毕赤酵母 PichiaPink 4 Elec-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格（CAT#：PE1034）

PichiaPink 4 Elec-Competent Cell	80μl /支	保存： -80℃（3 个月）
1M 山梨醇溶液（0.45um 过滤除菌）	10ml	保存： 4℃（12 个月）
pPink-LC (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存：-80℃（12 个月）

● 基因型（Genotype）

ade2, prb1, pep4

● 产品说明

PichiaPink 4 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。PichiaPink 4 电转感受态细胞经特殊工艺制作，-80℃可保存三个月，线性化的 pPink-LC 质粒（7.7kb，Amp^R in E.coli）检测转化效率>0.5×10^5 cfu/μg DNA。

● 操作方法

1. 取适量 1M 山梨醇溶液（0.45um 过滤除菌）冰浴，每管感受态准备 1ml。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分，正置 5 分钟，待乙醇挥发干净立即插入冰中，压实冰面，电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖，冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取-80℃保存的 PichiaPink 4 电击感受态细胞插入冰中 2-5 分钟，待其融化，加入 2-10ug 线性化的目的 DNA (加入 DNA 的体积不超过 8ul，DNA 纯度越高越好，保证尽可能低的离子含量)，立即插入冰中。
4. 用 200 μl 枪头(用刀切除 0.5cm 枪尖)将感受态-DNA 混合物缓慢吹打两次，除去气泡，快速转移到电击杯中（避免产生气泡），轻轻晃动电击杯使液面保持水平状态，盖上杯盖，插入冰中。

5. 启动电转仪，设置参数：C=25 μF，PC=200 Ω，V=2kV，将电击杯从冰中拿出，用吸水纸擦拭吸干表面水渍，放入电转槽中，电击完成后拿出电转杯放室温，打开杯盖，10 秒内加入 1ml 预冷的 1M 山梨醇溶液，转移到 30℃静置 2-3 小时。
6. 将感受态-DNA 混合物转移到离心管中，4000 rpm 离心 30 秒收菌，弃上清，留 50ul 上清重悬后涂布到含相应抗生素的筛选平板上，将平板倒置放于 30℃培养箱培养 3-5 天。

● 筛选培养基选择

PAD 培养基:全合成腺嘌呤缺陷培养基，可用于 PichiaPink 系列质粒的阳性菌落筛选；

唯地货号：PIM4010S

PD 培养基：半合成腺嘌呤缺陷培养基，可用于 PichiaPink 系列质粒的阳性菌落筛选；

唯地货号：PIM4020S

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化，转化高浓度的质粒可相应减少最终用于涂板的菌量，或使用更大的平板。
2. pPink-LC 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 SpeI/EcoN I/Afl II 在 TRP2 位点进行线性化。
3. 关于 pPink 系列毕赤酵母菌株筛选阳性菌落的筛选培养基：PAD 培养基:全合成腺嘌呤缺陷培养基，筛选的酵母菌落生长偏慢；PD 培养基：半合成腺嘌呤缺陷培养基，菌落生长速度更快。
4. PichiaPink 4 酵母菌株对高温敏感，最适生长温度为 27-30℃；高于 31℃，生长速度和转化效率下降，同时也不利于蛋白表达。