

## THY.AP4 二代甘油菌种说明书

### ● 产品规格 (CAT#: Bsa-1210)

THY.AP4 二代甘油菌	400 $\mu$ l / 1 支	保存: -80°C/大于 10 年
YPDA 平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	—

### ● 基因型

MAT $\alpha$ ;ade2-, his3-, leu2-, trp1-,ura3-;lexA::ADE2,lexA::HIS3, lexA::lacZ

### ● 产品说明

THY.AP4 菌株是 mbSUS assay 酵母双杂实验用菌株, MAT $\alpha$  型, 可直接转化质粒或与 MAT $\alpha$  型酵母菌株 THY.AP5 通过 mating 操作进行蛋白互作验证或筛库试验。Transformation marker 为: trp1, leu2, 报告基因为: lacZ、HIS3、ADE2。mbSUS assay 系统需要 pNXgate、pXNgate 和 pMetYC gate 质粒配套使用。质粒 pNXgate/pXNgate 的筛选标志为 TRP1, 用于表达 Nub G 与目标蛋白 (Prey) 的融合蛋白; 质粒 pMetYC gate 的筛选标志为 LEU, 用于表达 Cub-PLV 与目标蛋白(Bait)的融合蛋白。mbSUS assay 系统原理: 自然状态的泛素的 N 端区域 Nub 和 C 端区域 Cub 能够自发组成完整的泛素蛋白, 而 Nub 的突变形式 NubG 与 Cub 不互作, 无法形成完整的泛素蛋白; 将要检测的蛋白分别与 NubG 和 Cub 融合, 形成 bait 融合蛋白 (bait-CubPLV)和 prey 融合蛋白 (prey-Nub), 如果 bait 和 prey 发生相互作用, 就会促使 NubG 和 Cub 相互接近, 形成完整的泛素蛋白, 泛素蛋白能被 USP 识别, 释放融合在 Cub C 端的人工转录因子 PLV(protein A-LexA-VP16), PLV 能够进入细胞核中激活 lacZ、HIS3、ADE2 报告基因。本产品为二代甘油菌种(一代种扩增两个世代后保种), 未经过大量扩繁, 核 DNA 及表型稳定, 菌落表型及生长曲线与原种匹配度大于 99.5%。

### ● 操作方法

- 1, 客户收到菌株后, 不可直接吸取菌液接种扩繁。应先对菌种进行复壮, 待长出单菌落后挑单菌落接菌扩繁; 复壮方法如下: 在超净台打开盖子, 用接种环沾取少量甘油菌液采用交叉划线法(图 1)在 YPDA 平板表面轻轻划线(注意: 不要刺破培养基), 将平板封口后放 30 度培养 3-5 天, 即可长出单菌落。
- 2, 交叉划线法: 划线的目的是经过几次不连续划线达到梯度稀释菌液的效果, 保证能长出单菌落。具体步骤如下:  
A, -80 度取出的甘油菌应在超净台打开盖子, 立即在表面挑取菌液/菌块划线, 不用等融化后划线, 固体状态时即可用接种环挑取划线, 操作要点是“快速操作, 立即划线”, 目的是最大限度减少温度波动对菌种造成的“冷休克”和冰晶物理损伤; 如果收到的是液体甘油菌, 可直接划线, 在超净台打开盖子用接种环沾取少量甘油菌液划线。

B, 取出无菌接种环, 注意不要污染, 图 1 所示为标准的五段交叉划线法, 分五个区, 每个区划三条直线, 第 1、2 区可共用一个接种环, 划好 1、2 区后换一个新接种环划第 3 区, 再换一个新接种环划第 4 区, 再换一个新接种环划第 5 区, 每一次换接种环划线要经过前面划线区的划线痕迹, 这样就相当于对菌种进行稀释。简易划线也可只划 3 个区或 4 个区。

C, 客户也可用金属接种环灼烧后划线; 本公司提供的接种环为 ABS 材质, 不可灼烧。

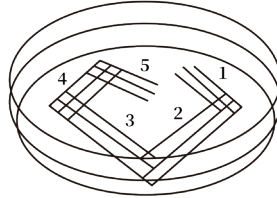


图 1. 五段交叉划线法示意图

## ● 注意事项

- 1, 客户收到二代甘油菌株后, 应立即放-80 度保存, 不可放-20 度保存。
- 2, 应减少甘油菌冻融的次数, 冻融的次数越多, 菌种的活力越低;
- 3, 若扩繁菌种, 注意一次扩繁不要超过四个世代, 以保证菌种基因组的稳定; 扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证, 所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。