



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号: 2025-06-30

Y187-pHis2 系统酵母单杂互作验证试剂盒

Y187-pHis2 Yeast One-Hybrid interaction proving kit

产品组成	产品货号	产品组分	规格	保存温度
培养基	ZC1811	SD/-Trp with Agar (备用)	0.5 L	-20°C
	ZC1808	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×4	-20°C
	ZC1801	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3	-20°C
筛选剂	ZCS102	3-AT (2.5 M, 过滤除菌)	25 mL	-20°C
鉴定试剂盒	ZC221A	酵母阳性克隆快速鉴定试剂盒 (直扩)	20 T	-20°C
质粒	ZK977	pGADT7-Rec2 质粒	1 µg	-20°C
	ZK971	pHis2 质粒	1 µg	-20°C
对照菌株	ZCS311	Y187[p53-His2] 甘油菌 (备用)	0.3 mL	-80°C
	ZCS312	Y187[p53-His2+pGADT7-p53] 甘油菌	0.3 mL	-80°C
	ZCS313	Y187[p53-His2+pGADT7] 甘油菌	0.3 mL	-80°C
感受态细胞	ZC1603-2	Y187 感受态细胞	100 µL×20	-80°C

运输及储存条件:

培养基系列质保2年, 鉴定试剂盒质保1年、甘油菌质保1年, 感受态质保3个月; 感受态干冰运输, 其余产品冰袋运输; 各类产品按照标签所表示温度进行储存;

注:

1. 本试剂盒提供的产品以产品组成为准。大概能用于10对单杂互作验证, 例如, 1个诱饵和10个转录因子(质粒除外)。
2. 各组分需按照标签温度储存, 感受态细胞务必-80°C保存。
3. 对照菌株的最佳3-AT浓度参考网站菌株说明书。
4. 本试剂盒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。
5. 感受态细胞Y187配带有Carrier DNA和PEG/LiAc。
6. 载体序列, 在我司网站可以下载。

实验室使用, 仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司
Beijing Zoman Biotechnology Co., Ltd.

产品说明

Y187 菌株是 GAL4 系统酵母单杂实验常用菌株, 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-Rec2 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-Rec2 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 和蛋白有相互作用。

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。

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 µL、200 µL、10 µL)、涂布棒或玻璃珠, Φ 90 mm 培养皿, 备用。
2. Carrier DNA 在 95-100°C 水浴 5 min, 后快速冰浴, 可再重复一次, 备用。
3. 自备 0.9% 生理盐水, 可用 ddH₂O 无菌水代替, 备用。
4. 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°C 灭菌 20 min)。液体培养基 4°C 冰箱保存; 固体培养基, 20-25 mL/块倒平板 (Φ 90 mm), 凝固后 4°C 冰箱保存。
5. 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 (Φ 90 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

2.1 菌株活化

取甘油菌 10-50 μL 至 SD培养基 (平板) 上进行划线。置于培养箱 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。

2.2 菌株保存

挑取上述单菌落于 SD 液体培养基中, 200 r/min、28-30°C 振荡过夜培养, OD600 应大于 1, 取 1 mL 菌液集菌, 弃上清, 加入 0.2 mL 80%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和p53-His2 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: ZC1603), 依次加入预冷的质粒 Bait 和 Prey (各 2-5 μg), Carrier DNA 10 μL (95-100°C, 5 min, 快速冰浴, 重复一次), PEG/LiAc 500 μL 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. 5,000 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, 29-30°C 培养 3-5 d (同时, 将 Y187 阴性甘油菌于 SD/-Leu/-Trp 平板划线活化)。
5. 实验组和对照组的设置参考表 2。

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

注: 对照组 *可以更好的体现实验组是否互作。

3.2 阳性克隆鉴定

此步骤可以省略。详细步骤可参考酵母阳性克隆快速鉴定试剂盒 (直扩) (ZC221A), 猎物 AD 引物, 诱饵 BD 引物需要根据实际情况设计。

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 溶液中重悬, 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 OD600=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. 29-30°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。

注: 本试剂盒没有提供 SD/-Leu/-Trp 液体培养基。



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 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

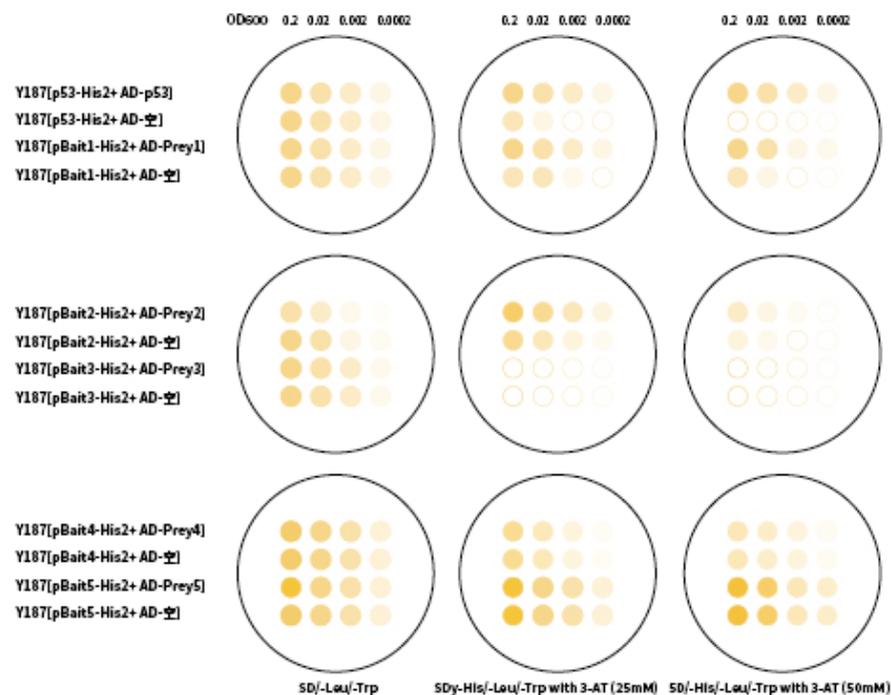
由图 1 可知，在所有的 SD 平板上，Y187[pBait3-His2+pGADT7-Prey3]/Y187[pBait3-His2+pGADT7] 和 Y187[pBait4-His2+pGADT7-Prey4]/Y187[pBait4-His2+pGADT7] 长势都相同，所以 Bait3 与 prey3，Bait4 与 prey4 均无互作。

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。

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

载体注意事项：

1. 建议收到质粒后请先转化感受态（克隆菌株），再挑选单菌落重新提取后使用。
2. 转化前请准确查找该质粒对应的抗生素、抗生素浓度、感受态（克隆菌株）和培养温度。
3. 如有必要请测序后使用，我司网站检索对应货号可下载质粒图谱。

培养基注意事项：

1. 一般情况下 pH 值不必调节，建议测定一下 pH5.8±0.2 即可。
2. SD 培养基可能溶解不彻底或灭菌后有少量沉淀，不影响实验进行。
3. SD 培养基灭菌后，颜色为白色至浅黄色。



感受态注意事项:

1. 一支感受态不建议分成两份使用。
2. 如果转化效率低,只有几个单克隆,建议做 PCR 鉴定。
3. 筛选出来的单克隆,一般是圆形凸起、边缘整齐、表面光滑湿润、不透明、乳白色-浅黄-浅粉色的菌落,有酵母气味。

本试剂盒注意事项:

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。



扫描二维码关注公众号