



# Y2HGold-GAL4 系统酵母双杂互作验证试剂盒 使用说明书

产品编号: YH2011-10T

产品组成:

组成	产品	产品货号	产品名称	规格
成份一 常温储存	培养基	PM2221	SD/-Leu/-Trp Broth	0.5 L×1
		PM2222	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3
		PM2152	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar (备用)	0.5 L×1
		PM2112	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3
成份二 -20°C储存	筛选剂	SL0940	X-α-gal (20mg/mL, 过滤除菌)	5×1 mL
		CA2332G	金担子素 A (AbA, 1mg/mL)	1 mL
	质粒	VT001	pGADT7 质粒	10 μg
		VT006	pGBKT7 质粒	10 μg
成份三 -80°C储存	对照菌株	YS3091	Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T]菌株	0.2 mL
		YS3092	Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T]菌株	0.2 mL
	感受态细胞	CC309	Y2HGold 感受态细胞	20×100 μL/支

注:

1. 本试剂盒可用于 10 对互作蛋白验证 (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. 0.5 L×3 代表: 3 个包装, 每个包装 0.5L; 5×1 mL 代表: 1 个包装, 含 5 个 1 mL。
4. 按照本试剂盒的流程操作, 在最大程度上节约时间, 最快 10 d 可出实验结果。
5. 本方案不适用大批量酵母双杂交实验, 因为诱饵蛋白表达、自激活检测和毒性验证应该预先完成。

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(pre)。 (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。根据目前通用的系统中 BD 来源的不同主要分为 GAL4 系统和 LexA 系统，目前常用的是 Y2HGold-GAL4 和 AH109-GAL4 系统。

Y2HGold 菌株是 GAL4 系统酵母双杂实验用菌株，MATa 型，可直接转化质粒或与 MAT $\alpha$ 型酵母菌株 Y187 通过 mating 操作进行蛋白互作验证或筛库试验。Transformation marker 为: trp1, leu2, 报告基因为: AbAr, HIS3, ADE2, MEL1。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 DNA-BD(来自酵母转录因子 GAL4N 端 1~174 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。

## 目录

一、实验耗材和试剂	3
二、菌株使用及保存	3
三、实验方法	4
3.1 共转化	4
3.2 阳性克隆鉴定(选做)	5
3.3 互作检测	5
四 互作验证分析	6
4.1 互作/无互作	6
4.2 Bait 蛋白有自激活	6
4.3 Prey 蛋白有毒性	6
五、注意事项	7



## 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  $\mu\text{L}$ 、200  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{L}$ ）、涂布棒或玻璃珠， $\Phi 90$  mm 培养皿，备用。
2. Carrier DNA 在 95-100  $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min，后快速冰浴，可再重复一次，备用。
3. 稀释金担子素：取 100  $\mu\text{L}$  AbA(1mg/mL)于 900  $\mu\text{L}$  无水乙醇中稀释，充分混匀，即 AbA 浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，4  $^{\circ}\text{C}$ 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  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min）。液体培养基 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用；固体培养基，按照 20-25 mL/块倒平板（ $\Phi 90$  mm），凝固后放入 4  $^{\circ}\text{C}$ 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  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min），冷却至 50  $^{\circ}\text{C}$ 左右，每 25 mL 固体培养基加入 25-50  $\mu\text{L}$  X- $\alpha$ -gal 母液，倒平板（25 mL/块， $\Phi 90$  mm），凝固后于 4  $^{\circ}\text{C}$ 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  $^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min），冷却至 50  $^{\circ}\text{C}$ 左右，每 20 mL 固体培养基加入 20-40  $\mu\text{L}$  X- $\alpha$ -gal 溶液（20 mg/mL），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  $^{\circ}\text{C}$ 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )加入量 ( $\mu\text{L}$ )	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

1. 挑取一环甘油保存的菌液（约 10-50 $\mu\text{L}$ ）于 SD/-Leu/-Trp 平板上划线，28-30  $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d，培养出来的单菌落可直接用于互作验证实验。
2. 挑取单菌落于 SD/-Leu/-Trp 液体培养基中，200 r/min、28-30  $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 2 d，OD<sub>600</sub> 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

双杂实验方案较多，本公司根据多年经验，给出一个较优的点板互作验证实验方案，我们将蛋白表达，自激活检测，毒性验证放在互作检测之后（本方案不作分析）。我们假设载体构建已完成，互作验证分为三个步骤：共转化，阳性克隆鉴定（选做），互作检测。本方案还对常见互作验证结果进行了分析。

#### 3.1 共转化

1. 取 100  $\mu$ L 冰上融化的 Y2HGold 感受态细胞，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, 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, 28-30 °C培养 48-96 h。

**注：**按表 1，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 1 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-Bait1	pGADT7-Prey1	SD/-Leu/-Trp	实验组 1
pGBKT7-Bait1	pGADT7	SD/-Leu/-Trp	对照组 1*
pGBKT7-Bait2	pGADT7-Prey2	SD/-Leu/-Trp	实验组 2
pGBKT7-Bait2	pGADT7	SD/-Leu/-Trp	对照组 2*

**注：**对照组 1\*和 2\*可以更好的体现实验组是否有互作。





## 四 互作验证分析

### 4.1 互作/无互作

由图 2 可知，对照组 Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T] 和 Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T] 在 SD-Leu/Trp 板上长势相同；Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T] 在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -gal 板上显蓝色，且长势同 SD/-Leu/-Trp 板；而 Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T] 在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -gal 板上不生长且不显色，所以，pGBKT7-53 与 pGADT7-T 有互作，pGBKT7-Lam 与 pGADT7-T 无互作。

同理，pGBKT7-Bait1 与 pGADT7-Prey1 有互作，pGBKT7-Bait1 与 pGADT7 无互作（即 pGBKT7-Bait1 无自激活）。

### 4.2 Bait 蛋白有自激活

Y2HGold[pGBKT7-Bait2+pGADT7-Prey2] 和 Y2HGold[pGBKT7-Bait2+pGADT7] ， 在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -gal 板上显蓝色，且长势同 SD/-Leu/-Trp 平板，所以 pGBKT7-Bait2 具有自激活。

解决自激活：在 SD-Leu/Trp/His/Ade/X- $\alpha$ -gal 板中加入梯度浓度的(AbA)，重做互作验证实验即可。（更多问题解答可参考 [http://coolaber.com/Column.asp?Model=Content\\_Detail&Column\\_ID=29596&C\\_ID=273086949](http://coolaber.com/Column.asp?Model=Content_Detail&Column_ID=29596&C_ID=273086949)）

### 4.3 Prey 蛋白有毒性

在 SD/-Leu/-Trp 平板上 Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7-Prey3] 长势明显弱于 Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7] 但是在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X- $\alpha$ -gal 板上 Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7-Prey3] 能够显蓝色（虽然长势弱），Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7] 不能生长或生长较弱，同样能够证明 pGBKT7-Bait3 与 pGADT7-Prey3 有互作，pGBKT7-Bait3 与 pGADT7 无互作（即 pGBKT7-Bait3 无自激活）。

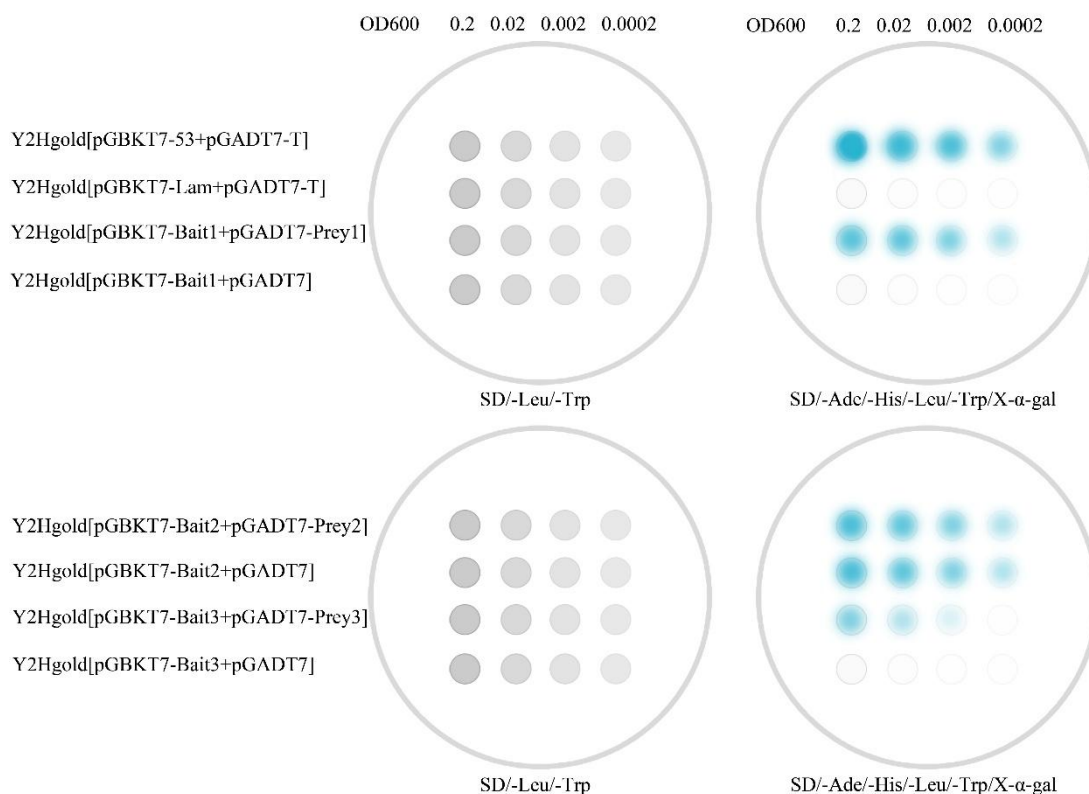


图 2. 互作验证结果

## 五、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。