

CLONTECH 社のユーザーマニュアルは

日本語版 <http://www.clontech.co.jp/manuals/indexJ.shtml>

英語版 <http://www.clontech.com/techinfo/manuals/index.shtml>

で入手可能です。

Two-Hybrid 法についての詳細や、各種ベクター、酵母株についての情報は、Yeast Protocols Handbook (protocol # PT3024-1)他、各種マニュアルを参照して下さい。

(「Two-hybrid.suppl」フォルダに、同 Handbook 他 PDF ファイルあり)

Two-Hybrid 法を用いて各種ライブラリーから目的の蛋白質と相互作用する蛋白質のスクリーニングを行うには、ライブラリーの形状により二つの方法 (co-transformation、mating) があります。

1. Co-transformation によるスクリーニング

MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries ユーザーマニュアル (Protocol # PT3247-1)、あるいは添付の MATCHMAKER Two-Hybrid System のマニュアル (TOYOBO) を参照にしてスクリーニングを行う。

各種ベクター、酵母株についての情報は、Yeast Protocols Handbook (protocol # PT3024-1) 参照。

以下のライブラリーを用いる場合は、この方法によりスクリーニングを行う。

***Schizosaccharomyces pombe* MATCHMAKER cDNA Library**

library data

cat. #: XL4000AA

lot #: 39043a

cloning vector : pGAD GH

cloning site : *Eco* RI & *Xho* I

priming method : *Xho* I - (dT)15 primed

mRNA source : exponentially growing strain SP972

estimated % of colonies with inserts : 90 %

number of independent clones : 1.3×10^7

average insert size : 1.3 kb

insert size range : 0.4 - 2.5 kb

形状 : in *E. coli* DH10B

また、この他に 2002/7/3 に、このライブラリーからプラスミドを回収したものが 있습니다 (1.5 mg ほど)。

(プラスミドライブラリーの増幅方法 : ユーザーマニュアル付録 B、C を参照)

◆実験の流れ◆

1. 融合蛋白質遺伝子 (DNA-BD / bait) の構築 (第 8 章 A 参照)

bait となる遺伝子を DNA-BD ベクター (pGBK-T7、pGBK-TH、pGBT9 等) に挿入する。

vector 情報の詳細については Yeast Protocols Handbook (p. 9、61) を御覧ください。vector 情報はクロンテック社のホームページからも入手可能です。

注 : pGBK-T7、pGBK-TH のセレクションマーカーは Km です。AD/ライブラリープラスミドは Amp マーカーなので、これらのプラスミドを用いた方が、のちに酵母株からプラスミドを回収する際便利です。

2. 構築した融合蛋白質が、それ自身でレポーター遺伝子を活性化しないこと、宿主に有害であるかどうかを確認する (ユーザーマニュアル第 8 章 C 参照)

融合蛋白質がほんのわずかでもレポーター遺伝子の転写を活性化した場合には、そのままスクリーニ

ングに用いることは極めて難しくなります。

3. ライブラリーと bait 遺伝子の酵母株への導入(第9章 参照)

前項2で、宿主に有害であると思われる場合(生育が極めて悪い等)、DNA-BD / bait とライブラリーの同時トランスフォーメーションを行う。そうでない場合は、連続トランスフォーメーションをおすすめします(DNA量が少なくすむので)。AH109株を用いる場合、SD/-Ade/-His/-Leu/-Trpのプレートでスクリーニングを行う。一部はSD/-Leu/-Trpプレートにて培養し、形質転換効率を計算し、スクリーニングしたクローン数を算出する(第9章表6注意d、第9章D参照)。

4. 陽性クローンの解析(第10章A参照)

5. 酵母からのプラスミドDNAの単離

6. 相互作用の再テスト(第10章E参照)

大腸菌からプラスミドDNAを回収し、AH109株に、BD/baitプラスミドと共に形質転換する。この時、からのBDベクター、ネガティブコントロール遺伝子が挿入されたBDベクターとも共に形質転換を行い、レポーターの活性化がBD/baitと得られた陽性クローンによってのみ引き起こされることを確認する。

7. AD/library インサートのシーケンス

6、7の過程は、好みでどちらから行っても、あるいは同時に行ってもかまわないと思います。

◆実験の実際◆ *ここでは、連続トランスフォーメーションについて記述しています。

スクリーニングの準備

BD/bait融合蛋白質がレポーターを活性化しないことを確認するために、AH109株に、

1. BD/bait
2. BD/bait + AD(からベクター)
3. BD/bait + AD/negative control(あれば)
4. BD/bait + AD/positive control(相互作用するとわかっているものがあれば)
5. pGBKT7-53/pGADT7-T(ポジコンとなるものならば何でもよい)

を形質転換し、SD/-Leu/-Trpプレート(2、3、4、5)、あるいはSD/-Trpプレート(1)で生育させる。

得られた形質転換体をSD/-Ade/-His/-Leu/-Trpプレート(1はSD/-Ade/-His/-Trp)にストリークし、生育の可否を検討する。もし、1、2、3の形質転換体が-Ade/-Hisのプレートにおいても生育可能であれば、新しくbaitを作り直す。

また、1の-Leu/-Trpプレートでの生育が著しく悪いようであれば、発現している融合蛋白質が宿主にとって有害である可能性があるため、baitを作り直すか、あるいはライブラリー形質転換の時に同時トランスフォーメーションを行ってみる。

1の形質転換体を用いて次のステップに進む(グリセロールストックを作っておくとよい)。

ライブラリープラスミドの形質転換

- BD/baitを形質転換したAH109細胞をSD/-Trpプレート上で2mm以上に生育させる
- シングルコロニー(3週間以内のもの)を2、3個選び、20mlのSD/-Trp液体培地に接種する。
- 30℃にて16~18時間振盪培養。

- 培養液を、300 ml の YPDA が入ったフラスコにうつす。
- 30°Cにて3時間振盪培養。
- 細胞を3000 rpm、5分間遠心して回収する。
- 20 ml ほどの TE にて細胞を洗浄する。
- 用時調製した 1.5 ml の 1×TE/LiAc に細胞を懸濁する(コンピテント細胞)。
- 50µg のライブラリープラスミド、2 mg のキャリアーDNA(使用前に5分間ボイル、急冷したもの)を入れた 50 ml チューブに 1 ml のコンピテント細胞を加え、ボルテックスでよく混合する。
- 6 ml の PEG/LiAc 溶液を加え、ボルテックスにて混合。
- 30°Cで30分間振盪する。
- 700 µl の DMSO を加え、穏やかに十分混和する。
- 42°C、15分間ヒートショック(たまに混ぜる)。
- 2分間、氷上放置。
- 3000 rpm、1分間遠心して、上清を除く。
- 10 ml の YPDA に細胞を懸濁し、30°Cで1時間保温。
- 15 cm シャーレに作成した SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp プレートに 250 µl ずつプレーティングする(計 40 枚)。
また、別に、×10000、×1000、×100 の希釈液 100 µl ずつをそれぞれ SD/-Leu/-Trp プレートにプレーティングして、後で形質転換効率、スクリーニングしたクローン数を計算する(第9章 D 参照)。
- 30°Cにて7~10日培養する。
このとき、2~3日後に一度プレートを観察し、この時現れているコロニーに印をつけておく。長期間培養することにより偽陽性が生育するので、2~3日以降に現れて、2 mm 以上に生育しない小さな青白いコロニーは無視する。また、培養につれて赤褐色になり、生育が止まってしまったような Ade コロニーも無視する(白、ピンクは可)。

陽性クローン表現型の再テスト

- 上記のように生育した Ade+/His+ の形質転換体を SD/-Leu/-Trp プレートにシングルコロニーが得られるようストリークする。
- 30°Cで4日間培養後、再び SD/-Leu/-Trp プレートにシングルコロニーが得られるようストリークする。
- シングルコロニーを SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp プレートにストリークして、Ade+/His+ の表現型が維持されていることを確認する。こうして得られた陽性クローンからプラスミドを回収する。陽性クローンが途方もなく多い場合は、マニュアルに従いコロニーPCR、制限酵素処理によるグループ化を行うか(第10章 C 参照)、さらに多い場合はコロニーハイブリダイゼーションを行って、重複するクローンを排除する(Yeast Protocols Handbook 参照)。

陽性クローンからのプラスミド DNA の単離

Yeast Protocols Handbook をご参照下さい。

または、以下の簡易プロトコールによって単離することも可能です。

- 2 ml YPDA 中、30°Cで定常期まで(～16 時間)培養する。
- 遠心して、ペレットを 200 μ l の cell lysis buffer (2 % TritonX-100、1 % SDS、100 mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に懸濁する。
- 等量(200 μ l)のフェノール/クロロホルムをくわえる。
- グラスビーズを加え、2 分間激しくボルテックス。
- 14,000 rpm、5 分間遠心し、水層を新しいチューブにとる。
(好みでもう一度フェノクロ処理を行う)
- エタノール沈澱を行う。
- 70 %エタノールで洗浄し、沈澱を 20 μ l の TE に溶解。
- ～10 μ l ほどを大腸菌にトランスフォームする。
(AD-library ベクターは amp マーカーを持っているので、+amp プレートにまく。注:BD ベクターとして pGBT9 を用いた場合、BD/bait のプラスミドも amp 耐性コロニーとして生育してしまう。この場合、コロニーPCR 等によって、AD プラスミドを選択する。)
- トランスフォーマントよりプラスミド回収

注:酵母が複数種の AD/library プラスミドを保持している場合があるので、余裕があれば、コロニーPCR 等を行って確認してみるとよい。以下の再テストを行って陰性となった場合は特に、スクリーニング時に陽性を示したものと違うプラスミドをひろってしまった可能性があるので注意する。

酵母菌での蛋白質間相互作用の再テスト

得られたライブラリープラスミドを、BD/bait プラスミドと共に AH109 株に形質転換する(SD/-Leu/-Trp)。この時、カラの BD ベクター、ネガティブコンコロール遺伝子が挿入された BD ベクターとも共に形質転換を行い(SD/-Leu/-Trp)、次いで形質転換体の SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp プレート上での生育を検討する。レポーターの活性化がBD/baitと得られた陽性クローンによってのみ引き起こされるクローンを真の陽性クローンとして、以後の解析に用いる。

AD/ライブラリーインサートのシーケンス

5' AD Sequencing Primer、3' AD Sequencing Primer を用いてインサートのシーケンスを行う。AD の読み枠と一致した ORF の存在が確認されたら、データベース上の配列と比較する。

2. Mating によるスクリーニング

Pretransformed MATCHMAKER Libraries User Manual (Protocol # PT3183-1: 英語版のみ)、その他、MATCHMAKER の各種マニュアルに従ってスクリーニングを行う。

このスクリーニングができるライブラリーは、Pretransformed MATCHMAKER Library (AD/ライブラリープラスミドが既に酵母株 Y187 にトランスフォームしてあるもの)です。Hela のライブラリー等は、この形状です。

◆実験の流れ◆

1. 融合蛋白質遺伝子 (DNA-BD / bait) の構築

bait となる遺伝子を DNA-BD ベクター (pGBK-T7, pGBK-TH, pGBT9 等) に挿入する。

vector 情報の詳細については *Yeast Protocols Handbook* (p. 9, 61) を御覧ください。vector 情報はクロンテック社のホームページからも入手可能です。

注: pGBK-T7, pGBK-TH のセレクションマーカーは Km です。AD/ライブラリープラスミドは Amp マーカーなので、これらのプラスミドを用いた方が、のちに酵母株からプラスミドを回収する際便利です。

2. 構築した融合蛋白質が、それ自身でレポーター遺伝子を活性化しないこと、宿主に有害であるかどうかを確認する (ユーザーマニュアル VI. B 参照)

融合蛋白質がほんのわずかでもレポーター遺伝子の転写を活性化した場合には、そのままスクリーニングに用いることは極めて難しくなります。

また、液体培地中での増殖を見た時に、カラの BD ベクターを形質転換したものよりも極めて悪いようであれば、有害であると思われます。この場合、用いた bait の領域を再検討するか、発現量の少ないベクター (pGBK9) を用いてみたほうがよいでしょう。

さらに、場合によっては mating 効率をあらかじめ見ておいたほうがよいかもしれません (VI. D)。

3. ライブラリー-strain と bait strain との mating (VII. B)

4. 陽性クローンの解析

5. 酵母からのプラスミド DNA の単離

6. 相互作用の再テスト

大腸菌からプラスミド DNA を回収し、AH109 株に、BD/bait プラスミドと共に形質転換する。この時、からの BD ベクター、ネガティブコントロール遺伝子が挿入された BD ベクターとも共に形質転換を行い、レポーターの活性化が BD/bait と得られた陽性クローンによってのみ引き起こされることを確認する。

7. AD/library インサートのシーケンス

6, 7 の過程は、好みでどちらから行っても、あるいは同時に行ってもかまわないと思います。

◆実験の実際◆

スクリーニングの準備

BD/bait 融合蛋白質がレポーターを活性化しないことを確認するために、AH109 株に BD/bait プラスミドを形質転換し、SD/-Trp プレートで生育させる (BD カラベクターも同時に形質転換しておく)。

得られた形質転換体を SD/-Ade/-His/-Trp にストリークし、生育の可否を検討する。もし、-Ade/-His のプレートにおいても生育可能であれば、新しく bait を作り直す。

形質転換体を用いて次のステップに進む (グリセロールストックを作っておくとよい)。

bait strain の準備

- 上記形質転換体 (SD/-Trp プレート上のもの) のシングルコロニーを、50 ml の SD/-Trp に植菌する。
- 30°C で 16-24 時間培養し、OD₆₀₀ の値を測定する。この時、0.8 以上になっているはずである (カラベクターを形質転換したものもチェック)。もしそうならなければ、融合蛋白質が宿主にとって有害であると考えられるので、用いる bait の領域を再検討するか、発現量の少ないベクター (pGBK9 注: Amp 耐性) を用いてみたほうがよいでしょう。
- 1500 rpm、5 分間遠心して、細胞を回収する。
- 細胞濃度が 1×10^9 cells/ml 以上になるように、~5 ml の SD/-Trp 液体培地に懸濁する (AH109/BD-bait 懸濁液)。

library strain (Y187) と bait strain (AH109) の mating

- library strain の入ったチューブ (~1 ml) を室温程度のウォーターバスでとかす。
- 細胞を均一に混ぜて、10 μ l ほどを別にとって氷上においておく (後にタイターをはかるのに用いる。タイターの測定法については、Appendix A を参照)。
- 滅菌した 2L のフラスコに、残りの library と、上記の作製した AH109/BD-bait 懸濁液を入れる。
- library の入っていたチューブを 1 ml の 2 \times YPDA/Km で洗い、フラスコに加える。さらに、45 ml の 2 \times YPDA/Km を加える。フラスコの内容物をおだやかに均一にまぜる。
- 30°C、30-50 rpm で、20-24 時間インキュベートする。早く回転させると mating 効率が落ちるので、必ず 50 rpm 以下にする。
- 1500 rpm、10 分間遠心して、集菌する。フラスコに残った細胞を 30 ml の 0.5 \times YPDA/Km (50 μ g/ml) で洗浄し、先に遠心したチューブにうつして細胞のペレットを再懸濁する。フラスコをさらに 20 ml の 0.5 \times YPDA/Km (50 μ g/ml) で洗浄し、また同じチューブに加える。
- 1500 rpm、10 分間遠心し、細胞のペレットを 10 ml の 0.5 \times YPDA/Km (50 μ g/ml) に懸濁する。懸濁液の総量を測っておく。
- 以下のようにプレーティングする。
 - a) mating 効率を見るため、 $\times 10$ 、 $\times 100$ 、 $\times 1,000$ 、 $\times 10,000$ の希釈液を作り、各 100 μ l を以下の 3 種のプレートにまく。
 1. SD/-Leu
 2. SD/-Trp
 3. SD/-Leu/-Trpmating 効率の計算は、User Manual の VII. C を参照してください。
 - b) 残りを 15 cm シャーレに作製した SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp プレートに 200 μ l ずつまく (50 枚ほど)。
- 30°C にて 5 日間培養する。

このとき、2~3 日後に一度プレートを観察し、この時現れているコロニーに印をつけておく。長期間培養することにより偽陽性が生育するので、2~3 日以降に現れて、かつ 2mm 以上に生育しない小さな青白いコロニーは無視する。また、培養につれて赤褐色になり、生育が止まってしまったような Ade コロニーも無視する (白、ピンクは可)。

陽性クローン表現型の再テスト

- 上記のように生育した Ade⁺/His⁺ の diploid を SD/-Leu/-Trp プレートにシングルコロニーが得られるようストリークする。
- 30°C で 4 日間培養後、再び SD/-Leu/-Trp プレートにシングルコロニーが得られるようストリークする。
- シングルコロニーを SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp プレートにストリークして、Ade⁺/His⁺ の表現型が維持されていることを確認する。こうして得られた陽性クローンからプラスミドを回収する。陽性クローンが途方もなく多い場合は、マニュアルに従いコロニー PCR、制限酵素処理によるグループ化を行うか (VIII. C)、さらに多い場合はコロニーハイブリダイゼーションを行って、重複するクローンを排除する (Yeast Protocols Handbook 参照)。

陽性クローンからのプラスミド DNA の単離

Yeast Protocols Handbook をご参照下さい。

または、以下の簡易プロトコールによって単離することも可能です。

- 2 ml YPDA 中、30°C で定常期まで (~16 時間) 培養する。
- 遠心して、ペレットを 200 µl の cell lysis buffer (2 % TritonX-100、1 % SDS、100 mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA) に懸濁する。
- 等量 (200 µl) のフェノール/クロロホルムをくわえる。
- グラスビーズを加え、2 分間激しくボルテックス。
- 14,000 rpm、5 分間遠心し、水層を新しいチューブにとる。
(好みでもう一度フェノクロ処理を行う)
- エタノール沈澱を行う。
- 70 % エタノールで洗浄し、沈澱を 20µl の TE に溶解。
- ~10 µl ほどを大腸菌にトランスフォームする。
(AD-library ベクターは amp マーカーを持っているので、+amp プレートにまく。注: BD ベクターとして pGBT9 を用いた場合、BD/bait のプラスミドも amp 耐性コロニーとして生育してしまいます。)
- トランスフォーマントよりプラスミド回収

酵母菌での蛋白質間相互作用の再テスト

得られたライブラリープラスミドを、BD/bait プラスミドと共に AH109 株に形質転換する (SD/-Leu/-Trp)。この時、カラの BD ベクター、ネガティブコントロール遺伝子が挿入された BD ベクターとも共に形質転換を行い (SD/-Leu/-Trp)、次いで形質転換体の SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp プレート上での生育を検討する。レポーターの活性化が BD/bait と得られた陽性クローンによってのみ引き起こされるクローンを真の陽性クローンとして、以後の解析に用いる。

AD/ライブラリーインサートのシーケンス

5' AD Sequencing Primer、3' AD Sequencing Primer を用いてインサートのシーケンスを行う。AD の読み枠と一致した ORF の存在が確認されたら、データベース上の配列と比較する。

3.特に使用する試薬と確認のための transformation について

020617 早川 智博

培地

YPD 培地

Difco peptone	20.0	g
Yeast extract	10.0	g
Agar (for plates only)	20.0	g
D.W.	950.0	ml
Total (final)	1000.0	ml

上記の分量を計量し、pH を 5.8 に合わせた後、オートクレーブをかける。
ある程度冷めたら (~55°C)、滅菌済みの 40% glucose を 50ml 加える。

* YPDA 培地には YPD 培地をオートクレーブ後、ある程度冷めたら 0.2% adenine hemisulfate 溶液を 15ml 加える (終濃度 0.003%)。

* カナマイシンを添加する場合は、同様にオートクレーブ後ある程度冷めたら 30mg/ml カナマイシンを 0.33~0.5ml 添加する (終濃度 10~15mg/L)。

SD 培地

Yeast nitrogen base without amino acids	6.7	g
Agar (for plates only)	20.0	g
D.W.	850.0	ml
Total (final)	1000.0	ml

上記の分量を計量し (必要なら pH を 5.8 に合わせる)、オートクレーブをかける。
ある程度冷めたら (~55°C)、滅菌済みの 40% dextrose (glucose) を 50ml 加える。またこの際に 3-AT, adenine, X-gal などを加える。

* 3-AT の使用濃度は、yeast strain、plasmid 等により変わってくる。

* adenine を添加する場合、0.2% adenine hemisulfate 溶液を 15ml 加える (終濃度 0.003%)。

Transformation

carrier DNA の denature

10mg/ml の Salmon sperm DNA または Herring testes DNA を sonication し、20 分ボイルする。ボイル後、氷で急冷する。

PEG/LiAc solution	10ml
50% PEG 4000	8.0 ml
10x TE	1.0 ml
10x LiAc	1.0 ml
total	10.0 ml

• Stock solutions

50% PEG 4000:D.W. で 1:1 に混ぜる。(溶けにくい場合は温める)

100% DMSO

10x TE: 0.1 M Tris-HCl, 10mM EDTA, pH7.5 (オートクレーブ滅菌)

10x LiAc: 1 M lithium acetate, AcOH で pH を 7.5 に調整後オートクレーブ。

精製方法

1. 直径 2~3mm の大きさになったコロニーを 1ml の YPD または SD 培地に植菌。
2. 菌の固まりが無くなるように、よくボルテックスを行う。
3. 2 を 50ml の YPD または SD 培地を入れたフラスコに移す。

4. 30°Cで16~18時間培養する(250rpm shaking, OD600>1.5)。
5. 4のovernight cultureを300mlのYPDを入れたフラスコに移す。希釈後必要ならOD600を測定し、OD600が0.2より低いようならovernight cultureを追加する。
6. 30°Cで3時間培養する(230rpm)。培養後OD600はだいたい0.4~0.6になっているはずである。
7. 培養液を50ml遠心管に移し、1000 x gで5分遠心する(室温)。
8. 上清を捨て、TEまたはD.W.で完全にsuspendし、1本のチューブにまとめる(最終のボリュームが25~50mlになるように)。
9. 1000 x gで5分遠心する(室温)。
10. 上清をデカントで捨てる。
11. 1.5mlの1x TE / 1x LiAc(用時調製)で細胞のペレットをresuspendする。
12. Eppendorf tubeに0.1µgのplasmid DNAと0.1mgのcarrier DNAを入れて混ぜる。
13. 11で調製したコンピテントセルを0.1mlずつ12のEppendorf tubeに添加。ボルテックスでよく混ぜる。
14. 0.6mlの滅菌済みPEG / LiAc solutionをそれぞれ添加し、10秒ほどボルテックスでよく混ぜる。
15. 30°Cで30分ほど培養する(200rpm shaking)。
16. 70µlのDMSOを添加し、転倒攪拌にてよく混ぜる。ボルテックス厳禁。
17. 42°Cのヒートショックを15分間行う。
18. 氷冷1~2分間。
19. 14,000 rpmで5秒ほど遠心(室温)。上清を除く。
20. 0.5mlの滅菌済み1xTE bufferでresuspendする。
21. それぞれのセレクションに適したSD agar plateに100µlずつspreadする。
22. 30°Cでコロニーができるまでインキュベート(通常2~4日)。