产品使用说明书
Product Manual

SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 琼脂

品牌	**Chinook　钦诺克**
货号	**CN260743**
中文名称	**SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade　琼脂**
英文名称	**SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade Agar**
产品别名	**SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade 琼脂、酵母筛选用培养基 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade、缺失色氨酸、亮氨酸、组氨酸、腺嘌呤的酵母筛选用培养基**
用途	**用于酵母筛选等相关实验**

成分（mg/L）：

无氨基酵母氮源 YNB	6700.0
L-精氨酸盐酸盐 L-arginine HCL	20.0
L-天冬酰胺 L-asparagine	100.0
L-谷氨酸 L-glutamate	100.0
L-赖氨酸 L-lysine	30.0
L-甲硫氨酸 L-methionine	20.0
L-苯丙氨酸 L-phenylalanine	50.0
L-丝氨酸 L-serine	375.0
L-苏氨酸 L-threonine	200.0
L-酪氨酸 L-tyrosine	30.0
L-缬氨酸 L-valine	150.0
尿嘧啶 Uracil	20.0
葡萄糖 Dextrose	20000.0
琼脂 Agar	20000.0
pH	5.7 ± 0.2

用法:

取本品一袋，加蒸馏水 450mL 溶解，加热煮沸，搅拌至完全溶解，定容到 0.5L，无需调 pH 值，121℃高压灭菌 15 分钟。待温度降到 55℃以下倒平板即可。

备注:

1.本品包装为 0.5L*5，每包可配置 0.5L 培养基溶液。
2.本品灭菌后，无菌添加 5-溴-4-氯-3-吲哚-α-D-吡喃半乳糖苷（X-α-Gal）与金担子素（AbA），可配置成 SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade/X-α-Gal/AbA 培养基。
3. X-a-gal 的配置与用量：
（1）20 mg/ml X-a-Gal 溶液配制：
0.1g X-a-Gal 加入二甲基甲酰胺（DMF）5ml，完全溶解后用 0.22um 的滤膜过滤除菌。
（2）倒平板：酵母用固体培养基微波炉加热融化后或高压灭菌后冷却至 55℃以下，每 500ml 培养基中加入 1ml 20mg/ml 的 X-a-gal 溶液混匀倒平板即可。
（3）也可直接将 X-a-gal 溶液涂布在酵母筛选平板表面：例如，直径 90mm 的平板（约 20ml 培养基）可以直接加入 40ul 20mg/ml 的 X-a-gal 溶液，用无菌涂布棒涂布均匀，超净台晾干即可。
4.金担子素（AbA）用法与用量：
（1）Y2HGold（pGBKT7+pGADT7）双杂系统：Y2HGold 菌株基因组中整合了 AbA 抗性基因 AUR1-C，Y2HGold 有四个报告基因：AbAr，HIS3，ADE2，MEL1，当蛋白互作时会激活这四个报告基因的表达。酵母双杂的自激活验证和筛选试验中 AbA 的常规使用浓度为 125-200ng/ml。在做酵母双杂试验之前应对 Bait 质粒进行自激活验证，初始 AbA 浓度可以用 125ng/ml，若没有自激活，可将此浓度作为后面双杂试验时的筛选浓度，若有自激活可以提高 AbA 浓度，直到 Bait 质粒没有自激活为止，但 AbA 浓度最高不要超过 1000ng/ml（若超过此浓度仍然有自激活，说明酵母细胞中有内源转录因子或其他分子可以识别 Bait 质粒，激活 AUR1-C 基因，这种试验结果是不准确的）。若酵母筛库试验中获得的阳性菌落太少，可以适当降低筛库时的 AbA 浓度到 100ng/ml。
（2）Y1HGold（pAbAi+pGADT7）单杂交系统：Y1HGold 菌株基因组本身没有整合 AbA 抗性基因 AUR1-C，在 pBait-AbAi 经线性化整合到 Y1HGold 基因组后变成 Y1HGold[Bait/AbAi] 菌株，此菌株含有报告基因：AbAr，当蛋白与 DNA 互作时会激活 AUR1-C（AbAr）基因的表达。酵母单杂的自激活验证和筛

选试验中 AbA 的常规使用浓度为 100- 200ng/ml。在做单杂试验之前应对 Bait 质粒进行自激活验证，初始 AbA 浓度可以设置为：100ng/ml、150ng/ml、200ng/ml，若均没有自激活，可选最低浓度作为后面单杂试验时的筛选浓度，若有自激活可以提高 AbA 浓度，直到 Bait 质粒没有自激活为止，但 AbA 浓度最高不要超过 1000ng/ml（若超过此浓度仍然有自激活，说明酵母细胞中有内源转录因子或其他分子可以识别报告基因，激活 AUR1-C 基因，这种试验结果是不准确的）。单杂的自激活验证可先将菌液浓度调整到 OD600=0.2， 再稀释 100 倍到 0.002，取 100ul 涂相应 AbA 浓度平板即可

（3）倒平板：酵母用固体培养基微波炉加热融化后或高压灭菌后冷却至 55℃以下，若配制 125ng/ml 的 AbA 平板，每 100ml 培养基加入 12.5ul 1mg/ml 的 AbA 溶液混匀倒平板即可；

若配制 200ng/ml 的 AbA 平板，每 100ml 培养基加入 20ul 1mg/ml 的 AbA 溶液混匀倒平板即可。

储存方式：

贮存于避光、干燥处，用后立即旋紧瓶盖；贮存期三年。

注意事项：

1、称量时注意粉尘，佩戴口罩操作以避免引起呼吸道系统不适。
2、干粉培养基使用后立即旋紧瓶盖，避免吸潮结块。贮存于避光、干燥处。未开封产品保质期三年。开封后根据存放条件的不同，保质时间存在一定的差异。
3、 温度降低时 X-a-Gal 溶液（过滤除菌）可能会有沉淀析出，如有沉淀将 X-a-Gal 溶液放室温预热可重新溶解，也可剧烈摇晃促进溶解。
4、X-a-Gal 溶液（过滤除菌）在密封的情况下-20℃可保存 1 年，开封后若发现染菌，需停止使用。

废物处理：

检测之后带菌物品置于 121℃下高压灭菌 30 分钟后处理。

附录：

微生物培养基正确配置方法及注意事项

步骤一：称量

根据配方和使用说明上所标注的重量，用 1/100 的电子天平准确称出所需的培养基（称量时可以使用称量纸）**注意：称量一定要准确**，称量不准，则会影响使用效果。

步骤二：溶解

1.搅拌：

将培养基纳入烧杯容器中，加小适量的水，缓慢加水**并用玻璃棒小幅度搅拌。**

注意：一定要搅拌。特别是在溶解含有琼脂的培养基，在加热的同时一定要进行搅拌。

2.加热：

倘若培养基中**不含琼脂**，一般**不需要对培养基进行加热；**相反**含有琼脂**，需要用**本生灯/电磁炉加热煮沸。**

注意：

（1）琼脂只有煮沸，且不断搅拌才能溶解充分。

不要把未经加热及搅拌煮沸的培养基溶液直接高压灭菌，这样很容易使琼脂溶解不充分，且粘在容器底部。

（2）不建议使用水浴加热或微波炉加热，特别是微波炉。

水浴加热：一般需要时间长，也很可能会发生琼脂溶解不充分的情况。

微波炉加热：一般没法进行搅拌，也会容易使琼脂溶解不充分。

（3）琼脂溶解不充分导致非常严重的后果，会严重影响后续的铺平板、划线以及培养效果等，会导致实验无法完成。

3.待培养基完全溶解后，再加入适量的水搅拌均匀。如准备的培养基较多，在不锈钢锅中融化加热，是可以使用温水加热的，还需不停搅拌，**防止焦化。**

如果不小心出现焦化现象，则表面制备好的培养基将无法使用，必须重新配制培养基。

4.推荐使用玻璃、搪瓷材质的容器来溶解培养基。

注意：一定不要使用铜或铁容器来溶解制备培养基。

因为铜或铁容器可能会导致容器内培养基中铜、铁超标，影响实验结果。

①其中培养基中铜含量大于 0.3 毫克每升，细菌不适宜生长。铁含量超过 0.14 毫克每升，会防止细菌产生毒素。

②实验中，容易发生反应和沉淀的药物应单独溶解，然后加入培养基中，如磷酸氢二钾和硫酸镁。

步骤三：调培养基 pH

1.培养基中一般都已调好 pH 值，不需额外再次调节 pH 值。但如果是配制的培养基达不到实验的要求，则必须要进行调整。

（1）如果有校准过的 **pH 计**，则可以使用 **pH 计**。如果没有，可以使用精确的 **pH 试纸。**

（2）然后根据调节需要，使用 **1mol/L 氢氧化钠或 1mol/L 盐酸**进行微调，直到调节到配方所需要的 pH 值为止。

培养基有酸性或碱性，pH 值一般为 7.4～7.6。对于需要用氢氧化钠调节的培养基，需要将 pH 调至比要求值高 0.1～0.2 个单位，因为用氢氧化钠调节时，高压灭菌后培养基的 pH 值会降低 0.1 ~0.2。如果微生物培养基中含有碳酸钙，一般无需调整 pH 值。

步骤四：培养基过滤

1.如果对配制的培养基没有特殊要求，这一步可以省略。

2.培养基如有浑浊和沉淀现象，可将需要澄清的液体培养基进行油纸过滤。固体介质可以用双层纱布过滤，中间有一层薄薄的脱脂棉。

如果过滤法不能满足澄清要求，可以采用蛋清澄清法，即将培养基加热后冷却至五十度至六十度，不超过三角瓶一半的容量。每一千毫升放入 1~2 个蛋清，用力摇晃三至五分钟，用 121℃高压蒸汽灭菌二十分钟，之后趁热取出过滤。

步骤五：培养基分装

1. 准备好的培养基根据用途不同，分为烧瓶、试管等容器。

①分装试管量大则采用-自动分液器。

②分装试管量小则采用-漏斗分液。

2. 分液量不超过容器体积的三分之二，三角瓶不要超过体积的二分之一，琼脂斜面不要超过试管长度的五分之一。

灭菌后斜面应为培养基量的三分之一，底层应为培养基量的三分之二，半固态琼脂的体积为三分之一。

用于接种或保护细菌的高级琼脂，分装试管长度的三分之一和四分之一，接种厌氧菌的量应达到三分之二；琼脂平板 90 毫米内径 13~15 毫升，内径 70 毫米 8~10 毫升。

3. 如果琼脂平板表面有较多水，可将平板倒置，置于 37℃培养箱中三十分钟，晾干后使用。每批培养基分装在二十毫升左右的小玻璃瓶中，与该批培养基同时灭菌，在以确定这批培养基的最终 pH 值。

步骤六：培养基灭菌处理

分装完成的培养基应马上进行灭菌。其杀毒灭菌方式主要有三种类型：

（1）高压蒸汽灭菌方式

此方法可用于大多数耐热培养基。

①对于小份：121°C 十五分钟

②对于大份：121°C 三十分钟

③对于含糖类（碳水化合物）的培养基：则需要进行 113~115°C/15min 灭菌，以避免糖分的破坏，**避免焦化。**

（2）煮沸灭菌法方式

此方法可用于含有不耐高温物质的培养基。

（3）过滤除菌方式

此方法可用于当培养基中含有不耐热物质时。采用无菌技术来定量添加培养基。血液和抗生素可以用无菌技术抽取，并加入已经冷却至约五十度的培养基中。

对 LST 培养基进行灭菌时，发酵管内可能存在气泡。为了防止发酵管内形成气泡，可以采取以下措施：

（1）倒置的小管内充满培养基，不留气泡，然后加入含有 LST 的试管中。

（2）在关闭灭菌锅的排气阀之前，将锅内的气体排空。灭菌锅内空气是否排净，这个是影响灭菌是温度和压力比例关系的要点，同样达到了相同的压力的情况下，如果空气未能排净，也就是说不是纯蒸汽灭菌，此时的温度不一定能达到目的要求，会严重影响灭菌效果。

（3）试管塞不要塞得太紧。使用硅胶塞时，请勿使用橡胶塞。

（4）不可过早打开灭菌锅，等灭菌锅内的气压和温度降到与室温相同或相差不大时，再打开杀菌锅。如果按照以上方法操作还有气泡，可以用水作为培养基组的对照试验。如果培养基组依旧有气泡，对照组没有气泡，可以确定是培养基本身原因。

步骤七：培养基倒入平板

1. 将灭菌溶化的培养基冷却至五十度后，倒入无菌干燥的培养皿中。

微生物培养基制备的温度不能太高，否则培养皿内盖容易形成过多的冷凝水；温度太低，培养基容易凝固成块状，不能做成平板。

2.倒平板时，要靠近酒精的火焰（以此防止外来细菌落入盘中）。左手托住培养皿，右手托住三角瓶底部。用小指和手掌拉出锥形瓶的棉塞，烧灼烧瓶口，用拇指和食指在培养皿盖上打开一条缝，直到烧瓶口刚好伸进去，倒入培养基，直到底部被覆盖。

3.不要超过培养皿高度的三分之一，迅速盖上盖子，放在桌上后轻轻旋转培养皿，使培养基分布均匀，凝结后即可。24 小时后检查，如培养基未长杂菌，即可用来培养微生物。

步骤八：培养基摆斜面

灭菌完成后，将试管中的琼脂培养基放在木架或玻璃架上，并且要有适当的坡度。冷却后使琼脂凝固并变成斜面。（斜面长度不超过试管的二分之一）

步骤九：微生物培养基质检

1. 检验培养基灭菌后，若发现有破损，浸水，颜色异常，棉塞被培养基污染。所有这些问题，都必须丢弃，不能重复使用，并确定其最终 pH 值。

2.无菌检查和效果检查也是必需的。

（1）无菌检查是取 1~2 瓶无菌培养基，37℃孵育一两天，确认无细菌生长。

（2）效果检查是将标准菌株接种到相关培养基上进行细菌检查。菌种的生长、形态和生化条件与已知条件一致。

若两个条件都检查合格，准备好的培养基就可以使用了。