

### 毕赤酵母 X-33 Chemically Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 ( CAT# : PC1002 )

X-33 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 )

wild-type

#### ● 表型 ( Phenotype )

Mut<sup>+</sup>

#### ● 产品说明

X-33 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。X-33 是未经过基因改造的野生型菌株(WT), 不可利用营养缺陷培养基筛选重组成功的阳性菌落, 一般使用 100ug/ml 的 Zeocin 或盐酸博来霉素进行筛选。X-33 毕赤酵母的表型为 Mut<sup>+</sup> (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<sup>+</sup>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<sup>s</sup> 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<sup>+</sup>还是 Mut<sup>s</sup>作为宿主进行蛋白表达更好, 虽然 Mut<sup>+</sup>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<sup>s</sup>型酵母虽然生长缓慢, 转录得到的 mRNA 比 Mut<sup>+</sup>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)。X-33 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<sup>R</sup> in *E.coli*/ *Pichia pastoris*) 检测转化效率>10<sup>4</sup> 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 X-33 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。

### ● 培养基配制

含有 Zeocin 抗性基因的毕赤表达质粒转化 X-33, 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  $\mu$ g/ml。
4. X-33 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。