

## KM71H 酵母感受态细胞说明书

### 产品规格 (Cat.Y0008)

KM71H Chemically Competent Cell	100 $\mu$ l/支	-80 $^{\circ}$ C (3个月)
Carrier DNA (10 $\mu$ g/ $\mu$ l)	10 $\mu$ l/支	-20 $^{\circ}$ C (12个月)
PB Buffer	20ml	4 $^{\circ}$ C (3个月)
PC Buffer	20ml	4 $^{\circ}$ C (3个月)

### 基因型:

aox1::ARG4, arg4

### 表型 (Phenotype)

Mut<sup>S</sup>, Arg<sup>+</sup>

### 产品简介:

KM71H 菌株是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 $\alpha$  A, B, C 等具有 Zeocin 抗性基因的毕赤酵母表达质粒可使用 100 $\mu$ g/ml 的 Zeocin 或盐酸博来霉素进行筛选。KM71H 毕赤酵母的表型为 Mut<sup>S</sup>, Arg<sup>+</sup>。KM71H 的亲本菌在精氨酸琥珀酸裂解酶基因 (arg4) 存在突变, 但在 AOX1 基因位点引入野生型 ARG4 基因从而使 KM71H 菌株具有 Arg<sup>+</sup>。因在 AOX1 基因位点引入野生型 ARG4 基因从而破坏了 AOX1 基因, 产生了 Mut<sup>S</sup> 表型; 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性的蛋白质; 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, 产生有活性的蛋白质)。KM71H 化转感受态细胞经特殊工艺制作, -80 $^{\circ}$ C可保存三个月, 线性化的 pPICZ A 质粒 (3.3kb, ZeocinR in E.coli/ Pichia pastoris) 检测转化效率 >10<sup>4</sup> cfu/ $\mu$ g DNA。

## 使用方法:

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 5 min, 加热后快速插入冰中。
2. 取 2-10 μg 线性化质粒 DNA 和 10 μl 预变性 Carrier DNA 加入到未融化的 100 μl 酵母感受态细胞, 置于 37°C 水浴 5 min, 中途颠倒混匀 2 次, 直至感受态细胞完全融化 (融化后及时取出)。
3. 加入 1.5 ml 室温平衡后的缓冲液 PB 溶液颠倒混匀。30°C 水浴 60 min, 每隔 20 min 颠倒混匀。室温 3,000 rpm 离心 10 min 弃上清留菌体沉淀, 加入 1.5 ml 缓冲液 PC 溶液重悬菌体。3000 rpm 离心 10 min 弃上清留菌体沉淀, 加入 200 μl 缓冲液 PC 溶液重悬菌体。
4. 将 200 μl 菌液全部涂布到相应的抗性平板培养基, 30°C 恒温培养 3-5 天, 直至平板出现酵母克隆。

## 注意事项:

1. 初次使用 Carrier DNA, 请把装有 Carrier DNA 的管子在沸水中煮沸 5 min, 然后立即放在冰上, 用后放在 -20°C 储存备用。下次使用前请于冰上解冻 Carrier DNA。反复冻融 3-5 次后需重新变性 Carrier DNA。
2. pPICZ A 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 SalI 进行线性化。
3. 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, 可根据实验需要增加 Zeocin/盐酸博莱霉素的浓度以提高筛选高拷贝蛋白表达框。
4. KM71H 毕赤酵母适宜的生长温度是 28°C 至 30°C, 温度超过 31°C 影响酵母生长。