

电转毕赤酵母 KM71 Elec-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格 (CAT#: PE1003)

KM71 Elec-Competent Cell	10×80μl /支	保存: -80°C (3个月)
1M 山梨醇溶液 (0.45um 过滤除菌)	10ml	保存: 4°C (12个月)
pPIC9K (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存: -80°C (12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 (pPICZA, 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 电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. 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°C 保存的 KM71 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 μ 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 μ F, PC=200 Ω , 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 15 min 高压灭菌。		121 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C, 20 min 高压灭菌; 待培养基温度降到 55 $^{\circ}$ 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 μ g/ml, 倒平板。
 - 含有 Zeocin/盐酸博莱霉素的 YPDS 可以在 4 $^{\circ}$ 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 μ 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 μ 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 μ g/ml。
3. KM71 酵母菌株对高温敏感, 最适生长温度为 27-30 $^{\circ}$ C; 高于 31 $^{\circ}$ C, 生长速度和转化效率下降。