

SG/R-CAA with Agar 产品说明书

● 产品规格和内容:

包装名称	货号	包装含量	包装数量	保存条件/时间
SG/R-CAA with Agar	CAT#: YEM7013S-01	19.77g (可配 0.5L SG/R-CAA 固体培养基)	5 袋	室温干燥/24 个月
		20%半乳糖 (250ml/瓶)	1 瓶	
		20%棉子糖 (250ml/瓶)	1 瓶	
		50%葡萄糖 (5ml/瓶)	1 瓶	

● 产品组分与配方:

产品组分	SG/R-CAA Broth 配方/L	SG/R-CAA with Agar 配方/L	备注
YNB(含硫酸铵, 无氨基酸)	6.7g	6.7g	—
Casamino acids (酪蛋白水解物)	5g	5g	—
半乳糖	20g	20g	诱导剂, 必须添加
棉子糖	20g	20g	可选碳源, 优先添加
葡萄糖	1g	1g	可选碳源, 不是必须添加
Na ₂ HPO ₄ (磷酸氢二钠)	5.4g	5.4g	—
NaH ₂ PO ₄ (磷酸二氢钠)	7.44g	7.44g	—
Agar	—	15g	—

● PH 值(25°C): 6.0±0.2

● 产品说明

SG/R-CAA 是一种适用于 EBY100 酵母菌株的半合成培养基, YNB 提供氮源、维生素、微量元素; 半乳糖是融合蛋白表达的诱导剂; Casamino acids (酪蛋白水解物) 提供除腺嘌呤、尿嘧啶、色氨酸外的各种必需氨基酸和核苷酸, 部分维生素, 微量元素; Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 磷酸盐提供缓冲环境, 稳定 PH 值; 棉子糖和葡萄糖提供碳源(在 Aga2p 融合蛋白的诱导试验中, 半乳糖主要是作为诱导剂起作用, 虽然部分文献中提到半乳糖可以作为酿酒酵母的碳源使用, 但 EBY100 利用半乳糖的能力很弱, 在只有半乳糖作为碳源的环境中几乎不能生长, 但可以继续表达融合蛋白直到自身储存的能量耗尽; 棉子糖是酵母的优质碳源同时不会抑制酵母半乳糖诱导启动子的表达, 有利于 Aga2p 融合蛋白的持续表达; 葡萄糖是最好的碳源, 但同时也是半乳糖诱导启动子的抑制剂, 在 SG/R-CAA 诱导培养基中添加少量的葡萄糖可以提高菌体活力, 增加融合蛋白的表达量, 在葡萄糖存在时酵母快速繁殖, 储存能量, 当葡萄糖耗尽时菌体处于最佳的生长状态, 在半乳糖的诱导下表达大量融合蛋白)。

● 使用方法

SG/R-CAA with Agar 为 SG/R-CAA 固体培养基, 配制方法: 取 SG/R-CAA with Agar 培养基一袋, 加蒸馏水 350ml 搅拌溶解后, 定容到 0.4L, 121°C-15min 高压灭菌, 灭菌后温度降到 55 度以下, 加入 1ml 50%葡萄糖溶液, 50ml 20%半乳糖溶液, 50ml 20%棉子糖溶液。

● 注意事项

1. 若发现有严重吸潮现象, 停止使用或酌情增加用量。若配制少于 0.5L, 按比例加入即可。
2. 因为粉末中含有磷酸盐, 高压灭菌后会有少量沉淀, 不影响使用。

● EBY100 中 Aga2p 融合蛋白的诱导表达 Protocol (for reference only)

EPY100 菌株的培养可以用 YPD 也可以用 Minimal Dextrose Plates (with leucine、tryptophan) ;

PYD1 质粒转化 EPY100 感受态, 筛选阳性菌落的平板可以用以下四种培养基的固体形式: SD/-Trp/-Ura with Agar (货号: YM3234S), Minimal Dextrose Plates (with leucine)(货号: YEM7021S), YNB-CAA with Agar (with glucose)(货号: YEM7001S), 或 SD-CAA with Agar (货号: YEM7011S), 常用 SD/-Trp/-Ura with Agar。Aga2p 融合蛋白的诱导表达前的酵母细胞扩增步骤可以用以上四种培养基的液体形式, 常用 SD/-Trp/-Ura Broth (货号: YM3234L) 或 YNB-CAA with Agar (with glucose)。

注意: PYD1 质粒转化 EPY100 感受态的筛选培养基或融合蛋白诱导前的扩增步骤主要用来筛选出含有质粒的阳性菌落及蛋白诱导前扩增酵母细胞, 用何种培养基影响不大; 但是因试验展示的蛋白不同, 诱导融合蛋白的最佳诱导培养基需要做预试验确认, 不同的诱导培养基可能产生不同的诱导效果, 下面列出常用的八种 Aga2p 融合蛋白诱导培养基:

培养基名称	货号	特点	培养基名称	货号	特点
SG/-Trp/-Ura Broth	YEM7134L	只添加半乳糖, 菌生长慢	YNB-CAA with Agar (with galactose)	YEM7001L	只添加半乳糖, 菌生长慢
SGR/-Trp/-Ura Broth	YEM7234L	含半乳糖、棉子糖, 菌生长快	SG-CAA with Agar	YEM7012L	只添加半乳糖, 菌生长慢
SDG/-Trp/-Ura Broth	YEM7334L	含葡萄糖、半乳糖, 菌生长快	SGR-CAA with Agar	YEM7013L	含半乳糖, 棉子糖, 菌生长快
SDGR/-Trp/-Ura Broth	YEM7434L	含葡萄糖、半乳糖、棉子糖, 菌生长快	SDG-CAA with Agar	YEM7014L	含葡萄糖、半乳糖、棉子糖, 菌生长快

更常用的诱导培养基是 YNB-CAA with Agar (with galactose)或 SGR/-Trp/-Ura Broth。

下面以 YNB-CAA with Agar (with galactose)液体培养基为例简要介绍 EBY100 中 Aga2p 融合蛋白的诱导表达步骤:

1. 准备未转化质粒的 EBY100, EBY100(含 pYD1 空载体)和 EBY100(含 pYD1-gene)三种菌落, 其中 EBY100、EBY100(含 pYD1 空载体)作为对照使用
2. 酵母菌接种到 10ml SD/-Trp/-Ura Broth 或 YNB-CAA (with glucose)中 (用 50ml 或 100ml 三角瓶), 30°C、200rpm 过夜摇菌。
3. 第二天早晨测酵母在 600nm 处的吸光值。OD600 应介于 2-4 之间, 如果 OD600 低于 2, 继续摇菌, 若高于 4, 取 1ml 酵母菌液重新接种到 9ml YNB-CAA with Agar(with galactose)液体培养基中继续摇菌到合适的浓度。
4. 在室温下超净台操作, 将酵母培养物转移到离心管中, 3000g 离心 5 分钟, 弃上清, 吸干残液, 注意不要污染。
5. 加入含有 2%半乳糖的 YNB-CAA with Agar(with galactose)液体培养基, 将细胞沉淀重悬到 OD600=0.6-0.8, 同时取 OD600 为 0.6-0.8 的酵母培养物 4ml 作为诱导前的对照组样品(0 点)放冰中或 4 度, 或离心后弃上清放 -20 度保存。
6. 可在 20-25°C 环境温度下 200rpm 诱导 EBY100 中目的蛋白的表达。注意: 一般情况下, 优先在 20°C 下诱导 Aga2p 融合蛋白的表达, 某些特殊蛋白 (比如有些蛋白表达会影响酵母的细胞周期, 降低酵母生长速度; 或低温影响其二级结构、蛋白表达速度) 可以提高温度到 25 度。
7. 在 48 小时的诱导时间段内, 每隔 12h 取样一次(0 点样品已取), 在诱导的第 12h、24h、36h、48h 四个时间点各取一次样品(注意: 取样的量要与 0 点取样一致, 可根据 OD600 值计算每个取样时间点所取样的体积)。Aga2p 融合蛋白最快在菌体转移到半乳糖培养基后 5h 可以检测到, 表达量高峰在 12-48h, 72h 后酵母衰老、裂解会导致 Aga2p 融合蛋白降解, 检测不到。
8. Aga2p 融合蛋白检测: 若做 FITC 染色, 样品放冰中或 4 度保存, 直到所有样品准备完毕, 继续进行后面的染色步骤; 若做 western 鉴定 Aga2p 融合蛋白的表达, 所有样品可离心后保留沉淀, 放 -20 度保存。
9. 实验者第一次操作本试验, 最好准备 EBY100、EBY100(含 pYD1 空载体)和 EBY100(含 pYD1-gene)三种菌落做对照试验, 前两个对照组菌落可以只在 0h、24h 取两个样, EBY100(含 pYD1-gene)菌落按步骤 7 中的时间点取样, 也可每隔 6h 取样一次, 根据染色或 western 实验找到 Aga2p 融合蛋白最大表达量的时间点。操作熟练后可以不设对照组。