



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号: 2025-06-06

EGY48-LacZ 系统酵母单杂互作验证试剂盒

EGY48-LacZ Yeast One-Hybrid interaction proving kit

目录号: ZC1905



扫描二维码关注公众号

产品组成	产品货号	产品组分	规格	保存温度
LacZ 基因胞外表达显色试剂盒 (ZCS121)	ZCS118	10×BU buffer (过滤除菌)	100 mL	-20°C
	ZCS123-1	20%半乳糖溶液 (过滤除菌)	100 mL	-20°C
	ZCS124-1	20%棉子糖溶液 (过滤除菌)	50 mL	-20°C
	ZC1815-0.5L	SD/-Trp/-Ura with Agar	0.5 L×3	-20°C
	ZC1768-8g	SC/-Trp/-Ura Broth	8 g	-20°C
	ZS819M	X-Gal 储存液 (20 mg/mL)	5 mL	-20°C
	Z1296-20g	Agar	20 g	常温
质粒	ZK943	pB42AD(PJG4-5)质粒	10 µg	-20°C
	ZK1859	pLaczi 质粒	10 µg	-20°C
对照菌株	ZCS314	EGY48 单杂阳性菌	0.3mL	-80°C
感受态细胞	ZC1605-2	EGY48 感受态细胞	100 µL×20/支	-80°C

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。
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. pLaczi 是否酶切线性化之后转入 EGY48, 根据实际情况而定 (试剂盒提供的 pLaczi不需要线性化转入酵母)。
4. EGY48感受态细胞配带有 Carrier DNA 和 PEG/LiAc。
5. 载体序列, 在公司官网可以下载, 勿反复冻融。

产品说明

EGY48 酵母菌可用单双杂实验, 转化质粒进行互作验证或筛库试验。筛选标记为: his3, trp1, ura3。EGY48-LacZ 酵母单杂系统需要 pB42AD 和 pLacZi 两种质粒配套使用。质粒 pB42AD 的筛选标记为 TRP1, 用于表达AD (来自疱疹病毒的88个氨基酸残基组成的B42AD蛋白) 与目标蛋白 (Prey) 的融合蛋白。质粒pLacZi的筛选标记为 URA3, 报告基因为 LacZ, 只有当 Bait 和 Prey 互动时才能启动 LacZ 表达, 在显色培养基上显蓝色, 从而确定 DNA 和蛋白有相互。本方案结合 LacZ 基因胞外表达显色试剂盒进行互作验证, 采用稀释点板的方法, 与涂板的方法相比, 更能直观的体现出 DNA 和蛋白的互动, 还能减少培养基的使用。

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°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°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保存。
6. 显色平板配置
参考 LacZ 基因胞外表达显色试剂盒 (货号: ZCS121) 附件①。

二、菌株使用与保存

2.1 菌株活化

取甘油菌 10-50 μ L 至 SD/-Trp/-Ura 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/-Trp/-Ura 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。

附件①: LacZ 基因胞外表达显色试剂盒 (货号: ZCS121)

使用方法:

■ 筛选培养基配制: (SD/-Trp/-Ura平板)

1. 请将0.5 L的SD/-Trp/-Ura with Agar干粉, 加入500mL的蒸馏水中, 搅拌溶解;
2. 115°C灭菌20min, 冷却后倒板;

注意: 灭菌的培养基如有剩余, 可置于超净台密封保存, 再次使用时微波加热溶解后倒板即可。

■ 显色培养基配制: (SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal平板)

1. 组分配比, 见下表:

组分	培养基体积100ml	培养基体积500ml
SC/-Trp/-Ura Broth	0.8g	4g
20%半乳糖溶液 (过滤除菌)	10ml	50ml
20%棉子糖溶液 (过滤除菌)	5ml	25ml
10×BU Buffer (pH7.0, 过滤除菌)	10ml	50ml
X-Gal工作液 20mg/ml	0.4ml	2ml
Agar	2g	10g

2. 以配制100ml为例: 称取 SC/-Trp/-Ura Broth和Agar, 加水至75ml搅拌溶解;

注: 1. 具体配制多少, 根据需要按照上表比例计算称取即可;

2. Agar常温溶解不了为正常现象。

3. 115°C 20min灭菌培养基; 同时预热20%半乳糖溶液、20%棉子糖溶液、10×BU buffer至55°C左右;

4. 培养基冷却到55°C左右后加入预热的上述成分以及X-Gal储存液, 混匀倒板。

注意: 显色平板请尽快使用。3天内避光4°C保存的板子亦可以使用。

实验方法:

以EGY48-pLacZi酵母单杂体系为例:

1. 载体构建pLacZi-X & pB42AD-Y;
2. 载体共转化EGY48酵母感受态细胞;
3. 转化产物涂布SD/-Trp/-Ura with Agar 平板, 28-30°C培养3-5天;
4. 随机选择5个单菌落, Marker笔做好标记, 挑取少量菌落做阳性克隆检测 (参照ZC221A使用说明);
5. 挑取鉴定为阳性克隆的菌落涂布SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal with Agar显色平板, 28-30°C培养3-5天后观察显色反应。

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 $pH5.8 \pm 0.2$ 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。

三、实验方法

EGY48-LacZ 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，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 EGY48，阳性克隆鉴定，互作验证。本方案仅适用于酵母小规模转化，大规模转化，请先做自激活和毒性实验，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 EGY48

AD-Prey、AD-Empty、pBait-LacZi 和 Empty pLacZi 空载测序后，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 EGY48 感受态细胞（货号：ZC1605），依次加入预冷的质粒 Bait 和 Prey（各 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. 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/-Trp/-Ura 平板，28-30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3-5 d。
5. 实验组和对照组的设置参考表 1。

表 1 共转化的实验组和对照组

实验组	对照组 *
EGY48[Positive LacZi+ Positive AD]	EGY48[Positive LacZi+ AD- Empty]
EGY48[pBait1-LacZi+ AD-Prey1]	EGY48[pBait1-LacZi+ AD- Empty]
EGY48[pBait2-LacZi+ AD-Prey2]	EGY48[pBait2-LacZi+ AD- Empty]
EGY48[pBait3-LacZi+ AD-Prey3]	EGY48[pBait3-LacZi+ 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),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/-Trp/-Ura 液体培养基培养至 OD600=0.2)。

2. 再用 0.9% NaCl 溶液依次稀释 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 μ L 于相应的 SD/-Trp/-Ura 和 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板,参考图 1。

4. 28-30 $^{\circ}$ C 培养 2-3 d,观察每组重组酵母在平板上生长状况和颜色深浅,从而确定是否互作。

注:如果,梯度稀释点板在 SD/-Trp/-Ura 平板上生长正常,在 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板上生长缓慢或不能生长,可能是酵母菌利用半乳糖作为碳源的能力较弱导致。建议增加过渡培养的步骤:用 3 mL SGR/-Trp/-Ura 液体培养基(2%半乳糖,1%棉子糖),摇菌至 OD600 为 0.5-1.0,5000 rpm 离心 40 s 弃上清。无菌水清洗一次。无菌水重悬菌液,然后梯度点板(参考上述)。

四、互作验证分析

4.1 互作

由图 1 可知,在 SD/-Trp/-Ura 平板上,对照组 EGY48[Positive LacZi+ Positive AD]和 EGY48[Positive LacZi+AD]长势相同。在 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板上,EGY48[Positive LacZi+ Positive AD]长势明显优于 EGY48[Positive LacZi+AD],且显蓝色,所以 Positive LacZi 与 Positive AD 具有互作。同理,Bait1 和 Prey1 也有互作。

4.2 无互作

由图 1 可知,EGY48[pBait2-LacZi+AD-Prey2]/EGY48[pBait2-LacZi+AD]和 EGY48[pBait3-LacZi+AD-Prey3]/EGY48[pBait3-LacZi+AD]在所有的 SD 平板上,长势都相同,所以 Bait2 与 Prey2 无互作,Bait3 与 Prey3 无互作。

4.3 Prey 蛋白有毒性

由图 1 可知,在 SD/-Trp/-Ura 平板上,EGY48[pBait4-LacZi+AD-Prey4]长势弱于对照组 EGY48[pBait4-LacZi+AD],可能是 Prey 蛋白有毒性导致;但是在 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板上,EGY48[pBait4-LacZi+AD-Prey4]长势优于 EGY48[pBait4-LacZi+AD],且显蓝色,所以 Bait4 与 Prey4 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。

4.4 Bait 有自激活

EGY48[pBait2-LacZi+AD-Prey2]和 EGY48[pBait2-LacZi+AD]在所有的在 SD 平板上长势均相同,且能够显蓝色,所以 Bait2 具有较强的自激活。EGY48[pBait5-LacZi+AD-Prey5]和 EGY48[pBait5-LacZi+AD]在 SD/-Trp/-Ura 平板上长势相同,在 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板上,实验组较对照组的颜色更深,所以 Bait5 和 Prey5 有互作,虽然 Bait5 也有一定的自激活。

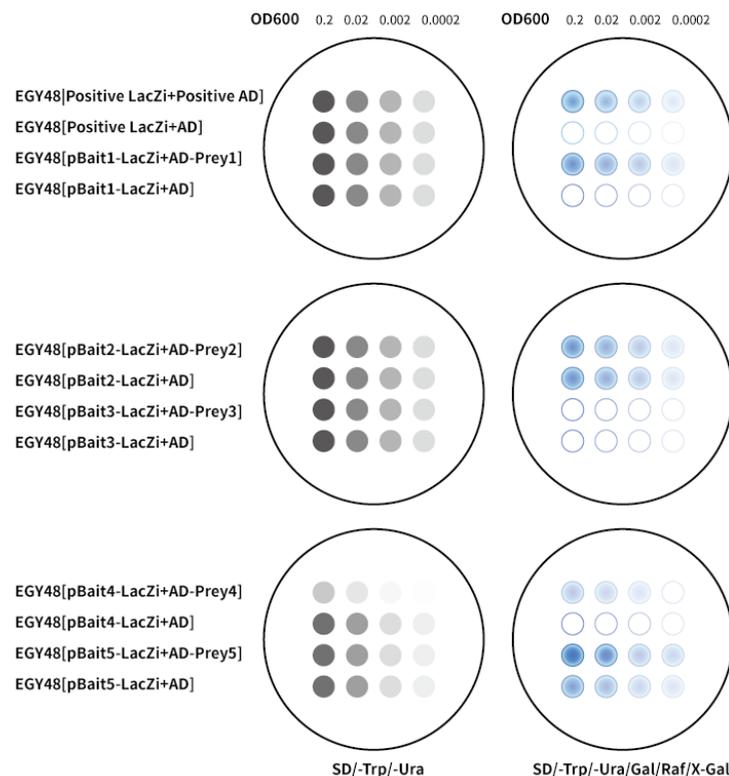


图 1.点板互作验证结果示意图