

**唯地生物**

**YTK12 酵母信号肽分泌检测试剂盒用户手册**

试剂盒货号 CAT#: YCK7170

版号: SA-EX25211-2  
2025-03-07

## YTK12 酵母信号肽分泌检测试剂盒

### 产品内容

组分类别	组分名称	规格	货号	储存温度
培养基	CMD-W Broth	0.5L×1 袋	YM8012L	RT
	CMD-W with Agar	0.5L×1 袋	YM8012S	RT
	YPRAA(含琼脂粉, 含抗霉素 A)	0.5L×1 袋	YM8014S	RT/-20°C
试剂	TTC 反应缓冲液	25 mL×1 瓶	YC4041-25	2-8°C
试剂	10%蔗糖溶液 (w/v)	50 mL×1 瓶	C1061-50	2-8°C
试剂	1%TTC 显色液	5 mL×1 瓶	YC4042-5	避光/2-8°C
质粒	pSUC2	50 μL×1 支	PS1029	-20°C
	pSUC2-Avr1b	50 μL×1 支	PS1028	-20°C
酵母感受态	YKT12 Chemically Competent Cell	100 μL×20 支	YC1170-20	-80°C
	pYES2 (control vector, 10 ng/μl)	10 μL×1 支		-20°C
	Carrier DNA (10 μg/μl)	100 μL×2 支		-20°C
	PEG/LiAC	5 mL×2 支		4°C
说明书	/	1 份	/	/

### 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; 可以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, 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。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。

pSUC2 载体属酵母分泌信号肽功能验证系统的基础载体, 核心结构在于 SUC2 的 N 端信号肽被切除, 其上游设有多克隆位点, 即 SUC2 蛋白的 N 端可插入待检测的信号肽序列或含信号肽的靶基因片段。若插入的序列含功能性分泌信号肽, 可引导 SUC2 融合蛋白分泌至酵母细胞外, 使酵母能在以棉子糖为唯一碳源的 YPRA 或 YPRAA 培养基上正常生长 (SUC2 催化蔗糖分解为可利用的单糖)。

### 产品特点

本试剂盒可用于检测信号肽是否具有分泌功能, 简单高效。包含了信号肽分泌检测所需的全部培养基、试剂、菌株和载体。

### 操作步骤

#### 一、培养基配制

**CMD-W Broth 液体培养基:** 取 CMD-W Broth 培养基一袋, 加蒸馏水 450 mL 搅拌溶解后, 定容到 0.5 L (不用调 pH 值), 121°C-15 min 高压灭菌, 灭菌后温度降到 30°C 以下使用。

**CMD-W with Agar 固体培养基:** 取 CMD-W with Agar 培养基一袋, 加蒸馏水 450 mL 溶解 (Agar 不溶), 定容到 0.5 L (不用调 pH 值), 121°C-15 min 灭菌, 灭菌后温度降到 55 度以下倒平板即可。

**YPRAA with Agar 固体培养基:** 取 YPRAA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)一袋, 加蒸馏水 400 mL 搅拌溶解后 (Agar 不溶), 定容到 0.45 L (不用调 pH 值), 121°C-15 min 高压灭菌, 温度降到 55°C 以下加入 20%棉子糖溶液 50 mL, 倒平板即为 YPRAA(含琼脂粉, 不含抗霉素 A)平板; 每 100 mL YPRA 培养基中加入 1 mg/mL 的抗霉素 A 溶液 5 μL, 倒平板即为 YPRAA(含琼脂粉, 含抗霉素 A)平板。

## 二、实验方法

### 1. 载体构建

将待验证基因的信号肽区域 SP 构建到 pSUC2 载体 EcoRI & XhoI 之间, 即为实验 pSUC2-SP。pSUC2 载体信息参见本公司官网。

### 2. 酵母转化

(1) Carrier DNA 的预处理: 将 Carrier DNA 插入 95°C 金属浴 5 min 或插入浮漂中 95°C 水浴 3 min, 加热后快速插入冰中。

(2) 取 100  $\mu$ L 冰上融化的 YKT12 感受态细胞, 依次加入预冷的目的质粒 2-5  $\mu$ g, 预处理后的 Carrier DNA 10  $\mu$ L, PEG/LiAc 500  $\mu$ L 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8 次混匀)。

(3) 将管放 42°C 水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。

(4) 5000 rpm 离心 40 s 弃上清, ddH<sub>2</sub>O 400  $\mu$ L 重悬, 离心 30 s 弃上清。

(5) ddH<sub>2</sub>O 50  $\mu$ L 重悬, 涂 CMD-W 板, 29°C 培养 48-96 h。

按表 2 将质粒分别转入酵母 YKT12 感受态细胞。

表 2 酵母转化质粒

质粒	培养基
pSUC2	CMD/-W with Agar
pSUC2-Avr1b	同上
pSUC2-SP	同上

### 3. 阳性克隆鉴定 (选做)

此步骤可选做, 也可忽略不做, 鉴定引物可使用 T7: TAATACGACTCACTATAGG; ADH1 promoter-F: CGGTATACGG CCTTCCTTCC, pSUC2 空载体 PCR 条带大小为: 288 bp, pSUC2-SP 需加上信号肽序列长度。

### 4. 信号肽分泌检测

(1) 转化后, 将酵母细胞铺布在 CMD-W 培养基板上, 于 30°C 倒置培养 48-72 h;

(2) 挑选较大的阳性单菌落于 CMD-W 液体培养基中振荡培养过夜;

(3) 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、0.00005)。

(4) 按照顺序分别取 5  $\mu$ L 点板至 CMD-W、YPRA 以及 YPRAA 培养基上, 30°C 培养 2-5 d (其中 YPRAA 平板需培养 5-6 d), 观察酵母生长状态。

【注意: YKT12 感受态在 CMD-W 平板或其他缺色氨酸/Trp 的平板上容易长出假阳性菌落, 假阳性菌落偏小, 应避开小菌落, 挑较大的阳性单菌落, 并对选中的菌落应做好标记或保种, 以备下次使用; 平板要事先倒好, 打开盖子在超净台吹 1 小时后点板, 每个位置点 5  $\mu$ L, 不可点样过多, 菌液过多或平板不干会导致菌液不易干, 相邻位置的菌液扩散后容易连成片或菌液扩散形状不规则, 一般点样后 2 分钟内干燥为宜。】

(5) 另取 1.5 mL 菌液, 5000 rpm 离心 1 min, 弃上清, 加入 1.5 mL 无菌 ddH<sub>2</sub>O 洗涤三次。

(6) 用 750  $\mu$ L 无菌 ddH<sub>2</sub>O 重悬, 加入 250  $\mu$ L TTC 反应缓冲液, 500  $\mu$ L 10% 蔗糖溶液 (w/v), 在 37°C 下孵育 10 分钟。

(7) 5000 rpm 离心 1 min, 取 100  $\mu$ L 上清液, 于 1.5 mL 离心管中, 加入 900  $\mu$ L 0.1% TTC 溶液 (用 1 M NaOH 稀释至 0.1%), 室温孵育 5 分钟。如果信号肽功能正常, 则会观察到溶液变红色, 而携带 pSUC2 载体的 YTK12 菌株则不会观察到红色或红色很弱 (室温孵育时间要做预试验确认, 一般控制在 20 分钟以内)。

### 5. 示例结果分析

阳性对照 YTK12 (pSUC2-Avr1b) 可以在 YPRAA (含琼脂粉, 含抗霉素 A) 培养基上生长, 阴性对照 YTK12 (pSUC2) 在 YPRAA (含琼脂粉, 含抗霉素 A) 平板上生长状态弱于阳性对照; 阳性对照 YTK12 (pSUC2-Avr1b) 分泌蔗糖酶能把蔗糖水解成单糖, 单糖与 TTC 反应变成红色且不溶于水的氯化三苯基四氮唑。阴性对照 YTK12 (pSUC2) 不分泌蔗糖酶, 因此不能与 TTC 发生显色反应 (图 1)。如实验组 pSUC2-SP 与阳性对照结果一致, 则表明该基因的信号肽具有分泌功能。反之, 则表明该基因的信号肽不具有分泌功能。



图1 Avr1b 信号肽功能验证 (本公司验证结果)

### 6. 若没有观察到预期表型, 可能原因分析如下:

- (1) 目标基因无相关功能;
- (2) 目标基因功能较弱, 需要优化 TTC 浓度、孵育时间, 或其他试验条件;
- (3) 目标基因无表达, 或表达量弱, 可 western blot 检测目标基因是否表达, 若没有表达, 需要重新优化密码子构建酵母表达质粒。

### 注意事项:

1. 点板之前, 阴性对照、阳性对照, 试验组的 OD 值要调一致; 起始 OD<sub>600</sub> 值一般为 0.5, 根据实验结果也可以调整为 0.05-1.0 之间, 但阴性对照、阳性对照与试验组的 OD 值一定要调一致。
2. 稀释倍数可根据实验调整, 可按 10 倍稀释也可按 5 倍稀释, 设置 3-5 个梯度均可。
3. TTC 不能在水中长期保存, 使用时将 1%TTC 用 1 M NaOH 稀释至 0.1%使用。
4. 最后一步显色反应, 加入 TTC 溶液, 室温孵育的时间要做预试验确认, 一般控制在 20 分钟以内。

### 参考文献:

- [1] Jacobs KA, Collins-Racie LA, Colbert M, *et al.* A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene.* 1997 Oct 1;198(1-2):289-96.
- [2] Daolong D, D S K, Xia W, *et al.* RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *[J]. The Plant cell,* 2008, 20 (7): 1930-47.