

## YTK12 二代甘油菌种说明书

### ● 产品规格 (CAT#: Bsa-1170)

YTK12 二代甘油菌	400 $\mu$ l / 1 支	保存: -80 $^{\circ}$ 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

MATa, trp1-1, ade2-101, his3, ura3-1, suc2

### ● 产品说明

YTK12 菌株是一个蔗糖转化酶(SUC2)缺陷型酿酒酵母。酵母蔗糖转化酶(SUC2)可将蔗糖或棉子糖水解成葡萄糖和果糖;参与碳水化合物分解代谢;可以两种不同的形式定位于细胞质并分泌到细胞外起作用,该基因的 N 端有一个外分泌信号肽,这个信号肽引导蔗糖转化酶分泌到细胞外起作用。YTK12 菌株中的 SUC2 基因被突变,无法合成蔗糖转化酶,通过酵母质粒: pSUC2 载体引入一个有功能的蔗糖转化酶基因,但是 pSUC2 空载体的 N 端信号肽被切除,无法分泌到胞外,把不同的待验证的多肽连接到 SUC2 蛋白的 N 端就可以验证连入的多肽是否有分泌功能。YTK12 酵母菌株为 SUC2 基因缺陷型菌种,无法在以棉子糖为单一碳源的 YPRAA 培养基上正常生长。只有将具有分泌活性的信号肽序列连接在 pSUC2 载体蔗糖酶基因 SUC2 的 N 端,转化入 YTK12 酵母菌株中,才能使蔗糖转化酶正常分泌, YTK12 酵母才能将棉子糖转化为葡萄糖,在 YPRAA 培养基上正常生长(Jacobs et al 1997, Oh et al 2009)。另外,蔗糖转化酶(SUC2)的水解产物葡萄糖可以将 2,3,5-三苯基四唑氯(TTC)还原为不溶的红色物质 1,3,5-三苯基甲酸(TPF),通过显色反应也可以判断待验证多肽是否有分泌功能。YTK12 菌株筛选标记(Transformation marker)为: trp1, his3, ura3。本产品为二代甘油菌株(一代种扩增两个世代后保种), 未经大量扩繁,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。

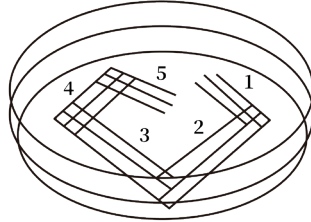


图 1. 五段交叉划线法示意图

### ● 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。