

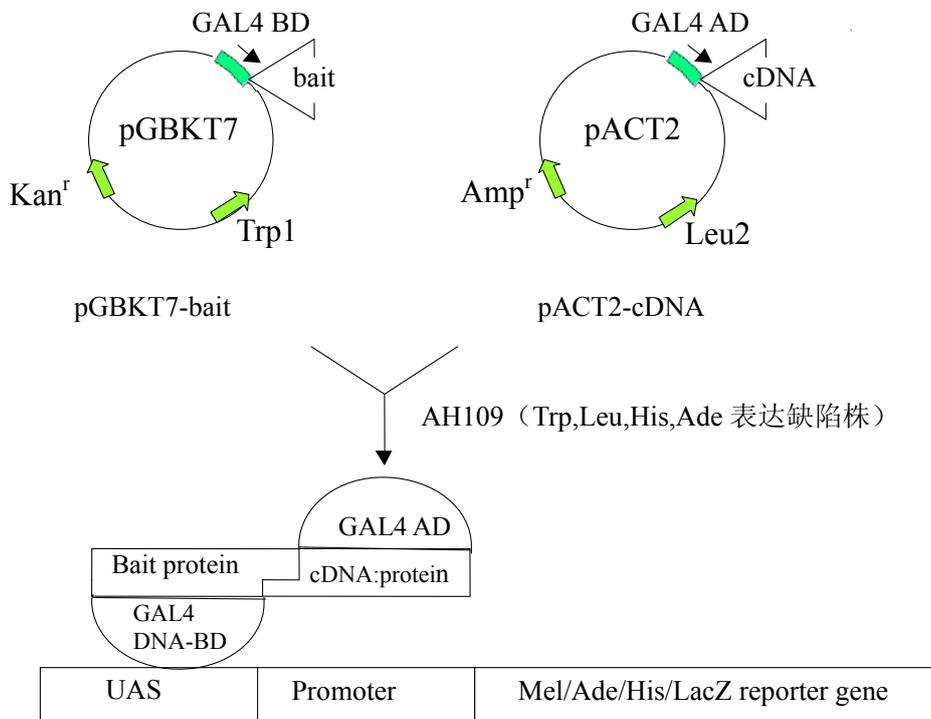
蛋白的酵母双杂交实验

——以诱饵蛋白筛选 cDNA 文库研究蛋白相互作用

第一部分 系统简介

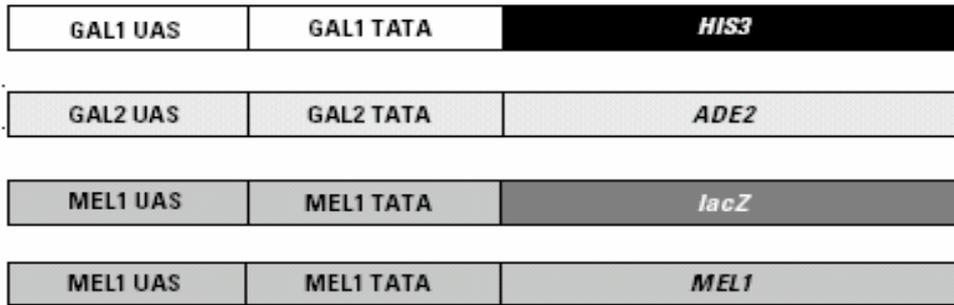
1. 实验原理

蛋白的酵母双杂交实验是以酵母的遗传分析为基础,研究反式作用因子之间的相互作用对真核基因转录调控影响的实验。很早就已知道,转录活化蛋白可以和 DNA 上特异的序列结合而启动相应基因的转录反应。这种 DNA 结合与转录激活的功能是由转录活化蛋白上两个相互独立的结构域即 DNA 结合结构域(Binding Domain, BD)和转录活化结构域(Activation Domain, AD)分别来完成的,并且这两个结构域对于基因的转录活化都是必须的。目前酵母双杂交实验采用的系统有 LexA 系统和 Gal4 系统两种。在 LexA 系统中, DNA 结合结构域由一个完整的原核蛋白 LexA 构成,转录活化结构域则由一个 88 个氨基酸的酸性的大肠杆菌多肽 B42 构成,它在酵母中可以活化基因的转录;在 Gal4 系统中, BD 和 AD 分别由 Gal4 蛋白上不同的两个结构域(1-147aa 与 768-881aa)构成。在利用 GAL4 系统筛选 cDNA 文库或研究蛋白间的相互作用时, DNA 结合结构域与靶蛋白即“诱饵”相结合,转录活化结构域与文库蛋白或要验证的蛋白相结合。一般情况下,单独的 BD 可以与 GAL4 上游活化序列(GAL UAS)结合但不能引起转录,单独的 AD 则不能与 GAL UAS 结合,只有当 BD 与 AD 分别表达的融合蛋白由于相互作用而导致两者在空间上相互靠近时, BD 与 AD 才能与 GAL UAS 结合并且引起报道基因的转录。在 BD 与 AD 要导入的酵母菌 AH109 中,通过基因工程的方法在 GAL4 UASs 和启动子的下游构建了 3 个报道基因——ADE2, HIS3, MEL1 (或 LacZ),因此可以通过营养缺陷筛选和酵母菌表型的改变来筛选或验证两个蛋白之间是否存在相互作用。GAL4 系统的原理如图所示:



图一: 酵母双杂交系统工作原理

AH109 Constructs

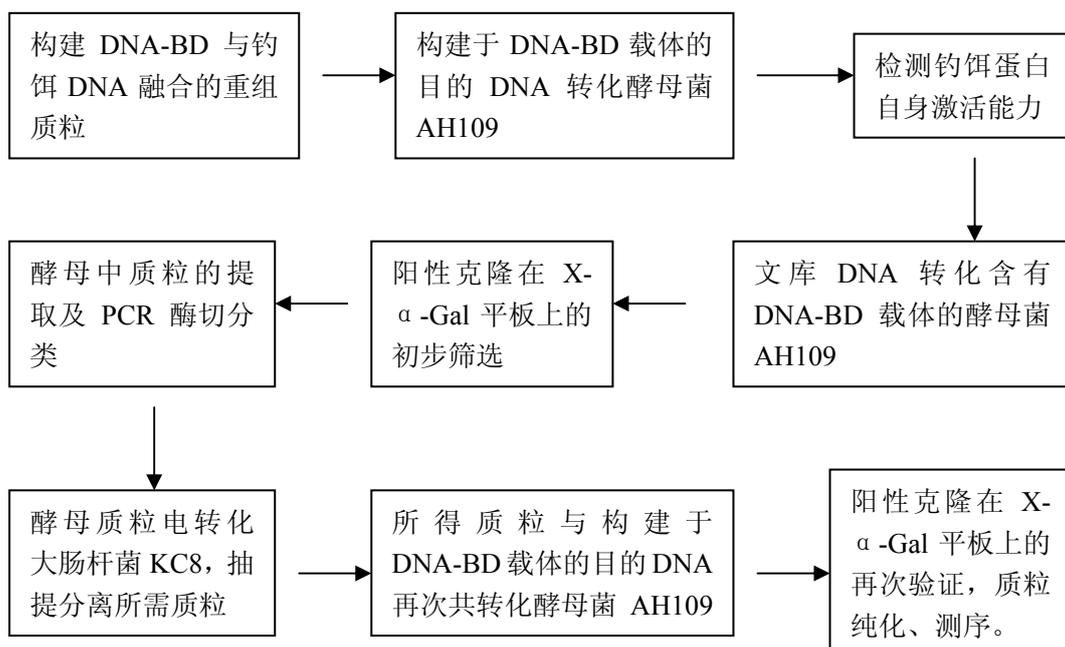


2. 系统特点

同以往研究蛋白质—蛋白质之间相互作用的实验手段相比，双杂交系统具有其独特优势。首先，融合体蛋白之间的相互作用是在真核酵母细胞内进行，蛋白质有可能保持天然的折叠状态，类似其在体内生理状态下的情况，这是其他离体生化检验方法所缺乏的，因此较之后者，它所证实的蛋白质间相互作用将更接近于在体的真实水平。其次，双杂交系统的敏感度即高，可以检测到在蛋白质之间结合常数低至 1mmol/L 左右的微弱作用。许多微弱或短暂的蛋白质之间的相互作用可以借助报道基因表达过程中的多级放大效应反映出来；融合蛋白基因在强启动子的作用下，处于较高的表达水平。第三，在筛选 cDNA 文库时，双杂交系统能够简捷地得到编码相互作用蛋白的基因序列，它只需构建质粒而不必准备抗体或纯化蛋白，省略了其它体外检测蛋白之间相互作用方法所必须的蛋白抽提、纯化等繁琐步骤。

需要指出的是，融合体蛋白必须转运至核内才能活化转录，因此对于胞外配体—受体作用以及需要核外修饰或受磷酸化等翻译后修饰过程介导的蛋白质间相互作用而言，该系统的应用受到一些限制。在进行文库筛选时，假阳性结果常常干扰实验的准确性，除某些文库编码的蛋白质本身含有转录活化成分外，细胞内的其它无关蛋白也可能有类似作用，因此双杂交系统检测的结果必须通过其它蛋白间相互作用的实验来进一步验证。

3. 酵母双杂交 GAL4 系统筛选 cDNA 文库实验流程



4. GAL 系统所用酵母菌株与载体

1). GAL 系统所用酵母菌株

TABLE II. MATCHMAKER YEAST STRAIN GENOTYPES		
Strain	Genotype	References
AH109	<i>MATα</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2</i> , <i>URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	James <i>et al.</i> , 1996; A. Holtz, unpublished
Y187	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4Δ</i> , <i>met⁻</i> , <i>gal80Δ</i> , <i>URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993
CG-1945	<i>MATα</i> , <i>ura3-52</i> , <i>his3-200</i> , <i>ade2-101</i> , <i>lys2-801</i> , <i>trp1-901</i> , <i>leu2-3</i> , <i>112</i> , <i>gal4-542</i> , <i>gal80-538</i> , <i>cyh2</i> , <i>LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3</i> , <i>URA3 :: GAL4_{17-mer(x3)}-CYC1_{TATA}-lacZ</i>	Feilotter <i>et al.</i> , 1994; C. Giroux, pers. comm.

注：菌株 AH109 可利用所带的 HIS3、ADE2、MEL1 三个报道基进行筛库。

菌株 Y187 可利用所带的 lacZ 报道基因来验证两个已知蛋白间的相互作用。

菌株 CG-1945 可被用于用环己酰亚胺来分离 BD-bait 和 AD-library 质粒。

TABLE III. MATCHMAKER YEAST STRAIN PHENOTYPES								
Strain	SDI-Ade	SDI-Met	SDI-Trp	SDI-Leu	SDI-His	SDI-Ura	YPDA	YPD/CHX
AH109	-	+	-	-	-	+	+	-
Y187	-	-	-	-	-	+	+	-
CG-1945	-	+	-	-	-	+	+	+

2). GAL 系统所用各种质粒

TABLE IV. MATCHMAKER TWO-HYBRID SYSTEM 3 VECTORS				
	Fusion	Epitope ^a	Yeast selection	Bacterial selection
Cloning vectors				
pGBKT7	DNA/bait	c-Myc	<i>TRP1</i>	kanamycin
pGADT7	AD/library	HA	<i>LEU2</i>	ampicillin
Control vectors				
pCL1	GAL4		<i>LEU2</i>	ampicillin
pGADT7-T	AD/T-antigen	HA	<i>LEU2</i>	ampicillin
pGBKT7-53	DNA-BD/p53	c-Myc	<i>TRP1</i>	kanamycin
pGBKT7-Lam	DNA-BD/lamin C	c-Myc	<i>TRP1</i>	kanamycin

^aHA = hemagglutinin

第二部分 实验流程

构建于 AD 载体的 cDNA 文库的扩增

一. 培养基:

LB 液体培养基, 121°C, 15 lbf/in² 灭菌 15min

A. bacto-Tryptone	10.0g
B. bacto-Yeast Extract	5.0g
C. NaCl	5.0g
D. 5N NaOH 调 pH →	7.0
<hr/>	
E. ddH ₂ O →	1000.0 ml

* LB 固体培养平板为含有 1.8% 琼脂 (Agar) 的 LB 培养基

LB/Amp 培养基为含有 Amp 100 ug/ml (高压后冷却到 50°C 加入) 的 LB 培养基

二. 实验步骤:

1. 自-70°C 冰箱取出含有 DNA 文库的甘油菌, 置于冰浴中缓慢化冻;
2. 用新鲜的 LB 培养液在 1.5ml 离心管中将上述甘油菌 1:10⁶ 和 1:10⁸ 稀释;
3. 取稀释菌液各 10ul 加入 90ul LB 培养液在 1.5ml 离心管中振荡混匀, 涂布 LB/Amp 平板(φ 90mm); 37°C 倒置培养过夜或 30°C 培养 24-36hr, 计数平板上单克隆菌落数;
4. 确定待扩增的 DNA 文库滴度(cfu/ml)=克隆数×10⁸(1:10⁶ 稀释)或克隆数×10¹⁰(1:10⁸ 稀释);
5. 按照>2-4×10⁴cfu/平板的浓度, 涂布 LB/Amp 平板(φ 150mm), 共 100 块; 37°C 倒置培养过夜;
6. 在超净台上, 将所有生长菌落的平板上加适量 LB 培养液, 将菌落刮下, 转入 2000ml LB/ Amp 培养液中, 37°C 振荡培养 2-4hr;
7. 留取适量培养菌液以 50% 无菌甘油稀释至 25% 终浓度, 分装, 保存于-70°C;
8. 其余培养菌液 8000rpm×10min, 4°C, 收集细菌; 用质粒 DNA 纯化试剂盒大量抽提质粒 DNA。

构建于 AD 载体的 cDNA 文库的纯化

一. 试剂:

质粒 DNA 提取缓冲液

名称	缓冲液	配 方
P1	悬浮缓冲液	50mM Tris-Cl,pH8.0; 10mM EDTA; 100ug/ml RNase A
P2	裂解缓冲液	200mM NaOH; 1%SDS
P3	中和缓冲液	3.0M KAc,pH5.5
QBT	平衡缓冲液	750mM NaCl; 50mM MOPS,pH7.0; 15%异丙醇; 0.15% TritonX-100
QC	洗涤缓冲液	1.0M NaCl; 50mM MOPS,pH7.0; 15%异丙醇
QF	洗脱缓冲液	1.25M NaCl; 50mM Tris-Cl, pH8.5; 15%异丙醇

二. 实验步骤:

1. 培养菌液离心 6000 rpm×10min, 4℃,每 500ml 的培养物的沉淀重悬于 50ml P1 缓冲液;
2. 加入 50ml P2 缓冲液, 倒置 4-6 次混匀, 室温孵育 5min;
3. 加入 4℃预冷的 50ml P3 缓冲液, 快速倒置 4-6 次混匀, 冰浴 30min (其间再倒置混匀 4-6 次);
4. 将上述混合液再倒置混匀, 离心 12000rpm× 30min, 4℃, 保留上清;
5. 上清再离心 12000rpm× 15min, 4℃, 留上清;
6. 将上清液上样于经 35mlQBT 缓冲液平衡的 QIAGEN-tip 层析柱;
7. 以 100ml QC 缓冲液洗涤层析柱 2 次;
8. 以 35ml QF 缓冲液洗脱吸附于层析柱上的 DNA;
9. 以 0.7 倍体积异丙醇沉淀 DNA, 离心 12500 rpm × 30min, 4℃, 小心去除上清;
10. 以 7ml 70%乙醇洗涤沉淀 DNA, 离心 12500 rpm × 10min, 4℃, 小心去除上清;
11. 将沉淀的质粒 DNA 溶于 5ml TE, pH8.0 缓冲液, 转移至新的无菌离心管中, 用 2.5 倍体积无水乙醇; 1/10 体积 3.0M NaAc, pH5.2, 于-20℃静置过夜;
12. 离心 12500rpm × 20min, 4℃,去除上清, 沉淀用 70%乙醇洗涤, 超净台风干;
13. 干燥的 DNA 溶于适量体积 TE, 定量, 分装 100-200ug/管(用于 1 次转化反应, 约 40ul), 保存于-20℃。

pGBKT7/bait 小规模转化酵母菌 AH109

一. 试剂:

1. 培养基:

YPDA 液体培养基, (121°C, 灭菌 15min)

A. YPD (Clontech 公司)	15.0g
B. 0.2%Adenine	4.5ml
<hr/>	
C. ddH ₂ O →	300.0 ml

SD/-Trp 固体培养基, (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司)	4.67g
B. 10 × DO (-Leu-Trp) (Clontech 公司)	10.0 ml
C. 20 × Leu	5.0 ml
<hr/>	
D. ddH ₂ O →	100.0 ml 铺 5 块平板(90-100mm)

2. 其它贮备液:

50% PEG 4000 (Sigma 公司, wt.=3,350), 用前抽滤或高压蒸汽灭菌;

100% DMSO (Sigma 公司);

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

10 × LiAc: 1M LiAc 用乙酸调 pH7.5, 高压蒸汽灭菌;

10 × Dropout/ -Trp-Leu 溶液: 3.2 g DO Supplement(-Leu-Trp) 溶于 500ml ddH₂O 中;

20 × Leu: 200 mg L-Leucine (Sigma 公司)溶于 100ml ddH₂O 中;

0.2%Adenine: 0.2g Adenine Hemisulfate Salt(Sigma 公司)溶于 100ml ddH₂O 中;

ddH₂O: 高压蒸汽灭菌;

二. 实验步骤:

1. 从 YPDA 平板上挑取生长 1-3 周、直径 2-3 mm 的 AH109 单克隆, 接入 1 ml YPDA 液体培养基中, **振荡**打散菌落, 然后接入 50 ml YPDA 液体培养基中, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养过夜 (16-18hr), 至 OD₆₀₀>1.5;
2. 取适量过夜菌液接种于 300 ml 新鲜的 YPDA 液体培养基, 至 OD₆₀₀=0.2-0.3, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养至 OD₆₀₀=0.4-0.6 (约 3hr);

3. 室温离心 2500rpm × 5min, 弃上清; 加入 25-50 ml ddH₂O 或 TE 重悬洗涤酵母沉淀细胞, 离心弃上清, 重复洗涤一次, 沉淀用 1.5 ml 1×TE/LiAc 重悬后, 即为酵母感受态细胞 (若仅用于转染质粒, 则可置于 4°C 可几天内使用);

4. 准备下列试剂:

	2×转化反应	10 × TE	10 × LiAc	50% PEG	ddH ₂ O
A. 1×TE/LiAc	1.50 ml	150 ul	150 ul	/	1.20 ml
B. PEG/LiAc	1.20 ml	120 ul	120 ul	960ul	/
C. 1×TE	1.00 ml	100 ul	/	/	900ul

5. 分装待转化的质粒 DNA, 振荡混匀:

pGBKT7-bait 0.1ug

Sperm DNA*(10 mg/ml) 0.1mg

*Sperm DNA 新配制时水浴煮沸 20 分钟, 立即插入冰浴, 保存于-20°C

6. 每管加入 100ul 用 1×TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞, 振荡混匀;
7. 各加入 600ul PEG/LiAc, **剧烈**振荡 (提高转化效率), 30°C 恒温, 200rpm 振荡培养 30min;
8. 各加入 70ul DMSO, 缓缓倒置混匀(**不能振荡**), 42°C 水浴热休克 15min, 迅速插入冰浴冷却 1-2min;
9. 室温离心 14,000rpm × 5sec, 尽量弃尽上清, 以 0.5 ml 1×TE 重悬沉淀细胞, 取 100ul 涂布 SD/ -Trp 固体培养板, 30°C 倒置培养 3 天待菌落长出。

钓饵蛋白自身激活报道基因的活性检测

—pGBKT7/bait 与 pACT2 小规模共转化酵母

一. 试剂:

1. 培养基:

YPDA 液体培养基, (121°C, 灭菌 15min)

A. YPD (Clontech 公司) 15.0g

B. 0.2%Adenine 4.5ml

C. ddH₂O → 300.0 ml

SD/-Trp-Leu 固体培养基, (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司) 4.67g

B. 10 × DO (-Leu-Trp) (Clontech 公司) 10.0 ml

C. ddH₂O → 100.0 ml 铺 5 块平板(90-100mm)

SD/-Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X-α -GAL 固体培养基 (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司) 4.67g

B. 10 × DO (-Leu-Trp-His-Ade) (Clontech 公司) 10.0 ml

C. ddH₂O → 100.0 ml

121°C, 灭菌 15min, 冷却到 50°C 加入适量 5M 3-AT (至终浓度 15mM) 与 100ul X-α -GAL (20mg/ml), 铺 5 块平板(90-100mm);

2. 其它贮备液:

50% PEG 4000 (Sigma 公司, wt.=3,350), 用前抽滤或高压蒸汽灭菌;

100% DMSO (Sigma 公司);

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

10 × LiAc: 1M LiAc 用乙酸调 pH7.5, 高压蒸汽灭菌;

10 × Dropout/ -Trp-Leu 溶液: 3.2 g DO Supplement(-Leu-Trp) 溶于 500ml ddH₂O 中;

10 × Dropout/ -Trp-Leu-His-Ade 溶液: 3.0 g DO Supplement (-Trp-Leu-His-Ade)溶于 500ml ddH₂O 中;

0.2%Adenine: 0.2g Adenine Hemisulfate Salt(Sigma 公司)溶于 100ml ddH₂O 中;

3-AT (5M) : 4.202g 3-AT 溶于 10ml ddH₂O, 温水浴(<50°C)溶解, 无菌滤器过滤后分装 10 个 EP 管, -20°C 保存;

X-α -GAL(20mg/ml): 25mg X-α -GAL 溶于 1.25ml DMF 中;

dddH₂O: 高压蒸汽灭菌;

二. 实验步骤:

1. 从 YPDA 平板上挑取生长 1-3 周、直径 2-3 mm 的 AH109 单克隆, 接入 1 ml YPDA 液体培养基中, 振荡打散菌落, 然后接入 50 ml YPDA 液体培养基中, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养过夜 (16-18hr), 至 $OD_{600} > 1.5$;
2. 取适量过夜菌液接种于 300 ml 新鲜的 YPDA 培养基中, 至 $OD_{600} = 0.2-0.3$, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养至 $OD_{600} = 0.4-0.6$ (约 3hr);
3. 室温离心 2500rpm \times 5min, 弃上清; 加入 25-50 ml ddH₂O 或 TE 重悬洗涤酵母沉淀细胞, 离心弃上清, 重复洗涤一次, 沉淀用 1.5 ml 1 \times TE/LiAc 重悬后, 即为酵母感受态细胞;
4. 准备下列试剂:

	3 \times 转化反应	10 \times TE	10 \times LiAc	50% PEG	ddH ₂ O
A. 1 \times TE/LiAc	1.50 ml	150 ul	150 ul	/	1.20 ml
B. PEG/LiAc	2.00 ml	200 ul	200 ul	1.6ml	/
C. 1 \times TE	1.00 ml	100 ul	/	/	900 ul

5. 分装待转化的质粒 DNA, 振荡混匀:

实验组	阳性对照	阴性对照	用量
pGBKT7-bait	pGBKT7-53	pGBKT7-lam	0.2 ug
pACT2	pGADT7-T	pGADT7-T	0.1 ug
Sperm DNA*(10 mg/ml)			0.1 mg

*Sperm DNA 新配制时水浴煮沸 20 分钟, 立即插入冰浴, 保存于 -20°C
6. 每管加入 100ul 用 1 \times TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞, 振荡混匀;
7. 各加入 600ul PEG/LiAc, **剧烈**振荡 (提高转化效率), 30°C 恒温, 200rpm 振荡培养 30min;
8. 各加入 70ul DMSO, 缓缓倒置混匀(**不能振荡**), 42°C 水浴热休克 15min, 迅速插入冰浴冷却 1-2min;
9. 室温离心 14,000rpm \times 5sec, 尽量弃尽上清, 各以 0.1 ml 1 \times TE 重悬沉淀细胞, 涂布 SD/ -Trp-Leu 固体培养板, 30°C 倒置培养 3 天;
10. 挑取菌落点种于 SD/ -Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X- α -GAL 平板, 30°C 倒置培养 1-2 天。实验组菌落若无生长, 说明钓饵无自身激活能力; 实验组菌落若生长且变蓝, 说明钓饵有自身激活能力。

文库质粒大规模转化已携带钓饵质粒的酵母

一. 试剂:

1. 培养基:

SD/-Trp 液体培养基 (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Base (Clontech 公司)	1.335g
B. 10 × DO (-Leu-Trp) (Clontech 公司)	5.0 ml
C. 20 × Leu	2.5 ml
<hr/>	
D. ddH ₂ O →	50.0ml

YPDA 液体培养基 (121°C, 灭菌 15min)

A. YPD (Clontech 公司)	15.0g
B. 0.2%Adenine	4.5ml
<hr/>	
C. ddH ₂ O →	300.0 ml

SD/-Trp-Leu 固体培养基 (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司)	32.69g
B. 10 × DO (-Leu-Trp) (Clontech 公司)	70.0 ml
<hr/>	
C. ddH ₂ O →	700.0 ml × 5 铺 10×5 块平板 (150mm)

2. 其它贮备液:

50% PEG 4000 (Sigma 公司, wt.=3,350), 用前抽滤或高压蒸汽灭菌;

100% DMSO (Sigma 公司);

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

10 × LiAc: 1M LiAc 用乙酸调 pH7.5, 高压蒸汽灭菌;

10 × Dropout/ -Trp-Leu 溶液: 3.2g DO Supplement (-Leu-Trp) 溶于 500ml ddH₂O 中;

20 × Leu: 200 mg L-Leucine 溶于 100ml ddH₂O 中;

0.2%Adenine: 0.2g Adenine Hemisulfate Salt(Sigma 公司)溶于 100ml ddH₂O 中;

ddH₂O: 高压蒸汽灭菌;

二. 实验步骤:

1. 从 SD/-Trp 平板上挑取直径 2-3 mm、携带 pGBKT7-bait 质粒(小规模转化)的 AH109 单克隆, 接入 1 ml SD/-Trp 液体培养基中, **振荡**打散菌落, 然后接入 50 ml SD/-Trp 液体培养基中, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养过夜 (16-18hr), 至 OD₆₀₀>1.5;
2. 取适量过夜菌液接种于 300 ml 新鲜的 YPDA 培养基, 至 OD₆₀₀=0.2-0.3, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养至 OD₆₀₀=0.4-0.6 (约 3hr);
3. 室温离心 5000rpm × 5min, 弃上清, 加入 25-50 ml ddH₂O 或 TE 重悬洗涤酵母沉淀

细胞，离心弃上清，重复洗涤一次，沉淀用 1.5 ml 1×TE/LiAc 重悬后，即为酵母感受态细胞；

4. 准备下列试剂：

		10 × TE	10 × LiAc	50% PEG	ddH ₂ O
1×TE/LiAc	1.50 ml	150 ul	150 ul	/	1.20 ml
PEG/LiAc	10 ml	1.0ml	1.0ml	8.0ml	/
1×TE	10 ml	1.0ml	/	/	9.0ml

5. 取 1ml 用 1.5 ml 1×TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞，加入以下成分，振荡混匀：

cDNA 文库质粒 100ug
 10 mg/ml Sperm DNA* 200ul
 *Sperm DNA 新配制时水浴煮沸 20 分钟，立即插入冰浴，保存于-20°C

6. 加入 6ml PEG/LiAc, **剧烈**振荡(提高转化效率), 30°C 恒温, 200rpm 振荡培养 30min;

7. 加入 700ul DMSO, 缓缓倒置混匀(**不能振荡**), 42°C 水浴热休克 15min(间歇轻柔混匀), 迅速插入冰浴冷却 1-2min;

8. 室温离心 2500rpm × 5min, 尽量弃尽上清, 以 10ml 1×TE 重悬沉淀细胞, 取 200 ul 涂布 φ 150mm 的 SD/ -Trp-Leu 固体培养板 (共 50 块), 同时取 12ul 菌液加 108ul 1×TE 后作 1:10, 1:10², 1:10³ 稀释, 涂布 3 块 φ 90mm 的 SD/ -Trp-Leu 固体培养板 (用于计算转化效率), 30°C 倒置培养 3-5 天。

附表 不同规模转化酵母感受态细胞

	小规模	大规模	库规模
1. YPDA 或 SD 液体培养基扩增酵母	50ml	50ml	150ml
2. YPDA 液体培养基扩增酵母菌	300ml	300ml	1000ml
3. TE 或 ddH ₂ O 洗涤酵母细胞	25-50ml	25-50ml	500ml
4. 准备 A. 1×TE/LiAc	1.50 ml	1.50ml	8.0ml
B. PEG/LiAc	10ml	10ml	100ml
C. 1×TE	0.5ml	1ml 或 10ml	10ml
5. 分装 A.DNA-BD vector	0.1ug	20-100ug	0.2-1.0mg
B.AD vector	0.1ug	10-50ug	0.1-0.5mg
C.Sperm DNA(10mg/ml)	10ul	200ul	2.0ml
6. 1×TE/LiAc 重悬感受态细胞	1.5ml	1.0ml	8.0ml
酵母感受态细胞	100ul×20	1.0ml	8.0ml
7. 加 PEG/LiAc, 剧烈振荡	0.6ml×20	6.0ml	60.0ml
8. 加 DMSO, 轻柔混匀	70ul×20	700ul	7.0ml
9. 室温离心后弃上清	14000rpm×5sec	2500rpm×5min	2500rpm×5min
10. 1×TE 重悬感受态细胞	0.1ml×20	6.0ml	10.0ml
铺固体选择培养基平板	φ 90mm×20	φ 150mm×50	φ 150mm×50

- 注：小规模转化用于：
- (1) 检验 DNA-BD/bait 有无自身激活报道基因的能力；
 - (2) 观测 DNA-BD/bait 对宿主的毒性作用；
 - (3) 对照实验；
 - (4) 筛库前先转入 DNA-BD/bait；

大规模、库规模转化用于：转入文库质粒或同时转化两种质粒筛库；

转化子的筛选与库质粒纯化

一. 培养基：

SD/-Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X- α -GAL 固体培养基 (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司)	4.67g
B. 10 × DO (-Leu-Trp-His-Ade) (Clontech 公司)	10.0 ml
<hr/>	
C. ddH ₂ O →	100.0 ml

121°C, 灭菌 15min, 冷却到 50°C 加入适量 5M 3-AT (至终浓度 15mM) 与 100ul X- α -GAL(20mg/ml), 铺 5 块平板(90-100mm)

65%甘油-硫酸镁缓冲液

A. 甘油	65ml
B. Mg ₂ SO ₄ · 2H ₂ O	2.465g
C. 2.0M Tris · HCl	1.25ml
<hr/>	
D. ddH ₂ O →	100.0ml

二. 实验步骤：

1. 选择菌落数 30-300 的滴度平板计算转化效率与克隆总数：

假设 100ug 库质粒转化时重悬菌液 10ml, 以 100ul 菌液涂布的 1:100 的滴度板上菌落数 100, 则：

$$\text{转化效率: } \frac{100 \text{ cfu}}{100 \mu\text{l} \times 0.01} \times \frac{(10 \text{ ml} \times 10^3 \mu\text{l/ml})}{100 \mu\text{g}} = 1 \times 10^4 \text{ cfu}/\mu\text{g}$$

$$\text{克隆总数: } 1 \times 10^4 \text{ cfu} \times 100 \mu\text{g} = \mathbf{1 \times 10^6 \text{ clones screened.}}$$

2. 筛库要求克隆总数超过文库克隆数 (胎肝库为 1.6×10^6 克隆) 的十倍；若克隆总数低于 10^6 则需重新转化；
3. 将平板移至 4°C 冰箱，固化琼脂 3-4 小时；

4. 超净台中，向每块平板滴加 5ml 1×TE，用涂布棒刮下菌落，收集于 50ml 离心管；
5. 室温离心 2500rpm×5min，弃上清。用无菌双蒸水反复洗涤 3-5 次；
6. 保存菌种：每管取 0.5ml 菌液与 0.5ml 65%甘油·硫酸镁混匀，-70℃ 冻存；
7. 取适量菌液（使克隆总数达文库滴度的 5-10 倍），涂布 SD/ -Trp-Leu-His-Ade 筛选平板，30℃ 倒置培养 3-5 天至菌落出现；
8. 挑取菌落点种到 SD/ -Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X- α -GAL 平板，30℃ 倒置温育，显兰色的菌落即阳性候选克隆；
9. 阳性候选克隆分区划线接种于 SD/ -Trp-Leu /X- α -GAL 平板上，30℃ 倒置温育 3 天，使同一酵母菌中几种库质粒分离；
10. 挑取再次显兰色菌落重复上一步；
11. 此次所得兰色菌落点种于 SD/ -Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X- α -GAL 平板，30℃ 倒置温育 1-2 天，显兰色的菌落即可用于质粒提取鉴定。

酵母双杂合系统阳性克隆的鉴定

—— 酵母质粒 DNA 的提取

一. 试剂与培养基:

SD/-Leu 培养液, (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Base (Clontech 公司)	2.67g
B. 10 × DO (-Leu-Trp)	10.0 ml
C. 20 × Trp	5.0 ml
<hr/>	
D. ddH ₂ O →	100.0 ml

酵母裂解液: 2% Triton X-100; 1% SDS; 100mM NaCl; 10mM Tris, pH8.0; 1mM EDTA

A. 10% Triton X-100	20.0ml
B. 10% SDS	10.0ml
C. NaCl	0.58g
D. Tris	0.12g
E. EDTA Na ₂ · 2H ₂ O	0.12g
F. 1.0N HCl →	pH8.0
<hr/>	
G. ddH ₂ O →	100.0ml

二. 实验步骤:

1. 挑取经过酵母营养缺陷平板筛选并分离的兰色酵母单菌落, 接种于 5.0ml SD/-Leu 液体培养基, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养 1-2 天, 使丢失 pGBKT7/bait 质粒;
2. 室温离心 5000rpm × 1min, 弃上清;
3. 加入酵母裂解液 200ul, 振荡重悬菌团;
4. 加入玻璃珠(sigma)0.2g, 苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25:24:1) 0.2ml, 涡流振荡 5min;
5. -70°C 保存过夜或液氮冻存 10 min;
6. 室温复融, 再振荡 5 min;
7. 室温离心 12000 rpm × 10min, 上清转移至新的 1.5 ml 离心管中, 加入 3M NaAc (1/10V) 20ul, 无水乙醇 (2.5V) 500ul, -70°C 冻存 30-60min;
8. 离心 12500 rpm × 10min, 4°C, 弃上清; 70%乙醇洗涤沉淀, 于 37°C 烘箱或超净台干燥 DNA; 以 20-30ul 无菌 ddH₂O 重悬 DNA, 保存于 -20°C。

大肠杆菌感受态细胞的制备（电转化）

一. 培养基:

SOB 液体培养基, 115°C, 101b/in² 灭菌 15min

A. bacto-Tryptone	10.0g
B. bacto-Yeast Extract	2.5g
C. NaCl	0.25g
D. KCl	0.09g
E. MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.02g
<hr/>	
F. ddH ₂ O →	500.0ml

二. 实验步骤:

1. 挑取 LB 固体培养基上生长的 *E.coli*KC8 单菌落, 接种于 5ml LB 液体培养基中, 37°C 恒温, 250 rpm 振荡培养过夜;
2. 将 2.5ml 新鲜菌液接种于 500ml SOB 培养液中, 37°C 恒温, 250 rpm 振荡培养至 OD₆₀₀=0.5-0.6 (约 2.5-3hr);
3. 将培养菌液收集于离心管中, 冰水浴 15-20min;
4. 离心 6000 rpm × 10min, 4°C, 弃上清; 以 5ml 预冷的无菌 ddH₂O 重悬菌团, 再加入 500ml 预冷的无菌 ddH₂O 洗涤沉淀细菌;
5. 重复上述步骤 1 次, 以充分去除培养基中残余的盐离子成分;
6. 用 40-50ml 预冷的无菌 10% 甘油重悬沉淀细菌, 转移至 50ml 无菌离心管中, 离心 6000 rpm × 10min, 4°C, 弃上清; 重复此步骤 1 次;
7. 以等体积 (约 1.5-2.0ml) 预冷的无菌 10% 甘油重悬上述沉淀的感受态细胞, 分装 200ul/管 (5 次转化反应), 冻存于 -70°C 备用。

文库质粒 DNA 电转化大肠杆菌 *E.coli*KC8

1. 冰浴条件下, 取 2ul 待转化质粒 DNA 加入 40ul 感受态细胞中, 混匀;
2. 加入间距 0.1cm 样品杯, 电转化 (1.8KV, 25uF, 200 Ω);
3. 迅速加入 1ml 新鲜 LB 培养液, 混匀, 转入 1.5ml 离心管, 37°C 恒温, 250rpm 振摇孵育 1h;
4. 离心 2500rpm × 5min, 4°C, 弃上清, 保留 100ul 菌液涂布 LB/Amp 平板, 37°C 倒置温育。

碱裂解法小量制备细菌质粒 DNA

1. 挑取 LB 固体培养基上生长的 E.coli.入单菌落,接种于 2.0ml LB 液体培养基中, 37℃ 恒温, 250rpm 振荡培养过夜(约 12-14hr);

2. 取 1.5ml 新鲜过夜菌, 室温离心 8000rpm×1min,弃尽上清;

3. 将沉淀细菌振荡悬浮于 100ul 溶液 I;

(溶液 I: 50mM 葡萄糖; 25mM Tris·Cl; 10mM EDTA, pH8.0)

A.	2.0M Tris-Cl, pH8.0	6.25ml
B.	0.4M EDTA, pH8.0	12.50ml
C.	葡萄糖	4.730g
<hr/>		
D.	ddH ₂ O →	500ml

4. 加 200ul 新鲜配制的溶液 II, 倒置数次混匀;

(溶液 II: 0.2M NaOH; 1%SDS)

A.	10M NaOH	0.1 ml
B.	SDS	0.5 ml
C.	ddH ₂ O	4.4 ml

5. 加入 150ul 预冷的溶液 III, 振荡混匀; 离心 12000rpm×5min, 4℃, 弃沉淀;

(溶液 III: KAc 缓冲液, 3.0MK⁺; 5.0M Ac⁻)

A.	5MKAc	300.0 ml
B.	冰乙酸	57.5 ml
C.	ddH ₂ O	142.5 ml

6. 上清加入 450ul 的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),振荡混匀,离心 12000rpm×5min,4℃;

7. 取上层水相, 加 0.9ml 预冷无水乙醇,-20℃静置 2hr 以上,离心 12000rpm×15min,4℃;

8. 将沉淀 DNA 用 70%乙醇洗 1 次, 37℃烘箱或超净台干燥 DNA;

9. 沉淀 DNA 重溶于 20ul TE 缓冲液(含 RNase 10-20ug), 37℃水浴 1-2hr 后进一步酶切分析或保存于-20℃。

(TE 缓冲液: 10mM Tris-Cl;1mM EDTA)

A.	Tris	1.2lg
B.	EDTANa ₂ ·2H ₂ O	0.37g
C.	ddH ₂ O	800.0ml
<hr/>		
D.	1.0N HCl 调 pH 至所需	
E.	ddH ₂ O →	1000.0ml

DNA 的限制性内切酶分析

1. 限制性内切酶分析一般在 0.5ml 或 1.5ml Eppendorf 离心管内进行, 在适当的温度(通常为 37°C)水浴消化 1-2hr;
2. 一般每 20ul 反应体系如下:

A. DNA(0.2-2ug/ul)	7.0ul
B. 10×酶切缓冲液	2.0ul
C. 限制性内切酶(10-20U / ul)	1.0ul
D. ddH ₂ O	10.0ul
3. 用于制备时, 反应总体积可达 50-200ul, 各反应组分相应增加。
4. 多酶消化时若缓冲液条件相同, 可同时加入; 否则, 先做低温或低盐的酶消化, 再做高温或高盐的酶解。

本试验目的是将文库质粒按酶切图谱归类, 因此所用酶为高频酶: HaeIII 或 AluI 酶。

DNA 片段的连接

1. DNA 片段的连接一般在 0.5ml 或 1.5ml Eppendorf 离心管内进行, 一般每 20 ul 反应体系如下, 在适当的温度(通常为 12-15°C)水浴 8-14hr:

A. 载体 DNA(0.1-2ug/ul)	2.0ul
B. 插入 DNA(0.1-2ug/ul)	10.0ul
C. 10×T4 连接缓冲液	2.0ul
D. T4 DNA 连接酶(1.0U / ul)	1.5-2.0ul
E. ddH ₂ O	4.5-5.0ul
2. 单酶位点连接时, 为避免自身环化可进行脱磷酸化反应, 一般在限制性酶切反应结束时, 每 20L11 反应体系加入 2.0ul 10×CIP 缓冲液和 1-1.5U CIP 酶, 37°C 水浴 30-60min, 补加 0.5M EDTA, pH8.0 1.0ul, 75°C 热变性 5min 灭活 CIP, 然后苯酚: 氯仿: 异戊醇抽提, 乙醇沉淀回收酶解 DNA 片段, 再进行连接反应。
3. 平端连接时, 使用高浓度 T4 DNA 连接酶(5-10U/ul), 并加入 15% 终浓度的 PEG8000。

蛋白相互作用的验证

——pGBKT7/bait 与 pACT2 小规模共转化酵母

一. 试剂:

1. 培养基:

YPDA 液体培养基, (121°C, 灭菌 15min)

A. YPD (Clontech 公司) 15.0g

B. 0.2%Adenine 4.5ml

C. ddH₂O → 300.0 ml

SD/-Trp-Leu 固体培养基, (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司) 4.67g

B. 10 × DO (-Leu-Trp) (Clontech 公司) 10.0 ml

C. ddH₂O → 100.0 ml 铺 5 块平板(90-100mm)

SD/-Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X-α-GAL 固体培养基 (121°C, 灭菌 15min)

A. SD Agar Base (Clontech 公司) 4.67g

B. 10 × DO (-Leu-Trp-His-Ade) (Clontech 公司) 10.0 ml

C. ddH₂O → 100.0 ml

121°C, 灭菌 15min, 冷却到 50°C 加入适量 5M 3-AT (至终浓度 15mM) 与 100ul X-α-GAL(20mg/ml), 铺 5 块平板(90-100mm)

2. 其它贮备液

50% PEG 4000 (Sigma 公司 wt.=3,350), 用前抽滤或高压蒸汽灭菌;

100% DMSO (Sigma 公司);

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

10 × LiAc: 1M LiAc 用乙酸调 pH7.5, 高压蒸汽灭菌;

10 × Dropout/ -Trp-Leu 溶液: 3.2 g DO Supplement(-Leu-Trp) 溶于 500ml ddH₂O 中;

10 × Dropout/ -Trp-Leu-His-Ade 溶液: 3.0 g DO Supplement (-Trp-Leu-His-Ade) 溶于 500ml ddH₂O 中;

0.2%Adenine: 0.2g Adenine Hemisulfate Salt(Sigma 公司)溶于 100ml ddH₂O 中;

3-AT (5M) : 4.202g 3-AT 溶于 10ml ddH₂O, 温水浴(<50°C)溶解, 无菌滤器过滤后分装 10 个 EP 管, -20°C 保存;

X-α-GAL(20mg/ml): 1.25mg X-α-GAL)溶于 1.25ml DMF 中;

ddH₂O: 高压蒸汽灭菌;

二. 实验步骤:

1. 从 YPDA 平板上挑取生长 1-3 周、直径 2-3 mm 的 AH109 单克隆, 接入 1 ml YPDA 液体培养基中, **振荡**打散菌落, 然后接入 50 ml YPDA 液体培养基中, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养过夜 (16-18hr), 至 $OD_{600} > 1.5$;
2. 取适量过夜菌液接种于 300 ml 新鲜的 YPDA 培养基, 至 $OD_{600} = 0.2-0.3$, 30°C 恒温, 250rpm 振荡培养至 $OD_{600} = 0.4-0.6$ (约 3hr);
3. 室温离心 5000rpm \times 5min, 弃上清; 加入 25-50 ml ddH₂O 或 TE 重悬洗涤酵母沉淀细胞, 离心弃上清, 重复洗涤一次, 沉淀用 1.5 ml 1 \times TE/LiAc 重悬后, 即为酵母感受态细胞;
4. 准备下列试剂:

	3 \times 转化反应	10 \times TE	10 \times LiAc	50% PEG	ddH ₂ O
A. 1 \times TE/LiAc	1.50 ml	150 ul	150 ul	/	1.20 ml
B. PEG/LiAc	2.00 ml	200 ul	200 ul	1.6ml	/
C. 1 \times TE	1.00 ml	100 ul	/	/	900 ul

5. 分装待转化的质粒 DNA:

	实验组	阳性对照	阴性对照	用量
1.	pGBKT7-bait	pGBKT7-53	pGBKT7-lam	0.2ug
2.	pACT2-Y	pGADT7-T	pGADT7-T	0.1ug
3.	Sperm DNA*(10 mg/ml)			0.1 mg

* Sperm DNA 新配制时水浴煮沸 20 分钟, 立即插入冰浴, 保存于-20°C。

6. 每管加入 100ul 用 1 \times TE/LiAc 重悬的酵母感受态细胞, 振荡混匀;
7. 各加入 600ul PEG/LiAc, **剧烈**振荡 (提高转化效率), 30°C 恒温, 200rpm 振荡培养 30min;
8. 各加入 70ul DMSO, 缓缓倒置混匀(**不能振荡**), 42°C 水浴热休克 15min, 迅速插入冰浴冷却 1-2min;
9. 室温离心 14,000rpm \times 5sec, 尽量弃尽上清, 每管各取 0.1 ml 1 \times TE 重悬沉淀细胞, 涂布 SD/ -Trp-Leu 固体培养板, 30°C 倒置培养 3 天;
10. 挑取菌落点种于 SD/-Trp-Leu-His-Ade/3-AT/X- α -GAL 平板, 30°C 倒置培养 1-2 天。实验组菌落若无生长, 说明蛋白间无相互作用; 实验组菌落若生长且变蓝, 说明蛋白有相互作用;

附录 1 培养基组分:

酵母培养基

● YPD (Clontech 公司) 成分:

Difco peptone	20 g/L
Yeast extract	10 g/L
Agar	20 g/L

10 × Dropout(-His-Trp -Leu-Ade) 溶液

为不含 His, Trp, Leu, Ade 等成分的 10 × Dropout 溶液

每 1000ml 溶液中含有下列成分, 可用双蒸水配制后保存 4℃

(1) L-Isoleucine	L-异亮氨酸	300mg
(2) L-Valine	L-缬氨酸	1500mg
(3) L-Uracil	L-尿嘧啶	200mg
(4) L-Arginine HCl	L-精氨酸盐酸盐	200mg
(5) L-Lysine HCl	L-赖氨酸盐酸盐	300mg
(6) L-Methionine	L-甲硫氨酸	200mg
(7) L-Phenylalanine	L-苯丙氨酸	500mg
(8) L-Threonine	L-苏氨酸	2000mg
(9) L-Tyrosine	L-酪氨酸	300mg

20×氨基酸储存液

每 100ml 溶液中分别含有下列成分, 可用双蒸水配制后保存 4℃

20 × Trp	L-Tryptophan	L-组氨酸	40mg
20 × His	L-Histidine	L-色氨酸	40mg
20 × Leu	L-Leucine	L-亮氨酸	200mg

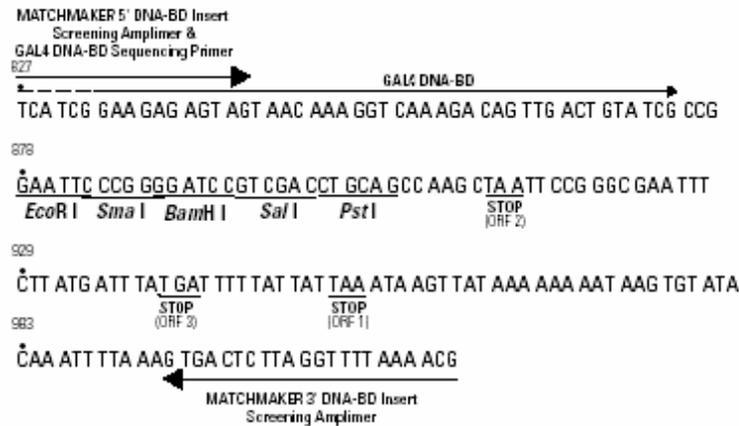
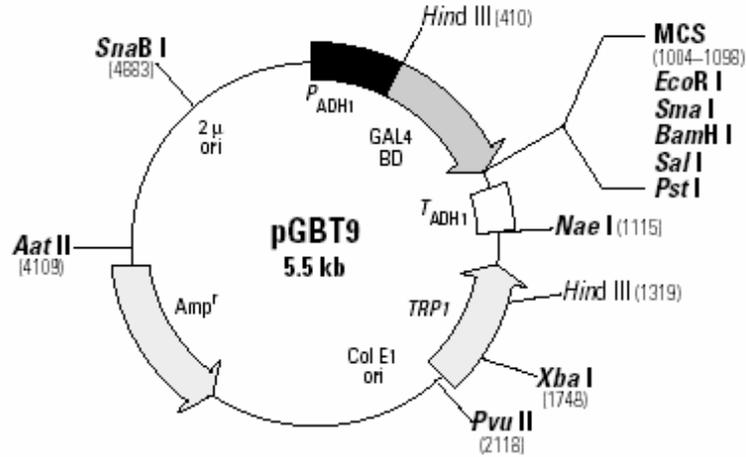
附录 2 酵母穿梭质粒图谱
GAL4 系统 2 所用质粒

pGBT9 DNA-BD Vector Information

GenBank Accession #: U07646

PT1021-5

Catalog #K1605-A



Restriction map and multiple cloning site (MCS) of ppGBT9 DNA-BD Vector. Unique restriction sites are in bold.

Description:

pGBT9 generates a hybrid protein that contains the sequences for the GAL4 DNA-binding domain (DNA-BD; a.a. 1–147). For the construction of a hybrid protein, the gene encoding the protein of interest is ligated into the MCS in the correct orientation and in the correct reading frame such that a fusion protein is generated. The fusion protein is expressed in yeast host cells from the constitutive *ADH1* promoter; transcription is terminated at the *ADH1* transcription termination signal. The hybrid protein is targeted to the yeast nucleus by nuclear localization sequences that are an intrinsic part of the GAL4 DNA-BD (2). pGBT9 is a shuttle vector that replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae*. It carries the *bla* gene (for ampicillin resistance in *E. coli*) and the *TRP1* nutritional marker that allow yeast auxotrophs carrying pGBT9 to grow on limiting synthetic medium lacking Trp.

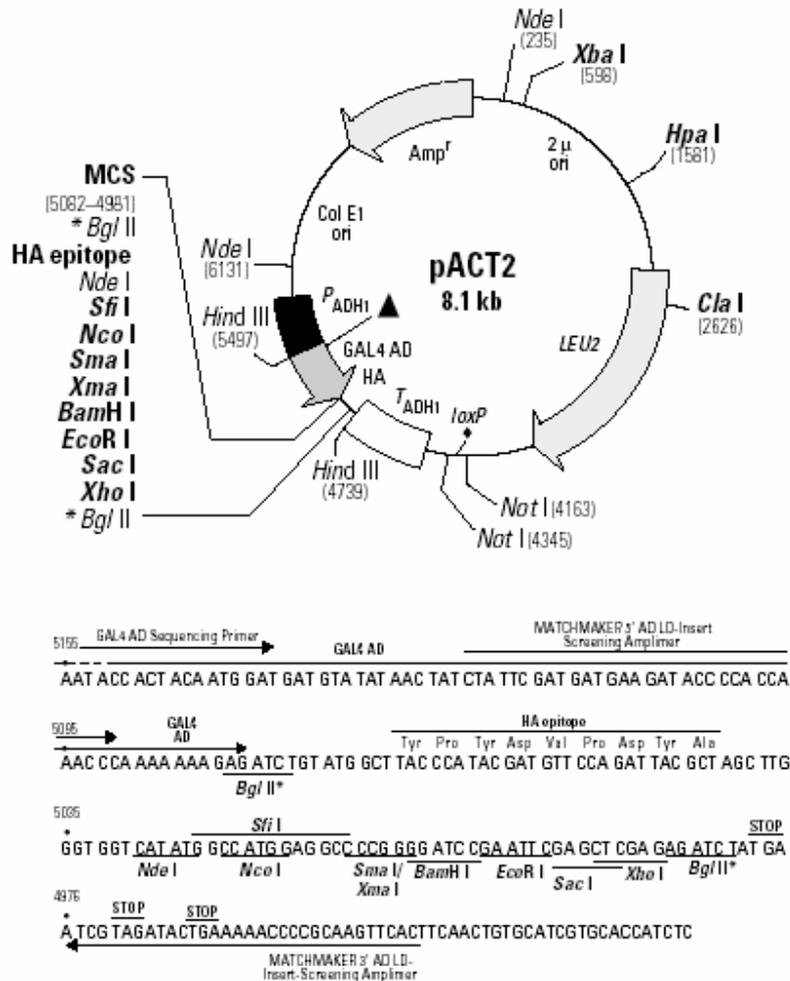
附录 2 酵母穿梭质粒图谱
GAL4 系统 2 所用质粒

pACT2 AD Vector Information

GenBank Accession #: U29899.

PT3022-5

Catalog #K1604-A



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pACT2 AD. Unique restriction sites are in bold.

Description:

pACT2 generates a fusion of the GAL4 AD (amino acids 768–881), an HA epitope tag, and a protein of interest (or protein encoded by a cDNA in a fusion library) cloned into the MCS in the correct orientation and reading frame. pACT2, which is derived from pACT (1), contains a unique *EcoR*I site in the MCS. The hybrid protein is expressed at high levels in yeast host cells from the constitutive ADH1 promoter (*P*); transcription is terminated at the ADH1 transcription termination signal (*T*). The protein is targeted to the yeast nucleus by the nuclear localization sequence from SV40 T-antigen which has been cloned into the 5' end of the GAL4 AD sequence (2). pACT2 is a shuttle vector that replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* and carries the *bla* gene, which confers ampicillin resistance in *E. coli*. pACT2 also contains the *LEU2* nutritional gene that allows yeast auxotrophs to grow on limiting synthetic media. Transformants with AD/library plasmids can be selected by complementation by the *LEU2* gene by using an *E. coli* strain that carries a *leuB* mutation (e.g., HB101).

Note: The *Sfi*I and *Sma*I sites in the MCS tend to compress during sequencing.

(PR8X956)

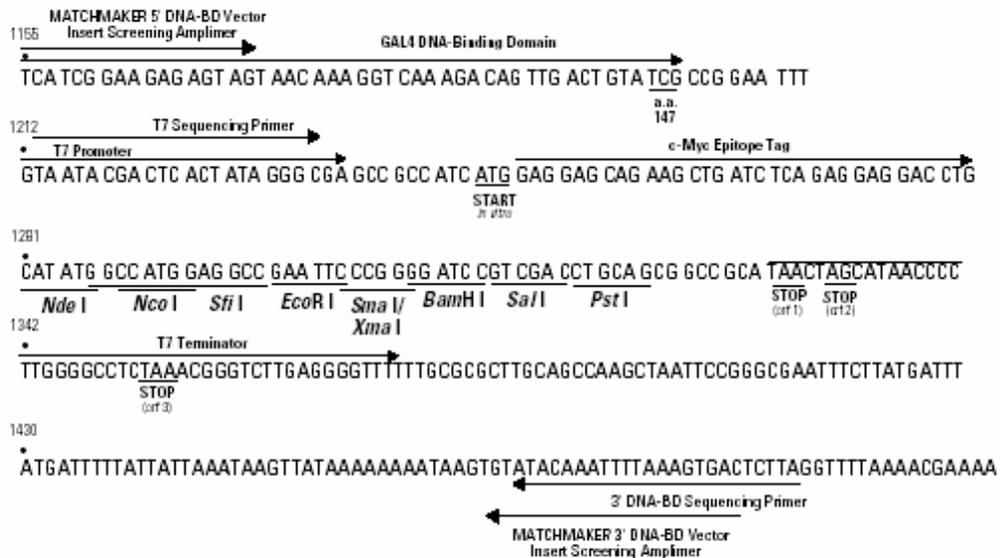
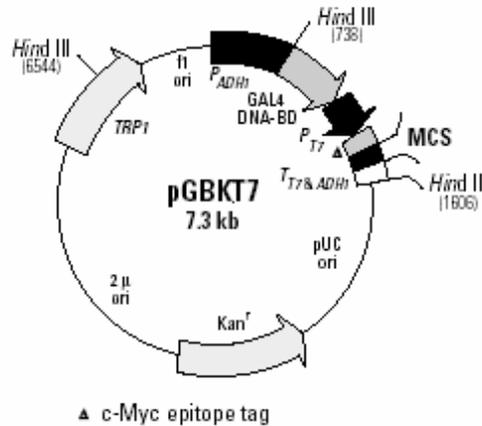
GAL4 系统 3 所用质粒

pGBKT7 Vector Information

GenBank Accession #: Submission in Progress.

PT3248-5

Catalog # K1612-1



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pGBKT7. Unique restriction sites are in bold.

Description:

The pGBKT7 vector expresses proteins fused to amino acids 1–147 of the GAL4 DNA binding domain (DNA-BD). In yeast, fusion proteins are expressed at high levels from the constitutive *ADH1* promoter (*P_{ADH1}*); transcription is terminated by the *T7* and *ADH1* transcription termination signals (*T_{T7 & ADH1}*). pGBKT7 also contains the *T7* promoter, a c-Myc epitope tag, and a MCS. pGBKT7 replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* from the pUC and 2 μ ori, respectively. The vector carries the Kan^r for selection in *E. coli* and the *TRP1* nutritional marker for selection in yeast. Yeast strains containing pGBKT7 exhibit a higher transformation efficiency than strains carrying other DNA-BD domain vectors (1).

(PR8Z150)

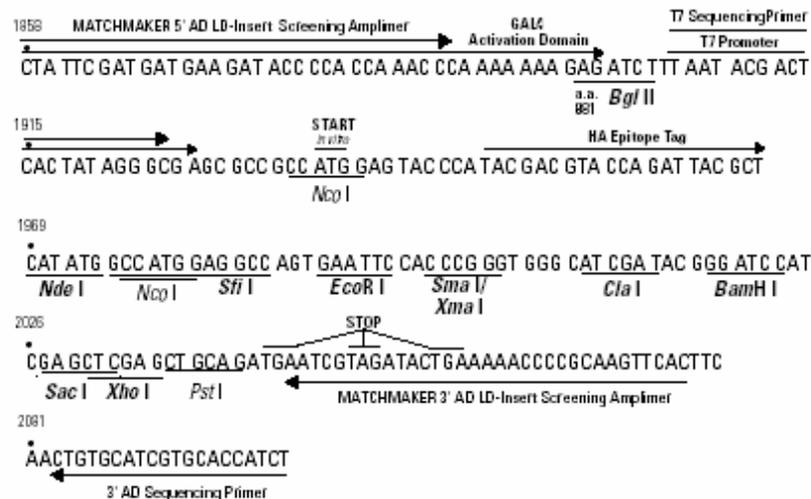
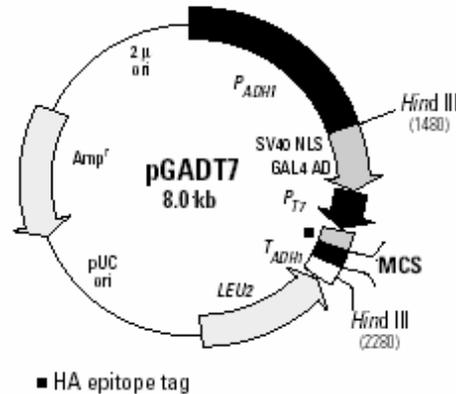
GAL4 系统 3 所用质粒

pGADT7 Vector Information

GenBank Accession #: Submission in progress.

PT3249-5

Catalog # K1612-1



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pGADT7. Unique restriction sites are in bold.

Description:

The pGADT7 vector expresses proteins fused to amino acids 768–881 of the GAL4 activation domain (AD). In yeast, fusion proteins are expressed at high levels from the constitutive *ADH1* promoter (P_{ADH1}); transcription is terminated at the *ADH1* transcription termination signal (T_{ADH1}). The fusion protein is targeted to the yeast nucleus by the SV40 nuclear localization sequences that have been added to the activation domain sequence (1). pGADT7 also contains the T7 promoter, an HA epitope tag, and a MCS. pGADT7 replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* from the pUC and 2 μ ori, respectively. The vector carries *Amp^r* for selection in *E. coli* and the *LEU2* nutritional marker for selection in yeast.

Use:

pGADT7 is the AD Vector included with MATCHMAKER Two-Hybrid System 3. The MCS of pGADT7 has unique restriction sites in frame with the 3'-end of the GAL4 AD for constructing a fusion protein with either a protein of interest or a fusion protein library. The bait protein is also expressed

(PR8Z151)

LexA 系统所用质粒

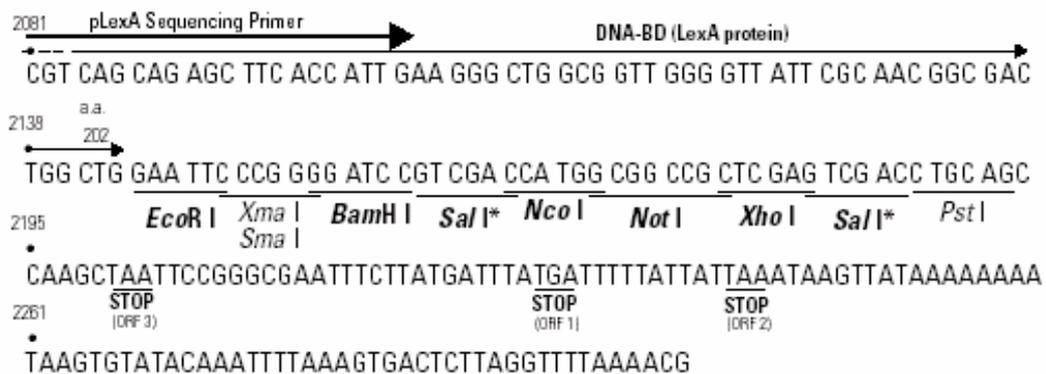
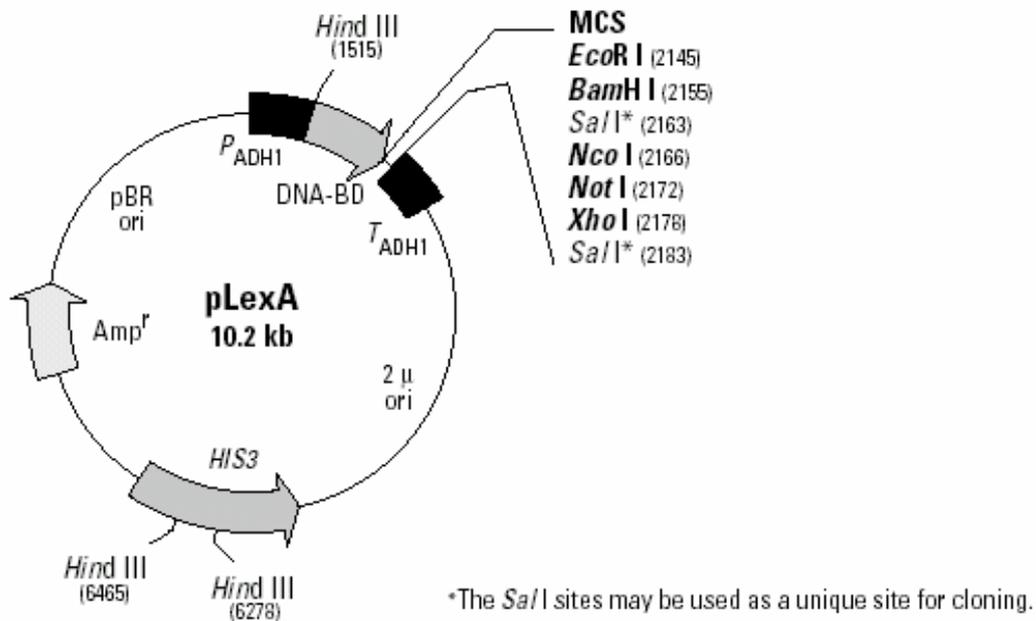


Figure 8. pLexA plasmid map and MCS sequence. (pLexA was originally published as pEG202 in Gyuris *et al.*, 1993.) pLexA is used to generate fusions of the DNA-BD (the 202-residue LexA protein) with a target (or bait) protein. Fusion protein expression is controlled by the strong yeast *ADH1* promoter. May be propagated and selected for in *E. coli* and yeast. The *HIS3* transformation marker is used for selection in yeast. Unique sites are in bold. A pLexA insert sequencing primer is included in the MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System for sequencing inserts.

LexA 系统所用质粒

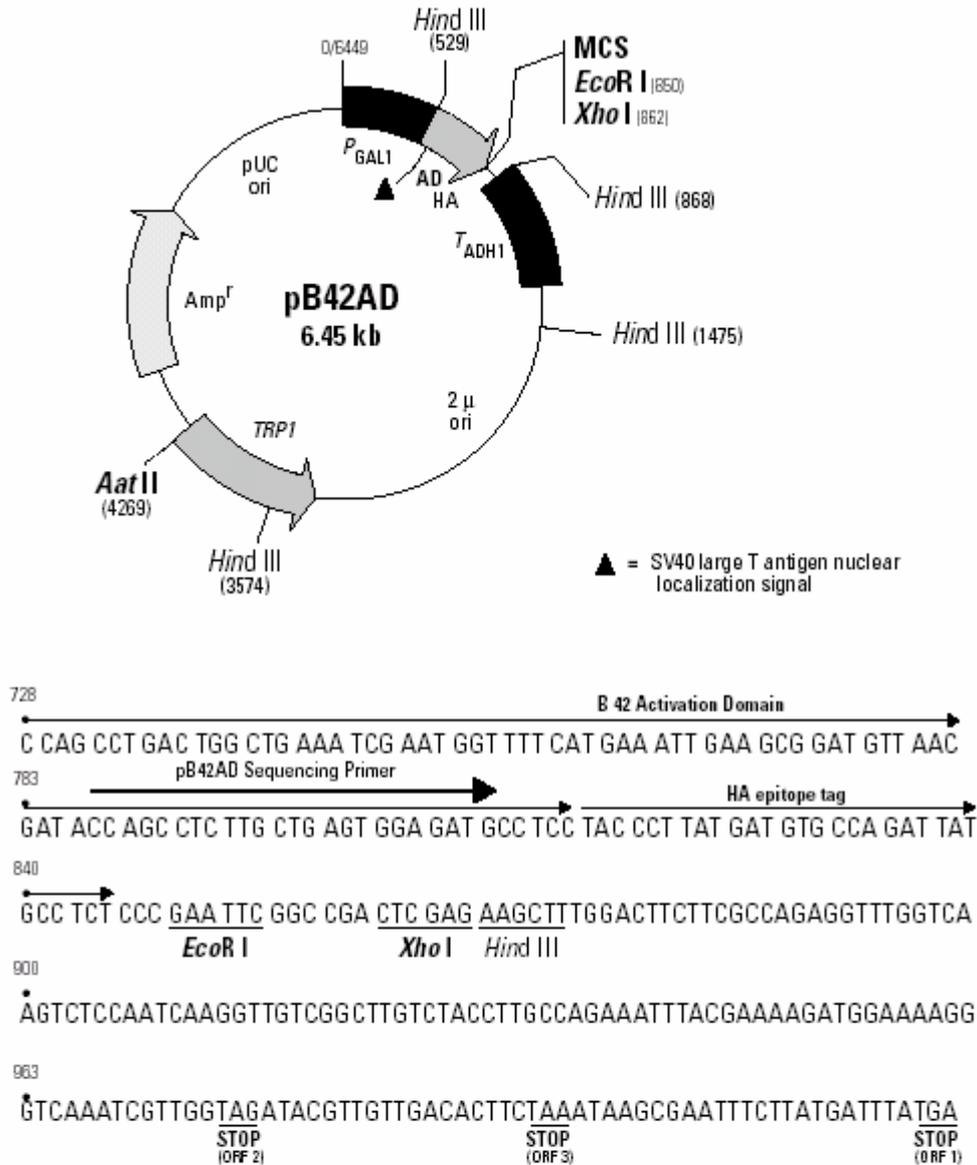


Figure 9. pB42AD plasmid map and MCS sequence. (pB42AD was originally published as pJG4-5 in Gyuris *et al.*, 1993.) pB42AD expresses cDNAs or other coding sequences inserted into the unique *EcoR I* and *Xho I* sites as translational fusions to a cassette consisting of the SV40 nuclear localization sequence, the 88 residue B42 acidic activator (AD), and the hemagglutinin epitope tag. Fusion protein expression is under the control of the GAL1 inducible promoter. May be propagated and selected for in *E. coli* and yeast. The TRP1 transformation marker is used for selection in yeast. Unique sites are in bold. A pB42AD insert sequencing primer is included in the MATCHMAKER LexA Two-Hybrid System for sequencing inserts.

LexA 系统所用质粒

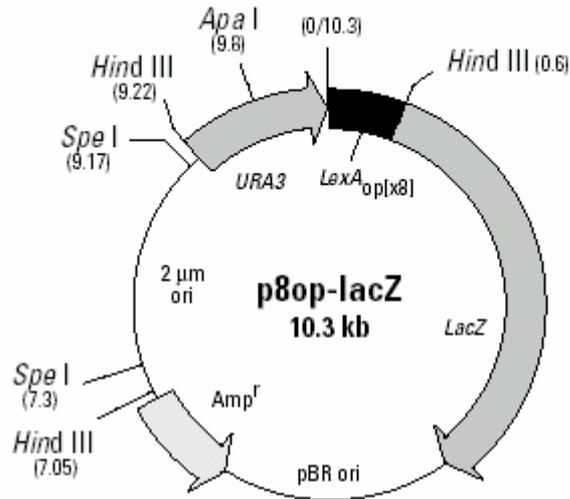


Figure 10. p8op-lacZ plasmid map. p8op-lacZ was originally published as pSHI8-34 (Golemis *et al.*, 1994; Estojak *et al.*, 1995). p8op-lacZ carries the *lacZ* reporter gene under the control of eight LexA operators and the minimal TATA region from the *GAL1* promoter; the GAL4 UAS sites were completely removed in the parent plasmid pLR1Δ1 (West *et al.*, 1984). p8op-lacZ exhibits zero transcriptional activity in the absence of a LexA-fused activator. p8op-lacZ can be maintained as an autonomously replicating plasmid in strain EGY48 or can be forced to integrate into the EGY48 genome.