



Y187-pHis2 系统酵母单杂互作验证试剂盒 使用说明书

产品编号: YH1011-10T

产品组成:

组成	产品	产品货号	产品名称	规格
成分一 常温储存	培养基	PM2252	SD/-Trp with Agar (备用)	0.5L
		PM2222	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5L×4
		PM2152	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5L×3
成分二 -20℃储存	筛选剂	SL0930	3-AT (2.5 M, 过滤除菌)	5×5mL
	鉴定试剂盒	SK2420	酵母阳性克隆快速检测试剂盒	20T
	质粒	VT003	pGADT7-Rec2 质粒	10μg
		VT011	pHis2 质粒	10μg
成分三 -80℃储存	对照菌株	YS3061	Y187[p53-His2] (备用)	0.2mL
		YS3062	Y187[p53-His2+pGADT7-p53]	0.2mL
		YS3063	Y187[p53-His2+pGADT7]	0.2mL
	感受态细胞	CC306	Y187 感受态细胞	20×100μL/支

注:

1. 本试剂盒可用于 10 对单杂互作验证 (质粒除外)。
2. 注意每个成份的保存温度, 感受态细胞务必-80℃保存。
3. 0.5L×2 表示: 2 个包装, 每个包装 0.5L; 5×1mL 表示: 1 个包装, 含 5 个 1mL。
4. 对照菌株的最佳 3-AT 浓度参考网站菌株说明书。
5. 本方案不适用大批量酵母单杂交实验, 因为诱饵自激活检测和毒性验证应该预先完成。

产品说明:

Y187 菌株是 GAL4 系统酵母单双杂实验常用菌株, MAT α 型, 可直接转化质粒或与 MAT α 型酵母菌株 (Y2HGold, AH109 等) 通过 mating 操作进行筛库实验。筛选标志为: trp1, leu2, 报告基因为: lacZ, MEL1。Y187-pHis2 系统酵母单杂需要 pHis2 和 pGADT7-Rec 两种质粒配套使用。质粒 pHis2 的筛选标志为 TRP, 用于表达 pBait-His2 construct (1~3 个 bait DNA 序列重复串联后克隆到 pHis2 中); 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。Y187-pHis2



系统酵母单杂原理：当猎物蛋白（Prey）结合到诱饵序列（Bait DNA）上，GAL4 AD 就会激活下游报告基因 HIS3 的表达，能够在含有 3-AT 的培养基上生长，从而确定 DNA 和蛋白有相互。

本方案中检测诱饵酵母菌株的 3-AT 最佳使用浓度和互作验证都采用了稀释点板的方法，与涂板的方法相比，点板法能更直观的体现出 DNA 和蛋白的互作，还能减少培养基和 3-AT 的使用量。本方案还对常见的酵母单杂结果进行了分析。

目录

一、实验耗材和试剂.....	2
二、菌株使用与保存.....	3
三、实验方法.....	3
3.1 Bait 和 Prey 共转化 Y187	3
3.2 阳性克隆鉴定	4
3.3 互作验证	4
四 互作验证分析	5
4.1 互作	5
4.2 Prey 蛋白有毒性	5
4.3 无互作	5
4.4 Bait 有自激活	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 μ L、200 μ L、10 μ L）、涂布棒或玻璃珠， Φ 90 mm 培养皿，备用。
2. Carrier DNA 在 95-100 $^{\circ}$ C 水浴 5 min，后快速冰浴，可再重复一次，备用。
4. 自备 0.9% 生理盐水，可用 ddH₂O 无菌水代替，备用。
5. 普通平板制备

将 1 条培养基溶于 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 冰箱保存；固体培养基，20-25 mL/块倒平板（ Φ 90 mm），凝固后 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存。

6. 特殊平板制备



SD/-His/-Leu/-Trp with Agar (3-AT): 将一条 SD/-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 25 mL 固体培养基，按照表 1 加入 3-AT，混匀倒平板 25 mL/块（Φ90 mm），凝固后于 4 °C 冰箱保存。

表 1 不同浓度 3-AT 平板

培养基体积 (mL)	25	25	25	25	25	25
3-AT (2.5 M) 加入量 (μL)	50	100	300	500	800	1000
3-AT 终浓度 (mM)	5	10	30	50	80	100

二、菌株使用与保存

1. 挑取甘油保存的对照菌液（10-50 μL）于 SD 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。
2. 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。

注：Y187[p53-His2+pGADT7-p53]和 Y187[p53-His2+pGADT7]用 SD/-Leu/-Trp 培养基，Y187[p53-His2]用 SD/-Trp 培养基。

三、实验方法

Y187-pHis2 系统酵母单杂互作验证实验方案较多，本公司根据多年经验，给出一个较优方案，首先我们将自激活检测和毒性验证放在互作检测之后（本方案不作分析）。略过载体构建，分为三个步骤：**Bait** 和 **Prey** 共转化 Y187，阳性克隆鉴定，互作验证。此外，本方案还对常见的互作验证结果进行了分析。

3.1 Bait 和 Prey 共转化 Y187

AD-Prey、AD- Empty、pBait-His2、p53-His2 和 Empty pHis2 空载（或 Mutant Bait pHis2）测序后，将其



大肠杆菌菌液进行扩大培养，然后提取质粒。

1. 取 100 μL 冰上融化的 Y187 感受态细胞 (货号: CC306)，依次加入预冷的质粒 Bait 和 Prey (各 1-2 μg)，Carrier DNA 10 μL (95-100 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min，快速冰浴，重复一次)，PEG/LiAc 500 μL 并吸打几次混匀，30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。
2. 将管放 42 $^{\circ}\text{C}$ 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，ddH₂O 400 μL 重悬，离心 30 s 弃上清。
4. ddH₂O 50 μL 重悬，涂板 SD/-Leu/-Trp 平板，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d (同时，将 Y187 阳阴性菌株于 SD/-Leu/-Trp 平板划线活化)。
5. 实验组和对照组的设置参考表 2。

表 2 共转化的实验组和对照组

实验组	对照组 1*	对照组 2**
Y187[p53-His2+ AD-p53]	Y187[p53-His2+ AD- Empty]	Y187[Empty pHis2+ AD-p53]
Y187[pBait1-His2+ AD-Prey1]	Y187[pBait1-His2+ AD- Empty]	Y187[Empty pHis2+ AD-Prey1]
Y187[pBait2-His2+ AD-Prey2]	Y187[pBait2-His2+ AD- Empty]	Y187[Empty pHis2+ AD-Prey2]
Y187[pBait3-His2+ AD-Prey3]	Y187[pBait3-His2+ AD- Empty]	Y187[Empty pHis2+ AD-Prey3]

注：对照组 1*可以更好的体现实验组是否互作。对照组 2**诱饵菌株可以是 Y187[Mutant Bait pHis2]也可以是 Y187[Empty pHis2]，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。

3.2 阳性克隆鉴定

此步骤可以省略。详细步骤可参考 SK2420 酵母阳性克隆快速检测试剂盒，本试剂盒包含猎物 AD 引物，诱饵 BD 引物可根据实际情况设计。

3.3 互作验证

1. 上述的转化成功之后，每个样品挑取新鲜单菌落 (2-3 mm) 于 1 mL 0.9% NaCl 无菌水中重悬，OD₆₀₀ 调至 0.2 (也可以用 SD/-Leu/-Trp 液体培养基培养至 OD₆₀₀=0.2)。



2. 再用 0.9% NaCl 依次稀释 10 倍, 100 倍, 1000 倍 (即 $OD_{600}=0.2, 0.02, 0.002, 0.0002$)。
3. 按照先实验组后对照组的顺序, 分别点板 10 μL 于相应的 SD/-Leu/-Trp, SD/-His/-Leu/-Trp with 3-AT* 平板 (如果已知自激活浓度, 需加入对应的 3-AT 浓度), 参考图 1。
4. 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 2-3 d, 观察每组重组酵母在对应的自激活 3-AT 浓度平板上生长状况, 从而确定是否互作。

四 互作验证分析

4.1 互作

由图 1 可知, 在 SD/-Leu/-Trp 平板上, 对照组 Y187[p53-His2+pGADT7-p53]和 Y187[p53-His2+pGADT7]长势相同。在 SD/-His/-Leu/-Trp with 3-AT(25 mM)平板上, Y187[p53-His2+pGADT7-p53]长势明显优于 Y187[p53-His2+pGADT7], 所以 p53-His2 与 pGADT7-p53 具有互作。同理, Bait1 和 Prey1 也有互作。

4.2 Prey 蛋白有毒性

由图 1 可知, 在 SD/-Leu/-Trp 平板上, Y187[pBait2-His2+pGADT7-Prey2]长势弱于对照组 Y187[pBait2-His2+pGADT7], 可能是 Prey 蛋白有毒性导致; 但是在 SD/-His/-Leu/-Trp with 3-AT(25mM)和 SD/-His/-Leu/-Trp with 3-AT(50mM)平板上, Y187[pBait2-His2+pGADT7-Prey2]长势优于 Y187[pBait2-His2+pGADT7], 所以 Bait2 与 prey2 有互作。

注: 酵母杂交互作验证实验, 不适于毒性很强的 Prey 蛋白。

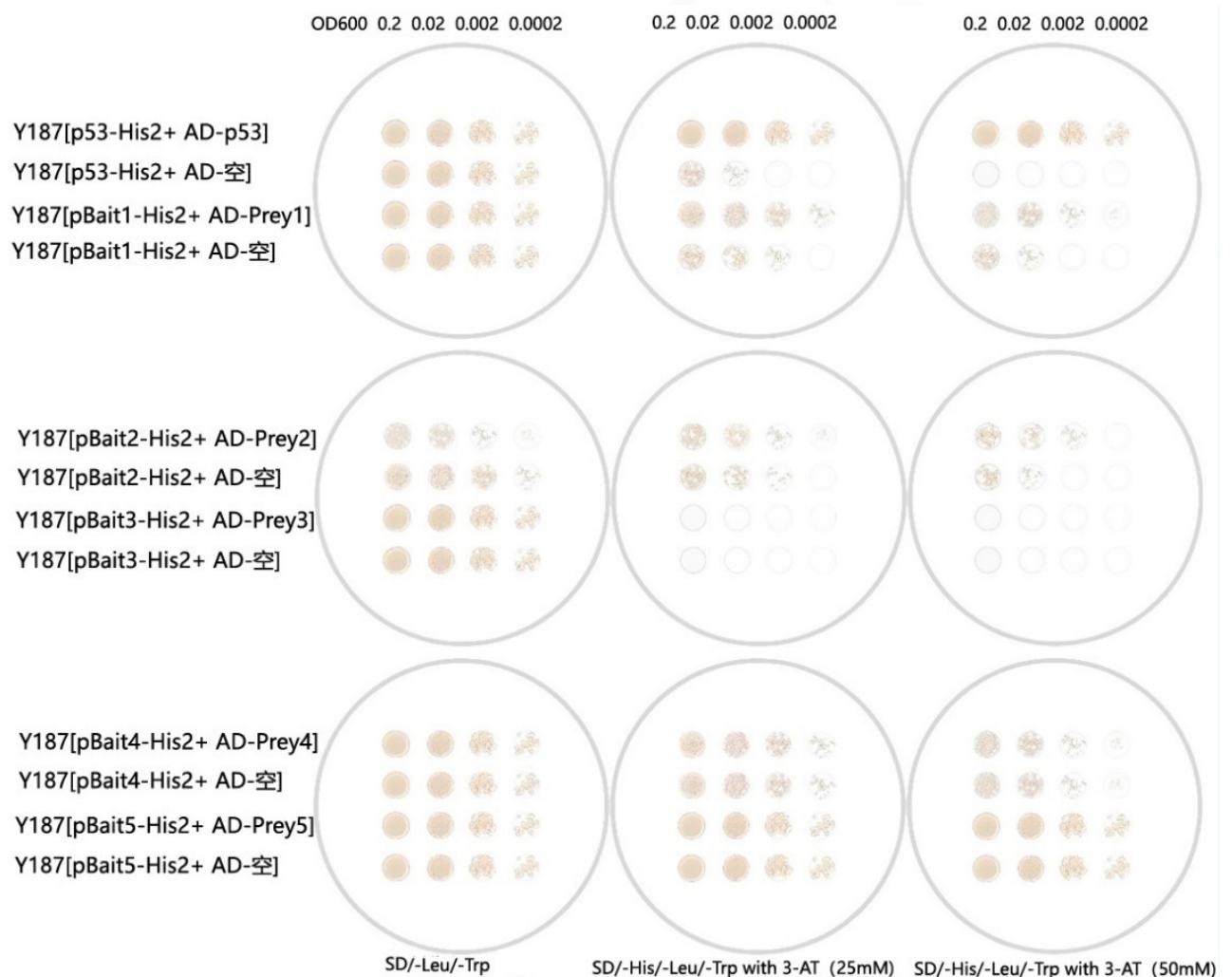
4.3 无互作

由图 1 可知, 在所有的 SD 平板上, Y187[pBait3-His2+pGADT7-Prey3]/Y187[pBait3-His2+pGADT7]和 Y187[pBait4-His2+pGADT7-Prey4]/Y187[pBait4-His2+pGADT7]长势都相同, 所以 Bait3 与 prey3, Bait4 与 prey4 均无互作。



4.4 Bait 有自激活

Y187[pBait5-His2+pGADT7-Prey5]和 Y187[pBait5-His2+pGADT7]在所有的 3-AT(50mM)平板上长势均相同，所以 Prey5 具有自激活。解决自激活更多问题解答可参考[酵母杂交实验常见问题——单杂知识及自激活检测篇 \(coolaber.com\)](#)。



注：Y187[pBait3-His2+pGADT7] 仅在 SD/-Leu/-Trp 平板上生长，说明 Bait3 无自激活。
Y187[pBait5-His2+pGADT7]能够在 SD/-His/-Leu/-Trp with 3-AT (50mM)平板上长势相同，说明 Bait5 具有一定的自激活。

图 1.点板互作验证结果示意图



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。