



南京瑞源生物

实 验 报 告

酵母单杂交筛选

订单号: _____

客 户: _____

日 期: _____

酵母单杂交筛选与启动子 pHIS2-A 互作蛋白实验报告

目的:

筛选与启动子 pHIS2-A 互作的蛋白。

方法:

以构建到 pHIS2 载体上的 A 基因为诱饵，筛选酵母单杂交拟南芥文库，经过对阳性克隆的多重报告基因检测、DNA 测序和 BLAST 比对分析，确定与 pHIS2-A 相互作用的蛋白。

材料:

1. 诱饵克隆: pHIS2-A
2. 诱饵载体: pHIS2
3. 文库质粒: 拟南芥 cDNA 文库
4. Clontech 酵母单杂交系统
5. 培养基:

1). 大肠杆菌培养基:

LB: 0.5% Yeast extract, 1% Tryptone, 1% NaCl。

2). 酵母完全培养基:

YPDA: 1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Glucose, 0.02% Adenine。

3). 酵母缺陷型筛选培养基:

参照 Clontech 公司的 PT3024-1/Yeast Protocols Handbook。其中各种培养基分别以下列符号表示:

SD-T: -trp;

SD-TL: -trp, -leu;

SD-TLH: -trp, -leu, -his。

4). 其他贮备液:

10×TE: 0.1 M Tris-HCl (pH7.5), 10 mM EDTA, 高压灭菌;

10×LiAc: 1 M LiAc (pH7.5), 高压灭菌。

第一部分 将诱饵质粒转化受体菌 Y187 中及其背景筛选检测

1.1 酵母转化反应

Reaction	pHIS2 plasmid	AD plasmid	转化平板	备注
1	pHIS2-A	—	SD-T	筛库备用
2	pHIS2-A	pGADT7	SD-TL	背景筛选检测
3	pHIS2-p53	pGAD53m	SD-TL	阳性对照

1.2 酵母感受态制备及转化方法

1. 从 YPDA 平板挑取 Y187 单菌落接种于 YPDA 液体培养基 4 ml, 30°C, 225 rpm, 振荡培养 18-20 h (过夜), 至 OD₆₀₀>1.5。
2. 转接 YPDA 液体培养基, 培养体积为 50 ml, 使初始 OD₆₀₀=0.2, 30°C, 225 rpm, 振荡培养 4-5 h, 至 OD₆₀₀=0.6。
3. 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min。
4. 用 20 ml 无菌水重悬菌体, 混匀, 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清。
5. 用 5 ml 0.1 M LiAc 重悬菌体, 混匀, 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清。
6. 用 500 ul 0.1 M LiAc 重悬菌体, 混匀, 分装至 1.5 ml 离心管, 每个 50 ul (每个转化), 备用。
7. 每个 1.5 ml 离心管中依次加入如下试剂, 用枪头吹打混匀, 或剧烈振荡 1 min 左右, 至完全混匀。

50%PEG3350	1 M LiAc	ssDNA(10 mg/ml)	质粒 DNA
240 ul	36 ul	5 ul	各 5 ul

8. 30°C水浴孵育, 30 min。
9. 42°C水浴热激, 25 min。
10. 30°C水浴复苏, 30 min。
11. 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清。

12. 每个转化用 200 ul 无菌水悬浮菌体，尽量温和地混匀，涂布相应的缺陷型筛选平板。
13. 30°C 恒温培养 4 天。

1.3 背景筛选检测

分别从转化反应的平板上各随机挑取 3 个单菌落，稀释后涂板至对应的不添加 histidine、添加不同浓度 (0、5、10、20、30、40、50、75、100 mM) 3AT 的缺陷型平板上，30°C 恒温培养 3 天。

反应	转化平板	检测平板	检测内容
pHIS2-A+pGADT7	SD-TL	SD-TLH+3AT	背景筛选检测
pHIS2-p53+pGAD53m	SD-TL	SD-TLH+3AT	阳性对照

3AT 是酵母 HIS3 蛋白合成的竞争性抑制剂，用于抑制 HIS3 基因的泄漏表达。

实验结果如下：

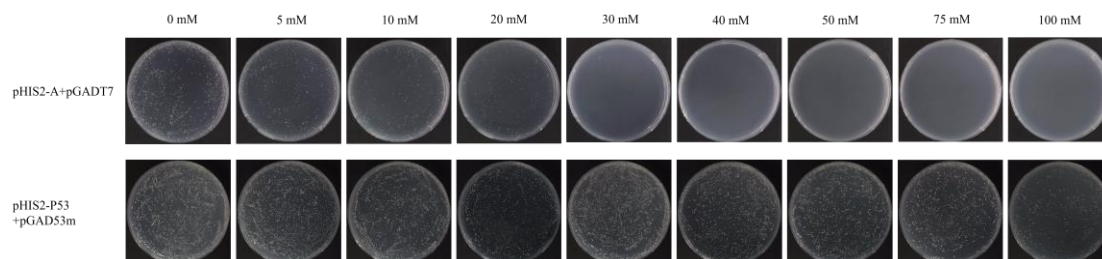


图 1. 背景筛选结果

阳性对照由于 HIS3 报告基因的激活，理论上在添加 3AT 抑制剂的平板上能正常生长不受影响，转化子数量与不添加 3AT 相同，但是实际观察到的生长值是比不添加 3AT 的平板约有 10% 的降低，并且随着 3AT 浓度增加，生长率会降低。

由背景筛选检测结果看出，在添加 75 mM 3AT 的平板上转化子生长没有菌落生长，显示未激活 HIS3 报告基因。

结论：选用 75 mM 3AT 进行后续筛库浓度。

第二部分 文库筛选

用含有正确 pHIS2-A 诱饵质粒的 Y187 酵母转化子作为受体菌制备感受态，将拟南芥 cDNA 文库质粒转入其中，涂 SD-TLH+75 mM 3AT 平板。

2.1 文库 DNA 转化方法

1. 从 SD-T 平板挑取单克隆菌种接于液体 SD-T 培养基 50 ml, 30°C, 225 rpm, 振荡培养 24 h。
2. 转接于 YPDA 液体 500 ml, 使初始 OD₆₀₀=0.2, 30°C, 225 rpm, 振荡培养 4-5 h, 至 OD₆₀₀=0.6。
3. 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min。
4. 用 30 ml 无菌水重悬菌体, 混匀, 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清。
5. 用 20 ml 0.1M LiAc 重悬菌体, 混匀, 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清。
6. 用 10 ml 0.1M LiAc 重悬菌体, 混匀, 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清。
7. 向离心管中依次加入如下试剂, 用枪头吹打混匀, 或剧烈振荡 1 min 左右, 至完全混匀。

50%PEG3350	1 M LiAc	ssDNA (10 mg/ml)	文库质粒 DNA
9.6 ml	1.44 ml	300 ul	25 ug

8. 30°C水浴孵育, 30 min。
9. 42°C水浴热激, 25 min。
10. 30°C水浴复苏 1 h。
11. 离心收菌, 室温, 4000 rpm, 5 min, 弃上清, 用 6 ml 无菌水重悬菌体, 尽量温和地混匀, 从中取 20 ul 培养物稀释后涂 SD-TL 平板, 用于检测文库转化效率。其余涂 SD-TLH+75 mM 3AT 共 20 块。
12. 30°C恒温培养 3-7 天, 观察菌落生长。

第三部分 筛库结果

待 SD-TLH+75 mM 3AT 筛库平板上长出的阳性转化子进行刮板, 做 NGS 筛选测序。测序结果见附件。

A	B	C	D	E	F
Gene ID	注释	序列	reads	kinase/TF	
AT1G01010.1	NAC domain conta	ATGGAGGAT	2	TF	
AT1G01030.1	AP2/B3-like trar	ATGGATCTA	1	TF	
AT1G01060.1	Homeodomain-like	ATGGATACT	44	TF	
AT1G01060.4	Homeodomain-like	ATGGATACT	22	TF	
AT1G01250.1	Integrase-type	DATGTCACCA	1	TF	
AT1G01260.1	basic helix-loop	ATGAATATT	1	TF	
AT1G01520.1	Homeodomain-like	ATGGTGACT	26	TF	
AT1G01720.1	NAC (No Apical	MATGTCAGAA	25	TF	
AT1G02030.1	C2H2-like zinc	fATGGAAGAG	1	TF	
AT1G02220.1	NAC domain conta	ATGGAAACT	1	TF	
AT1G02340.1	basic helix-loop	ATGTCCAAT	5	TF	
AT1G03040.1	basic helix-loop	ATGGCTAAT	9	TF	
AT1G03800.1	ERF domain prote	ATGACCACA	1	TF	
AT1G03970.1	G-box binding fa	ATGGCGTCC	4	TF	
AT1G04990.1	Zinc finger C-x	ATGCGAACC	1	TF	
AT1G04990.2	Zinc finger C-x	ATGCGAACC	1	TF	
AT1G05230.4	homeodomain	GLAEATGTTGAG	15	TF	
AT1G05710.5	basic helix-loop	ATGGAATTC	6	TF	
AT1G05805.1	basic helix-loop	ATGTACCAA	1	TF	
AT1G06040.1	B-box zinc finge	ATGAAGATA	97	TF	
AT1G06040.2	B-box zinc finge	ATGAAGATA	4	TF	
AT1G06070.1	Basic-leucine zi	ATGGATAAC	3	TF	
AT1G06180.1	myb domain prote	ATGGGGAGA	2	TF	
AT1G06850.1	basic leucine-zi	ATGGAGAAA	2	TF	
AT1G06910.1	TRF-like 7	ATGGCACTC	3	TF	
AT1G07980.1	nuclear factor	YATGGTGTCC	15	TF	
AT1G08000.2	GATA transcripti	ATGAATTGC	1	TF	
AT1G08010.1	GATA transcripti	ATGAATTGC	5	TF	
AT1G08320.1	bZIP transcripti	ATGGCGAAC	6	TF	

南京瑞源生物产品线一览图

