800 μ L YPDA重悬, 封口膜封上;

8) 30°C, 150rpm, 振荡培养1.5h;

9) 800g离心5min, 弃上清, 加入1mL 0.9% NaCl重悬, 分别涂150 μ L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;

10) 30°C倒置培养3-5 d, 观察菌落数量及状态。

4. 稀释点种

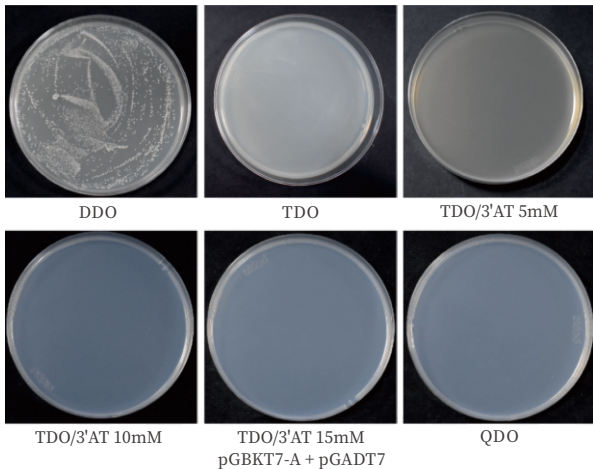
- 1) 依次从自激活、共转化实验组和共转化阴阳性对照组涂布的平板DDO上挑选2~5个圆润饱满的单菌落，分别接种于100 μ L 0.9% NaCl (2~5个单菌落放于同一管)；
- 2) 自激活、实验组和阴阳性对照组共4组，分别各取4个0.2mL PCR管，分别加入90 μ L 0.9% NaCl，依次编号为A、B、C、D；
- 3) 从步骤1摇好的菌液中取10 μ L菌液加入管A中混匀，从混匀的A中取10 μ L菌液加入管B中混匀，从混匀的B中取10 μ L菌液加入管C中混匀，从混匀的C中取10 μ L菌液加入管D中混匀；
- 4) 从上述A、B、C、D管中各取10 μ L菌液点种到平板DDO、TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上，30 $^{\circ}$ C培养箱培养3-5天，观察菌落生长情况。

5. 结果分析

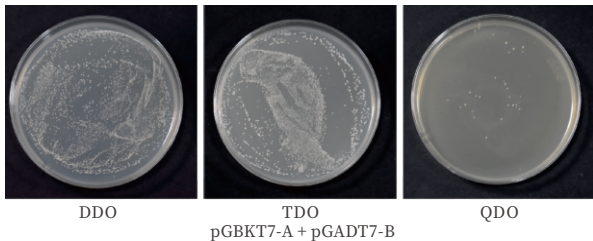
- 1) 阳性对照组Y2H[pGBKT7-53 + pGADT7-T]在DDO、TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上均有菌落生长，阴性对照组Y2H[pGBKT7-lam + pGADT7-T]在DDO有菌落生长，在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上无菌落生长，则说明整套实验操作系统没有问题；
- 2) 自激活组Y2H[pGBKT7-A + pGADT7]在DDO有菌落生长，在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得)、QDO上无菌落生长，则说明重组诱饵质粒成功转入宿主菌且对宿主无毒性；且在特定的3-AT浓度下，诱饵质粒不能激活酵母细胞报告基因的表达式，可以进行下一步共转实验；若自激活组在TDO/ 3-AT 15 mM平板上有菌落生长，则说明诱饵蛋白有很强的自激活，需要将诱饵蛋白截短后再进一步进行自激活验证，确保无自激活才可进行互作验证；
- 3) 实验组Y2H[pGBKT7-A + pGADT7-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Y2H[pGBKT7-A + pGADT7-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

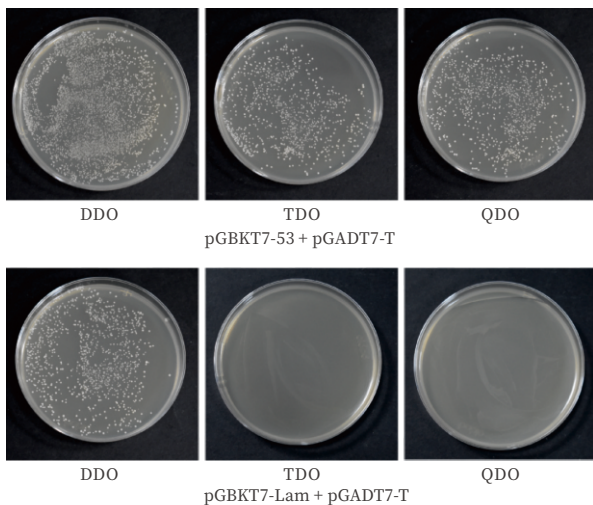
附录1: 诱饵A蛋白毒性检测和自激活检测



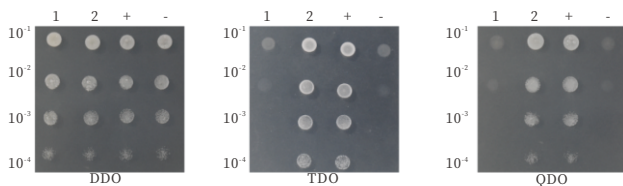
附录2: 诱饵A蛋白与猎物B蛋白共转验证



附录3: 阴、阳对照组共转化验证



附录4: 稀释点种验证



1: Y2H[pGBKT7-A + pGADT7] (自激活)
2: Y2H[pGBKT7-A + pGADT7-B] (实验组)

+: Y2H[pGBKT7-53 + pGADT7-T] (阳性对照组)
-: Y2H[pGBKT7-lam + pGADT7-T] (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：湖北省武汉市江夏区神墩五路北武汉生之源股份生物科创产业园

电话：027-87960366

邮箱：marketing@genecreate.com

网址：www.genecreate.cn

