

# 金担子素 A (AbA) 使用说明书

保存条件：2-8 °C 储存，未开封有效期 24 个月（若冷冻保存，使用前应震荡混匀）。

包装内容：

产品内容	CA2332	CA2332
Aureobasidin A (1 mg/mL)	1 mL	1 mL×5
说明书	1 份	

产品说明：

金担子素 A (Aureobasidin A, AbA) 是从丝状真菌 *Aureobasidium pullulans* No.R106 中分离出来的环酯肽类抗生素，具有很强的抗真菌能力。AbA 作用机制是抑制酵母中 *AURI* 基因 (1,2) 编码的肌醇磷酸酰胺 (inositol phosphorylceramide, IPC) 合成酶的活性，干扰鞘脂合成，从而杀死菌株。AbA 在较低的浓度下 (0.1-0.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 即可对酵母产生毒性。编码 IPC 合成酶的基因研究较多的来自酿酒酵母菌的 *AURI* 基因，以及构巢曲霉的 *AURA* 基因，两者具有同源性。通过对编码 *AURI-C* 基因进行突变即可使得菌株对 AbA 产生抗性，作为蛋白质互作研究的报告基因。

因为 AbA 可以直接杀死敏感的酵母菌株，而不是延迟菌株生长，所以 AbA 筛选有利于阳性克隆的生长和识别。与营养报告基因 (如 *HIS3*) 进行低严紧度初筛相比，AbA 筛选大大消除了背景克隆。实际操作中，用 AbA 进行初筛时会获得更多克隆，之后再再用 4 个报告子 (*AURI-C*, *HIS3*, *ADE2* 和 *MEL1*) 进行高严紧度的二次筛选以验证阳性克隆。AbA 非常适合用作阳性克隆子筛选用的药物选择性标记；也是酵母单/双杂交研究中理想的报告子，可以简化酵母双杂交文库筛选。*MEL1* 和 *lacZ* 分别编码  $\alpha$ -半乳糖苷酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶，可以作用于相应的底物 X- $\alpha$ -Gal 和 X-Gal 使酵母菌斑或酵母蛋白提取物变蓝。其中， $\alpha$ -半乳糖苷酶是外分泌酶，在酵母表面就能直接检测到； $\beta$ -半乳糖苷酶是内分泌酶，需要将酵母破碎后才能检测到。用蓝斑显示酵母细胞内两个蛋白的相互作用的方法不仅具有较高的敏感性，而且蓝斑的深浅还可以反映两个蛋白相互作用的强弱。

使用方法：

双杂交筛选应用

1. 用于自激活检测。将诱饵转化产物涂布含 AbA 的缺陷型培养基。常规使用浓度为 200 ng/mL。如抑制作用太强，工作浓度可以减少到 125-150 ng/mL；如自激活过强，工作浓度可以增加，但不能超过 1  $\mu\text{g/mL}$ 。
2. 用于互作筛选。将上述浓度的 AbA 加入互作筛选培养基，将共转或者融合产物涂布于含 AbA 的筛选培

培养基上，可有效减少假阳性。

**说明：**双杂中由于转化或者融合效率的影响，转化产物或者融合产物无需稀释，可以直接涂板；如果已经筛选出来的菌落摇菌后涂布或点板，由于单位面积的菌落数过多，AbA 抑制效果会大打折扣。

### 单杂交筛选应用（pAbAi 体系）

**单杂原理：**诱饵序列克隆到 pAbAi 载体形成 pBait-AbAi，通过同源重组整合到 Y1Hgold 基因组上，当猎物蛋白与诱饵发生互作后，会激活重组酵母菌 *AbAr* 基因的表达，使酵母菌对金担子素产生抗性，以此来筛选互作蛋白。

**自激活抑制：**重组酵母菌会有低背景的 *AbAr* 的本底表达，而且不同的诱饵表达程度也不一样。一般会用 100 ng/mL，150 ng/mL，200 ng/mL 的金担子素筛选约 2000 个细胞（OD600 值稀释到 0.002 后取 100  $\mu$ L 图板），通过梯度的金担子素来抑制菌落的生长，筛选出最低的金担子素浓度，作为后续互作筛选的使用浓度。

**注意事项：**金担子素有效浓度与酵母菌单位浓度数量正相关。菌液浓度和体积过大会导致平板上菌落连成片，金担子素无法起到抑制作用。在菌液浓度体积合适的前提下，如果金担子素浓度需要超过 1  $\mu$ g/mL 才能有效抑制，那么该诱饵也不适合用于金担子素筛选的互作实验。自激活检测时，建议将菌液稀释到 OD 值  $\approx$  0.002，再涂板。

### 其他应用：

对 AbA 敏感的真菌：出芽酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、粟酒裂殖酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）、光滑念珠菌（*Candida glabrata*）、构巢曲霉（*Aspergillus nidulans*）和黑曲霉（*A. niger*）。不同菌株建议 AbA 的工作浓度：

菌属	菌种	MIC ( $\mu$ g/mL)
S.cerevisiae	ATCC9763 (diploid)	0.2-0.4
	Baker's yeast (diploid)	0.2-0.4
	Beer yeast (triploid or tetraploid)	0.1
	SH3328 (haploid)	0.1
	Shochu yeast (diploid)	0.1
	Sake yeast (diploid)	0.1-0.2
C.albicans	TIMM-0136 (diploid)	0.04
C.tropicalis	TIMM-0324 (diploid)	0.08
Schizo.pombe	JY-745 (monoploid)	0.1