ZOMANBIO 庄盟生物 www.zomanbio.com
Toll-free:400-611-2007
Order:010-62617225 62979301
Email:zomanbio@126.com
Http://www.zomanbio.com

版本号：2025-10-10

Y2HGold-GAL4 系统酵母双杂互作验证试剂盒

Y2HGold-GAL4 Yeast Two-Hybrid interaction proving kit

目录号：ZC1908

产品组成	产品货号	产品组分	规格	保存温度
培养基	ZC1705	SD/-Leu/-Trp Broth	0.5 L×1	-20 °C
	ZC1808	SD/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3	-20 °C
	ZC1801	SD/-His/-Leu/-Trp with Agar（备用）	0.5 L×1	-20 °C
	ZC1793	SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar	0.5 L×3	-20 °C
互作试剂	ZCS107-2	X-α-gal（20mg/mL，过滤除菌）	5×1 mL	-20 °C
	ZCS108-1	金担子素 A（AbA，1mg/mL）	1 mg	4 °C
质粒	ZK974	pGADT7 质粒	10 μg	-20 °C
	ZK979	pGBKT7 质粒	10 μg	-20 °C
对照菌株	ZCS301	Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T]甘油菌	0.3 mL	-80°C
	ZCS302	Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T]甘油菌	0.3 mL	-80°C
鉴定试剂盒	ZC221A-1	酵母阳性克隆快速鉴定试剂盒（直扩）	20 T	-20 °C
感受态细胞	ZC1602-2	Y2HGold 感受态细胞	20×100 μL/支	-80°C

运输及储存条件：

培养基系列保质期2年，鉴定试剂盒、甘油菌保质期1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。各类产品按照标签所表示温度进行储存（培养基升级版可常温存放，具体储存条件依据实际标签）。

注：

1. 本试剂盒提供的产品以产品组成为准，大概能用于10对双杂互作验证（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. 0.5 L×3代表：3个包装，每个包装0.5 L；5×1 mL代表：1个包装，含5个1 mL。
4. 本方案不适用大批量酵母双杂交实验，因为诱饵蛋白表达、自激活检测和毒性验证应该预先完成。
5. 感受态细胞Y2HGold 配带有Carrier DNA和PEG/LiAc。
6. 载体序列，在我司网站可以下载。

产品说明

酵母双杂的原理基础：很多真核生物的位点特异转录激活因子通常具有两个可分割开的结构域，即 DNA 特异结合域（DNA-binding domain, BD）与转录激活域（Transcriptional activationdomain, AD）。这两个结构域各具功能，互不影响。但一个完整的激活特定基因表达的激活因子必须同时含有这两个结构域，否则无法完成激活功能。不同来源激活因子的 BD 区与 AD 结合后则特异地激活被 BD 结合的基因表达。基于这个原理，可将两个待测蛋白分别与这两个结构域建成融合蛋白，并共表达于同一个酵母细胞内。如果两个待测蛋白间能发生相互作用，就会通过待测蛋白的桥梁作用使 AD 与 BD 形成一个完整的转录激活因子并激活相应的报告基因表达。通过对报告基因表型的测定可以很容易地知道待测蛋白系统。分子间是否发生了相互作用。

酵母双杂交系统由三个部分组成 ：（1）与 BD 融合的蛋白表达载体，被表达的蛋白称诱饵蛋白(bait)。（2）与 AD 融合的蛋白表达载体，被其表达的蛋白称靶蛋白（prey）。（3）带有一个或多个报告基因的宿主菌株。常用的报告基因有 HIS3，URA3，LacZ 和 ADE2 等。而菌株则具有相应的缺陷型。双杂交质粒上分别带有不同的抗性基因和营养标记基因。这些有利于实验后期杂交质粒的鉴定与分离。根据目前通用的系统中 BD 来源的不同主要分为 GAL4 系统和 LexA 系统，目前常用的是 Y2HGold-GAL4 和 AH109-GAL4 系统。

Y2HGold 菌株是 GAL4 系统酵母双杂实验用菌株，MATa 型，可直接转化质粒或与 MATα 型酵母菌株 Y187 通过 mating 操作进行蛋白互作验证或筛库试验。Transformation marker 为：trp1，leu2，报告基因为： AbAr，HIS3，ADE2，MEL1。Y2HGold-GAL4 酵母双杂系统需要两种质粒配套使用：pGBKT7 和 pGADT7 。 质粒 pGBKT7 的筛选标志为 TRP1，用于表达 DNA-BD（来自酵母转录因子 GAL4N 端 1~174 位氨基酸） 与目标蛋白（Bait）的融合蛋白；质粒 pGADT7 的筛选标志为 LEU，用于表达 AD（GAL4 C 端 768~881 位氨基酸）与目标蛋白（Prey）的融合蛋白。

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（1000μL、200μL、10μL）、涂布棒或玻璃珠，Φ90mm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。

电话:010-62617225 62979301 Email:zomanbio@126.com

3. 稀释金担子素：

取 100 μL AbA（1 mg/mL）于 900 μL 无水乙醇中稀释，充分混匀，即AbA 浓度为 100 μg/mL，4°C冰箱中备用（稀释 10 倍后使用有利于在培养基中混匀，建议按用量稀释）。

4. 普通平板制备：

将 1 条培养基倒入 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 保存备用；固体培养基，按照 20-25 mL/块倒平板(Φ90 mm），凝固后放入 4°C冰箱保存。

5. 特殊平板制备：

SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar（X-α-gal）：将一条 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar 培养基溶于 500 mL 去离子水，无需调节 pH 值，高压灭菌（如，115°C灭菌 20 min），冷却至 50°C左右，每25 mL 固体培养基加入 25-50 μL X-α-gal 母液，倒平板（25 mL/块，Φ90 mm），凝固后于 4°C冰箱保存。

SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar（AbA +X-α-gal）：将一条 SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp with Agar 培养基溶于 500 mL 去离子水，无需调节 pH 值，高压灭菌（如，115°C灭菌 20 min），冷却至 50°C左右，每20 mL 固体培养基加入 20-40 μL X-α-gal 溶液（20 mg/mL），稀释后的金担子素（AbA）参考表 1 加入，倒平板 20 mL/ 块(Φ90 mm），凝固后于 4°C冰箱保存。

表 1 不同浓度 AbA 平板

培养基体积（mL）	20	20	20	20	20	20	20
AbA（100 μg/mL）加入量(μL)	0	20	40	60	100	140	200
AbA 终浓度（ng/mL）	0	100	200	300	500	700	1000

二、菌株使用与保存

2.1 菌株活化

取甘油菌 10-50 μL 至 SD/-Leu/-Trp 培养基（平板）上进行划线。置于培养箱 28-30°C 培养 3-5d。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/-Leu/-Trp 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。

三、实验方法

双杂实验方案较多，本公司根据多年经验，给出一个较优的点板互作验证实验方案，我们将蛋白表达，自激活检测，毒性验证放在互作检测之后（本方案不作分析）。我们假设载体构建已完成，互作验证分为三个步骤：共转化，阳性克隆鉴定（选做），互作检测。本方案对常见互作验证结果进行了分析。

3.1 共转化

1. 取 100 µL 冰上融化的 Y2HGold 感受态细胞，依次加入预冷的质粒 pGBKT7和 pGADT7 （各2-5 µg），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. 5000 rpm 离心 30 s 弃上清，ddH_2O 400 µL 重悬，离心 30 s 弃上清。
4. ddH_2O 100 µL 重悬，涂布于 SD/-Leu/-Trp 平板，28-30°C培养 48-96 h。

注：按表 1，将各质粒转入酵母 Y2HGold 感受态细胞中，阳性和阴性对照菌株于 SD/-Leu/-Trp 平板划线活化。

表 1 酵母转化反应

BD plasmid	AD plasmid	培养基	备注
pGBKT7-p53	pGADT7-T	SD/-Leu/-Trp	阳性对照
pGBKT7-Lam	pGADT7-T	SD/-Leu/-Trp	阴性对照
pGBKT7-Bait1	pGADT7-Prey1	SD/-Leu/-Trp	实验组 1
pGBKT7-Bait1	pGADT7	SD/-Leu/-Trp	对照组 1*
pGBKT7-Bait2	pGADT7-Prey2	SD/-Leu/-Trp	实验组 2
pGBKT7-Bait2	pGADT7	SD/-Leu/-Trp	对照组 2*

注：对照组 1*和 2*可以更好的体现实验组是否有互作。

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

3.3 互作检测

1. 每个样品挑取新鲜单克隆（2-3 mm）于 1 mL ddH_2O 无菌水中重悬，OD600

电话:010-62617225 62979301 Email:zomanbio@126.com

调至 0.2（也可以用 SD/-Leu/-Trp 液体培养基培养至 OD600=0.2）。

2. 用 ddH_2O 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 10 μL 菌悬液于 SD/-Leu/-Trp 、SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal 平板（如已知自激活浓度，需加入 AbA），28-30°C培养 3-5d。

四 、互作验证分析

4.1 互作/无互作

由图 1 可知，对照组 Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T] 和 Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T] 在 SD-Leu/Trp 板上长势相同；Y2HGold[pGBKT7-53+pGADT7-T] 在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal 板上显蓝色，且长势同 SD/-Leu/-Trp 板；而 Y2HGold[pGBKT7-Lam+pGADT7-T]在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal 板上不生长且不显色，所以，pGBKT7-53 与 pGADT7-T 有互作，pGBKT7-Lam 与 pGADT7-T 无互作。

同理，pGBKT7-Bait1 与 pGADT7-Prey1 有互作，pGBKT7-Bait1 与 pGADT7 无互作（即 pGBKT7-Bait1 无自激活）。

4.2 Prey 蛋白有毒性

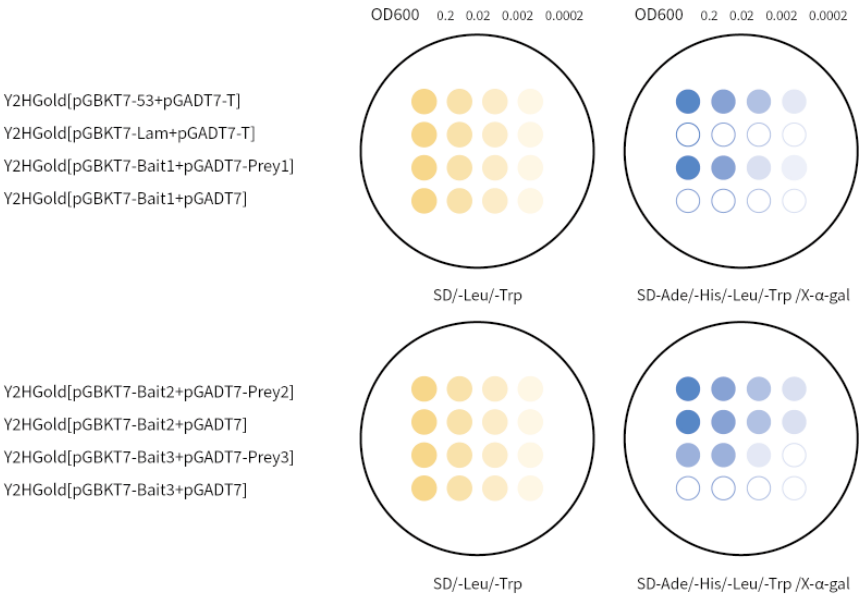
在 SD/-Leu/-Trp 平板上 Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7-Prey3]长势明显弱于 Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7]但是在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/X-α-gal 板上 Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7-Prey3]能够显蓝色（虽然长势弱），Y2HGold[pGBKT7-Bait3+pGADT7]不能生长或生长较弱，同样能够证明 pGBKT7-Bait3 与 pGADT7-Prey3 有互作，pGBKT7-Bait3 与 pGADT7 无互作（即pGBKT7-Bait3 无自激活）。

4.3 Bait 蛋白有自激活

Y2HGold[pGBKT7-Bait2+pGADT7-Prey2]和 Y2HGold[pGBKT7-Bait2+pGADT7]，在 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade /X-α-gal 板上显蓝色，且长势同 SD/-Leu/-Trp 平板，所以 pGBKT7-Bait2 具有自激活。

抑制自激活：在 SD-Leu/Trp/His/Ade/X-α-gal 板中加入梯度浓度的（AbA），重做互作验证实验即可。

图 1 互作验证结果



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±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。

电话:010-62617225 62979301 Email:zomanbio@126.com

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。

扫描二维码关注公众号