

## 抗霉素 A 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
抗霉素 A	BC1070L-01	200ul/支	1 支	-20 度/ 12 个月
	BC1070L-02	500ul/支	1 支	-20 度/ 12 个月

### ● 产品组分与配方:

产品组分	分子式/CAS 号/分子量	纯度	配方	除菌方式
抗霉素 A1	C28H40N2O9 / 642-15-9 / 548.63	HPLC≥99%	1mg/ml	0.22um 过滤
抗霉素 A3	C26H36N2O9 / 522-70-3 / 520.57	HPLC≥99%		0.22um 过滤
甲醇溶解	-----	-----	-----	-----

### ● 产品说明

抗霉素 A 是抗霉素 A1 和 A3 的混合物。

功能: 抑制酵母线粒体呼吸链, 迫使酵母依赖发酵代谢 (而非有氧呼吸) 利用碳源;

原理: 抗霉素 A 通过结合线粒体复合体 III, 阻断电子传递链, 抑制有氧呼吸产生 ATP; 此时酵母需通过发酵棉子糖 (经蔗糖酶水解后) 生成 ATP, 间接 “强化” 蔗糖酶的分泌需求, 确保检测信号 (如 TTC 显色) 更明显;

使用注意: 抗霉素 A 为有毒性的抗生素, 需用甲醇溶解后过滤除菌, 待培养基灭菌后冷却至 50-60°C 时加入 (避免高温破坏活性)。

抗霉素 A 作为 YPRAA 培养基的成分 (终浓度 2 µg/mL), 作用是抑制酵母线粒体呼吸链, 避免胞内非分泌型转化酶的补偿作用, 确保只有分泌型转化酶发挥作用使酵母利用棉子糖生长, 精准验证目标信号肽的分泌功能。

### ● 培养基配制方法

YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A) (唯地货号: YM8013S) 为固体培养基, 取 YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A) 一袋, 加蒸馏水 450ml 搅拌溶解后, 定容到 0.5L(不用调 pH 值), 121°C-15min 高压灭菌, 灭菌后温度降到 55 度以下加入 20% 棉子糖溶液 50ml, 每 100ml YPRA 培养基中加入 1mg/ml 的抗霉素 A 溶液 200ul, 倒平板即为 YPRAA(含琼脂粉, 含抗霉素 A) (唯地货号: YM8014S) 平板。

### ● 注意事项

1. 抗霉素 A 固体、溶液不可高压灭菌; 不可放室温长期保存, 可低温保存。

## ● 抗霉素 A 使用方法

一, 用 YPRAA(含琼脂粉, 含抗霉素 A)培养基验证 TYK12 酵母系统分泌信号肽功能(pSUC2 载体, 唯地货号: PS1029; pSUC2-Avr1b 载体, 唯地货号: PS1028) :

1. 从 CMD-W (唯地货号: YM8012S) 或 SD/-Trp (唯地货号: YM3103S) 平板挑选阳性单菌落接种到 CMD-W 液体培养基中振荡培养过夜。
2. 取 1 mL 菌液, 5000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 并用灭菌 ddH<sub>2</sub>O 洗涤三次, 调 OD<sub>600</sub> 为 0.5, 用 ddH<sub>2</sub>O 进行梯度稀释 10 倍、100 倍、1000 倍 (即 OD<sub>600</sub> 为 0.05、0.005、0.0005) 。
3. 按照顺序分别取 5 ul 点到 CMD-W 或 SD/-Trp 平板以及 YPRAA 平板上, 30°C 培养 2-3 d, 观察酵母菌落形态: 若试验组的信号肽有功能, 可在 YPRAA 平板上长出正常菌落; 若无功能, 在 YPRAA 平板上不长或生长势弱。
4. CMD-W 液体培养基+2μg/mL 的抗霉素 A 摇菌, 取 1.5 mL 菌液, 12 000 rpm 离心 1min, 弃上清, 加入 1.5 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 洗涤三次。
5. 用 750 ul 无菌水重悬, 加入 250 ul TTC 反应缓冲液, 500 ul 10%蔗糖溶液 (w/v) , 在 37° C 孵育 10 分钟。
6. 12 000 rpm 离心 1 min, 取 500 ul 上清液, 于 1.5 mL 离心管中, 加入 500 ul 1%TTC 溶液, 室温孵育 20 分钟。如果信号肽功能正常, 会观察到溶液变红色, 而携带 pSUC2 空载体的 YTK12 对照组不变色, 或变色不明显。

## ● 关于抗霉素 A (使用浓度: 2μg/mL)

1. 功能: 抑制酵母线粒体呼吸链, 迫使酵母依赖发酵代谢 (而非有氧呼吸) 利用碳源;
2. 原理: 抗霉素 A 通过结合线粒体复合体 III, 阻断电子传递链, 抑制有氧呼吸产生 ATP; 此时酵母需通过发酵棉子糖 (经蔗糖酶水解后) 生成 ATP, 间接“强化”蔗糖酶的分泌需求, 确保检测信号 (如 TTC 显色) 更明显;
3. 若不加抗霉素 A, 酵母可通过有氧呼吸利用其他碳源 (酵母粉中含有其他微量碳源) 或胞内残留转化酶生长, 产生假阳性, 无法区分信号肽是否真的具备分泌功能。