

SMD1168H 酵母感受态细胞说明书

产品规格 (Cat.Y0012)

| | | |
|------------------------------------|---------------|--------------------------|
| SMD1168H Chemically Competent Cell | 100 μ l/支 | -80 $^{\circ}$ C (3 个月) |
| Carrier DNA (10 μ g/ μ l) | 10 μ 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:

pep4

表型 (Phenotype)

Mut⁺, Pep4⁻

产品简介:

KM71 菌株是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; pPICZ A, 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 100 μ g/ml 的 Zeocin 或盐酸博来霉素进行筛选。SMD1168H 毕赤酵母的表型为 Mut⁺, Pep4⁻。Pep4⁻ 表示蛋白水解酶 A 缺陷, 这有助于目标蛋白的稳定表达。Mut⁺ 表示 SMD1168H 含有正常功能的 AOX1 基因。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, 结果使细胞代谢甲醇的能力下降, 在甲醇培养基中生长缓慢。针对不同的蛋白, 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性的蛋白质; 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, 产生有活性的蛋白质。SMD1168H 化转感受态细胞经线性化的 pPICZ A 质粒 (3.3kb, ZeocinR in E.coli/ Pichia pastoris) 检测转化效率 > 10⁴ cfu/ μ 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 5min，加热后快速插入冰中。
2. 取 2-10 μ g 线性化质粒 DNA 和 10 μ l 预变性 Carrier DNA 加入到未融化的 100 μ l 酵母感受态细胞，置于 37°C水浴 5min，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 10min 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 10min 弃上清留菌体沉淀，加入 200 μ l 缓冲液 PC 溶液重悬菌体。
4. 将 200 μ l 菌液全部涂布到相应的抗性平板，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. SMD1168H 毕赤酵母对温度敏感，适宜的生长温度是 27°C-30°C，温度超过 31°C会影响酵母生长。