



南京瑞源生物

实 验 报 告

酵母双杂交筛选

订单号: _____

客 户: _____

日 期: _____

酵母双杂交筛选 pGBKT7-A 的相互作用蛋白实验报告

目的:

发现与 pGBKT7-A 相互作用的蛋白。

方法:

以构建到 pGBKT7 载体上的 A 基因为诱饵, 筛选酵母双杂交拟南芥文库, 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 pGBKT7-A 相互作用的蛋白。

材料:

1. 诱饵克隆: pGBKT7-A
2. 诱饵载体: pGBKT7
3. 文库质粒: 拟南芥 cDNA 文库
4. Clontech 酵母双杂交系统
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;

SD-TLHA: -trp, -leu, -his, -ade。

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 AH109 中及其自激活检测

1.1 酵母转化

将以下质粒分别转入 AH109 中:

Reaction	BD plasmid	AD plasmid	转化平板	备注
1	pGBKT7-A	——	SD-T	筛库备用
2	pGBKT7-A	pGADT7	SD-TL	自激活检测
3	pGBKT7-p53	pGADT7-largeT	SD-TL	阳性对照
4	pGBKT7-laminC	pGADT7-largeT	SD-TL	阴性对照

1.2 酵母感受态制备及转化方法

1. 从 YPDA 平板挑取 AH109 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 d。

1.3 自激活检测

从 pGBKT7-A+pGADT7 共转 AH109 长出的酵母转化子随机各挑取了 8 个单菌落进行 PCR 检测并保菌。从 PCR 检测正确的单菌落中随机各挑取 3 个点在 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X- α -gal 平板上，30°C 培养 3-5 d。

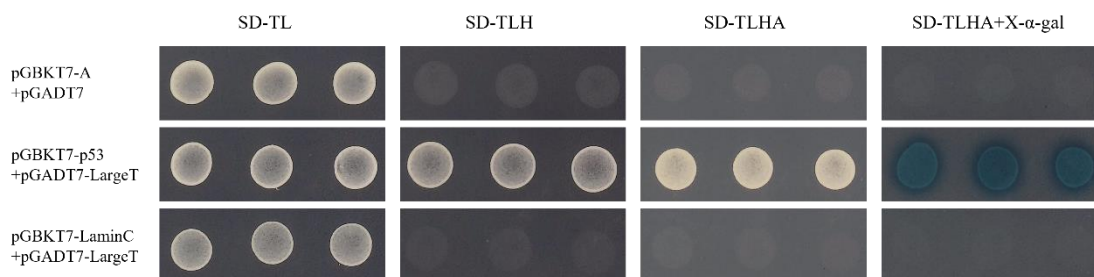


图 1. 自激活检测结果

注：(+) 为阳性对照 pGBKT7-p53+pGADT7-largeT

(-) 为阴性对照 pGBKT7-laminC+pGADT7-largeT

从图中可得，阳性对照能在 SD-TL、SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X- α -gal 平板上生长，并能在 SD-TLHA+X- α -gal 平板上显蓝色。阴性对照在 SD-TL 平板上生长，在 SD-TLH、SD-TLHA、SD-TLHA+X- α -gal 平板上不生长。实验组与阴性对照生长一致。

结论：pGBKT7-A+pGADT7 无自激活现象。

第二部分 文库筛选

用含有正确 pGBKT7-A 诱饵质粒的 AH109 酵母菌株作为受体制备感受态，将拟南芥 cDNA 文库质粒转入其中，涂 SD-TLH 筛选平板。

2.1 文库 DNA 转化方法：

1. 从 SD-T 平板挑取单菌种接于液体 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 0.1 M LiAc 重悬菌体，混匀，离心收菌，室温，4000 rpm，5 min，弃上清。
6. 用 10 ml 0.1 M 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，共 20 块。
12. 30°C恒温培养 3-7 d，观察菌落生长。

第三部分 筛库结果

待 SD-TLH 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。

1	Gene ID	注释	序列	reads	kinase/TF
869	AT5G64220.1	Calmodulin-bindin	ATGGCGGAT	2	TF
870	AT5G64530.1	xylem NAC domain	ATGAATCTA	1	TF
871	AT5G65050.2	AGAMOUS-like 31	ATGGGTAGA	1	TF
872	AT5G65050.3	AGAMOUS-like 31	ATGGGTAGA	56	TF
873	AT5G65060.1	K-box region anc	ATGGGAAGA	7	TF
874	AT5G65060.2	K-box region anc	ATGGGAAGA	1	TF
875	AT5G65080.1	K-box region anc	ATGTGTCCG	3	TF
876	AT5G65210.5	bZIP transcripti	ATGAATTCC	12	TF
877	AT5G65210.6	bZIP transcripti	ATGTTCCGAT	3	TF
878	AT5G65310.1	homeobox proteir	ATGAAGAGA	4	TF
879	AT5G65310.2	homeobox proteir	ATGATTTTA	2	TF
880	AT5G65410.1	homeobox proteir	ATGGAGTTI	6	TF
881	AT5G65590.1	Dof-type zinc fi	ATGTCCTCC	1	TF
882	AT5G66320.1	GATA transcripti	ATGGAACAA	1	TF
883	AT5G66730.1	C2H2-like zinc f	ATGCCGGTI	3	TF
884	AT5G67060.1	basic helix-loop	ATGGATTCT	1	TF
885	AT5G67110.1	basic helix-loop	ATGGGTGAT	4	TF
886	AT5G67180.1	target of early	ATGTGGAAC	2	TF
887	AT5G67190.1	DREB and EAR mot	ATGGAAGGC	24	TF
888	AT5G67300.1	myb domain prote	ATGGCTGAT	8	TF
889	AT5G67420.1	LOB domain-conta	ATGAGCTGC	14	TF
890	AT5G67450.1	zinc-finger prot	ATGGCTCTC	1	TF
891	AT5G67580.1	Homeodomain-like	ATGGGTGCA	7	TF
892	AT1G01140.1	CBL-interacting	ATGAGTGGA	19	kinase
893	AT1G01220.1	L-fucokinase/GDF	ATGTCTAAC	1	kinase
894	AT1G01450.1	Protein kinase s	ATGGCTGAT	1	kinase
895	AT1G01540.2	Protein kinase s	ATGTCGGTC	3	kinase
896	AT1G01740.1	Protein kinase p	ATGGGAGGI	1	kinase
897	AT1G01740.2	Protein kinase p	ATGGGAGGI	5	kinase
898	AT1G02880.3	thiamin pyrophos	ATGTCAGCC	6	kinase
899	AT1G02880.4	thiamin pyrophos	ATGGATTCT	1	kinase
900	AT1G02970.1	WEE1 kinase homc	ATGTTCCGAC	1	kinase
901	AT1G03080.1	kinase interacti	ATGACTGCT	21	kinase
902	AT1G03920.1	Protein kinase f	ATGGATTCT	2	kinase
903	AT1G03930.1	dual specificity	ATGGATCTI	2	kinase
904	AT1G04210.1	Leucine-rich rep	ATGGATTCC	8	kinase
905	AT1G04440.1	casein kinase li	ATGGATCGI	5	kinase
906	AT1G05100.1	mitogen-activate	ATGAATTGC	1	kinase
907	AT1G06020.1	pfkB-like carboh	ATGGCATCA	1	kinase

NGS分析结果表



南京瑞源生物产品线一览图

