

Y187-pHis2 Yeast One-Hybrid Media Kit 使用说明书

产品编号: YM1010 (序号 1-7), YM1011 (序号 1-8)

储存温度: 序号 1-7 常温保存; 序号 8 需-20°C储存, 蓝冰运输

产品组成: (0.5 L/pouch)

序号	组分编号	产品组成	1 Set
1	PM2011	YPDA Broth	1 pouch
2	PM2021	YPDA with Agar	1 pouch
3	PM2251	SD/-Trp Broth	1 pouch
4	PM2252	SD/-Trp with Agar	1 pouch
5	PM2222	SD/-Leu/-Trp with Agar	1 pouch
6	PM2282	SD/-His/-Trp with Agar	2 pouches
7	PM2152	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar	6 pouches
8	SL0930	2.5 M 3-AT 溶液(过滤除菌)	100 mL
说明书		1 份	

产品说明:

Y187-pHis2 Yeast One-Hybrid Media Kit (酵母单杂培养基套装 YM1010), 含有用于 Y187-pHis2 系统酵母单杂交文库筛选的全套培养基, 性价比更高。培养基以非常方便使用的铝箔袋形式包装, 每个独立包装可以配制 0.5 L 的培养基。使用时仅需要将袋中的所有干粉倒入三角瓶或培养瓶中, 加入 0.5 L 的 ddH₂O, 然后 121 °C 灭菌 15 分钟即可。无需称量和调整 pH 值。

Y187-pHis2 Yeast One-Hybrid Media plus Kit (YM1011) 在试剂盒 YM1010 基础上增加了 100 ml 3-AT 溶液 (2.5M, 过滤除菌)。

实验材料:

酵母菌株: Y187 (缺陷基因型 *his3-200*、*trp1-901*、*leu2-3*)

诱饵载体: pHis2-DNA (筛选标记 Trp 报告基因 His)

文库载体: pGADT7-cDNA (筛选标记 Leu)

实验步骤:

一、转化诱饵载体 (参考 SK2400 中质粒转化步骤)

1. YPDA 平板培养划线, 活化 Y187 酵母菌种; 挑酵母菌落于液体 YPDA 培养基摇菌培养;
2. 制备感受态并将 pHis2-DNA 转化进入感受态细胞;
3. SD/-Trp 平板检测转化结果。

二、自激活检测

1. 制备不同 3-AT 浓度梯度的 SD/-His/-Trp 平板 (ϕ 150mm), 3-AT 的浓度一般设定在 50-100 mM 之间, 并设置不含 3-AT 的对照;
2. 将上述转化产物稀释到单克隆水平 (OD 值 < 0.002), 涂板。
3. 筛选出适宜的 3-AT 浓度。(如某浓度 3-AT 平板上的菌落弱小且稀疏, 与对照相比差距明显, 且延长培养时间也不会再生长, 即为理想的 3-AT 浓度)

三、互作筛选 (具体步骤参考 SK2400 中文库转化步骤)

1. 液体 SD/-Trp 培养基培养诱饵菌株 Y187 (pHis2-DNA), 制备 Y187 (pHis2-DNA) 感受态细胞;
2. 将 pGADT7-cDNA 文库转入 Y187 (pHis2-DNA) 感受态细胞;
3. 转化产物 (取 10 μ L 稀释 10 倍, 100 倍, 1000 倍) 涂 SD/-Leu/-Trp 平板各一块, 用于计算转化效率; 剩余转化产物全部涂 SD/-His/-Leu/-Trp + X mM 3-AT (X 为筛选所得浓度) 平板 50 块 (ϕ 150mm), 培养 3-5 天;
4. 挑取 SD/-His/-Leu/-Trp 平板上克隆, PCR (推荐 SK2420) 后测序鉴定;
5. 点对点验证。

培养基配制方法:

1. 一袋培养基干粉倒入三角瓶或培养瓶中, 加 0.5 L 去离子水中溶解 (琼脂冷水不溶)。
2. 无调整 pH 值, 121 °C 高压灭菌 15 min。
3. 液体培养基封好口避光、室温储存备用。
4. 固体培养基冷却到 50 °C 左右倒入平板, 室温凝胶, 封口倒置 4 °C 保存。

3-AT 的使用方法:

1. 计算所需平板的数量，配制培养基；
2. 设置3-AT 的浓度梯度；
3. 灭菌筛选培养基，待培养基冷却到55 °C左右，按设置浓度加入3-AT 母液，摇匀后倒板；
4. 标记每个平板的3-AT 浓度，超净台冷却凝胶后，将转化产物涂板，28-30 °C培养3-5天。