上海源叶生物科技有限公司
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd
电话：400-666-5481
网址：www.shyuanye.com
邮箱：sky@shyuanye.com

Y1HGold-pAbAi系统酵母单杂互作验证试剂盒

产品内容：

产品组成		产品组分	规格（10 T）
成分一	培养基	SD/-Ura with Agar	0.5L×1
		SD/-Ura Broth	0.5L×1
		YPDA Medium	0.5L×1
		SD/-Leu with Agar	0.5L×2
		SD/-Leu Broth	0.5L×1
	筛选剂	金担子素 A（AbA，1mg/mL）	1 mL
	鉴定试剂盒	酵母基因组菌落 PCR 试剂盒	20 T
	转化试剂盒	Super 酵母感受态制备与转化试剂盒 Plus	20 T
	质粒	pGADT7 质粒	10 μg
		pAbAi 质粒	10 μg
	对照菌株	Y1HGold[p53-AbAi]菌株（备用）	0.2 mL
		Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53] 冻干粉	0.2 mL
		Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-REC2] 冻干粉	0.2 mL
成分二	感受态细胞	Y1HGold 感受态细胞	20×100 μL/支

运输及储存条件：成分一蓝冰运输，成分二干冰运输；各组分按照标签所示温度进行储存，成分一保质期 6个月，成分二保质期 6 个月。

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. 请按照感受态的需求量制备感受态，Super 酵母感受态制备与转化试剂盒Plus 中的试剂加入量可以按比例放缩。

3. 各组分需按照标签温度储存，感受态细胞务必-80℃保存。

4. 0.5 L×2 表示：2 个包装，每个包装 0.5 L；5×1 mL 表示：1 个包装，含 5 个 1 mL。

5. 对照菌株的最佳 AbA 浓度参考网站菌株说明书。

6. 感受态细胞配带有 Carrier DNA 和 PEG/LiAc。

7. 载体序列，在我司网站可以下载。

产品说明：

Y1HGold-GAL4-AbA 酵母单杂系统使用的菌株 Y1HGold 是 MATα 型，可直接转化质粒进行筛库试验。筛选标记住为: ura3，leu2；报告基因为：AbAr。

Y1HGold-GAL4-AbA 酵母单杂系统需要 pAbAi 和 pGADT7 两种质粒配套使用。质粒 pAbAi 的筛选标志为 URA，用于表达 pBait-AbAi construct (1~3 个 bait DNA 序列重复串联后克隆到 pAbAi 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。GAL4-AbA 酵母单杂系统原理：Aureobasidin A (AbA)是一种环酯肽抗生素，在低浓度(0.1-0.2 μg/mL) 下即可对酵母产生毒性。基因组中整合了 pBait-AbAi 的酵母菌株（Bait-Reporter Yeast Strains），当猎物蛋白（Prey）结合到诱饵序列（Bait DNA）上，GAL4 AD 就会激活 AbAr 的表达，从而能够在含有抗生素 AbA 的培养基上生长。AbAr 与营养缺陷报告基因相比具有更低背景的优点，可以降低酵母单杂假阳性发生的概率。

本方案中筛选诱饵酵母菌株的 AbA 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 AbA 的使用量。本方案中诱饵菌株鉴定采用了高保真酶，大大减少了操作步骤，另外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 3
二、菌株使用与保存 4
2.1 冻干粉溶解 4
2.2 菌株活化 4
2.3 菌株保存 5
三、实验方法 5
3.1 pBait-AbAi 转化 Y1HGold 5
3.1.1 pBait-AbAi 质粒线性化 5
3.1.2 pBait-AbAi 转化 Y1HGold 6
3.1.3 诱饵菌株鉴定 6
3.2 筛选诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度 6
3.3 Y1HGold[pBait]感受态制备与 Prey 转化 7
3.4 互作验证 9
四、 互作验证分析 9
4.1 互作 9
4.2 Prey 蛋白有毒性 9
4.3 无互作 10
五、 注意事项 11

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，Φ90 mm 培养皿，备用。

2. Carrier DNA 在 95-100℃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 μLAbA（1 mg/mL）于 900 μL 无水乙醇中稀释，充分混匀，即 AbA 浓度为 100 μg/mL，4℃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. 自备 0.9%生理盐水，可用 ddH_2O 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℃灭菌 20 min）。液体培养基 4℃冰箱保存；固体培养基，20-25 mL/块倒平板(Φ90 mm），凝固后 4℃冰箱保存。

6. 特殊平板制备：SD/-Leu（AbA）或 SD/-Ura（AbA）：将一条 SD/-Leu with Agar 培养基溶于 500 mL 去离子水中，无需调节 pH 值，高压灭菌（如，115 ℃灭菌20 min），冷却至 50 ℃左右，参照表 1 加入稀释后的金担子素（AbA），倒平板 20 mL/块(Φ90 mm），凝固后于 4 ℃冰箱保存。

表 1. 不同 AbA 浓度的平板

培养基体积（mL）	20	20	20	20	20	20	20
AbA（100 μg/mL）加入量(μL)	0	20	40	60	100	140	200
AbA 终浓度（ng/mL）	0	100	200	300	500	700	1000

二、菌株使用与保存

2.1 冻干粉溶解

可选择将冻存管中冻干粉全部溶解或部分溶解

1. 全部溶解

取一整管冻干粉，加入 200 μL 无菌水或无菌培养基溶解，重悬后即可得 200 μL 菌悬液，直接用于菌株活化，剩余菌液-80℃冰箱保存（建议分装保存，注意避免反复冻融）。

2. 部分溶解

用枪头刮取管中冻干粉，用无菌水或无菌培养基溶解，直接用于菌株活化，剩余冻干粉-80℃保存。

2.2 菌株活化

取2.1 中冻干粉溶解得到的菌液 10-50 μL 至 SD 培养基（平板）上进行划线。置于培养箱28-30℃培养 3-5 d。培养出来的单菌落可直接用于互作验证实验。

2.3 菌株保存

挑取上述单菌落于 SD 液体培养基中，200 r/min、28-30℃振荡过夜培养，OD_{600} 应大于 1，取 1 mL 菌液集菌，弃上清，加入 0.2 mL 15%甘油，-80℃可长期保存。

注：Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53]和 Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7]用 SD/-Leu 培养基，Y1HGold[p53-AbAi]用 SD/-Ura 培养基。

三、实验方法

Y1HGold 酵母杂交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，略过载体构建，可为四个步骤：pBait-AbAi 转化 Y1Hgold，筛选诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度，Y1HGold[Bait]感受态制备与 Prey 转化，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 pBait-AbAi 转化 Y1HGold

pAbAi 质粒是通过同源重组的方式整合到酵母染色体组中而存在于酵母体内的，所以转化之前要通过酶切的方法将环状的质粒线性化。将线性化的 pAbAi 质粒转入酵母 Y1HGold 菌株中，转化后的重组子（诱饵 AbA 特异性报告菌株）可以在 SD/-Ura 培养基上生长。

3.1.1 pBait-AbAi 质粒线性化

pBait-AbAi、p53-AbAi 和 Mutant Bait pAbAi 测序后，将其大肠杆菌菌液进行扩大培养，然后提取质粒。用 BstbI限制性内切酶（NEB）进行线性化处理。

诱饵载体酶切体系

组分	体积
BstB I	4-10 μL
质粒 DNA	4-10 μg
10×Buffer	20-50 μL
无酶 ddH_2O	补充至 200-500 μL

65℃酶切2 h，1%的琼脂糖跑胶，检测载体是否酶切完全，纯化回收。

注：Mutant Bait pAbAi 线性化后转入 Y1HGold，作为可选对照组。

3.1.2 pBait-AbAi 转化 Y1HGold

1. 取 100 μL 冰上融化的 Y1HGold 感受态细胞（货号：CC308），依次加入预冷的线性化质粒 pAbAi（2-5 μg），Carrier DNA 10 μL（95-100℃，5 min，快速冰浴，重复一次），PEG/LiAc 500 μL 并吸打几次混匀，30℃水浴 30 min（15 min 时翻转 6-8 次混匀）。

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

3. 10,000 rpm 离心 30 s 弃上清，ddH_2O 400 μL 重悬，离心 30 s 弃上清。

4. ddH_2O 50 μL 重悬，涂板 SD-/Ura 平板，30℃培养 3-5 d（同时，将 Y1HGold 阳阴性菌株冻干粉溶解后，于 SD 平板划线活化）。

3.1.3 诱饵菌株鉴定

此步骤可以省略。详细步骤可参考酵母基因组菌落 PCR 试剂盒。

注：

a. 本公司提供的酵母基因组菌落 PCR 试剂盒中 Y1H 引物混合物扩增空载 pAbAi 重组 Y1HGold 的产物为 1346 bp。测序可以用 pAbAi-F（GCTCCTTCCTTCGTTCTTCCTTC），或插入片段的特异性引物。

b. 用 1%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 扩增产物，鉴定阳性克隆，消除假阳性。PCR 分析结果应为：阳性对照 Y1HGold[p53-AbAi]，1.4 kb；诱饵菌株 Y1HGold[pBait-AbAi]，1.35 kb+insert size。

3.2 筛选诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度

诱饵酵母菌株在没有 Prey 载体存在情况下，其基本 AbA 表达量非常低。对于不同的诱饵片段，其 AbA*最佳使用浓度不同。因此，需要筛选每个诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度，具体步骤如下：

1. 上述的转化验证成功之后，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，OD_{600} 调至 0.2（也可以用 SD-Ura 液体培养基培养至 OD_{600}=0.2）

2. 用 0.9%氯化钠溶液依次稀释 10 倍，100 倍，1000 倍（即 OD_{600}=0.2，0.02，0.002，0.0002）。

3. 分别点板 10 μL 于SD/-Ura；SD/-Ura with AbA（100 ng/mL、200 ng/mL、300 ng/mL、500 ng/mL、

800 ng/mL、1000 ng/mL）平板，如图 1 所示。

4. 30℃培养2-3 d，观察诱饵酵母在不同 AbA 浓度平板上生长状况，从而确定 AbA 最佳使用浓度（例如，Y1HGold[p53-AbAi]诱饵菌株 OD_{600}=0.002 时，在 SD/-Ura with AbA（200 ng/mL）平板上刚好不能生长）。

注：在不同浓度 AbA 平板上（100 ng/mL，200 ng/mL，300 ng/mL，500 ng/mL，800 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 AbA 浓度不宜超过 1000 ng/mL。

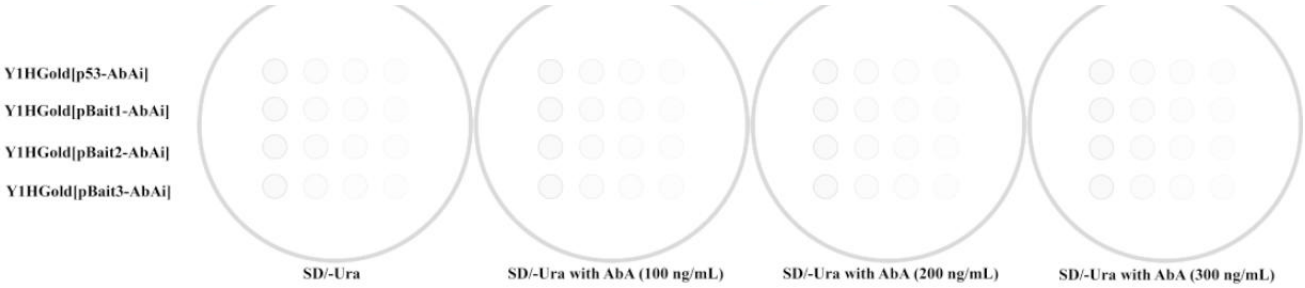


图 1 点板筛选 AbA 最佳使用浓度的示意图

3.3 Y1HGold[pBait]感受态制备与 Prey 转化

注：以下方案可制备 1 mL 感受态，可分装为 20 支 50 μL 用于小体积质粒转化。若只需制备少量感受态，可将步骤 2 中菌液（OD_{600} 值仍为 0.5-0.8）和步骤 3、4 中所用试剂体积等比例缩小。同样，也可按比例扩大。

1. 挑取鉴定成功的 Y1HGold[pBait-AbAi]单菌落接种到 3 mL YPDA 液体培养基中。30℃，200 rpm 过夜培养。

注：-80℃保存的或平板上生长超过 2 周的菌种需要先在 YPDA 培养基平板上划线活化。

2. 将 3 mL 小摇菌体（上步小摇所得）第二天转接到含有 50 mL YPDA 液体培养基的三角瓶中继续培养，待 OD600 达到 0.5-0.8，4000 rpm 离心 5 min，弃上清。（4℃保存 1 周内的酵母菌液，用 3 mL 接种50 mL YPDA 培养基过夜培养亦可）

3. 用 10 mL Y1 溶液重悬沉淀，4000 rpm 离心 5 min，弃上清。

4. 加入 1 mL Y2 溶液重悬，按 50 μL 分装于无菌冻存管，感受态细胞即制备完毕，可直接用

于转化。

注：制备好的感受态细胞需缓慢冷冻后，再置于-80℃冰箱长期保存。将感受态细胞放入程序降温盒，或用多层纸包裹放入泡沫盒中，先置于-80℃冰箱过夜后，再取出感受态置于-80℃冰箱，可保存一年。使用前室温融化后用于转化。

5. 取上述 Y1HGold[pBait-AbAi]感受态细胞 50 μL 于冰上，依次加入预冷的目的质粒 2 μg，Y3 溶液 350 μL，轻柔吸打混匀，30℃水浴 60 min（10 min 时翻转 1 次混匀）。对于部分菌种，延长孵育时间可提高转化效率，但不要超过 3 h。建议用 ddH_2O 补充体积，将质粒与 Y3 溶液的体积定容为 0.36 mL。实验组和对照组的设置参考表 1。

表 1 Prey 转化诱饵菌株

诱饵菌株感受态	实验组	对照组 1*	对照组 2**
Y1HGold[p53-AbAi]	Y1HGold[p53-AbAi] + AD-p53	Y1HGold[p53-AbAi] + AD- Empty	Y1HGold[Mutant Bait pAbAi] + AD-p53
Y1HGold[pBait1-AbAi]	Y1HGold[pBait1-AbAi] + AD-Prey1	Y1HGold[pBait1-AbAi] + AD- Empty	Y1HGold[Mutant Bait pAbAi] + AD-Prey1
Y1HGold[pBait2-AbAi]	Y1HGold[pBait2-AbAi] + AD-Prey2	Y1HGold[pBait2-AbAi] + AD- Empty	Y1HGold[Mutant Bait pAbAi] + AD-Prey2
Y1HGold[pBait3-AbAi]	Y1HGold[pBait3-AbAi] + AD-Prey3	Y1HGold[pBait3-AbAi] + AD- Empty	Y1HGold[Mutant Bait pAbAi] + 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 Y1HGold[Mutant Bait pAbAi]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。

6. 3000 rpm 离心 5 min，弃上清。

7. 用 0.5 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30℃摇床震荡培养 30-60 min，12000 rpm 离心 15 s，弃上清。

8. 加入 50 μL ddH_2O 重悬菌体，涂板 SD-/Leu 平板，30℃培养 3-5 d。

3.4 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（2-3mm）于 1 mL 0.9%氯化钠溶液中重悬，OD_{600} 调至 0.2（也可以用 SD-Leu 液体培养基培养至 OD_{600}=0.2）。

2. 再用 0.9%氯化钠溶液依次稀释 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顺序，分别点板 10 μL 于相应的 SD/-Leu with AbA*平板，参考图 1。

4. 30℃培养2-3 d，观察每组重组酵母在对应的自激活 AbA 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

由诱饵酵母菌株的AbA 最佳使用浓度筛选可知Y1HGold[p53-AbAi]自激活浓度是 100 ng/mL。由图 2 可知，在 SD/-Leu 平板上，对照组 Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53] 和 Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7] 长势相同。在 SD/-Leu with AbA（100 ng/mL）平板上，Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53] 长势明显优于 Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7]，所以 p53-AbAi 与 pGADT7-p53 具有互作。同理，Bait1 和 Prey1 也有互作。

注：GAL4 AD-p53 与 p53 结合序列（顺式作用元件）的相互作用而诱发 AbA 抗性基因 AUR1-C 的表达，所以 Y1HGold[p53-AbAi+pGADT7-p53]能够在 SD/-Leu with AbA（1000 ng/mL）平板上生长。

4.2 Prey 蛋白有毒性

由诱饵酵母菌株的 AbA 最佳使用浓度筛选可知 Y1HGold[pBait2-AbAi] 自激活浓度是 100 ng/mL。由图 2 可知，在 SD/-Leu 平板上，Y1HGold[pBait2-AbAi+pGADT7-Prey2]长势弱于对照组Y1HGold[pBait2-AbAi+pGADT7]，可能是Prey 蛋白有毒性导致；但是在 SD/-Leu with AbA（100 ng/mL）和 SD/-Leu with AbA（300 ng/mL）平板上，Y1HGold[pBait2-AbAi+pGADT7-Prey2] 长势优于 Y1HGold[pBait2-AbAi+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

图 2，在所有的 SD 平板上，Y1HGold[pBait3-AbAi+pGADT7-Prey3]/ Y1HGold[pBait3-AbAi+pGADT7]和 Y1HGold[pBait4-AbAi+pGADT7-Prey4]/Y1HGold[pBait4-AbAi+pGADT7]长势都相同，所以 Bait3 与 prey3，Bait4 与 prey4 均无互作。

注：Y1HGold[pBait3-AbAi+pGADT7]仅在 SD/-Leu 平板上生长，说明 Bait3 无自激活。Y1HGold[pBait5-AbAi+pGADT7]能够在 SD/-Leu with AbA（300 ng/mL）平板上长势相同，说明 Bait5 具有一定的自激活。

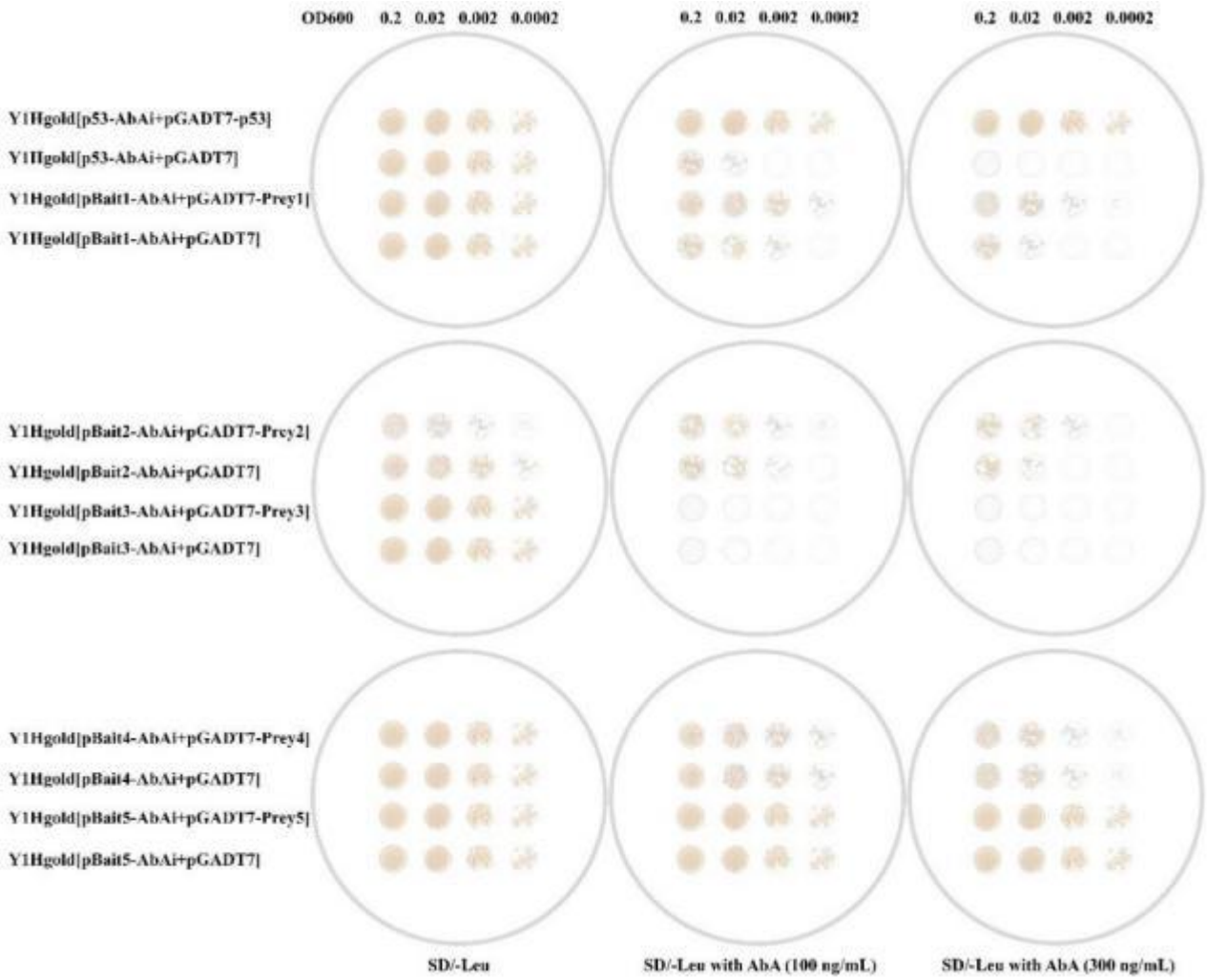


图 2.点板互作验证结果示意图

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。