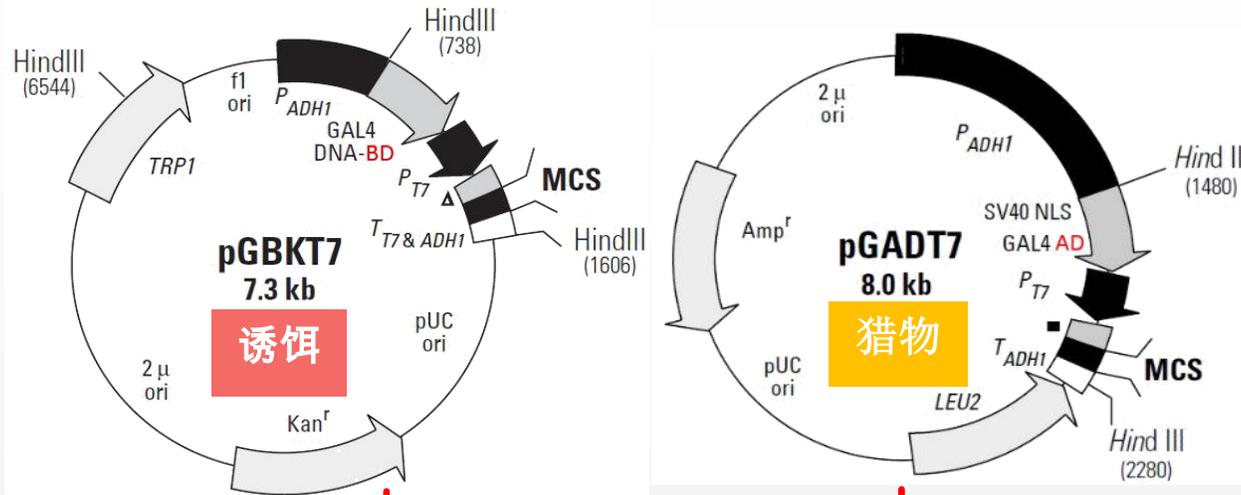


酵母杂交实验 结果解读

| 专注 | 品质 | 诚信 |

提供核酸和蛋白的整体研究方案

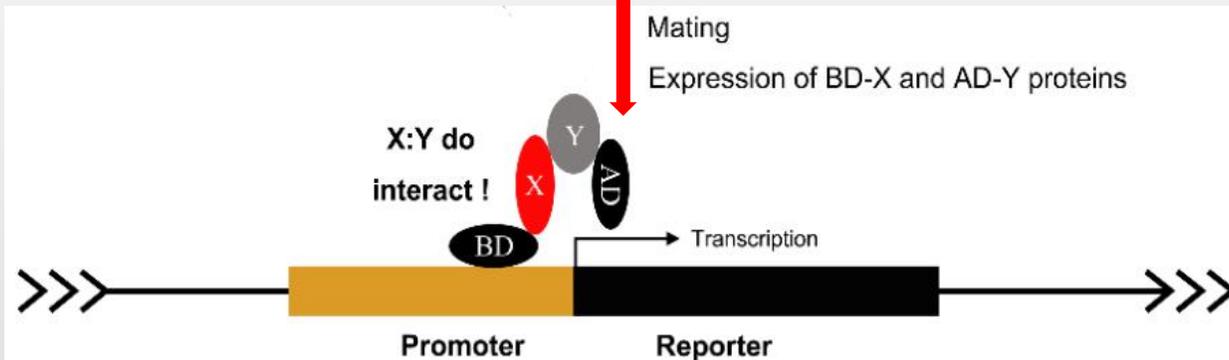
>>>



核蛋白酵母双杂交原理:

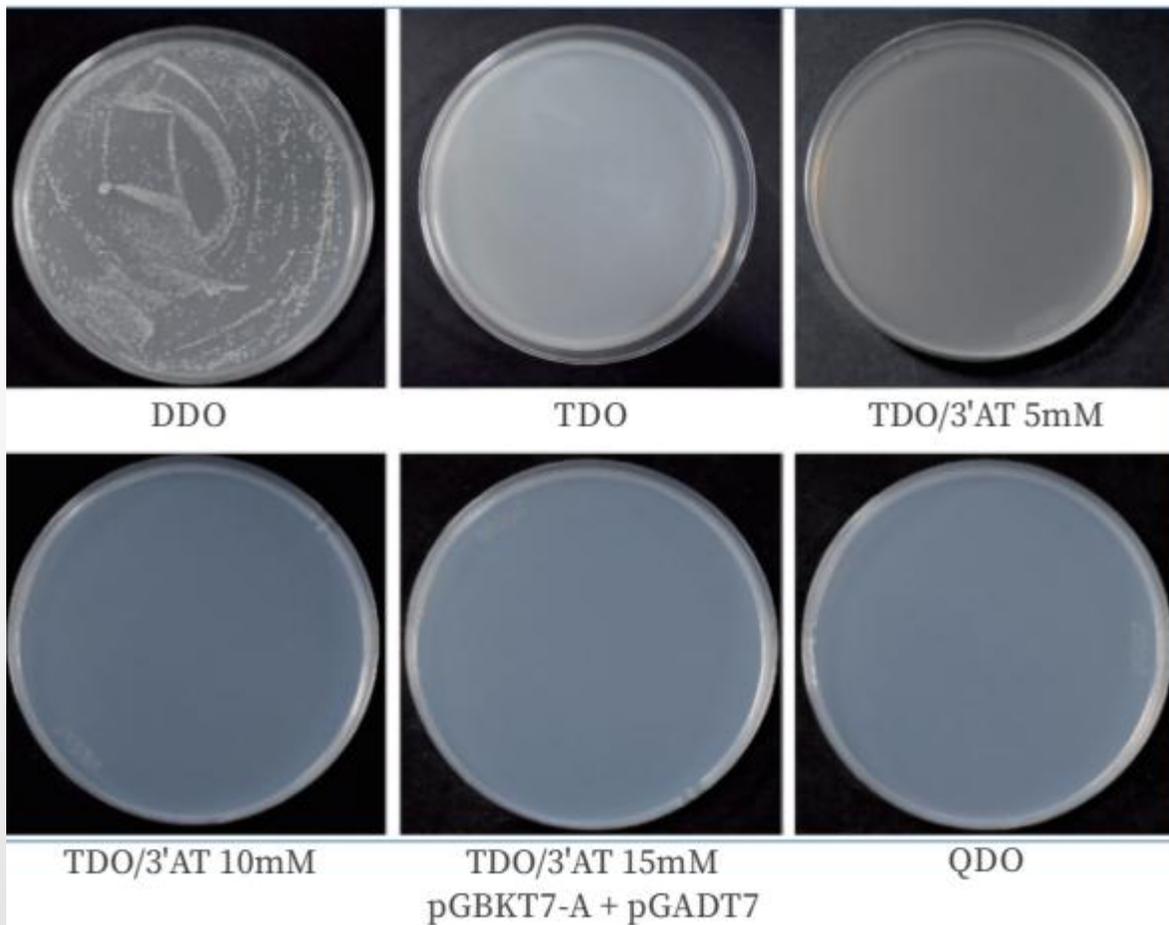
酵母转录因子GAL4在结构上是由DNA结合功能域(BD)和转录激活结构域(AD)组成。这两个结合域将它们分开时仍分别具有功能，但不能激活转录，只有当两者通过适当的途径在空间上较为接近时，才能重新呈现完整的GAL4转录因子，并可激活下游启动子，使启动子下游的报告基因得到转录

该技术利用酵母转录因子GAL4的特性，将BD与X蛋白融合，AD与Y蛋白融合，如果X、Y互作形成蛋白复合物，那么AD与BD会在空间上充分接近，使GAL4转录因子激活并启动报告基因的转录。



自激活验证

诱饵A蛋白毒性检测和自激活检测

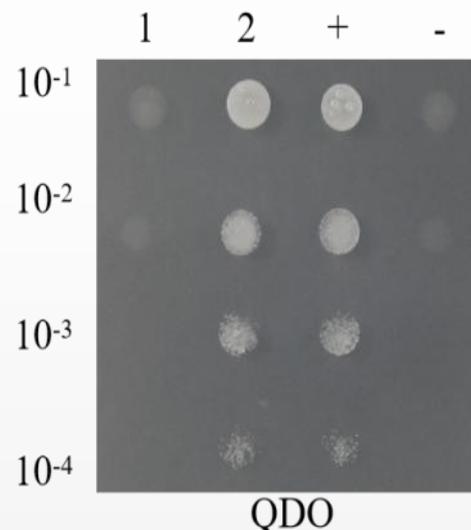
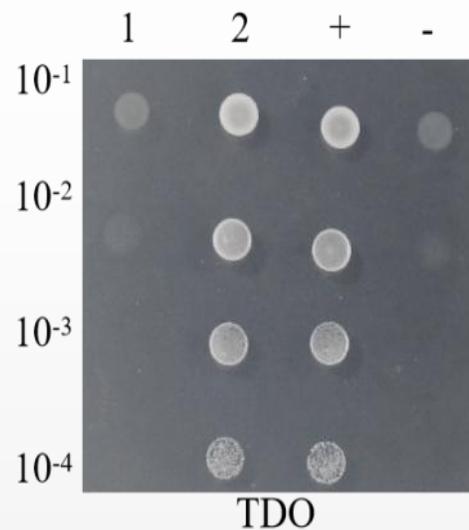
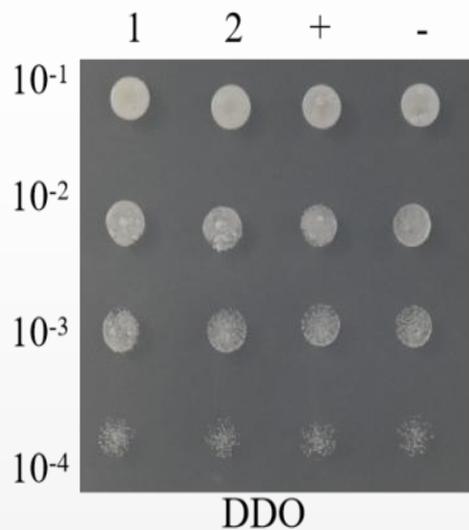


一般情况下，GAL4分子的BD可单独与上游激活序列（UAS）结合，但不能引起转录，但是某些蛋白本身具有自激活或转录功能，使DNA结合结构域杂交蛋白（BD-bait）在无特异激活结构域（AD）的情况下可以激活转录，如果将它构建到BD载体上，可以产生假阳性结果。

另外酵母细胞的某些具有转录激活活性的内源蛋白也可能与诱饵蛋白互作。这样就无法判断报告基因的表达是不是由于bait和prey互作导致的。所以只有在排除自激活的基础上，才能判断bait和prey是否互作。

在互作验证中，如果不进行自激活检测，不设对照组，而直接进行互作验证，无法判断实验结果是否可信。

点对点结果解读



- 1: Y2H[pGBKT7-A + pGADT7] (自激活)
- 2: Y2H[pGBKT7-A + pGADT7-B] (实验组)
- +: Y2H[pGBKT7-53 + pGADT7-T] (阳性对照)
- : Y2H[pGBKT7-lam + pGADT7-T] (阴性对照)

二缺板(**DDO**: SD/-Leu/-Trp)
(L-色氨酸、L-亮氨酸)

三缺板(**TDO**: SD/-His/-Leu/-Trp)

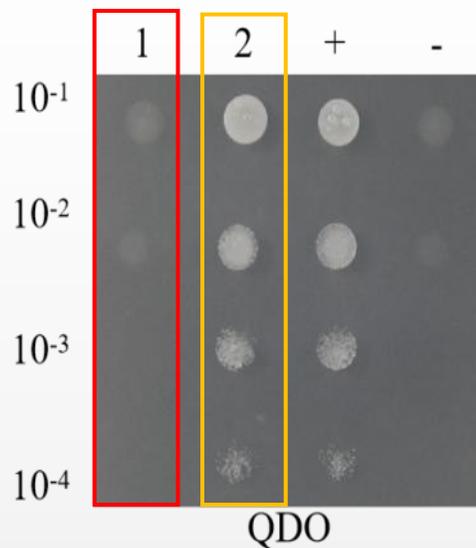
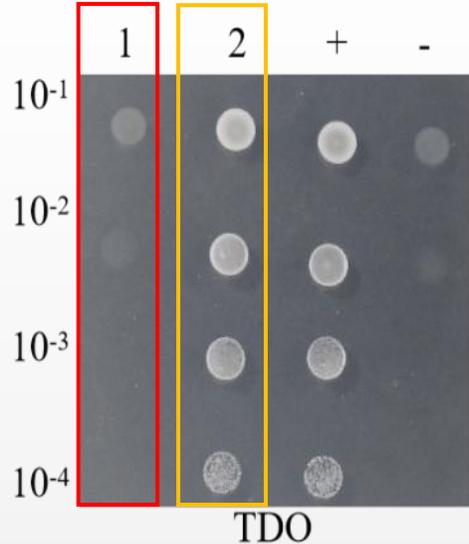
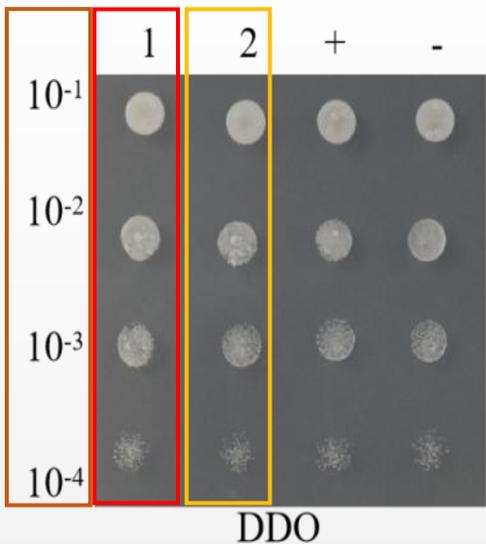
四缺板(**QDO**: SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp)

二缺培养基培养转化的产物：将共转的酵母细胞均匀涂布在二缺板；这两种氨基酸不是酵母生长所需的，不影响酵母生长，所以都能长出菌来。

影印三缺和四缺板：L-色氨酸、L-亮氨酸、L-组氨酸、腺嘌呤是酵母生长必需的，

点对点结果解读

10^{-1} - 10^{-4} 表示不同的稀释倍数



诱饵-X蛋白 猎物空载

1: Y2H[pGBKT7-X + pGADT7] (自激活)

2: Y2H[pGBKT7-X + pGADT7-Y] (实验组)

+: Y2H[pGBKT7-53 + pGADT7-T] (阳性对照组)

诱饵阳性质粒 猎物对照质粒

-: Y2H[pGBKT7-lam + pGADT7-T] (阴性对照组)

诱饵阴性质粒, 猎物对照质粒

- 1) 各个组合在二缺培养基上均能正常生长, 证明质粒转入到酵母中去, 阴性对照组在DDO有菌落生长, 在TDO、QDO上无菌落生长, 则说明整套实验操作系统没有问题;
- 2) 自激活组在DDO有菌落生长, 在TDO、QDO上无菌落生长, 则说明重组诱饵质粒成功转入宿主菌且对宿主无毒性; 且在特定的3-AT浓度下, 诱饵质粒不能激活酵母细胞报告基因的表达, 可以进行下一步共转实验; 若自激活组在TDO平板上有菌落生长, 则说明诱饵蛋白有很强的自激活, 需要将诱饵蛋白截短后再进一步进行自激活验证, 确保无自激活才可进行互作验证;
- 3) 实验组在DDO有菌落生长, 说明诱饵X和猎物Y共转化成功, 在TDO、QDO上有菌落生长, 说明诱饵X和猎物Y有互作, 在TDO/ 3-AT X mM (3-AT的浓度通过自激活验证获得) 上有菌落生长、QDO上无菌落生长, 说明诱饵X和猎物Y有弱互作; 在TDO、QDO上均无菌落生长, 说明诱饵X和猎物Y无互作。若实验组在DDO无菌落生长, 则说明转化失败, 需要重新进行转化。

感谢聆听

提供核酸和蛋白的整体研究方案

