

毕赤酵母 KM71 Chemically Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT# : PC1003)

KM71 Chemically Competent Cell	100μl /支	保存: -80°C (3个月)
Carrier DNA (10μg/μl)	100μl	保存: -20°C (12个月)
pPIC9K (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)

his4, aox1::ARG4, arg4

● 表型 (Phenotype)

Mut^S, Arg⁺, His⁻

● 产品说明

KM71 菌株是由 invitrogen 公司开发专门用于重组蛋白表达的毕赤酵母菌株。KM71 是组氨酸缺陷型菌株，基因组中组氨酸脱氢酶 (His4) 基因位点产生突变，自身无法合成组氨酸；部分携带 HIS 筛选标记的毕赤酵母表达质粒 (pPIC3.5K/pPIC9K/pAO815 等) 可以表达 HIS4 基因，与 KM71 互补，通过组氨酸缺陷培养基来筛选整合成功的阳性转化子；其他无 HIS 筛选标记的毕赤酵母表达质粒 (pPICZ A, B, C, pPICZ α A, B, C 等) 也可通过 Zeocin 或盐酸博来霉素筛选阳性转化子。KM71 毕赤酵母的表型为 Mut^S, Arg⁺, His⁻，His⁻表示 KM71 是组氨酸缺陷型菌株，不能在组氨酸缺陷型培养基中生长；Arg⁺表示 KM71 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 KM71 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)。KM71 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 pPIC9K 质粒 (9.3kb, Amp^R in E.coli) 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 μ l 冰上融化的 KM71 感受态细胞，依次加入预冷的线性化质粒 2-10 μ g(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 μ l，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 上清重悬后涂布到合适的营养缺陷型筛选平板或含相应抗生素的筛选平板上，平板倒置放于 30°C 培养箱培养 3-5 天。

● 筛选培养基配制

1. KM71 可用组氨酸缺陷培养基筛选阳性菌落，常用培养基为 SD/ - His 固体培养基或 MD 培养基，配方如下：

SD/ - His with Agar(唯地 CAT#: YM3101):	1L	MD medium 配方 :	1L
Yeast Nitrogen base	6.7g	Yeast Nitrogen base	6.7g
葡萄糖	20g	葡萄糖	20g
DO Supplement - His	0.78g	生物素 (biotin)	0.0004g
补水到 1L, 调 PH 至 5.8		补水到 1L, 调 PH 至 7.0	
Agar (for plates only)	20g	Agar (for plates only)	20g
121°C, 15 min 高压灭菌。		121°C, 15 min 高压灭菌。	

2. 无 HIS 筛选标记的毕赤酵母表达质粒转化 KM71，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 \pm 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. pPIC9K 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 Sall 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. KM71 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。