

信号肽分泌酵母检测试剂盒

产品规格：

Component	PT1227	Store
CMD/-W Medium	500 ml	RT
1%TTC 显色液	100 ml	4°C
YPRAA（含抗霉素 A）	500 ml	RT/-20°C
pSUC2 载体	10ul 质粒	-20°C
pSUC2-Avr1b 载体	10ul 质粒	-20°C
YTK12 感受态	100ul×20 支	-80°C
说明书	1 份	/

产品说明：

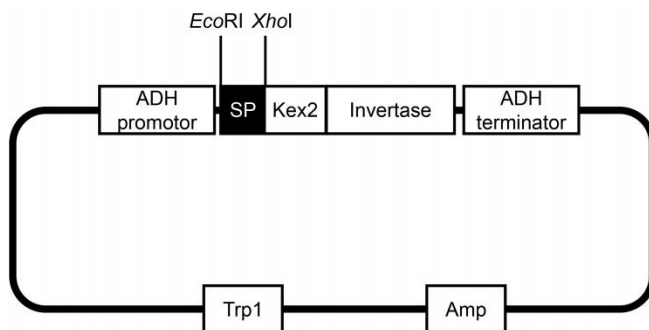
本试剂盒用于信号肽酵母检测，包含了信号肽检测全部试剂、菌株和载体。

实验流程：

A. pSUC2 载体构建

1. 将待验证基因的信号肽区域 SP 构建到 pSUC2 载体 EcoRI & XhoI 之间，即为实验组 pSUC2-SP；
2. pSUC2 载体信息如下：

EcoRI: 5' TCCAAGCTCGGAATTTTAATTAAGAATTC 3'
XhoI: 5' CTCGAGGTTCTCCCTATAGTGAGTCGTAT 3'



3. pSUC2 载体克隆检测引物

pSUC2F: GGTGTGAAGTGGACCAAAGGTCTA

pSUC2R: CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCTT

B. 酵母转化

1. 将 Carrier DNA 沸水煮 5min，迅速放置冰上；
2. 取 3 支无菌 1.5ml EP 管，各加 5μl Carrier DNA，1~3 管分别加入 1-3ug 的 pSUC2-Avr1b（阳性对照）、pSUC2-SP（实验组）、pSUC2（阴性对照）；

3. 每个 EP 管中分别加入 100μl YTK12 感受态及 500μl PEG/LiAc 转化液；
4. 30°C水浴 30min，每 15min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
5. 42°C水浴 15min，每 7.5min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
6. 4000rpm 离心 5min 弃上清，用 100μl 0.9%NaCl 重悬；
7. 涂布 CMD-W 平板；
8. 将上述平板倒置于 30°C培养箱内培养 3~5d。

C. 信号肽分泌检测

1. 上述平板中，分别随机挑取若干个克隆，用 2×Yeast direct PCR Mix（货号 PY1057）以及 pSUC2-F/R 引物进行 PCR 验证；
2. 选择 1 个鉴定的阳性克隆，分别划线到 YPRAA 平板和 CMD-W 平板上，30°C培养 2~3d，观察酵母菌对棉子糖的利用情况验证信号肽的功能；
3. 同时再选择 1 个鉴定的阳性克隆，接种于 5ml 的 CMD-W 液体培养基，30°C，220 rpm，振荡培养 24h 后，11000 rpm 离心 1 min 收集菌体；
4. 弃上清，加入 1 ml 无菌水重悬沉淀，11000 rpm 离心 1 min 收集菌体；
5. 重复步骤 4 一次；
6. 加入 1 ml 10%蔗糖溶液，重悬菌体；
7. 加入 1ml 1%TTC 溶液，混匀后 35°C水浴 30 min，室温放置 5 min，观察颜色变化并拍照。

（注：若阳性对照未变红，可再次 35°C水浴适当时间。）

D. 结果与分析

本研究采用 pSUC2 酵母分泌系统来验证信号肽的分泌功能，Avr1b 的信号肽已经被证明具有分泌功能，因此将 pSUC2-Avr1b 作为阳性对照，pSUC2 空载体作为阴性对照。实验组需要构建 pSUC2-SP 信号肽重组载体，然后与对照同时分别转入酵母菌株 YTK12。

实验结果分析：阳性对照 YTK12[pSUC2-Avr1b]可以在 YPRAA 培养基上生长，阴性对照 YTK12[pSUC2]不能在 YPRAA 平板上生长；

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。

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，结果示例如下。（注：阴性对照弱生长为正常现象，是 YTK12 本身背景斑。）

