

### 电转毕赤酵母 SMD1168H Elec-Competent Cell 产品说明书

#### ● 产品规格 (CAT#: PE1022)

SMD1168H Elec-Competent Cell	10×80μl /支	保存: -80℃ (3个月)
1M 山梨醇溶液 (0.45um 过滤除菌)	10ml	保存: 4℃ (12个月)
pPICZA (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80℃ (12个月)

#### ● 基因型 (Genotype)

*pep4*

#### ● 表型 (Phenotype)

Mut<sup>+</sup>, Pep4<sup>-</sup>

#### ● 产品说明

SMD1168H 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。SMD1168H 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; pPICZA, 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。SMD1168H 毕赤酵母的表型为 Mut<sup>+</sup>, Pep4<sup>-</sup>, Pep4<sup>-</sup> 表示蛋白水解酶 A 缺陷, Pep4 编码蛋白水解酶 A, 是液泡内的天冬氨酸蛋白酶, 能够自激活, 由于蛋白水解酶 A 可以促进其他蛋白水解酶的激活, 所以 pep4 缺陷型菌株的蛋白水解酶 B 活力也下降了, 这有助于目标蛋白的稳定表达; Mut<sup>+</sup> 表示 SMD1168H 含有有功能的 AOX1 基因 (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, 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)。SMD1168H 电转感受态细胞经特殊工艺制作, 线性化的 pPICZA 质粒 (3.3kb, Zeocin<sup>®</sup> in *E.coli*/ *Pichia pastoris*) 检测转化效率 > 10<sup>4</sup> cfu/μg DNA。

#### ● 操作方法

1. 取适量 1M 山梨醇溶液 (0.45um 过滤除菌) 冰浴, 每管感受态准备 1ml。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净后立即插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80℃ 保存的 SMD1168H 电击感受态细胞插入冰中 2-5 分钟, 待其融化, 加入 2-10ug 线性化的目的 DNA (加入 DNA 的体积不超过 8ul, DNA 纯度越高越好, 保证尽可能低的离子含量), 立即插入冰中。

4. 用 200  $\mu$ l 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物缓慢吹打两次, 除去气泡, 快速转移到电击杯中(避免产生气泡), 轻轻晃动电击杯使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25  $\mu$ F, PC=200  $\Omega$ , V=2kV, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 10 秒内加入 1ml 预冷的 1M 山梨醇溶液, 转移到 30°C 静置 2-3 小时。
6. 将感受态-DNA 混合物转移到离心管中, 4000 rpm 离心 30 秒收菌, 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 抗性基因的毕赤表达质粒转化 SMD1168H, 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  $\mu$ g/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. 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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。
3. SMD1168H 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。