

毕赤酵母 KM71H Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : PC1004)

| | | |
|-----------------------------------|----------|------------------|
| KM71H Chemically Competent Cell | 100μl /支 | 保存: -80°C (3个月) |
| Carrier DNA (10μg/μl) | 100μl | 保存: -20°C (12个月) |
| pPICZ A (control vector, 10ng/μl) | 10μl | 保存: -80°C (12个月) |
| PD Buffer | 15ml | 保存: 4°C (3个月) |
| PN Buffer | 18ml | 保存: 4°C (3个月) |

● 基因型 (Genotype)

aox1::ARG4, arg4

● 表型 (Phenotype)

Mut^S, Arg⁺

● 产品说明

KM71H 菌株是 invitrogen 公司开发专门用于重组蛋白表达的毕赤酵母菌株。KM71H 可以表达 HIS4 基因, 不可利用营养缺陷培养基筛选重组成功的阳性菌落; pPICZ A, B, C, pPICZ α A, B, C 等具有 Zeocin 抗性基因的毕赤酵母表达质粒可使用 100ug/ml 的 Zeocin 或盐酸博来霉素进行筛选。KM71H 毕赤酵母的表型为 Mut^S, Arg⁺, Arg⁺表示 KM71H 的亲本菌在精氨酸琥珀酸裂解酶基因 (*arg4*) 有突变, 在 AOX1 基因位点引入野生型 ARG4 基因同时破坏了 AOX1 基因, 产生了 Mut^S 表型; Mut^S 表示 KM71H 的 AOX1 基因功能被破坏 (毕赤酵母是甲醇营养型酵母, 可利用甲醇作为唯一碳源。甲醇代谢的第一步是: 醇氧化酶利用氧分子将甲醇氧化为甲醛, 毕赤酵母中有两个基因编码醇氧化酶: AOX1、AOX2, 野生型毕赤酵母中大多数的醇氧化酶是 AOX1 基因产物, 甲醇可诱导 AOX1 基因表达, AOX1 蛋白产物最高可占细胞中可溶蛋白的 30%以上, 很多毕赤酵母表达质粒正是利用 AOX1 表达框进行外源基因表达的, 若毕赤酵母含有有功能的 AOX1 基因就称为 Mut⁺型; AOX2 是 AOX1 的同源基因 (97%的同源性), 在缺失 AOX1 基因或 AOX1 基因丧失功能时, AOX2 基因会发挥作用, 产生一种表型为 Mut^S 的突变株, 但 AOX2 基因氧化甲醇的能力比 AOX1 弱很多, 结果是细胞代谢甲醇的能力下降, 在甲醇培养基中生长缓慢。针对具体的蛋白, 很难预测选择 Mut⁺还是 Mut^S 作为宿主进行蛋白表达更好, 虽然 Mut⁺型酵母转录得到的 mRNA 更多, 但超量的 mRNA 并不一定可以产生有活力的蛋白质; Mut^S型酵母虽然生长缓慢, 转录得到的 mRNA 比 Mut⁺少, 但有可能更有利于蛋白形成正确构象, 产生有活力的蛋白质)。KM71H 化转感受态细胞经特殊工艺制作, -80°C 可保存三个月, 线性化的 pPICZ A 质粒 (3.3kb, Zeocin^R in *E.coli*/ *Pichia pastoris*) 检测转化效率 >10⁴ cfu/μg DNA。

● 操作方法

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 μl 冰上融化的 KM71H 感受态细胞, 依次加入预冷的线性化质粒 2-10 μg (加入 DNA 的体积不超过 10ul, DNA 纯度越高越好), 预处理后的 Carrier DNA 10 μl, PD Buffer 1.4ml 并吸打几次混匀, 30°C 水浴 60 min (30 min 时翻转 6-8 次混匀)。

3. 将管放 42°C 水浴 20 min (10 min 时翻转 6-8 次混匀)。
4. 5000 rpm 离心 40 s 弃上清，加入 PN Buffer 1.4ml 重悬，离心 30s 弃上清。
5. 加入 PN Buffer 0.3ml 重悬，若平板较多可直接涂板；若平板较少，可 5000 rpm 离心 30 秒，弃上清，留 50ul 上清重悬后涂布到含相应抗生素的筛选平板上，将平板倒置放于 30°C 培养箱培养 3-5 天。

● 筛选培养基配制

含有 Zeocin 抗性基因的毕赤酵母表达质粒转化 KM71H，可用 YPDS+Zeocin/盐酸博莱霉素筛选，1L 配方如下：

- 蛋白胨 (peptone) 20g
 - 酵母提取物 (yeast extract) 10g
 - 山梨醇 (sorbitol) 182.2 g
 - 补水到 950ml，用盐酸调 PH 到 7.0±0.2；
 - 琼脂粉 (agar) 20g(for plates only)
- 121°C，20 min 高压灭菌；待培养基温度降到 55°C 时，加入已过滤的 50% 葡萄糖 40 ml。
- 加入 100 mg/ml 的 Zeocin/盐酸博莱霉素母液到培养基中，终浓度 100 ug/ml，倒平板。
 - 含有 Zeocin/盐酸博莱霉素的 YPDS 可以在 4°C 保存两周（半衰期约 10-15 天）。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量，或使用更大的平板。
2. pPICZA 质粒要整合进毕赤酵母基因组中，在转化前必须做单酶切进行线性化，多用 SacI 进行线性化。
3. 关于 Zeocin/盐酸博莱霉素的使用浓度：Zeocin 抗性基因单拷贝插入毕赤酵母基因组可用 100 ug/ml 的 Zeocin/盐酸博莱霉素浓度筛选；多拷贝整合可增加毕赤酵母对 Zeocin/盐酸博莱霉素的抗性水平，每增加一个拷贝，Zeocin/盐酸博莱霉素的筛选浓度可增加 200 ug/ml，所以为了筛选到高拷贝的蛋白表达框可增加抗生素的使用浓度到 500, 1000, 甚至 2000 μ g/ml。
4. KM71H 酵母菌株对高温敏感，最适生长温度为 27-30°C；高于 31°C，生长速度和转化效率下降。