电转毕赤酵母 KM71 Elec-Competent Cell 产品说明书

● 产品规格（CAT#：PE1003）

KM71 Elec-Competent Cell	10×80μl /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）
pPIC9K (control vector, 10ng/μl)	10μl	保存：-80℃（12 个月）

● 基因型（Genotype）

his4, aox1::ARG4, arg4

● 表型（Phenotype）

Mut^S, Arg^+, His^-

● 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（pPICZ A, B, C，pPICZ α 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^S, Arg^+, His^-，His^-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^+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^S 表型；Mut^S 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^+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^+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力的蛋白质；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，产生有活力的蛋白质）。KM71 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 pPIC9K 质粒（9.3kb，Amp^R in E.coli）检测转化效率>2×10^5 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 KM71 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。

● 筛选培养基配制

1.KM71 可用组氨酸缺陷培养基筛选阳性菌落，常用培养基为 SD/－His 固体培养基或 MD 培养基，配方如下:

SD/－His with Agar(唯地 CAT#：YM3101):	1L	MD medium 配方 ：	1L
Yeast Nitrogen base	6.7g	Yeast Nitrogen base	6.7g
葡萄糖	20g	葡萄糖	20g
DO Supplement－His	0.78g	生物素（ biotin）	0.0004g
补水到 1L，调 PH 至 5.8		补水到 1L，调 PH 至 7.0	
Agar (for plates only)	20g	Agar (for plates only)	20g
121℃，15 min 高压灭菌。		121℃，15 min 高压灭菌。	

2.无 HIS 筛选标记的毕赤酵母表达质粒转化 KM71，可用 YPDS+Zeocin/盐酸博莱霉素筛选，1L 配方如下:

- 蛋白胨（peptone） 20g
- 酵母提取物（yeast extract） 10g
- 山梨醇（sorbitol） 182.2 g

  补水到 950ml，用盐酸调 PH 到 7.0±0.2;
- 琼脂粉（agar） 20g(for plates only)

  121℃，20 min 高压灭菌；待培养基温度降到 55℃时，加入已过滤的 50% 葡萄糖 40 ml。
- 加入 100 mg/ml 的 Zeocin/盐酸博莱霉素母液到培养基中，终浓度 100 ug/ml，倒平板。
- 含有 Zeocin/盐酸博莱霉素的 YPDS 可以在 4°C 保存两周（半衰期约 10-15 天）。

● 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. 关于 Zeocin/盐酸博莱霉素的使用浓度：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，每增加一个拷贝，Zeocin/盐酸博莱霉素的筛选浓度可增加 200 ug/ml，所以为了筛选到高拷贝的蛋白表达框可增加抗生素的使用浓度到 500, 1000，甚至 2000 μg/ml。
3. KM71 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。