

PichiaPink 4 二代甘油菌种说明书

● 产品规格 (CAT#: Bpc-1034)

PichiaPink 4 二代甘油菌	400 μ l / 1 支	保存: -80°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

ade2, prb1, pep4

● 产品说明

PichiaPink4 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。PichiaPink 4 是腺嘌呤缺陷型菌株, 基因组中腺嘌呤合成途径相关基因 2 位点产生突变, 自身无法合成腺嘌呤; 部分携带 ADE2 筛选标记的毕赤酵母表达质粒(pPink-HC/pPink-LC/pPink α -HC 等)可以表达 ADE2 基因, 与 PichiaPink 4 互补, 通过腺嘌呤缺陷培养基(PD/PAD)来筛选整合成功的阳性转化子。ADE2 基因的编码产物为磷酸核糖氨基咪唑羧化酶, 该酶催化嘌呤核苷酸从头合成途径中的第六步反应——将磷酸核糖氨基咪唑(AIR)羧化为磷酸核糖氨基咪唑羧酸(CAIR), 是腺嘌呤和鸟嘌呤合成的必需步骤。若该基因发生突变, 酵母会因嘌呤合成受阻, 成为腺嘌呤营养缺陷型菌株, 当 ade2 突变菌株处于腺嘌呤缺乏环境时, 嘌呤合成前体物质(如磷酸核糖氨基咪唑)会在细胞内积累并转化为色素, 使菌落呈现红色; 转化了相关质粒的酵母可以提供有活性的 ADE2 蛋白, 互补腺嘌呤缺陷表型, 嘌呤合成正常, 菌落为白色, 所以可以根据菌落颜色判断质粒拷贝数, 白色菌落为高拷贝, 粉色菌落为中低拷贝。此外, PichiaPink 4 菌株还突变了 pep4(蛋白水解酶 A)和 prb1(蛋白水解酶 B)两个蛋白酶, 这两种突变共同使该菌株成为 Pink 系列中蛋白酶活性最低的宿主菌, 能有效保护重组蛋白免受降解。针对具体的蛋白, 很难预测是高拷贝的毕赤酵母菌落还是低拷贝毕赤酵母菌落作为宿主进行蛋白表达更好, 虽然高拷贝酵母菌转录得到的 mRNA 更多, 但超量的 mRNA 并不一定可以产生有活力的蛋白质; 虽然低拷贝的酵母菌转录得到的 mRNA 更少, 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。

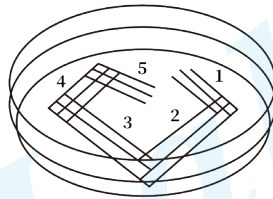


图 1. 五段交叉划线法示意图

● 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。