



## GAL4 系统酵母双杂筛库试剂盒 (mating 法) 使用说明书

产品编号: YH2000

产品组成: (0.5 L/pouch)

组成	产品	产品货号	产品名称	规格
成份一 常温储存	培养基	PM2011	YPDA Broth	0.5L×2
		PM2021	YPDA with Agar	0.5L×1
		PM2201	SD/-Leu Broth	0.5L×1
		PM2202	SD/-Leu with Agar	0.5L×1
		PM2251	SD/-Trp Broth	0.5L×1
		PM2252	SD/-Trp with Agar	0.5L×1
		PM2221	SD/-Leu/-Trp Broth	0.5L×1
		PM2222	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5L×10
		PM2152	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5L×1
		PM2112	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5L×1
成份二 -20°C储存	筛选剂	SL0940	X-α-gal (20mg/mL)	5×1mL
		CA2332G	金担子素 A (1mg/mL)	1 mL
	鉴定试剂盒	SK2420	酵母阳性克隆快速检测试剂盒	200T
	质粒	VT001	pGADT7 质粒	10μg
		VT006	pGBKT7 质粒	10μg
成份三 -80°C储存	对照菌株	YS3091	Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T]菌株	0.2mL
		YS3092	Y2HGold [pGBKT7-Lam+pGADT7-T]菌株	0.2mL
	感受态细胞	CC309	Y2HGold 感受态细胞	20×100μL/支

### 注:

1. 本试剂盒可用于一次酵母筛库 (质粒除外)。
2. 注意每个成份的保存温度, 感受态细胞务必-80°C保存。
3. 0.5L×3 代表: 3 个包装, 每个包装 0.5L; 5×1mL 代表: 1 个包装, 含 5 个 1mL。
4. 按照本试剂盒的流程操作, 可以在最大程度上节约时间。
5. Y2HGold 或 AH109 均可与文库菌株 Y187 通过 mating 法进行筛库, 我们更推荐 Y2HGold。
6. 对照菌株的最佳 AbA 浓度参考网站菌株说明书。

### 产品说明:

酵母双杂的原理基础: 很多真核生物的位点特异转录激活因子通常具有两个可分割开的结构域, 即 DNA 特异结合域 (DNA-binding domain, BD) 与转录激活域 (Transcriptional activation domain, AD)。这两个结构域各具功能, 互不影响, 但一个完整的激活特定基因表达的激活因子必须同时含有这两个结构域, 否则无法完成激活功能。不同来源激活因子的 BD 区与 AD 结合后则特异地激活被 BD 结合的基因表达。基于这个原理, 可将两个待测蛋白分别与这两个结构域建成融合蛋白, 并共表达于同一个酵母细胞内。如果两个待测蛋白间能发生相互作用, 就会通过待测蛋白的桥梁作用使 AD 与 BD 形成一个完整的转录激活因子并激活相应的报告基因表达。通过对报告基因表型的测定可以很容易地知道待测蛋白系统分子间是否发生了相互作用。

酵母双杂交系统由三个部分组成: (1) 与 BD 融合蛋白表达载体, 被表达的蛋白称诱饵蛋白 (bait)。(2) 与 AD 融合蛋白表达载体, 被其表达的蛋白称靶蛋白/猎物蛋白 (prey)。(3) 带有一个或多个报告基因的宿主菌株。常用的报告基因有 HIS3, URA3, LacZ 和 ADE2 等, 而菌株则具有相应的缺陷型, 双杂交质粒上分别带有不同的抗性基因和营养标记基因, 这些有利于实验后期杂交质粒的鉴定与分离。根据 BD 来源的不同, 目前常用的系统中主要是 GAL4 系统和 LexA 系统, 其中最常用的是 Y2HGold-GAL4 和 AH109-GAL4 系统。

酵母双杂交筛库常用的三种方法:

1. 先将诱饵质粒转化到酵母菌株 (Y2HGold 或 AH109), 做诱饵质粒的自激活, 再将诱饵质粒和文库



质粒共转化到同一种酵母菌株（Y2HGold 或 AH109）。

2. 先将诱饵质粒转化到酵母菌株（Y2HGold 或 AH109），做诱饵质粒的自激活，将诱饵菌株制备成感受态后再将文库质粒转入。

3. 先将诱饵质粒转化到 MAT $\alpha$  型酵母（Y2HGold 或 AH109），做诱饵质粒的自激活。文库质粒转化到 MAT $\alpha$  型酵母（Y187），两种酵母通过 mating 进行筛库试验。

Y2HGold 酵母菌含有 AUR1-C 基因，该基因具有 AbA 抗性，AbA 具有强效杀死酵母的作用。如果蛋白质之间进行了互作，就会激活该基因的转录，下游报告基因 AUR1-C 就会表达，使得酵母菌可在含有 AbA 抗生素的培养基上生长。而没有发生蛋白质互作的酵母菌则不能生长，这就大大减少了筛库时的背景，因此我们更推荐使用 Y2HGold-GAL4 筛库系统。三种筛库方法并没有明显的优劣之分，可以根据实验条件和习惯进行选择，本方案是第三种方法，使用的是 Y2HGold 和 Y187 酵母菌。Mating 法在筛库方面最大的优点是缩短了时间，操作简单，不再需要每次筛库再制备感受态细胞，也不用担心转化效率的问题。

## 目录

一、实验耗材和试剂	2
二、菌株使用及保存	3
三、实验方法	3
3.1 重组诱饵载体的自激活、毒性检测和表达	3
3.2 mating 法筛库	5
3.3 筛选阳性克隆	6
3.4 互作克隆鉴定	7
四、注意事项	8

## 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，也可以在本公司单独购买。

1. 灭菌的枪头（1000  $\mu$ L、200  $\mu$ L、10  $\mu$ L）、涂布棒或玻璃珠， $\Phi$ 90 mm 培养皿，备用。
2. Carrier DNA 在 95-100  $^{\circ}$ C 水浴 5 min，然后快速冰浴，可再重复一次，备用。
3. 稀释金担子素：取 100  $\mu$ L AbA（1mg/mL）于 900  $\mu$ L 无水乙醇中稀释，充分混匀，即 AbA 浓度为 100  $\mu$ g/mL，4  $^{\circ}$ C 冰箱中备用（稀释 10 倍后使用有利于在培养基中混匀，建议按用量稀释）。
4. 普通平板制备：  
将 1 条培养基倒入 0.5 L 去离子水中，无需调节 pH 值，高压灭菌（如，115  $^{\circ}$ C 灭菌 20 min）。液体培养基 4  $^{\circ}$ C 保存备用；固体培养基，按照 20-25 mL/块（ $\Phi$ 90 mm）或者 70-75 mL/块（ $\Phi$ 150 mm）倒平板，凝固后放入 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。
5. 特殊平板制备：  
SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar（X- $\alpha$ -gal）：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  $^{\circ}$ C 灭菌 20 min），冷却至 50  $^{\circ}$ C 左右，每 25 mL 固体培养基加入 25-50  $\mu$ L X- $\alpha$ -gal 母液，倒平板 25 mL/块（ $\Phi$ 90 mm），凝固后于 4  $^{\circ}$ C 冰箱保存。



SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar (AbA+X- $\alpha$ -gal): 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 °C 灭菌 20 min), 冷却至 50 °C 左右, 每 20 mL 固体培养基加入 20-40  $\mu$ L X- $\alpha$ -gal 母液, 稀释后的金担子素 (AbA) 参考表 1 加入, 倒平板 20 mL/块 ( $\Phi$ 90 mm), 凝固后于 4 °C 冰箱保存。

表 1. 不同 AbA 浓度平板

培养基体积 (mL)	20	20	20	20	20	20	20
AbA(100 $\mu$ g/mL)加入量 ( $\mu$ L)	0	20	40	60	100	140	200
AbA 终浓度 (ng/mL)	0	100	200	300	500	700	1000

## 二、菌株使用及保存

- 挑取一环甘油保存的菌液 (约 10-50  $\mu$ L) 于 SD/-Leu/-Trp 平板上划线, 28-30 °C 培养 3-5 d, 培养出来的单菌落可直接用于互作验证实验。
- 挑取上述单菌落于 SD 液体培养基中, 200 r/min、28-30 °C 振荡培养 2 d, OD600 应大于 1, 取 1 mL 菌液集菌, 弃上清, 加入 0.2 mL 15% 甘油, -80 °C 可长期保存。

## 三、实验方法

酵母双杂筛库实验方案较多, 本公司根据多年经验, 对 mating 法筛库进行了优化。本方案在诱饵载体和 Y187 文库酵母菌株构建已完成的基础上进行撰写, 分为四个步骤: 1 重组诱饵载体的自激活、毒性检测和表达; 2 mating 法筛库; 3 筛选阳性克隆; 4 互作克隆鉴定。

### 3.1 重组诱饵载体的自激活、毒性检测和表达

#### 3.1.1. 诱饵转化酵母 Y2HGold 感受态细胞

1 取 100  $\mu$ L 冰上融化的 Y2HGold 感受态细胞 (货号: CC309), 依次加入预冷的质粒 pGBKT7 (2-5  $\mu$ g, 约 5  $\mu$ L), pGADT7 (2-5  $\mu$ g, 约 5  $\mu$ L), Carrier DNA (95-100 °C, 5 min, 快速冰浴, 重复一次) 10  $\mu$ L, PEG/LiAc 500  $\mu$ L 并吸打几次混匀, 30 °C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。

2 将管放 42 °C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。

3 5000 rpm 离心 40 s, 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 400  $\mu$ L 重悬, 5000 rpm 离心 30 s, 弃上清。

4 ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ L 重悬, 涂布于 SD/-Leu/-Trp 平板, 30 °C 培养 48-96 h。

**注:** 按表 2, 将各质粒转入酵母 Y2HGold 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 2 酵母转化反应

BD plasmid	AD plasmid	培养基	备注
pGBKT7-p53	pGADT7-T	SD/-Leu/-Trp	阳性对照
pGBKT7-Lam	pGADT7-T	SD/-Leu/-Trp	阴性对照
pGBKT7-Bait	pGADT7	SD/-Leu/-Trp	自激活检测



pGBKT7	/	SD/-Trp	自激活检测（备用）
pGBKT7-Bait	/	SD/-Trp	自激活检测（备用）

注：Y2HGold[pGBKT7-Bait+pGADT7]和 Y2HGold[pGBKT7-Bait]都可以用于自激活检测。

### 3.1.2. 重组诱饵载体的自激活检测（筛选诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度）

1. 阳性对照为两个互作的蛋白，表达载体为 pGBKT7-53 和 pGADT7-T，阴性对照为两个没有互作的蛋白，表达载体为 pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T。

注：本试剂盒含有阳性和阴性对照菌株，于 SD/-Leu/-Trp 平板划线活化即可。

2. 阴性 Y2Hgold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T]和阳性 Y2Hgold[pGBKT7-53+pGADT7-T]对照菌株已转化完成，所以自激活实验组菌株选择 Y2HGold[pGBKT7-Bait+pGADT7]，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  $\mu$ L 涂板 SD/-Leu/-Trp，SD/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal 和 SD/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 这三种固体选择培养基上。

3. 将培养皿置于 30  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 3-5 d，直至长出克隆。

4. 观察诱饵酵母在不同 AbA 浓度平板上的生长状况，确定 AbA\*最佳使用浓度。

注：在不同 SD/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 平板上（0，100 ng/mL，200 ng/mL，300 ng/mL，500 ng/mL，700 ng/mL，1000 ng/mL），出现的酵母菌斑最少或完全没有，即为 AbA 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 AbA 浓度不宜超过 800 ng/mL。

### 3.1.3. 重组诱饵载体的毒性检测

1. 实验组为 Y2HGold[pGBKT7-Bait]，对照组为 Y2HGold[pGBKT7]，OD600 调至 0.002，然后取 100  $\mu$ L 分别涂板 SD/-Trp 固体选择培养基。

2. 将培养皿置于 30  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 3-5 d，直至长出克隆。如果诱饵具有毒性，含诱饵载体的菌株比转化空载体的克隆要小的多。

3. 挑取克隆到 SD/-Trp 液体培养基，30  $^{\circ}$ C 振荡培养，于不同时间取培养菌液测 OD600 值，观察酵母菌的生长速度。如果诱饵蛋白的表达对酵母有毒性，那么酵母在液体和固体培养基中都会生长的很慢。30  $^{\circ}$ C，200 rpm 振荡培养 15 h，测 OD600 值，若差异小则诱饵蛋白对 Y2HGold 菌株无毒性，差异大则有毒性。

注：酵母杂交实验，不适于毒性很强的蛋白。

### 3.1.4. 酵母菌表达蛋白的提取（SK2440-50T）

1. 配置裂解储液：8 M 尿素，5%的 SDS，40mM 的 Tris-HCl（pH6.8），0.1 mM 的 EDTA-Na<sub>2</sub>，0.01 mM 的溴酚蓝。用时在 1 mL 的裂解储液加入 10  $\mu$ L 的  $\beta$ -巯基乙醇和 50  $\mu$ L 的 100 $\times$ PMSF。

2. 将 Y2HGold[pGBKT7-Bait]酵母克隆在 SD/-Trp 液体培养基中悬浮，然后在 30  $^{\circ}$ C，250 rpm 条件下振荡培养，直到 OD600 值达到 0.6-1。离心后每 7.5 OD600 单位的菌体加入 100  $\mu$ L 的裂解液。

3. 裂解液中最初含有过量的 PMSF，但随着时间推移也会迅速降解，对蛋白样品进行操作 15 min 之后，补加等量的 100 $\times$ PMSF，此后每过 7 min 加一次，每 100  $\mu$ L 裂解液加入 1  $\mu$ L 的 100 $\times$ PMSF。

4. 每 7.5 OD600 单位的菌体加入 80  $\mu$ L 酸洗玻璃珠，剧烈振荡 1 min。然后 70  $^{\circ}$ C 水浴 10 min。

5. 将样品在 4  $^{\circ}$ C 下，12,000 rpm 离心 5min，转移上清至新的离心管中，置于冰上。

6. 所得沉淀在 100  $^{\circ}$ C 煮沸 3-5 min 后，剧烈振荡 1 min，然后在 4  $^{\circ}$ C 下，12000 rpm 离心 5 min。所得上清与步骤 5 所得上清合并。

7. 将蛋白提取液煮沸 3-5 min，可立即用于 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳和 Western blot 检测，或者 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

### 3.1.5. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

1. 制备 12%的聚丙烯酰胺分离胶两块，每块 15 mL，所需各种试剂为：去离子水 4.9 mL，30%丙烯酰胺溶液 6 mL，1.5M Tris-HCl（pH8.8）3.8 mL，10%SDS 0.15 mL，10%过硫酸铵 0.15mL，TEMED 6 $\mu$ L。配好后



- 混匀，立即向玻璃板之间注入 4/5 的分离胶。上部加入 1 cm 高的去离子水压平胶面，放置 40 min。
- 待分离胶聚合好后，倒去分离胶表面的去离子水，并用滤纸将剩余的水分吸干，然后配置 5% 浓缩胶 5 mL，所需试剂为：去离子水 3.4 mL，30% 丙烯酰胺溶液 0.83 mL，0.5M Tris-HCl (pH6.8) 0.63 mL，10% SDS 0.05 mL，10% 过硫酸铵 0.05 mL，TEMED 5 μL。配好后混匀，并注入分离胶上面。插入点样梳，放置 20 min。
  - 待浓缩胶聚合好后，向电泳槽中加入电泳缓冲液并小心拔去点样梳。
  - 将所提取的蛋白样品和 Marker 分别进行 100 °C 水浴 5 min，取出后立即置于冰浴中冷却。离心后取上清 20-30 μL 加入点样孔。
  - 电泳使用恒流程序，起始电流为每块胶 10 mA，待样品跑出浓缩胶后改为每块胶 20 mA 至电泳结束。
  - 一块胶用考马斯亮蓝方法染色，一块胶进行 western blot。

### 3.1.6. Western blot

- 转膜：将凝胶在转移缓冲液（192 mM 甘氨酸，25 mM Tris，20% 甲醇）中漂洗 30 min。剪 1 张和胶大小一致的硝酸纤维素膜和 8 张滤纸，放在去离子水中 5 min 排净表面空气，然后浸泡于转移缓冲液中 20 min。
- 在转移夹子一侧放一块泡沫垫，泡沫垫上放 4 张滤纸，然后将硝酸纤维素膜置于滤纸上对齐，凝胶置于膜上，在凝胶上方再放置 4 张滤纸，在滤纸上再放一块泡沫，上述操作每一步都需要严格对齐并排出气泡。合上转移夹子并放入转移电泳槽中，凝胶对着电泳槽的负极，加入适量转移缓冲液，恒流 120 mA 转移 3 h。
- 封闭：电转结束后，用去离子水冲洗，并用 TBST(氯化钠 9 g，Tris 12.1 g，Tween-20 500 μL，加去离子水至 1 L)漂洗硝酸纤维素膜，然后转入含有 5% 脱脂奶粉的封闭液中，4 °C 封闭过夜。
- 一抗反应：倒掉封闭液，TBST 冲洗 3 次，每次 10 min。重新配置封闭液，并 1:1000 的比例加入 c-Myc 单克隆抗体，37 °C 下轻轻摇晃孵育 2 h。
- 二抗反应：将膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 10 min。然后加入用 TBST 稀释 2000 倍的 HRP 标记的山羊抗鼠单克隆抗体，37 °C 下轻轻摇晃孵育 1 h。
- 显色反应：将膜用 TBST 漂洗 3 次，每次 10 min。利用 DAB 显色试剂盒（货号 SK2020）进行显色，室温避光反应 3-8 min 直至显色。

注：酵母杂交实验不适用于在酵母中无法表达的蛋白。

## 3.2 mating 法筛库

- 取一个新鲜的 2-3 mm 克隆 Y2Hgold[pGBKT7-Bait] 接种到含 50 mL SD/-Trp 液体培养基的三角瓶中。30 °C，200 rpm 振荡培养直到 OD 值为 0.8，一般需要 16-20 h。
- 3000 rpm 离心 5 min，弃上清，用 4-5 mL SD/-Trp 液体培养基悬浮沉淀，使细胞浓度大于  $1 \times 10^8$  /mL。
- 将 1 mL 的 Y187 文库酵母菌株与 4-5 mL 的 Y2HGold[pGBKT7-Bait] 诱饵菌株转到一个无菌的 2 L 三角瓶中，加入 45 mL 的 2×YPDA 液体培养基(含 50 μg/mL 的卡纳霉素)。
- 30 °C，30-50 rpm 缓慢震荡，培养 20-24 h。



5. 培养 20 h 后，取一滴菌液在 40×显微镜下观察，如果有“米老鼠”或“三叶草”形状的杂合子出现（如图 1），说明酵母交配成功，可以进行下一步，如果没有则继续培养 4 h。

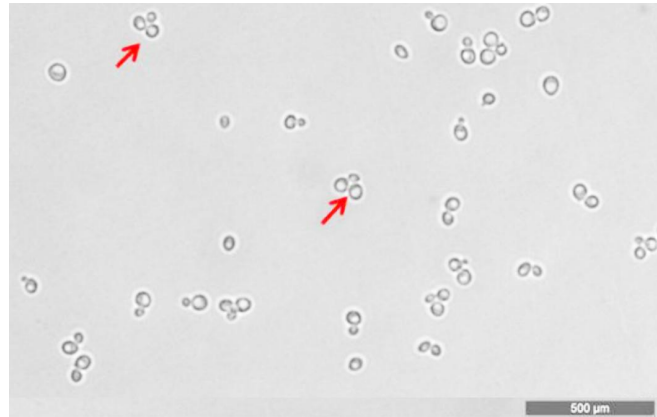


图 1. Y2HGold 和 Y187 酵母杂交

6. 3000 rpm 离心 10 min，同时用 50 mL 的 0.5×YPDA(含 50 μg/mL 卡纳霉素)漂洗 2 L 的三角瓶，并用此悬浮离心细胞。

7. 3000 rpm，离心 10 min，去掉上清，用 10 mL 0.5 ×YPDA/Kan 重悬沉淀，固定悬浮后的体积。例如：10 mL 培养基+1.5 mL 细胞=11.5 mL。

8. 取出 50 μL 进行梯度稀释，浓度分别为 1/10，1/100，1/1000，1/10000，然后每个浓度取 100 μL 分别涂在 SD/-Trp，SD/-Leu 和 SD/-Leu/-Trp 三种不同选择培养基上(Φ90 mm 培养皿)，然后 30 °C 培养 3-5 d。这一步必须做，目的是计算筛库的所有克隆数。

9. 剩余重悬菌体，每 200 μL 涂布于 SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA\*选择培养基上(Φ150 mm 培养皿)，一般需要涂 50-55 个培养皿，然后 30 °C 培养 3-5 d。

10. 克隆长出后，需要查清步骤 9 中各个培养皿内的克隆数，以此来计算筛选文库的克隆数目和筛库效率。  
注：

a. 总共 12 mL，每板可以适当增加重悬菌体量，减少平板数量（30 块），建议 50-55 块平板（Φ150 mm）。与自激活浓度相比，筛库平板 AbA\*浓度应高出 50 ng/mL。

b. SD/-Leu/-Trp 平板上，至少要有  $1.0 \times 10^6$  个克隆，如果克隆数较少，会降低筛选到阳性克隆的概率。SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA 平板上，克隆数非常少往往与诱饵序列和文库质量有关。有研究表明 30 万个克隆也能筛选到阳性克隆。

c. 30 °C 培养 3-5 d，统计 SD/-Leu/-Trp (Φ90 mm) 平板上单克隆数目，计算文库筛选克隆数。

文库筛选克隆数=[cfu/mL on SD/-Leu/-Trp]×[稀释倍数]×[重悬体积(15 mL)]

转化效率=克隆细胞数×悬浮体积 (mL) ×稀释倍数×[涂板体积 (mL) ×总 DNA 的量 (μg)]<sup>-1</sup>

### 3.3 筛选阳性克隆

#### 3.3.1. 活化阳性菌株

（可选步骤）将所得的蓝色克隆在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA\*固体选择培养基上划线培养，以此纯化互作克隆（也可以在 SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA\*板上挑取蓝色克隆重复划线，直至无白色菌落）。30 °C 培养，2-4 d 内长出的菌落可用于后续验证。

注：此步骤选做。与下面的 3.复筛鉴定互作酵母菌株有重复。是否加入 AbA，根据诱饵自激活情况而定。

#### 3.3.2. 菌落 PCR 鉴定互作酵母菌株



选择直径约为 2~3 mm 的克隆，菌落 PCR 扩增，引物为 pGADT7-F/R，PCR 体系和程序参见酵母阳性克隆快速检测试剂盒（货号：SK2420）。

### 3.3.3. 复筛鉴定互作酵母菌株

电泳条带大于 400 bp（根据实验目的和实际情况而定）的单菌落，划线于 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA 培养基上，30 °C 培养 2-4 d。有多条电泳条带的单菌落（含有多个质粒的转化子），需要在 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X- $\alpha$ -Gal/AbA\* 筛选培养基上重复划线培养 2-3 代，然后通过菌落 PCR 的方法选出具有单个质粒的克隆。

## 3.4 互作克隆鉴定

互作克隆鉴定也称点对点互作验证或回转验证。在回转验证实验中，AD 载体有两种形式，文库质粒或互作基因 CDS 片段重新构建 pGADT7 质粒，都可以用于验证实验。优于 Mating 方在回转验证实验中操作繁琐，我们推荐 AD 载体和 BD 载体共转 Y2HGold 的方法，可以参考本公司的 Y2HGold 双杂互作验证试剂盒，这里仅做简要描述。

以互作基因 CDS 片段重新构建 pGADT7 质粒为例，进行点对点互作验证。将上述 PCR 产物送公司测序，使用 BLAST 序列比对工具在线分析阳性克隆的测序结果，通过 NCBI 在线 Blast 分析互作基因 CDS 片段，然后设计引物，以 cDNA 为模板（建库时的 cDNA），PCR 扩增互作基因 CDS 片段（Prey），双酶切重新构建 pGADT7 载体，与 pGBKT7-Bait 共转化 Y2HGold 菌株。

1. 用 SD/-Leu/-Trp 液体培养基摇阳性酵母克隆菌株，离心收集菌体并提取文库质粒。如果阳性克隆超过 60 个，方法参见 PE056 96 孔一步法酵母质粒小提试剂盒（用于 PCR/大肠杆菌转化）；如果阳性克隆少于 60 个，方法参见 PE055 一步法酵母质粒小提试剂盒。
2. 从酵母中提取的文库质粒转入 E.coli 感受态细胞，转化液全部涂布在含 Amp 的 LB 培养基上，37 °C 培养 16 h。每个样品取 3-5 个克隆（重复）进行菌液 PCR 鉴定。
3. 挑取鉴定成功的单菌落摇菌，提取大肠杆菌中的文库质粒，方法参见\*\*公司的质粒小提试剂盒说明书。
4. 使用 BLAST 序列比对工具在线分析阳性克隆的测序结果，通过 NCBI 在线 Blast 分析互作基因 CDS，然后根据其对应的引物，以 cDNA 为模板（建库时的 cDNA），扩增互作基因 CDS 全长，重新构建 pGADT7 载体。
5. 互作转化反应如表 3，pGBKT7-Bait 和 AD-Prey 共转化 Y2HGold 为实验组，对照组 1 可以更好的体现实验组是否互作，对照组 2 可以避免诱饵序列突变（或无诱饵）的情况下，猎物直接激活报告基因而造成的假阳性，这种假阳性并不多见，可以省略。对照组 3 为反向验证。

表 3 酵母转化反应

BD plasmid	AD plasmid	培养基	备注
pGBKT7-p53	pGADT7-T	SD/-Leu/-Trp	阳性对照
pGBKT7-Lam	pGADT7-T	SD/-Leu/-Trp	阴性对照
pGBKT7-Bait	AD-Prey	SD/-Leu/-Trp	实验组
pGBKT7-Bait	AD	SD/-Leu/-Trp	对照组 1
pGBKT7	AD-Prey	SD/-Leu/-Trp	对照组 2
pGBKT7-Prey	AD-Bait	SD/-Leu/-Trp	对照组 3

6. 质粒共转化 Y2HGold 菌株，快速离心转化液，0.9% 的氯化钠溶液分别悬浮转化菌体，涂布 SD/-Leu/-



Trp 培养基上，30 °C 培养 3-5 d。

7. 取转化后的重组子菌落，重悬于 0.9% 的氯化钠溶液中，将 OD600 调至 0.2、0.02、0.002、0.0002。分别取 100 μL 菌悬液涂布于 SD/-Leu/-Trp/X-α-Gal 和 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp/X-α-Gal/AbA 培养基，30 °C 倒置培养 2-4 天，观察菌落生长情况，如表 4 表 5。

**注：**

上述为涂板法验证酵母杂交互作，梯度稀释点板法可参考本公司的 Y2HGold 双杂互作验证试剂盒。

8. 将转化后的重组子酵母进行 PCR、测序、比对分析（或提取质粒、PCR、测序、比对分析），方法同上。

**表 4 阳性**

Sample	Selective Agar Plate	Distinct 2 mm Colonies	Color
BD-Bait + AD-prey	DDO/X	Yes	Blue
	QDO/X/A	Yes	Blue
BD-Bait + AD	DDO/X	Yes	White
	QDO/X/A	Yes	N/A
BD-prey + AD-Bait	DDO/X	Yes	Blue
	QDO/X/A	Yes	Blue
Empty BD + AD-prey	DDO/X	Yes	White
	QDO/X/A	No	N/A

**表 5 假阳性**

Sample	Selective Agar Plate	Distinct 2 mm Colonies	Color
BD-Bait + AD-prey	DDO/X	Yes	Blue
	QDO/X/A	Yes	Blue
BD-prey + AD-Bait	DDO/X	Yes	White
	QDO/X/A	Yes	White
Empty BD + AD-prey	DDO/X	Yes	Blue
	QDO/X/A	Yes	Blue

## 四、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。
4. 此方案仅供参考，如有疑问请致电咨询 400-878-6800。