

YPRAA 培养基产品说明书

● 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
YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)	YM8013S-01/02	25g (可配 0.5L YPRA 固体培养基)	2 袋/5 袋	室温干燥/24 个月
YPRAA(含琼脂粉, 含抗霉素 A)	YM8014S-01/02	25g (可配 0.5L YPRAA 固体培养基)	2 袋/5 袋	室温干燥/24 个月
		20% 棉子糖溶液 (已过滤除菌)	100ml/250ml	室温干燥/12 个月
抗霉素 A (Antimycin A)	BC1070L-01/02	1mg/ml 甲醇溶液 (已过滤除菌)	200ul/ 500ul	-20 度/ 12 个月

● 产品组分与配方:

产品组分	YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)	YPRAA(含琼脂粉, 含抗霉素 A)
蛋白胨 (Peptone)	20g	20g
酵母浸粉 (Yeast Extract)	10g	10g
棉子糖 (Raffinose)	20g	20g
抗霉素 A (Antimycin A)	—	2ug/ml
Agar	20g	20g

● PH 值(25°C): 7.0±0.1

● 产品说明

YPRAA 培养基是营养丰富的半合成培养基, 不含葡萄糖, 含有棉子糖作为碳源, 是专门用于蔗糖转化酶(SUC2)缺陷型酿酒酵母 YTK12 菌株进行分泌信号功能验证的培养基。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)。

● 培养基配制方法

YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)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, 倒平板即为 YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)平板; 每 100mlYPRA 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)平板。

● 培养基使用方法

YTK12 酵母验证分泌信号肽功能的试验既可以用 YPRA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)培养基做, 也可以用 YPRAA(含琼

脂粉，含抗霉素 A)培养基做

一，用 YPRA(含琼脂粉，不含抗霉素 A)培养基验证分泌信号肽功能(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) 平板挑选含有目标质粒的单菌落在 YPRA(含琼脂粉，不含抗霉素 A)培养基平板划线。
2. 平板培养 48 小时后，取新长出酵母菌落，转移到 1.5ml 无菌离心管中，加入 1.5 mL 无菌 ddH₂O 洗涤三次。
3. 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。
4. 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(因没有加抗霉素 A，此显色反应的时间需要控制，一般在 1 小时以内(通常 20 分钟)观察，时间过长，阴性对照也会变色)。

二，用 YPRAA(含琼脂粉，含抗霉素 A)培养基验证分泌信号肽功能：

1. 从 CMD-W 或 SD/-Trp 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 ddH₂O 洗涤三次，调 OD₆₀₀ 为 0.5，用 ddH₂O 进行梯度稀释 10 倍、100 倍、1000 倍(即 OD₆₀₀ 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 ddH₂O 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。

● 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。