



版本号：DE241111

## 3-AT

产品编号：CA1311

产品规格：5 g/ 25 g/ 100 g

运输及储存条件：蓝冰运输；-20°C储存，保质期3年。

### 产品参数：

中文名称：3-氨基-1,2,4-三唑

中文别名：3-氨基-1,2,4-三氮唑；3-AT；杀草强；氨基三唑；阿米坐

英文别名：3-Amino-1,2,4-triazole；Amitrol

CAS：61-82-5

分子式： $C_2H_4N_4$

分子量：84.08

溶解性：易溶于水，常配制成 2.5 M，即 0.21 g/mL 母液

### 产品说明：

3-AT 是酵母 *HIS3* 蛋白（组氨酸）的竞争性抑制剂，可抑制组氨酸的合成。*HIS3* 是酵母单杂，双杂，三杂实验的报告基因。*HIS3* 报告基因在酵母中会有微弱的泄露表达，即报告基因没有被激活时的本底表达。此外，某些蛋白或 DNA 片段在酵母中有自激活现象，在没有互作发生时也可以激活报告基因，这种自激活现象导致酵母互作实验产生很多假阳性。这时需要在培养基中加入适量的 3-AT 以抑制 *HIS3* 的本底表达或抑制自激活，使得背景降低，或者增加使用报告基因如 *ADE2* 来进行更加严格的筛选，然后再确定是否存在互作。加入的 3-AT 浓度过高，比较弱的相互作用可能被抑制，因此需要筛选 3-AT 的最适浓度。

### 使用方法：

#### 酵母杂交实验

##### 一、母液配制

3-AT (2.5 M)：称取 2.1 g 3-AT 粉末，加少量无菌水溶解，定容至 10 mL，过滤除菌，-20°C 保存。

##### 二、自激活检测

1. 设置 3-AT 浓度梯度。在 0-100 mM 的浓度范围内设置梯度，如 0、10、20、30、40、50、60、70、80、100 mM。

注：需设有 0 浓度的 3-AT，用于检测菌株生长。



2. 灭菌固体培养基，待培养基冷却至 50-55°C，取 20-25 mL 培养基，加入 3-AT 母液，摇匀后倒平板（Φ90 mm），短期可于 4°C 冰箱保存。

**注：**培养基平板过薄会影响 3-AT 抑制效果。不同 3-AT 浓度的培养基体积需保持一致，如均为 20 mL。倒板时注意让平板平整。

3. 若后续为互作验证实验，建议将菌液 OD<sub>600</sub> 调至 0.2，后稀释至 0.02、0.002、0.0002，分别取 10 μL 菌液进行点板。若后续为筛库实验，建议将菌液 OD<sub>600</sub> 调至 0.002，取 100 μL 菌液进行涂板。

4. 30°C 培养 3-5 d，观察酵母在不同 3-AT 浓度平板上生长情况，从而确定 3-AT 最佳使用浓度，用于后期互作实验。

**注：**在不同浓度 3-AT 平板上，OD<sub>600</sub> 为 0.002 时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）。一般情况下互作验证实验 3-AT 浓度不宜超过 100 mM，筛库实验 3-AT 浓度不宜超过 80 mM。

### 三、互作验证/筛库

1. 灭菌固体培养基，待培养基冷却至 50-55°C，根据自激活检测结果加入 3-AT 母液，摇匀后倒平板，短期可于 4°C 冰箱保存。

**注 1：**互作验证实验取 20-25 mL 培养基，倒平板（Φ90mm）。筛库实验取 70-75 mL 培养基，倒平板（Φ150mm）。

**注 2：**筛库实验建议，与自激活浓度相比，筛库平板 3-AT 浓度应高出 5 mM。

2. 若为互作验证实验，建议将菌液 OD<sub>600</sub> 调至 0.2，后稀释至 0.02、0.002、0.0002，取 10 μL 菌液进行点板。若为筛库实验，将菌液重悬后，取 150 μL 菌液进行涂板。

3. 30°C 培养 3-5 d，观察酵母在平板上生长情况。

**注：**详细操作步骤可参照 Y187-pHis2 系统酵母单杂互作验证试剂盒（# YH1011）或 Y187-pHis2 系统酵母单杂筛库试剂盒（# YH1010）或 AH109-GAL4 系统酵母双杂互作验证试剂盒（# YH2021）或 AH109-GAL4 系统酵母双杂筛库试剂盒（# YH2020）。

### 注意事项：

1. 如果 80 mM 浓度的 3-AT 平板上有酵母生长，说明自激活活性太高，不能用于双杂交筛选。
2. 诱饵蛋白能够单独激活报告基因的表达，该蛋白如果是具有转录激活域一个转录因子，需要去掉转录激活结构域。如果不是转录因子但仍具有较强的转录激活活性，需要将诱饵蛋白具有激活活性的区域去除，但这样操作有可能影响蛋白间的互作。
3. 注意无菌操作，避免微生物污染。