



扫描二维码关注公众号



Toll-free:400-611-2007

Order:010-62617225 62979301

Email:zomanbio@126.com

Http://www.zomanbio.com



版本号：2025-06-06

## EGY48-LacZ 系统酵母单杂互作验证试剂盒

EGY48-LacZ Yeast One-Hybrid interaction proving kit

目录号：ZC1905

| 产品组成                         | 产品货号        | 产品组分                   | 规格          | 保存温度  |
|------------------------------|-------------|------------------------|-------------|-------|
| LacZ 基因胞外表达显色试剂盒<br>(ZCS121) | ZCS118      | 10×BU buffer (过滤除菌)    | 100 mL      | -20°C |
|                              | ZCS123-1    | 20%半乳糖溶液 (过滤除菌)        | 100 mL      | -20°C |
|                              | ZCS124-1    | 20%棉子糖溶液 (过滤除菌)        | 50 mL       | -20°C |
|                              | ZC1815-0.5L | SD/-Trp/-Ura with Agar | 0.5 L×3     | -20°C |
|                              | ZC1768-8g   | SC/-Trp/-Ura Broth     | 8 g         | -20°C |
|                              | ZS819M      | X-Gal 储存液 (20 mg/mL)   | 5 mL        | -20°C |
|                              | Z1296-20g   | Agar                   | 20 g        | 常温    |
| 质粒                           | ZK943       | pB42AD(PJG4-5)质粒       | 1 μg        | -20°C |
|                              | ZK1859      | pLacZi 质粒              | 1 μg        | -20°C |
| 对照菌株                         | ZCS314      | EGY48 单杂阳性菌            | 0.3mL       | -80°C |
| 感受态细胞                        | ZC1605-2    | EGY48 感受态细胞            | 100 μL×20/支 | -80°C |

注：

- 本试剂盒提供的产品以产品组成为准，大概能用于10对单杂互作验证。
- 各组分需按照标签温度储存，感受态细胞务必-80°C保存。
- pLacZi 是否酶切线性化之后转入 EGY48，根据实际情况而定（试剂盒提供的 pLacZi 不需要线性化转入酵母）。
- EGY48 感受态细胞配带有 Carrier DNA 和 PEG/LiAc。
- 载体序列，在公司官网可以下载，勿反复冻融。

实验室使用，仅用于科研

北京庄盟国际生物基因科技有限公司  
Beijing Zoman Biotechnology Co.,Ltd.



## 产品说明

EGY48 酵母菌可用单双杂实验，转化质粒进行互作验证或筛选试验。筛选标记为：his3, trp1, ura3。EGY48-LacZ 酵母单杂系统需要 pB42AD 和 pLacZi 两种质粒配套使用。质粒 pB42AD 的筛选标记为 TRP1，用于表达AD（来自疱疹病毒的88个氨基酸残基组成的B42AD蛋白）与目标蛋白（Prey）的融合蛋白。质粒pLacZi的筛选标志为 URA3，报告基因为 LacZ，只有当 Bait 和 Prey 互作时才能启动 LacZ 表达，在显色培养基上显蓝色，从而确定 DNA 和蛋白有相互。本方案结合 LacZ 基因胞外表达显色试剂盒进行互作验证，采用稀释点板的方法，与涂板的方法相比，更能直观的体现出 DNA 和蛋白的互作，还能减少培养基的使用。

## 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（1000 μL、200 μL、10 μL）、涂布棒或玻璃珠，Φ90 mm 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。

4. 自备 0.9% 生理盐水，可用 ddH<sub>2</sub>O 无菌水代替，备用。

5. 普通平板制备

将 1 条培养基溶于 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 冰箱保存；固体培养基，20-25 mL/块倒平板(Φ90 mm)，凝固后 4°C 保存。

6. 显色平板配置

参考 LacZ 基因胞外表达显色试剂盒（货号：ZCS121）附件①。

## 二、菌株使用与保存

### 2.1 菌株活化

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

EGY48-LacZ 系统酵母单杂互作验证实验方案较多，本公司根据多年经验，给出一个较优方案，首先我们将自激活检测，毒性验证放在互作检测之后（本方案不作分析）。略过载体构建，分为三个步骤：Bait 和 Prey 共转化 EGY48，阳性克隆鉴定，互作验证。本方案仅适用于酵母小规模转化，大规模转化，请先做自激活和毒性实验，此外，本方案还对常见的互作验证结果进行了分析。

#### 3.1 Bait 和 Prey 共转化 EGY48

AD-Prey、AD-Empty、pBait-LacZi 和 Empty pLacZi 空载测序后，将其大肠杆菌菌液进行扩大培养，然后提取质粒。

1. 取 100 μL 冰上融化的 EGY48 感受态细胞（货号：ZC1605），依次加入预冷的质粒 Bait 和 Prey（各2μg），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. 5,000 rpm 离心 40 s 弃上清，ddH<sub>2</sub>O 400 μL 重悬，离心 30 s 弃上清。
4. ddH<sub>2</sub>O 50 μL 重悬，涂板 SD/-Trp/-Ura 平板，28-30°C培养 3-5 d。
5. 实验组和对照组的设置参考表 1。

表 1 共转化的实验组和对照组

| 实验组                                | 对照组 *                            |
|------------------------------------|----------------------------------|
| EGY48[Positive LacZi+ Positive AD] | EGY48[Positive LacZi+ AD- Empty] |
| EGY48[pBait1-LacZi+ AD-Prey1]      | EGY48[pBait1-LacZi+ AD- Empty]   |
| EGY48[pBait2-LacZi+ AD-Prey2]      | EGY48[pBait2-LacZi+ AD- Empty]   |
| EGY48[pBait3-LacZi+ AD-Prey3]      | EGY48[pBait3-LacZi+ AD- Empty]   |

注：对照组 \*可以更好的体现实验组是否互作。



### 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)(ZC221A), 引物需要根据实际情况设计。

### 3.3 互作验证

1. 上述的转化成功之后, 每个样品挑取新鲜单菌落(2-3 mm)于1 mL 0.9% NaCl溶液中重悬, OD<sub>600</sub>调至0.2(也可以用SD/-Trp/-Ura液体培养基培养至OD<sub>600</sub>=0.2)。

2. 再用0.9% NaCl溶液依次稀释10倍, 100倍, 1000倍(即OD<sub>600</sub>=0.2, 0.02, 0.002, 0.0002)。

3. 按照先实验组后对照组的顺序, 分别点板10 μL于相应的SD/-Trp/-Ura和SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal平板, 参考图1。

4. 28-30°C培养2-3 d, 观察每组重组酵母在平板上生长状况和颜色深浅, 从而确定是否互作。

注: 如果, 梯度稀释点板在SD/-Trp/-Ura平板上生长正常, 在SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal平板上生长缓慢或不能生长, 可能是酵母菌利用半乳糖作为碳源的能力较弱导致。建议增加过渡培养的步骤: 用3 mL SGR/-Trp/-Ura液体培养基(2%半乳糖, 1%棉子糖), 摆菌至OD<sub>600</sub>为0.5-1.0, 5000 rpm离心40 s弃上清。无菌水清洗一次。无菌水重悬菌液, 然后梯度点板(参考上述)。

## 四、互作验证分析

### 4.1 互作

由图1可知, 在SD/-Trp/-Ura平板上, 对照组EGY48[Positive LacZi+ Positive AD]和EGY48[Positive LacZi+AD]长势相同。在SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal平板上, EGY48[Positive LacZi+ Positive AD]长势明显优于EGY48[Positive LacZi+AD], 且显蓝色, 所以Positive LacZi与Positive AD具有互作。同理, Bait1和Prey1也有互作。

### 4.2 无互作

由图1可知, EGY48[pBait2-LacZi+AD-Prey2]/EGY48[pBait2-LacZi+AD]和EGY48[pBait3-LacZi+AD-Prey3]/EGY48[pBait3-LacZi+AD]在所有的SD平板上, 长势都相同, 所以Bait2与Prey2无互作, Bait3与Prey3无互作。

### 4.3 Prey 蛋白有毒性

由图 1 可知，在 SD/-Trp/-Ura 平板上，EGY48[pBait4-LacZi+AD-Prey]长势弱于对照组 EGY48[pBait4-LacZi+AD]，可能是 Prey 蛋白有毒性导致；但是在 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板上，EGY48[pBait4-LacZi+AD-Prey]长势优于 EGY48[pBait4-LacZi+AD]，且显蓝色，所以 Bait4 与 Prey4 有互作。注：酵母杂交互作验证实验，不适用于毒性很强的 Prey 蛋白。

### 4.4 Bait 有自激活

EGY48[pBait2-LacZi+AD-Prey2]和 EGY48[pBait2-LacZi+AD]在所有的在 SD 平板上长势均相同，且能够显蓝色，所以 Bait2 具有较强的自激活。EGY48[pBait5-LacZi+AD-Prey5] 和 EGY48[pBait5-LacZi+AD]在 SD/-Trp/-Ura 平板上长势相同，在 SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal 平板上，实验组组较对照组的颜色更深，所以 Bait5 和 Prey5 有互作，虽然 Bait5 也有一定的自激活。

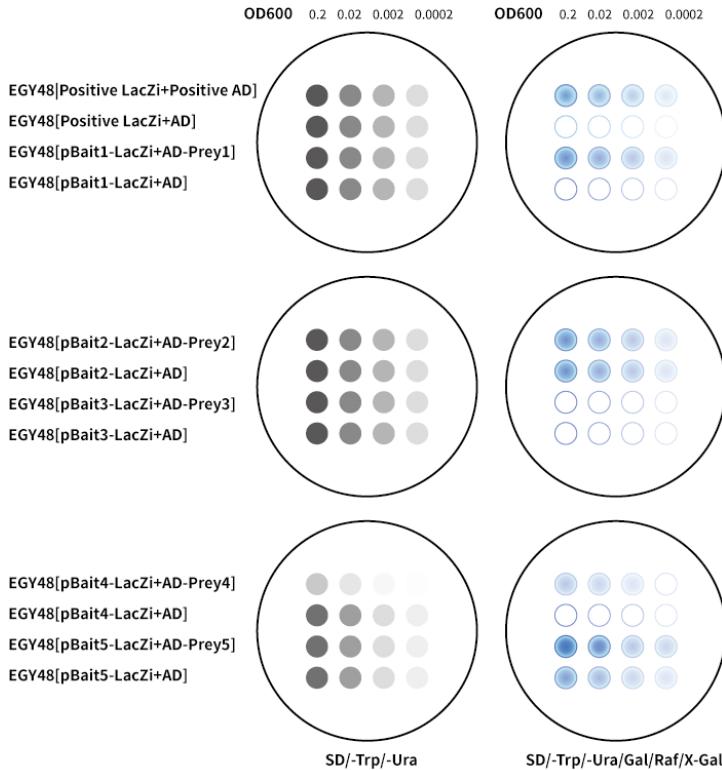


图 1.点板互作验证结果示意图



## 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  $pH 5.8 \pm 0.2$  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。

### 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。

## 附件①：LacZ基因胞外表达显色试剂盒（货号：ZCS121）

使用方法：

■ 筛选培养基配制：（SD/-Trp/-Ura平板）

1. 请将0.5 L的SD/-Trp/-Ura with Agar干粉，加入500mL的蒸馏水中，搅拌溶解；
2. 115°C灭菌20min，冷却后倒板；

注意：灭菌的培养基如有剩余，可置于超净台密封保存，再次使用时微波加热溶解后倒板即可。

■ 显色培养基配制：（SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal平板）

1. 组分配比，见下表：

| 组分                       | 培养基体积100ml | 培养基体积500ml |
|--------------------------|------------|------------|
| SC/-Trp/-Ura Broth       | 0.8g       | 4g         |
| 20%半乳糖溶液（过滤除菌）           | 10ml       | 50ml       |
| 20%棉子糖溶液（过滤除菌）           | 5ml        | 25ml       |
| 10×BU Buffer（pH7.0，过滤除菌） | 10ml       | 50ml       |
| X-Gal工作液 20mg/ml         | 0.4ml      | 2ml        |
| Agar                     | 2g         | 10g        |

2. 以配制100ml为例：称取 SC/-Trp/-Ura Broth和Agar，加水至75ml搅拌溶解；

注：1. 具体配制多少，根据需要按照上表比例计算称取即可；

2. Agar常温溶解不了为正常现象。

3. 115°C 20min灭菌培养基；同时预热20%半乳糖溶液、20%棉子糖溶液、10×BU buffer至55°C左右；

4. 培养基冷却到55°C左右后加入预热的上述成分以及X-Gal储存液，混匀倒板。

注意：显色平板请尽快使用。3天内避光4°C保存的板子亦可以使用。

实验方法：

以EGY48-pLacZi酵母单杂交体系为例：

- 1.载体构建pLacZi-X & pB42AD-Y；
- 2.载体共转化EGY48酵母感受态细胞；
- 3.转化产物涂布SD/-Trp/-Ura with Agar 平板，28-30°C培养3-5天；
- 4.随机选择5个单菌落，Marker笔做好标记，挑取少量菌落做阳性克隆检测（参照ZC221A使用说明）；
- 5.挑取鉴定为阳性克隆的菌落涂布SD/-Trp/-Ura/Gal/Raf/X-Gal with Agar显色平板，28-30°C培养3-5天后观察显色反应。