

# 酵母双杂交技术检测蛋白互作

## Yeast Two-hybrid Assay for Detecting Protein Interaction

毛文文, 魏灵芝, 李冰冰, 贾文锁\*

果树系, 园艺学院, 中国农业大学, 北京

\*通讯作者邮箱: [jiaws@cau.edu.cn](mailto:jiaws@cau.edu.cn)

引用格式: 毛文文, 魏灵芝, 李冰冰, 贾文锁. (2018). 酵母双杂交技术检测蛋白互作. *Bio-101* e1010223.

Doi: 10.21769/BioProtoc.1010223.

How to cite: Mao, W. W., Wei, L. Z., Li, B. B. and Jia, W. S. (2018). Yeast two-hybrid assay for detecting protein interaction. *Bio-101* e1010223. Doi: 10.21769/BioProtoc. 1010223. (in Chinese)

**摘要:** 酵母双杂交系统可进行两个蛋白的互作分析。真核生物的位点特异性转录激活因子通常含有两个不同的结构域: DNA 结合结构域 (DNA-binding domain) 和转录激活结构域 (transcription-activating domain)。前者可识别 DNA 上的特异序列, 并使转录激活结构域定位于所调节基因的上游, 转录激活结构域可同转录复合体的其他成分作用, 启动它所调节基因的转录。两个结构域可在适当部位打开且具有各自的功能, 当两结构域通过适当的途径在空间上接近时其激活转录的能力可被恢复。将两待检测的蛋白分别与 BD 和 AD 融合并导入酵母菌株中, 通过营养缺陷筛选可验证两个蛋白之间是否存在相互作用。

**关键词:** 蛋白互作, 酵母双杂交

### 材料与试剂

1. 枪头
2. 离心管
3. 冰
4. ssDNA (10 mg/ml)
5. 质粒 DNA
6. AH109 菌液
7. 酵母感受态
8. DMSO

9. PEG4000 (50%)
10. 10x LiAc (1 M)
11. Tris-HCl
12. EDTA (pH7.5)
13. YPD
14. 0.2% Ade
15. 琼脂粉
16. SD-base
17. SD/-leu/-trp
18. SD/-ade/-leu/-trp/-his
19. 10x TE (见溶液配方)
20. 1x TE/LiAc (见溶液配方)
21. PEG/LiAc (见溶液配方)
22. 液体和固体 YPDA 培养基 (1 L) (见溶液配方)
23. 营养缺陷型培养板 (1 L) (见溶液配方)
  - 1) 二缺培养板
  - 2) 四缺培养板

## 仪器设备

1. 三角瓶
2. 移液枪
3. 涡旋振荡器
4. 水浴锅
5. 分光光度计
6. 离心机
7. 摇床
8. 培养箱
9. 高压灭菌锅

## 实验步骤

1. 取少量 AH109 保存菌液，划线于固体 YPDA 培养板上；
2. 28 °C 培养 2-4 天，待长出直径 2-3 mm 的酵母单菌落；
3. 挑取大而圆的酵母单菌落于干净离心管中，加 1 ml 液体 YPDA 培养基涡旋混匀；
4. 将上述菌液转入装有 10 ml 液体 YPDA 培养基的三角瓶中，28 °C，250 rpm 摇菌至 OD<sub>600</sub> = 1.4-1.8；
5. 吸取 1 ml 菌液至装有 100 ml 液体 YPDA 培养基的三角瓶中，摇至 OD<sub>600</sub> = 0.6-0.8；
6. 将 100 ml 菌液分为两管，每管 50 ml，室温 1,000 x g 离心 5 min 收集菌体，用 25 ml 的灭菌超纯水轻轻重悬；
7. 室温 1,000 x g 离心 5 min 收集菌体，弃上清，重悬菌液于 1.5 ml 1x TE/LiAc；
8. 向干净离心管中依次加入下列成分：ssDNA 10 µl，质粒 DNA 0.1 µg，酵母感受态 100 µl，PEG/LiAc 600 µl；
9. 涡旋 1 min，使转化体系完全混匀；
10. 30 °C 的水浴 30 min，加入 70 µl DMSO；
11. 再放入 42 °C 的水浴热击 15 min，冰上冷却 2 min；
12. 室温 2,000 x g 离心 10 s，弃上清；
13. 加入 1 ml 的无菌水轻轻重悬沉淀；
14. 吸 200 µl 转化混合物涂布在营养缺陷型培养板上；
15. 28 °C 培养 2-4 天观察并鉴定结果。

## 溶液配方

1. 10x TE
 

Tris-HCl	0.1 M
EDTA (pH7.5)	10 mM
2. 1x TE/LiAc
 

10x TE	1 ml
10x LiAc	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	8 ml

### 3. PEG/LiAc

10x TE	1 ml
10x LiAc	1 ml
PEG4000 (50%)	8 ml

### 4. 液体和固体 YPDA 培养基 (1 L)

50 g YPD 溶于 1 L 去离子水加入 15 ml 0.2% Ade, 放入高压灭菌中进行灭菌; 若配制培养板, 再加入琼脂粉 15 g

### 5. 营养缺陷型培养板 (1 L)

#### 1) 二缺培养板

SD-base	26.7 g
SD/-leu/-trp	0.64 g
琼脂粉	15 g

#### 2) 四缺培养板

SD-base	26.7 g
SD/-ade/-leu/-trp/-his	0.60 g
琼脂粉	15 g