

## KM71 二代甘油菌种说明书

### ● 产品规格 (CAT#: Bpc-1003)

KM71 二代甘油菌	400 $\mu$ l / 1 支	保存: -80 $^{\circ}$ C/大于 10 年
YPDA 平板	9cm / 2 块	4 度保存/30 天
一次性接种环	4 支	—

### ● 基因型

his4, aox1::ARG4, arg4

### ● 表型 (Phenotype)

Mut<sup>s</sup>, Arg<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>

### ● 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, pPIC $\alpha$  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<sup>s</sup>, Arg<sup>+</sup>, His<sup>-</sup>, His<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>s</sup> 表型; Mut<sup>s</sup> 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<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)。本产品为二代甘油菌株 (一代种扩增两个世代后保种), 未经过大量扩繁, 核 DNA 及表型稳定, 菌落表型及生长曲线与原种匹配度大于 99.5%。

### ● 操作方法

1, 客户收到菌株后, 不可直接吸取菌液接种扩繁。应先对菌种进行复壮, 待长出单菌落后挑单菌落接菌扩繁; 复壮方法如下: 在超净台打开盖子, 用接种环沾取少量甘油菌液采用交叉划线法 (图 1) 在 YPDA 平板表面轻轻划线 (注意: 不要刺破培养基), 将平板封口后放 30 度培养 3-5 天, 即可长出单菌落。

2, 交叉划线法: 划线的目的是经过几次不连续划线达到梯度稀释菌液的效果, 保证能长出单菌落。具体步骤如下:

A, -80 度取出的甘油菌应在超净台打开盖子, 立即在表面挑取菌液/菌块划线, 不用等融化后划线, 固体状态时即可用接种环挑取划线, 操作要点是“快速操作, 立即划线”, 目的是最大限度减少温度波动对菌种造成的“冷休克”和冰晶物理损伤; 如果收到的是液体甘油菌, 可直接划线, 在超净台打开盖子用接种环沾取少量甘油菌液划线。

B, 取出无菌接种环, 注意不要污染, 图 1 所示为标准的五段交叉划线法, 分五个区, 每个区划三条直线, 第 1、2 区可共用一个接种环, 划好 1, 2 区后换一个新接种环划第 3 区, 再换一个新接种环划第 4 区, 再换一个新接种环划第 5 区, 每一次换接种环划线要经过前面划线区的划线痕迹, 这样就相当于对菌种进行稀释。简易划线也可只划 3 个区或 4 个区。

C, 客户也可用金属接种环灼烧后划线; 本公司提供的接种环为 ABS 材质, 不可灼烧。

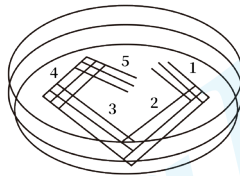


图 1. 五段交叉划线法示意图

## ● 注意事项

- 1, 客户收到二代甘油菌株后, 应立即放-80 度保存, 不可放-20 度保存。
- 2, 应减少甘油菌冻融的次数, 冻融的次数越多, 菌种的活力越低;
- 3, 若扩繁菌种, 注意一次扩繁不要超过四个世代, 以保证菌种基因组的稳定; 扩增后重新保存的菌种必须对菌种做表型、功能验证, 所有表型、功能保持完好的菌株才能作为菌种使用。