



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号: 2025-10-10

AH109-pBridge 系统酵母三杂互作验证试剂盒

AH109-pBridge Yeast Three-Hybrid interaction proving kit

目录号: ZC1911

产品组成	产品货号	产品组分	规格
培养基	ZC1808	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L
	ZC1807	SD/-Leu/-Trp/-Met with Agar	0.5 L×2
	ZC1801	SD/-Leu/-Trp/-His with Agar	0.5 L
	ZC1800	SD/-Leu/-Trp/-His/-Met with Agar	0.5 L
	ZC1793	SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His with Agar (备用)	0.5 L
	ZC1794	SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/-Met with Agar (备用)	0.5 L
筛选剂	ZCS102	3-AT 溶液 (2.5 M)	25 mL
质粒	ZK974	pGADT7 质粒	1 μg
	ZK990	pBridge 质粒	1 μg
感受态细胞	ZC1604-3	AH109 感受态细胞 (三杂专用)	30×100 μL/支

运输及储存条件:

培养基系列保质期2年, 感受态保质期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, 可用于 10 对三杂互作验证 (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. 规格 0.5 L×2 表示: 2 个包装, 每个包装 0.5 L; 规格 5×1 mL 表示: 1 个包装, 含 5 个 1 mL。
4. 本试剂盒不含 X-α-gal, 可以单独购买。
5. 感受态细胞 ZC1604 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

酵母三杂交技术是由酵母双杂交技术改进而来的，这套系统引进了 pBridge 质粒，这个质粒的特点是能够同时插入两个外源蛋白，在 MCSI 插入的蛋白的 N 端仍然融合 Gal4 系统中的 BD 结合域氨基酸多肽片段，而在 MCSII 中插入的蛋白不融合任何标签，但是在其上游有一个 Pmet25 启动子，这个启动子的特点是只有在甲硫氨酸 (Met) 缺乏的时候才能工作，使下游蛋白基因表达，所以必须要在甲硫氨酸缺陷型培养基中进行实验。

本试剂盒在前人研究研究的基础上进行了总结和优化，给出了一个较优的点板互作验证实验方案，可大大减少实验时间。AH109 有四个报告基因 lacZ，HIS3，ADE2，MEL1，本方案仅检测了 HIS3，所以使用了 SD/-Leu/-Trp/-Met with Agar 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met with Agar 培养基。如有必要可以使用 SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His with Agar 和 SD/-Leu/-Trp/-Ade/-His/-Met with Agar 培养基。

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；
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/-Leu/-Trp/-His with Agar (3-AT) 或 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met with Agar (3-AT) 配制：将 1 条培养基溶于 500 mL 去离子水中，无需调节 pH 值，高压灭菌 (如，115°C 灭菌 20 min)。待其冷却至 50°C 左右，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(μ L)	50	100	300	500	800	1000
3-AT 终浓度 (mM)	5	10	30	50	80	100

二、实验方法

三杂互作验证的目的是在已知 A 和 B 的关系情况下, 验证 X 基因对 A 和 B 基因互作关系的影响。常见的验证方法有三种:

1. A 基因构建到 pGADT7 载体上, B 和 X 基因分别构建到 pBridge 载体的 MCSI 和 MCSII 位点, 通过共转 AH109/Y2HGold 酵母菌的方法验证互作关系。
2. 载体构建同上, 构建好的 pBridge 载体转入 AH109/Y2HGold 酵母菌, 将其制备成感受态后再转入 pGADT7 载体。
3. 将构建好的 pBridge 载体转入 AH109/Y2HGold 酵母菌, 构建好的 pGADT7 载体转入 Y187 酵母菌, 通过 mating 的方法验证互作关系。

三杂交互作验证不仅有三种方法, 而且每种方法的实验操作差异较大, 给实验者带来诸多选择性难题, 本公司根据多年经验, 以 AH109 酵母三杂互作验证为例, 给出了一个较优方案。略过载体构建, 可为三个步骤: 检测诱饵菌株的 3-AT 最佳使用浓度, Bait 和 Prey 共转 AH109, 三杂互作验证。此外, 本方案还对常见的三杂互作验证结果进行了分析。

2.1 检测诱饵菌株的 3-AT 最佳使用浓度

在不同浓度 3-AT (10 mM, 20 mM, 30 mM, 40 mM, 50 mM, 60 mM, 70 mM, 80 mM) 平板上, 出现的酵母菌斑最少或者完全没有, 即为最佳的 3-AT 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)。

本方案以 AH109[pGADT7+pBridge-B-X]为诱饵自激活检测菌株 (诱饵菌株)。此菌株在互作验证实验中可作为对照组, 能更直观的体现出实验组是否有互作, 同时还能减少培养基的使用种类, 如 SD/-Trp/-Met, SD/-Trp/-His, SD/-Trp/-His/-Met。此外 AH109[pBridge-B]和 AH109[pBridge-B-X]也可以作为诱饵自激活检测菌株, 本方案不做分析。

2.1.1 构建诱饵菌株

1. 取 100 μL 冰上融化的 AH109 感受态细胞（货号：ZC1604），依次加入预冷的目的质粒 pGADT7 5 μL 和 pBridge-B-X 5 μL ，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. 10,000 rpm 离心 30 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/-Met 平板，30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48-96 h。

2.1.2 诱饵菌株的鉴定

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）（货号：ZC221A），猎物 AD 引物，诱饵 BD 引物需要根据实际情况设计。

2.1.3 诱饵菌株的自激活检测

1. 将上述转化鉴定成功的每个样品挑取新鲜单菌落（2-3 mm）于 1 mL ddH₂O 中重悬，OD₆₀₀ 调至 0.2。
2. 用 ddH₂O 依次稀释 10 倍，100 倍，1000 倍（即 OD₆₀₀=0.2，0.02，0.002，0.0002）。
3. 将稀释液按照先对照组后实验组的顺序，分别点接 10 μL 于下列平板，见表2。

表 2 诱饵菌株 AH109[pGADT7+pBridge-B-X]的自激活检测

自激活检测目标	培养基	目的
蛋白 B	SD/-Leu/-Trp	对照组，能够生长
	SD/-Leu/-Trp/-His	实验组
	SD/-Leu/-Trp/-Met	对照组，能够生长
蛋白 B-X	SD/-Leu/-Trp/-His/-Met	实验组
	SD/-Leu/-Trp/-His/-Met(3-AT*)	实验组，不能生长

注：3-AT 的浓度能够刚好抑制 AH109[pGADT7+pBridge-B-X]（OD₆₀₀=0.002）的生长，且 3-AT 浓度不宜超过 100 mM。

2.2 Bait 和 Prey 共转 AH109

1. 取 100 μL 冰上融化的 AH109 感受态细胞 (货号: ZC1604), 依次加入预冷的目的质粒 pGADT7-A 5 μL 和 pBridge-B-X 5 μL , 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. 10,000 rpm 离心 30 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/-Met 平板, 30°C 培养 48-96 h。
5. PCR 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) (货号: ZC221A), 猎物 AD 引物, 诱饵 BD 引物需要根据实际情况设计。

2.3 三杂互作验证

一般情况下自激活检测结果有两种, 有自激活和无自激活。因此我们将酵母三杂互作验证分为两种情况, 见表 1 表 2, 可以减少实验工作量, 尤其是在无自激活的情况下。如果自激活检测中出现其他现象, 可联系本公司了解更多详细。

2.3.1 无自激活

1. 将 2.2 中转化成功的每个样品挑取新鲜单菌落 (2-3 mm) 于 1 mL ddH₂O 无菌水中重悬, OD600 调至 0.2 (也可以用 SD/-Leu/-Trp/-Met 液体培养基培养至 OD600=0.2)
2. 用 ddH₂O 依次稀释 10 倍, 100 倍, 1000 倍 (即 OD600=0.2, 0.02, 0.002, 0.0002)。
3. 将稀释液按照先对照组后实验组的顺序, 分别点接 10 μL 于下列平板, 见表 3。

表 3 三杂互作验证点板 (诱饵无自激活)

菌株	培养基	目的
AH109[pGADT7-A+pBridge-B-X]	SD/-Leu/-Trp	对照组, 能够生长
	SD/-Leu/-Trp/-His	实验组
	SD/-Leu/-Trp/-Met	实验组

2.3.2 有自激活

按照上述方法, 将稀释液按照先对照组后实验组的顺序, 分别点接 10 μL 于下列平板, 见表 4。

表 4 三杂互作验证点板 (诱饵有自激活)

菌株	培养基	目的
AH109[pGADT7+pBridge-B-X] AH109[pGADT7-A+pBridge-B-X]	SD/-Leu/-Trp/-His(3-AT*)	对照组 实验组
AH109[pGADT7+pBridge-B-X] AH109[pGADT7-A+pBridge-B-X]	SD/-Leu/-Trp/-His/-Met(3-AT**)	对照组 实验组

三、三杂互作结果分析

本方案仅适用于 A 和 B 互作或不互作两种情况，且互作关系是已知的。上述实验已得知诱饵菌株是否有自激活，因此可以在有无自激活的情况下，分析 X 抑制或促进 A 和 B 互作。另外 X 对 A 和 B 的关系无影响，本方案不作详细分析。

3.1 无自激活

上述实验已得知诱饵无自激活，可以不使用 AH109[pGADT7+pBridge-B-X]做对照，也不再使用含 3-AT 的平板，SD/-Leu/-Trp 平板仅在 X 促进 A 和 B 互作中做对照（因为 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上无菌落）。如果 AH109[pGADT7-A+pBridge-B-X]在 SD/-Leu/-Trp/-His 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met 平板上的菌落长势相同，则 X 对 A 和 B 的关系无影响。

3.1.1 X 抑制 A 和 B 互作

由前期研究可知 A 和 B 互作，且诱饵无自激活。图 1 A，AH109[pGADT7-A1+pBridge-B1-X]在 SD/-Leu/-Trp 平板上生长正常（对照），在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met 平板上的长势弱于 SD/-Leu/-Trp/-His 平板（A1 和 B1 互作），则说明 X 抑制了 A1 与 B1 互作。

3.1.2 X 促进 A 和 B 互作

由前期研究可知 A 和 B 无互作，且诱饵无自激活。图 1 B，AH109[pGADT7-A2+pBridge-B2-X]在 SD/-Leu/-Trp 平板上生长正常（对照），在 SD/-Leu/-Trp/-His 平板上不生长（即 A2 与 B2 无互作），在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met 平板上能够生长，则说明 X 促进了 A2 与 B2 互作。

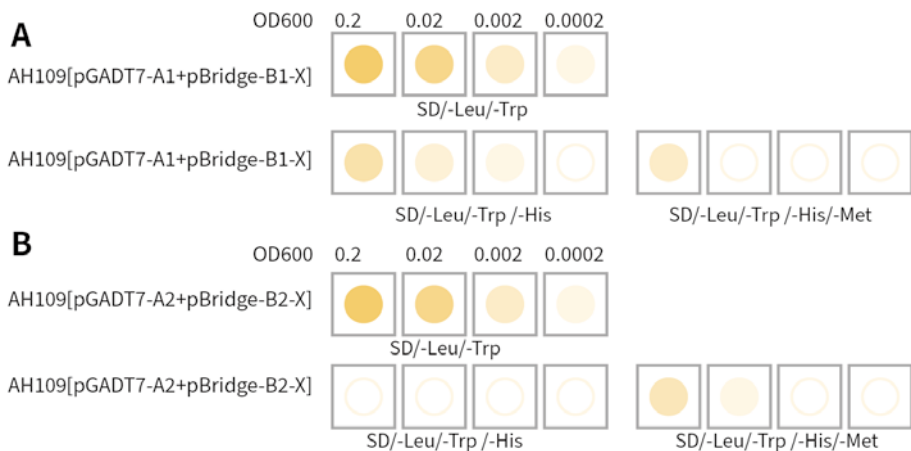


图 1 三杂互作验证示意图 (诱饵无自激活)

3.2 有自激活

上述实验已得知诱饵有自激活，所以必须使用含 3-AT 的平板，抑制诱饵自激活、A 和 B 互作。如果 AH109[pGADT7-A+pBridge-B-X]在 SD/-Leu/-Trp/-His 和 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met 平板上的菌落长势相同，则 X 对 A 和 B 的关系无影响。

3.2.1 X 抑制 A 和 B 互作

由前期研究可知 A 和 B 互作，且诱饵有自激活。图 2A，两种平板的 3-AT* 的浓度相同，且刚好可以抑制双杂酵母 (OD600=0.0002) 的互作。AH109[pGADT7-A3+pBridge-B3-X]在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met 平板上长的势弱于 SD/-Leu/-Trp/-His 平板 (即双杂酵母)，且强于 AH109[pGADT7+pBridge-B3-X] (即诱饵酵母菌) 长势，所以 X 抑制了 A3 和 B3 的互作。

3.2.2 X 促进 A 和 B 互作

由前期研究可知 A 和 B 无互作，且诱饵有自激活。图 2B，两种平板的 3-AT** 的浓度相同，且刚好可以抑制诱饵菌 (OD600=0.0002) 的自激活。AH109[pGADT7-A4+pBridge-B4-X]在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Met 平板上长的势强于 SD/-Leu/-Trp/-His 平板，且强于 AH109[pGADT7+pBridge-B4-X] (即诱饵酵母菌) 长势，所以 X 促进了 A4 和 B4 的互作。

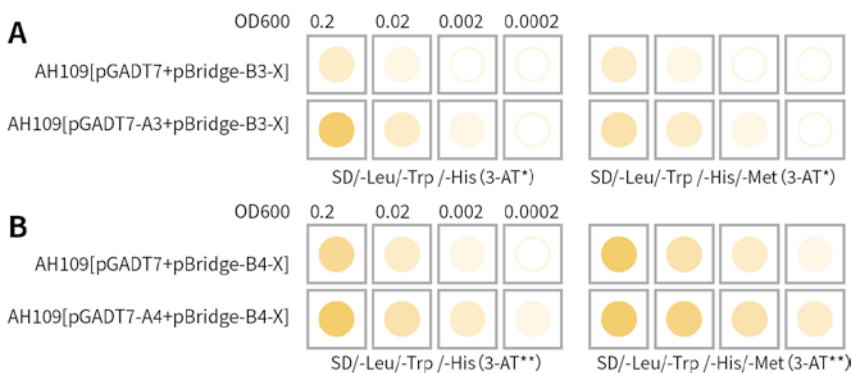


图2 三杂互作验证示意图（诱饵有自激活）

四、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。
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。