

Experiment 26: Ermittlung der Protein-Protein Interaktionen des Hefe 2-hybrid Systems.

**Verfasserinnen und Verfasser:** Albina Sokoli  
Rreze Mehmeti  
Jan Buchmann  
Oliver Hotz

**Betreuerin:** Ruth M Leiber

---

## **Einleitung**

Das System der Hefe 2-hybrid ist eine genetische Methode um Wechselwirkungen zwischen Proteinen in vivo in *Saccharomyces cerevisiae* zu ermitteln.

Das System kann benutzt werden um neue Proteinen einer Bibliothek auf Interaktion mit einem Köder-Protein auszusortieren oder zwei

bekannte Proteine oder Proteindomänen bei denen eine Interaktion zu erwarten ist zu testen.

## **Verwendete Hefezellen**

Linie A, welche LRX1 gen auf dem „Bait“ Köderplasmid tragen

Linie B, welche RALF gen auf dem „Prey“ Opferplasmid tragen

## **Verwendete Plasmide**

RALF gene auf dem Opferplasmid

Leeres Köderplasmid

Leeres Opferplasmid

## **Verwendete Lösungen und Reagenzien**

Träger DNA, Polyethyleneglycol (PEG) 3500 50% w/v, Lithium Acetate 1.0 Molar, steriles Wasser, Lösung für den Beta-Galactosidase-Assay, Beta-Mercaptoethanol, X-gal

Es wird ein Umwandlungsexperiment durchgeführt, indem das Köderplasmid oder das Opferplasmid in die kompetenten Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* eingeführt werden.

Zwei unterschiedlichen Hefelinien werden mit unterschiedlichen Plasmide umgewandelt.

Die Umwandlungs-Leistungsfähigkeit ist von der Dauer des Hitzeschockes abhängig.

Zum Vorgehen sei auf das Skript

[http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3\\_05/pdf/26yeast05.pdf](http://www.microeco.unizh.ch/uni/kurs/bio3_05/pdf/26yeast05.pdf) verwiesen.

## Experiment 26: Ermittlung der Protein-Protein Interaktionen des Hefe 2-hybrid Systems.

### 1. Teil

Drei Eppendorf tubes wurden gemäss der Anleitung vorbereitet

1. PEG 3500 50% w/v 240 microliter
2. Lithium Acetate 1.0 M 36 microliter
3. Carrier DNA (2mg/ml) 50 microliter
4. Plasmid DNA (1 microgramm) 34 microliter

Die drei Eppendorfer tubes wurden im Wasserbad je 10min, 20min, 30min lang inkubiert. Von jedem E. tube wurde der Inhalt einmal verdünnt auf 100 microliter Wasser und einmal Unverdünnt auf je eine Petrischale ausplattiert. Die Petrischalen werden für 3-4 Tage bei 30° C inkubiert.

### 2. Teil

Es wurden die Kolonien der transformierten Hefezellen ausgezählt und ausgewertet.

Transformations Fähigkeit der Hefezellen

	10 min	20min	30min
Verdünnt	400	1800	4000
Unverdünnt	190	1500	3440

Der Tabelle kann man entnehmen, dass das Transformationsvermögen der Zellen von 10 min auf 20 min bei 42°C viel grösser ansteigt als nach 30min. Der Grund liegt darin, dass nach 30min Hitzeschock die Zellen zum Teil porös werden und platzen.

### 3. Teil

Es wurde ein beta-galactosidase Assay gemacht um zu sehen ob die Protein-Protein Interaktion stattgefunden hat.

Als Selektivmedien wurden zwei Platten mit fehlenden Aminosäuren benutzt, da bei Hefe keine Selektion durch Antibiotika erfolgen kann:

- Auf die Platte ohne TRP, LEU und HIS wurde das „bait“ und „prey“ Paar aufgetragen und jeweils ein „bait“ ohne „prey“ aufgetragen und ein „prey“ ohne „bait“
- Auf den Platten ohne TRP und LEU wurde jeweils ein „bait“ ohne „prey“ aufgetragen und ein „prey“ ohne „bait“ und das „bait“ und „prey“ Paar

Auf der Platte ohne TRP, LEU und HIS wuchs nur die Kombination: „bait“ und „prey“ Paar und man konnte eine Blaufärbung erkennen, also hat dort eine Protein-Protein Interaktion stattgefunden. Bei den Platten ohne TRP und LEU konnte man Hefekolonien erkennen, aber der  $\beta$ -Galactosidase-Assay war negativ.