ZOMANBIO
庄盟生物
www.zomanbio.com

Toll-free:400-611-2007
Order:010-62617225 62979301
Email:zomanbio@126.com
Http://www.zomanbio.com

版本号：2026-03-24

信号肽分泌酵母检测试剂盒

Yeast Signal Trap Assay Kit

目录号：ZC1898

产品货号	产品组分	规格	保存温度
ZC1896	CMD-W 培养基（含琼脂）	0.5 L×1	-20°C
ZC1895	CMD-W 培养基（不含琼脂）	0.5 L×1	-20°C
ZC1897	YPR Agar 培养基(含 AntimycinA)	0.5 L×1	-20°C
ZCS141-1	10%蔗糖溶液	100 mL	4°C
ZCS128-1	1%TTC 显色液	50 mL	-20°C
ZK26139	pSUC2 质粒	1 μg	-20°C
ZK56771	pSUC2-Avr1b 质粒	1 μg	-20°C
ZCS317	YTK12[pSUC2]甘油菌	0.3 mL	-80°C
ZCS318	YTK12[pSUC2-Avr1b]甘油菌	0.3 mL	-80°C
ZC1614	YTK12 感受态	100 μL×20 支	-80°C

运输及储存条件：

培养基和质粒冰袋运输，感受态干冰运输，各组分按照标签温度储存，培养基质保二年，感受态质保三个月。

注：

1. 本试剂盒提供的产品以产品组成为准，可用于至少一次 10 组实验验证（质粒除外），如需要单独采购某个组分，请联系本公司。
2. 注意每个成份的保存温度，感受态细胞务必 -80 °C保存。
3. 感受态细胞 ZC1614 配带有 Carrier DNA 和 PEG/LiAc 。
4. 载体序列，在我司网站可以下载。

产品说明

YTK12 是一种蔗糖酶外泌缺陷型酿酒酵母，常用于信号肽的鉴定与分析。YTK12 信号肽酵母检测系统的核心原理基于一种遗传互补与表型筛选策略：系统使用的 YTK12 酿酒酵母菌株本身缺失蔗糖酶（SUC2）基因，无法在以棉子糖为单一碳源的 YPRAA 培养基上正常生长。试剂盒提供的 pSUC2 载体携带一个信号肽缺失的蔗糖酶基因 suc2，只有当具有分泌活性的信号肽序列被正确插入到该酶基因的 N 端时，才能引导蔗糖酶分泌至胞外，分泌的蔗糖酶将棉子糖水解为葡萄糖，从而使转化了该重组载体的 YTK12 酵母获得生长能力。此外，该系统还包含 TTC（2,3,5-三苯基四唑氯） 显色验证方法，蔗糖酶催化产生的葡萄糖可将无色的 TTC 还原为不溶性红色沉淀物（TPF），从而通过颜色变化直观、双重地确认信号肽的分泌活性。本试剂盒集成了实验所需的全部专用菌株、载体、培养基和检测试剂。

使用说明：

一、菌株使用与保存

1.1 菌株活化

取甘油菌(10-50 μL)于 CMD-W 平板上划线，28-30°C培养 3-5 d，培养出的单菌落可直接用于信号肽分泌检测实验。

1.2 菌株保存

挑取上述单菌落于 CMD-W 液体培养基中，200 r/min，28-30°C振荡过夜培养，OD_{600} 应大于 1，取 1 mL菌液集菌，弃上清，加入 0.2 mL 80%甘油，-80°C 可长期保存。

电话:010-62617225 62979301 Email:zomanbio@126.com

二、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

pSUC2-F: CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTT

pSUC2-R: GGTGTGAAGTGGACCAAAGGTCTA

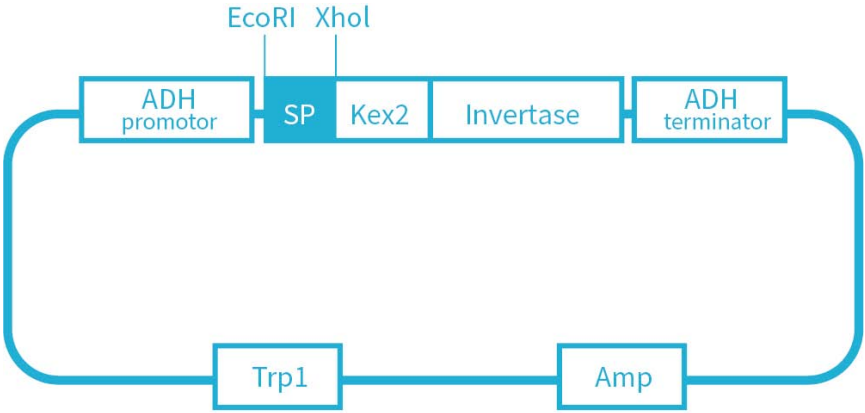

图 1 pSUC2 载体示意图

三、酵母转化

1. 取感受态细胞 100 μL 于冰上融化，依次加入预冷的目的质粒 2-5 μg，Carrier DNA (95-100°C , 5 min，快速冰浴，重复一次) 10 μL，PEG/LiAc 500 μL 并吸打几次混匀，30°C水浴 30 min (15 min 时翻转 6-8次混匀)。

注：按表 1，将各质粒分别转化酵母 YTK12 感受态细胞。

2. 将离心管放于 42°C水浴 15 min (7.5 min 时翻转 6-8 次混匀)。
3. 10,000 rpm 离心 30 s 弃上清，ddH_2O 400 μL 重悬，离心 30 s 弃上清。
4. ddH_2O 100 μL 重悬，涂布 CMD-W 平板。
5. 将上述平板倒置于 30°C培养箱内培养 3-5d。

表 1 酵母转化反应

质粒	培养基
pSUC2	CMD-W
pSUC2-Avr1b	CMD-W
pSUC2-SP	CMD-W

四、阳性克隆鉴定（选做）

此步骤可以省略。详细步骤可参考酵母阳性克隆快速鉴定试剂盒(直扩)(ZC221A)，引物需要根据实际情况设计。

五、信号肽分泌检测

1. 在转化后的平板中挑取 1 个鉴定的新鲜单菌落，使用无菌 ddH_2O 稀释至 OD_{600} 为 1，再用 ddH_2O 依次稀释 10 倍， 100 倍，1000 倍（即 OD_{600}=1 ，0.1 ，0.01，0.001）。
2. 分别取 10 µL 点板于 YPRAA 平板（含 2 µg/mL AntimycinA 的 YPR Agar 培养基）和 CMD-W 平板上， 30°C培养 2-3 d，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 5 mL 的 CMD-W 液体培养基，30°C，220 rpm，振荡培养 24 h后（OD_{600}>1），6000 rpm 离心 2 min 收集菌体。
4. 弃上清，加入 5 mL 无菌 ddH_2O 重悬沉淀，6000 rpm 离心 2 min 收集菌体；重复洗涤一次，离心后保留菌体。
5. 加入 2 mL 10%蔗糖溶液，重悬菌体，10000 rpm 离心 1 min 收集菌体。
6. 弃去上清，加入1.4 mL 10%蔗糖溶液重悬菌体。
7. 吸取 700 µL 重悬液至 EP 管中，加入 700 µL 1%TTC 溶液，混匀后 35°C水浴 10 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，可继续35°C水浴适当时间，或室温避光静置过夜。

电话:010-62617225 62979301 Email:zomanbio@126.com

六、示例结果与分析

采用 pSUC2 酵母分泌系统来验证信号肽的分泌功能。实验结果分析：

1. 阳性对照 YKT12[pSUC2-Avr1b] 可以在 YPRAA 培养基上生长，阴性对照 YKT12[pSUC2] 不能在 YPRAA 平板上生长（图 2A）。
2. 阳性对照 YKT12[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 YKT12[pSUC2] 不分泌蔗糖酶，因此不能与 TTC 发生显色反应（图 2B）。
3. 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。

注：在长时间的培养条件下（超过三天），没有转化任何载体的酵母也可以在CMD-W和YPRAA平板上有少量生长。将菌落多次接种在含有棉子糖但缺乏葡萄糖的YPRAA平板上，有助于检测转化酶的分泌。因此，当酵母菌落在CMD-W和YPRAA平板上培养时，需要每天观察。

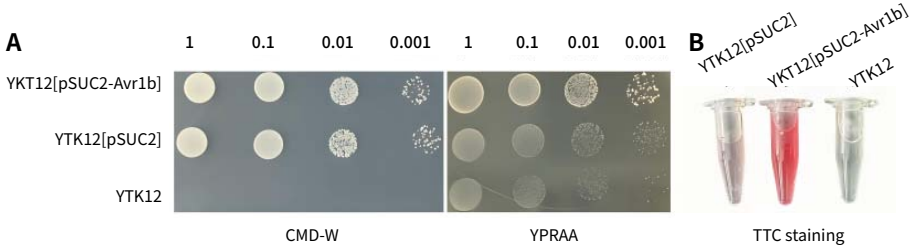

图 2 信号肽分泌功能检测

注意事项

载体注意事项：

1. 建议收到质粒后请先转化感受态（克隆菌株），再挑选单菌落重新提取后使用。
2. 转化前请准确查找该质粒对应的抗生素、抗生素浓度、感受态（克隆菌株）和培养温度。
3. 如有必要请测序后使用，我司网站检索对应货号可下载质粒图谱。

培养基注意事项：

1. 一般情况下 pH 值不必调节，建议测定一下 pH5.8±0.2 即可。
2. 培养基可能溶解不彻底或灭菌后有少量沉淀，不影响实验进行。
3. 培养基灭菌后，颜色为白色至浅黄色。

感受态注意事项：

1. 一支感受态不建议分成两份使用。
2. 如果转化效率低，只有几个单克隆，建议做 PCR 鉴定。
3. 筛选出来的单克隆，一般是圆形凸起、边缘整齐、表面光滑湿润、不透明、乳白色-浅黄-浅粉色的菌落，有酵母气味。

产品注意事项：

1. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
3. 请注意无菌操作，避免微生物污染。
4. 此方案仅供参考，如有疑问请致电咨询。

电话:010-62617225 62979301 Email:zomanbio@126.com

扫描二维码关注公众号