

## 2.5 M 3-AT 溶液 使用说明书

**保存条件：**-20℃储存，有效期 18 个月。

**包装内容：**

产品内容	SL0930-100ml	SL0930-5×5ml
2.5 M 3-AT 溶液（过滤除菌）	100 mL	5×5 mL
说明书	1 份	

**产品简介：**

*HIS2* 作为报告基因时，会有一定程度的泄漏性表达，出现背景过高的现象，一般称作自激活。这时可以在筛选培养基中加入适量的 *HIS2* 竞争性抑制剂 3-AT（3-amino-1,2,4-triazole），以降低背景；或者增加一个筛选标记 Ade 来进行更加严格的筛选。加入的 3-AT 浓度过高，蛋白间比较弱的相互作用也可能被抑制，因此需要筛选确定 3-AT 的最适浓度。

Coolaber 的 3-AT 溶液为经过过滤除菌的即用型母液，用于酵母杂交实验抑制本底表达，用以准确筛选出蛋白互作引发的 His 的报告基因的表达。

**使用方法：**

1. 计算所需平板的数量，计算配置培养基体积；
2. 设置 3-AT 的浓度梯度（建议 10-50 mM 的浓度范围设 3-5 个梯度，常用浓度约 30 mM）；
3. 灭菌筛选培养基，待培养基冷却到 55 °C 左右，加入 3-AT 母液，摇匀后倒板；
4. 标记每个平板的 3-AT 浓度，超净台冷却凝胶后，按单位面积单个克隆计算培养物浓度，涂板；
5. 28-30 °C 培养 3-5 天，筛选出最佳 3-AT 浓度，用于后期互做筛选。

**注意：**

1. 理想情况 10 mM 浓度的 3-AT 平板会有少量生长，20 mM 浓度的 3-AT 不能或极少生长。如果在 80 mM 浓度的 3-AT 平板上生长酵母，说明自激活活性太高，不能用于双杂交筛选。
2. 诱饵蛋白能够单独激活报告基因的表达，该蛋白如果是具有转录激活域一个转录因子，需要去掉转录激活结构域。如果不是转录因子但仍具有较强的转录激活活性，需要将诱饵蛋白具有激活活性的区域去除，但这样操作有可能影响蛋白间的互作。