

GS115 酵母感受态细胞说明书

产品规格 (Cat.Y0003)

GS115 Chemically Competent Cell	100μl/支	-80°C (3 个月)
Carrier DNA (10 μg/μl)	100μl/支	-20°C (12 个月)
PB Buffer	20ml	4°C (3 个月)
PC Buffer	20ml	4°C (3 个月)

基因型:

his4

表型 (Phenotype)

His⁻, Mut⁺

产品简介:

GS115 菌株是用于重组蛋白表达的毕赤酵母菌株。GS115 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 GS115 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(pPICZ A, B, C, pPICZα A, B, C 等)也可通过 Zeocin 或盐酸博来霉素筛选阳性转化子。GS115 毕赤酵母的表型为 His⁻,Mut⁺, His⁻表示 GS115 是组氨酸缺陷型菌株,不能在组氨酸缺陷型培养基中生长;Mut⁺表示 GS115 含有有功能的 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。毕赤酵母含有正常功能的 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,导致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。GS115 转化感受态细胞经线性化的 pPIC9K 质粒(9.3kb, Amp^R in E.coli)检测转化效率>10⁴ cfu/μg 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 2-10μg 线性化质粒 DNA 和 10 μl 预变性 Carrier DNA 加入到未融化的 100μl 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 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缺陷型平板培养基,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. pPIC9K 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. 同时转化 2-3 种质粒时可增加质粒的用量。
4. 毕赤酵母对温度敏感, 适宜的生长温度是 28°C-30°C, 温度超过 31°C影响酵母生长。