

版权声明:

本站几乎所有资源均搜集于网络, 仅供学习参考, 不得进行任何商业用途, 否则产生的一切后果将由使用者本人承担! 本站仅提供一个观摩学习与交流的平台, 将不保证所提供资源的完整性, 也不对任何资源负法律责任。所有资源请在下载后 24 小时内删除。如果您觉得满意, 请购买正版, 以便更好支持您所喜欢的软件或书籍!



☆☆☆☆☆生物秀[\[http://www.bbioo.com\]](http://www.bbioo.com)

☆☆☆☆☆中国生物科学论坛[\[http://www.bbioo.com/bbs/\]](http://www.bbioo.com/bbs/)

☆☆☆☆☆生物秀下载频道[\[http://www.bbioo.com/Soft/\]](http://www.bbioo.com/Soft/)

生物秀——倾力打造最大最专业的生物资源下载平台!

■■■■ 选择生物秀, 我秀我精彩!! ■■■■

欢迎到生物秀论坛(中国生物科学论坛)的相关资源、软件版块参与讨论, 共享您的资源, 获取更多资源或帮助。

毕赤酵母多拷贝表达载体试剂盒

用于在含多拷贝基因的毕赤酵母菌中表达并分离重组蛋白

综述:

基本特征:

作为真核生物,毕赤酵母具有高等真核表达系统的许多优点:如蛋白加工、折叠、翻译后修饰等。不仅如此,操作时与 E.coli 及酿酒酵母同样简单。它比杆状病毒或哺乳动物组织培养等其它真核表达系统更快捷、简单、廉价,且表达水平更高。同为酵母,毕赤酵母具有与酿酒酵母相似的分子及遗传操作优点,且它的外源蛋白表达水平是后者的十倍以至百倍。这些使得毕赤酵母成为非常有用的蛋白表达系统。

与酿酒酵母相似技术:

许多技术可以通用:

互补转化 基因置换 基因破坏 另外,在酿酒酵母中应用的术语也可用于毕赤酵母。例如: HIS4 基因都编码组氨酸脱氢酶;两者中基因产物有交叉互补;酿酒酵母中的一些野生型基因与毕赤酵母中的突变基因相互补,如 HIS4、LEU2、ARG4、TR11、URA3 等基因在毕赤酵母中都有各自相互补的突变基因。

毕赤酵母是甲醇营养型酵母:

毕赤酵母是甲醇营养型酵母,可利用甲醇作为其唯一碳源。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,还有过氧化氢。为避免过氧化氢的毒性,甲醛代谢主要在一个特殊的细胞器—过氧化物酶体—里进行,使得有毒的副产物远离细胞其余组分。由于醇氧化酶与 O₂ 的结合率较低,因而毕赤酵母代偿性地产生大量的酶。而调控产生醇过氧化物酶的启动子也正是驱动外源基因在毕赤酵母中表达的启动子。

两种醇氧化酶蛋白:

毕赤酵母中有两个基因编码醇氧化酶—AOX1 及 AOX2。细胞中大多数的醇氧化酶是 AOX1 基因产物。甲醇可紧密调节、诱导 AOX1 基因的高水平表达,较典型的是占可溶性蛋白的 30%以上。AOX1 基因已被分离,含 AOX1 启动子的质粒可用来促进编码外源蛋白的目的基因的表达。AOX2 基因与 AOX1 基因有 97%的同源性,但在甲醇中带 AOX2 基因的菌株比带 AOX1 基因菌株慢得多,通过这种甲醇利用缓慢表型可分离 Muts 菌株。

表达:

AOX1 基因的表达在转录水平受调控。在甲醇中生长的细胞大约有 5%的 polyA⁺ RNA 来自 AOX1 基因。AOX1 基因调控分两步:抑制/去抑制机制加诱导机制。简单来说,在含葡萄糖的培养基中,即使加入诱导物甲醇转录仍受抑制。为此,用甲醇进行优化诱导时,推荐在甘油培养基中培养。注意即使在甘油中生长(去抑制)时,仍不足以使 AOX1 基因达到最低水平的表达,诱导物甲醇是 AOX1 基因可辨表达水平所必需的。

AOX1 突变表型:

缺失 AOX1 基因,会丧失大部分的醇氧化酶活性,产生一种表型为 Muts 的突变株(methanol utilization slow),过去称为 Mut,而 Muts 可更精确地描述突变子的表型。结果细胞代谢甲醇的能力下降,因而在甲醇培养基中生长缓慢。Mut⁺(methanol utilization plus)指利用甲醇为唯一碳源的野生型菌株。这两种表型用来检测外源基因在毕赤酵母转化子中的整合方式。

蛋白胞内及分泌表达:

外源蛋白可在毕赤酵母胞内表达或分泌至胞外。分泌表达需要蛋白上的信号肽序列,将外源蛋白靶向分泌通路。几种不同的分泌信号序列已被成功应用,包括几种外源蛋白本身分

制作者:陈苗 商汉桥

泌信号序列，利用酿酒酵母 α 因子前原肽信号序列也获得许多成功。

分泌表达外源蛋白的最大优点是：毕赤酵母只分泌很少的自身蛋白，加上毕赤酵母最小生长培养基中只有少量的蛋白，这意味着分泌的外源蛋白是培养基中蛋白的主要组成成份，也可算作蛋白纯化的第一步。注意，如果外源蛋白一级结构中有可识别的糖基化位点（Asn-X-Ser/Thr），则这些位点可能发生糖基化。

翻译后修饰：

与酿酒酵母相比，毕赤酵母在分泌蛋白的糖基化方面有优势，因为不会使其过糖基化。酿酒酵母与毕赤酵母大多数为 N-连接糖基化高甘露糖型，然而毕赤酵母中蛋白转录后所增加的寡糖链长度（平均每个支链 8-14 个甘露糖残基）比酿酒酵母中的（50-150 个甘露糖残基）短得多。

另外，酿酒酵母核心寡糖有末端 α -1,3 聚糖接头，而毕赤酵母则没有。一般认为酿酒酵母中糖基化蛋白的 α -1,3 聚糖接头与蛋白的超抗原性有关，使得这些蛋白不适于治疗应用。虽然未经证明，但这对毕赤酵母产生的糖蛋白不构成问题，因为毕赤酵母表达蛋白与高级真核生物糖蛋白结构相似。

选择载体用于基因多拷贝整合：

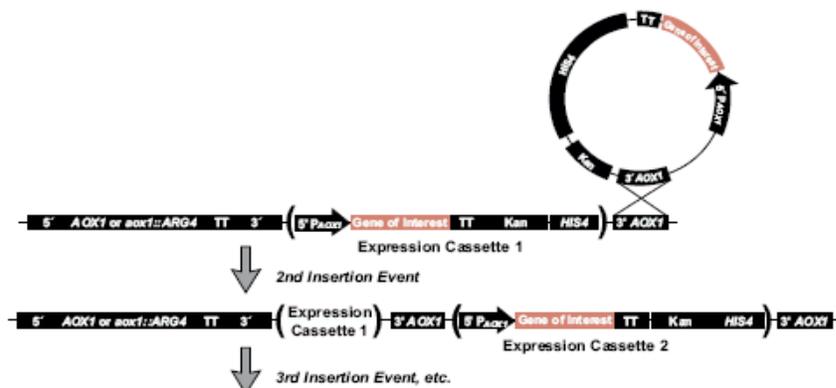
在某些情况下，毕赤酵母中重组基因多拷贝整合可增加所需蛋白的表达量。该试剂盒中的三个载体均可用于在体内（pPIC3.5K, pPIC9K）或体外（pAO815）产生并分离多拷贝插入，同时可检测增加重组基因的拷贝数是否增加蛋白表达量。体内整合可通过高遗传霉素抗性，筛选可能的多拷贝插入；而体外整合可通过连接产生外源基因的串联插入。pPIC3.5K, pAO815 用于胞内表达，而 pPIC9K 用于分泌表达，所有载体均利用 AOX1 启动子来诱导高水平表达。

多拷贝插入频率：

毕赤酵母 His⁺转化子高拷贝整合事件自发发生的概率为 1—10%，体内方法可筛选可能插入多拷贝外源基因的 His⁺转化子，体外方法可通过连接构建多拷贝子。当选择 His⁺转化子时，它们中插入体外构建结构多聚体的概率很高。

体内多拷贝插入的产生：

Ppic3.5k 及 Ppic9k 含有细菌 kan 基因，赋予毕赤酵母遗传霉素抗性，注意 Kan 并不赋予毕赤酵母卡那霉素抗性。遗传霉素抗性水平主要依赖整合的 kan 基因的数目。单拷贝 Ppic3.5k 或 Ppic9k 整合入毕赤酵母基因组后，赋予毕赤酵母约 0.25mg/ml 的遗传霉素抗性水平。任何载体多拷贝整合可增加遗传霉素抗性水平，从 0.5mg/ml（1-2 拷贝）到 4mg/ml（7-12 拷贝）。由于 kan 基因与表达盒（pAOX1 及目的基因）之间有遗传连锁，可从遗传霉素高抗性推断该克隆所包含多拷贝目的基因数。由于基因的剂量效益，蛋白的表达可能会增加。因此，kan 基因可检测转化子是否含有多拷贝目的基因。下图显示多拷贝插入及 kan 基因与表达盒的连锁。



制作者：陈苗 商汉桥

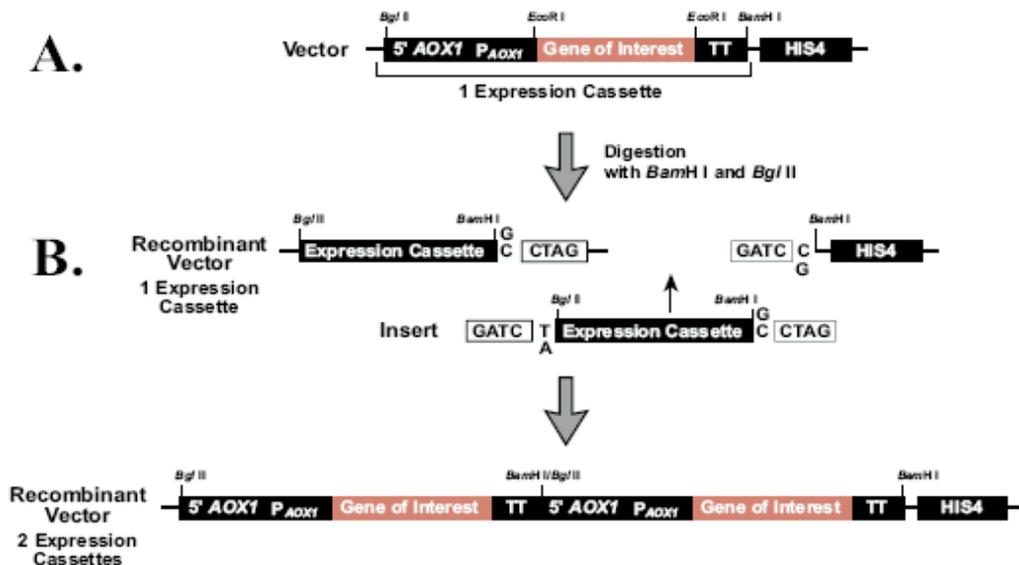
遗传霉素直接选择:

在酵母中对遗传霉素抗性进行直接选择并不十分有效,因为新转化的细胞需要时间表达足够量的抗性因子。由于酵母生长比细菌慢得多,大部分重组酵母在积累足够多的抗性因子以抵抗平板上抗生素之前就已经被杀死了。**最有效的筛选遗传霉素抗性 & 高抗性克隆的程序需要先对 HIS⁺转化子进行选择,再进行不同水平遗传霉素抗性筛选。**

虽然可以用电泳进行直接筛选,但用在遗传霉素筛选之后再用电泳筛选,获得含高拷贝克隆的机会更大,大约可获得 5-9 拷贝的克隆,而直接电泳选择只能获得平均为 1-3 拷贝的克隆。原生质转化时不能用遗传霉素直接选择。

体外多拷贝插入的产生:

下图显示如何产生多表达盒插入载体以转化毕赤酵母。目的基因插入独个 EcoRI 位点后,产生的表达盒 (pAOX1 及目的基因) 上下游侧翼分别为独个 BglII 及 BamHI 位点。



含目的基因的 pAOX815 用 BglII 及 BamHI 消化以分离表达盒,表达盒再插入 BamHI 位点以产生串联重复表达盒,重复该插入程序可产生一系列含单个 HIS4 基因及逐渐增加数目表达盒的载体。

用体外形成的多拷贝子转化毕赤酵母增加了多拷贝表达盒重组子出现的频率,可设计包含一特定数目多拷贝插入的毕赤酵母重组子。

转化及整合:

可产生两个不同表型的 His⁺重组菌株: 质粒 DNA 线性化位置不同,转化 GS115 后可产生两种转化子 His⁺Mut⁺及 His⁺Muts。KM71 只产生 His⁺Muts,因为该菌株为 Muts 表型。两种重组子 Mut⁺及 Muts 都是有用的,因为一个表型可能比另一个表型更有利于蛋白表达。理想条件下,每一个表型应该检测 6-10 个重组子。没有办法预测哪个结构或克隆更利于蛋白表达。强烈推荐用 PCR 分析重组子来证实整合情况。

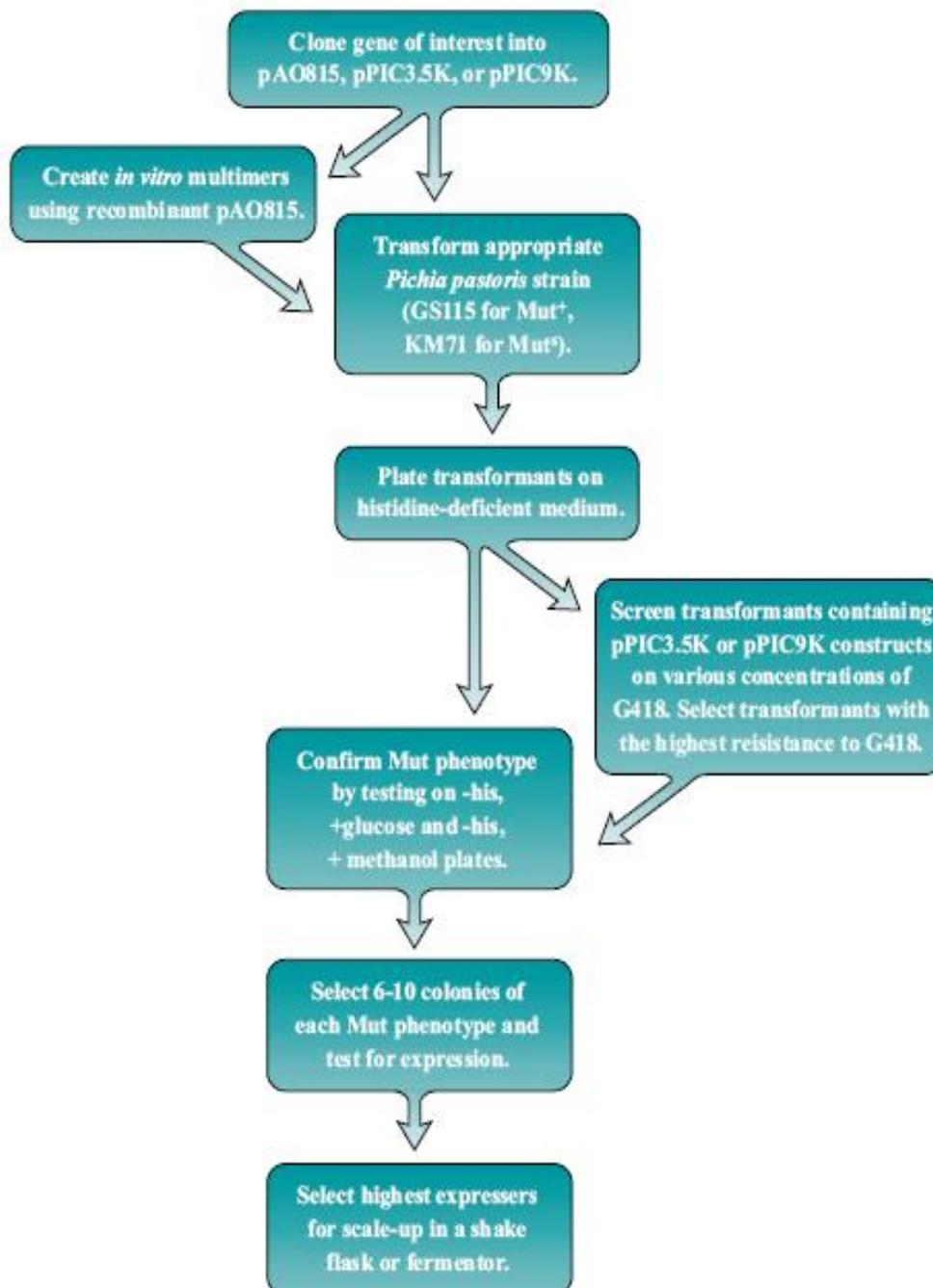
成功将基因构建至 AOX1 启动子下游后,线性化质粒转化毕赤酵母时激发重组。下图显示用不同酶消化时产生何种重组子。

限制酶	插入事件	GS115 表型	KM71 表型
SalI 或 StuI	插入 his4	His ⁺ Mut ⁺	His ⁺ Muts
SacI	插入 5' AOX1	His ⁺ Mut ⁺	His ⁺ Muts
BglII	取代 AOX1	His ⁺ Muts	His ⁺ Muts (不推荐)

表达及扩大培养:

用 PCR 证实毕赤酵母重组后, 可检测 His+Mut⁺及 His+Mut^s 的表达。小规模培养每个重组子, 用甲醇诱导, 检测时间点.如果是胞内表达, 每个时间点细胞沉淀用 SDS-PAGE 分析;如果是分泌表达, 分析每个时间点的细胞及上清。如果有蛋白的抗体, 推荐既用考马斯亮蓝染色又用 western blot 分析 SDS-PAGE 凝胶。如果可以, 建议检测蛋白活性。因为并不是所有蛋白都能达到 g/l 的水平, 所以建议进行 western blot 或活性分析, 不要仅做 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色分析。

如何选择最佳的表达蛋白毕赤酵母菌株及优化诱导见 P49-50。如表达已达最优, 大规模表达以产生更多蛋白。



制作者: 陈苗 商汉桥

方法

毕赤菌株表型:

毕赤酵母菌 GS115 及 KM71 在组氨酸脱氢酶位点 (His4) 有突变,因而不能合成组氨酸,所有表达质粒都有 HIS4 基因可与宿主进行互补,通过不含组氨酸的培养基来选择转化子。

GS115 及 KM71 自发回复突变到 His+ 原养生物机率小于 $1/10^8$ 。

KM71 的亲本菌在精氨酸琥珀酸裂解酶基因 (arg4) 有突变,在不含精氨酸的培养基中不能生长。用野生型 ARG4 基因破坏 AOX1 基因后,产生 KM71 MutsArg+His- 菌株。

GS115 及 KM71 都可在复合培养基如 YPD (YEPD) 及含组氨酸的最小培养基中生长。转化之前,GS115 及 KM71 都不能在最小培养基中生长,因为它们是 His-。

KM71 结构:

ARG4 基因 (约 2kb) 插入到克隆的野生型 AOX1 基因的 BamHI(AOX1 基因 15/16 密码子)及 Sall(AOX1 基因 227/228 密码子)位点。ARG4 取代了 AOX1 基因 16-227 密码子。此结构转化至 KM71 亲本菌 (arg4his4) 中,分离 Arg+ 转化子并分析 Muts 表型。Arg+ 转化子遗传分析显示野生型 AOX1 被 aox1::ARG4 结构所取代。

重点:

用 KM71 的优点是,不需要在甲醇最小培养基中筛选 Mut 表型。所有转化子都是 Muts 表型。第二, AOX1 位点没有被完全缺失,理论上可用你的目的结构通过基因取代方法替换 aox1::ARG4 结构,这样重组菌株的表型是 His+MutsArg-,这意味着重组菌株生长时需精氨酸。不幸的是,仅添加精氨酸并不能完全缓和 arg4 突变的影响, arg4 菌株在含精氨酸的最小培养基中不能很好地生长。因此不推荐在 KM71 中通过取代 aox1::ARG4 结构来获得 His+ 转化子。

菌株表达对照:

GS115/His+Muts 白蛋白: 该菌株为筛选毕赤酵母分泌表达转化子与 Muts 表型时的对照。血清白蛋白基因及其自身分泌信号被整合进毕赤酵母 AOX1 位点。该菌株可分泌白蛋白 (67kDa) 到培养基中,分泌水平 >1g/l。

GS115/His+Mut+ β -半乳糖苷酶: 该菌株为筛选毕赤酵母转化子胞内表达与 Mut+ 表型时的对照。 β -半乳糖苷酶 (lacZ) 基因被整合进毕赤酵母 his4 位点,该菌株表达 β -半乳糖苷酶 (117 kDa),达到通过 SDS-PAGE 考马斯亮蓝染色或 ONPG 分析可测水平。

毕赤酵母菌株生长:

毕赤酵母生长温度为 28-30 度 (液体、平板、斜面)。在 32 度以上诱导生长时,对蛋白表达有害,甚至会导致细胞死亡。

另外注意点有:

- 1 在 YPD 中,处于对数期的 Mut+、Muts 毕赤酵母倍增时间为 2 小时
 - 2 除了在甲醇中生长速度不同外, Mut+、Muts 生长速度没有差别
 - 3 甲醇培养基 (MM) 中,处于对数期的 Mut+ 倍增时间为 4-6 小时
 - 4 甲醇培养基 (MM) 中,处于对数期的 Muts 倍增时间为 18 小时
- 51OD600 = 5×10^7 细胞/ml

注意: 生长特性依重组菌株不同而不同

在甲醇中生长:

当使用甲醇平板或培养基培养时, 建议每天添加甲醇以补偿甲醇挥发及消耗。

1 平板培养时, 在倒置平板盖中加入 100ul 100% 甲醇

2 液体培养时, 加入 100% 甲醇至终浓度为 0.5%

3 部分研究者在进行液体培养时, 对 Mut^s 菌株每天加甲醇至浓度为 1%, 对 Mut⁺ 菌株每天加甲醇至浓度为 3% 时, 对液体培养没有不良影响。

贮存: 贮存细胞几周或数月, 用 YPD 培养基或 YPD 琼脂斜面

1 挑取所需菌株单克隆在 YPD 平板上划线生长

2 挑取单克隆转移至 YPD 进行穿刺培养, 30 度 2 天

3 细胞在 4 度可放几周

数月或几年, 存于 -80 度

1 挑取所需菌株单克隆在 YPD 中过夜培养

2 收集细胞, 在含 15% 甘油的 YPD 中悬浮至终 OD₆₀₀ 为 50-100 (大约 $2.5-5.0 \times 10^9$ 细胞/ml)

3 细胞先用液氮或干冰/酒精浴中冰冻再贮存于 -80 度。

注意: 在 4 度或 -80 度长期保存后, 用之前建议在 MM、MD 或 MGY 平板上划线培养以检测 His⁺ 转化子的表型是否正确及其活力。

大肠杆菌菌株:

大肠杆菌菌株表型: 提供 E.coli Top10F['] 以防没有合适的 E.coli 菌株。其它合适的菌株为 DH5 α F['], JM109 或其它重组缺失菌株 (recA), 最好是 endA, 及带有选择性的 F['] 附加体。Top10F['] 适用于重组及单链拯救。

如果不需进行单链 DNA 拯救, 也可用不含 F['] 附加体的大肠杆菌菌株。

建议: 建议冻存 Top10F[']

1 在 5ml 含 50-100mg/ml 四环素的 LB 中培养 Top10F['] 过夜

2 取 0.85ml 培养液加 0.15ml 灭菌甘油完全混匀

3 转入冻存瓶中, 冻在液氮或干冰/酒精浴中

4 存于 -80 度

选择毕赤酵母表达载体:

选择载体: 如果目的蛋白是细胞溶质型且是无糖基化蛋白, 可选择胞内表达蛋白。如果目的蛋白是正常分泌、糖基化蛋白或直接分泌至胞内细胞器内, 可尝试分泌表达目的蛋白。

建议用体内及体外方法产生并分离外源基因多拷贝插入子。无法预测哪种方法适用于你的蛋白, 每种方法的优缺点如下:

体外方法 pAO815

优点	缺点
可构建特定数目的多拷贝子	克隆特定数目多拷贝子需要更多工作
大多数 His ⁺ 转化子含有正确的特定数目插入	载体可能会很大, 与基因大小及插入拷贝数有关
筛选多插入子很容易, 因为大部分 His ⁺ 转化子含有多拷贝目的基因	在 E.coli 中可能会发生重排
体外构建可以分析拷贝数对蛋白表达的影响	
多拷贝插入位于单一位点	
载体上无需另外的药物抗性标记	

体外方法 **Ppic3.5k** 或 **Ppic9k**

优点	缺点
开始实验比较容易，转化毕赤酵母前载体中只需克隆单拷贝基因	定量筛选—遗传霉素抗性并不一定与基因拷贝数相关
1-10%的 His ⁺ 转化子有自发的多拷贝插入	筛选 His ⁺ 转化子需要做很多工作，因为要从成千上万个 His ⁺ 转化子中才能筛选到足够多的遗传霉素抗性克隆进行检测
载体平均大小与其它毕赤酵母表达系统相似	多拷贝插入的数目不知（尽管可用 southern 或 dot blot 分析方法进行检测）
多拷贝插入位于单一位点	遗传霉素筛选对细胞密度敏感，可能会分离到假阳性

特点：下表显示毕赤酵母多拷贝表达载体的一般特点及优点：

特点	描述	优点
5' AOX1	含 AOX1 启动子的约 1000bp 片段	毕赤酵母中可实现甲醇诱导的高水平表达
α -factor 信号序列	编码 α 因子信号序列的 269bp，用于毕赤酵母分泌表达（只能用于 Ppic9k）	分泌所需蛋白至培养基中
MCS	多克隆位点	在表达载体中插入目的基因
TT	AOX1 基因自带的转录终止及 polyA 信号（约 260bp）	mRNA 有效的转录终止及多聚腺苷酸化
HIS4	毕赤酵母野生型基因编码组氨酸脱氢酶（约 2.4kb），用于与毕赤酵母 his4 菌株进行互补	为选择毕赤酵母重组菌株提供选择标记
3' AOX1	AOX1 基因序列，在 TT3' 远端序列（约 650bp）	质粒靶向整合进 AOX1 基因
Amp pBR322 复制起点	Amp 抗性基因 E.coli 复制起始	用于选择、复制及维护 E.coli
BamHI BglIII NotI SacI SalI StuI	单一酶切位点 （StuI 在 Ppic3.5k 或 Ppic9k 中不是唯一的）	可线性化载体，使有效插入毕赤酵母基因组产生 Mut ⁺ 或 Mut ^s 重组子
Kan	来自 Tn903 的卡那抗性基因，赋予 E.coli 卡那基因抗性，赋予毕赤酵母遗传霉素抗性(Ppic3.5k 或 Ppic9k)	通过增加的抗遗传霉素抗性，可在体内筛选多拷贝插入子 在大肠杆菌中筛选 Kan 抗性菌株

在该试剂盒中，任何毕赤酵母表达载体都没有酵母复制起始位点。只有当质粒与毕赤酵母基因组发生重组时，才能分离到 HIS⁺转化子。

Ppic9k: 含卡那基因，体内筛选多拷贝子插入，分泌重组蛋白至培养基中。在 GS115 及 KM71 中有功能。

制作者：陈苗 商汉桥

- 1 9276bp 融合载体
- 2 在 α -factor 分泌信号阅读框中含有用于克隆的 4 个单限制酶位点。SnaBI、EcoRI、AvrII、NotI
- 3 α -factor 分泌信号分泌表达目的蛋白。表达时，目的基因必须克隆进信号序列起始密码的读码框中

毕赤酵母 HIS4 筛选

GS115 或 KM71, 在 AOX1 基因处插入, 用 SacI 线性化 (对于 GS115 产生 His+Mut+, 对于 KM71 产生 His+Muts)

在 HIS4 位点插入, 用 SalI 线性化 (对于 GS115 产生 His+Mut+, 对于 KM71 产生 His+Muts)

在 GS115 菌株中, 替换 AOX1 基因, 用 BglIII 线性化 (产生 His+Muts)

Map of pPIC9K

The figure below shows the map of pPIC9K. Details of the multiple cloning site and the α -factor secretion signal are shown on page 18. The sequence may be downloaded from our Web site (www.invitrogen.com) or requested from Technical Service (page 79).

Comments for pPIC9K:

9276 nucleotides

5' AOX1 promoter fragment: bases 1-948

5' AOX1 primer site: bases 855-875

α -Factor secretion signal(s): bases 949-1218

α -Factor primer site: bases 1152-1172

Multiple Cloning Site: bases 1216-1241

3' AOX1 primer site: bases 1327-1347

3' AOX1 transcription termination (TT):

bases 1253-1586

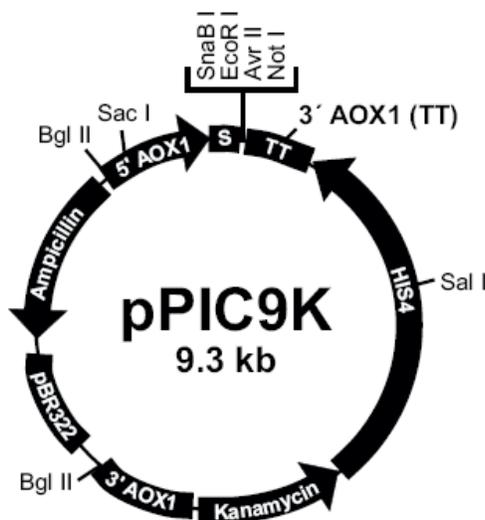
HIS4 ORF: bases 4514-1980

Kanamycin resistance gene: bases 5743-4928

3' AOX1 fragment: bases 6122-6879

pBR322 origin: bases 7961-7288

Ampicillin resistance gene: bases 8966-8106



克隆进毕赤酵母多拷贝表达载体:

介绍: 下面列出用这些载体进行克隆策略时应考虑的方针。考虑位点, 如用 Ppic9k 载体, 应考虑将目的基因克隆进 α -factor 信号序列读码框中。

建议将 3 个超螺旋毕赤酵母表达载体转化 E.coli, 以便长期保存。

1 用灭菌水或 TE 缓冲液稀释 1ul 质粒 (1ug/ul) 至 10-100pg/ul

2 取 1-2ul 稀释质粒转化感受态 E.coli, 在含 50-100 ug/ml Amp 的 LB 平板上选择

一般考虑: 下面是应用 pAO815、 Ppic3.5k 或 Ppic9k 时的一般考虑

1 毕赤酵母的密码偏爱与酿酒酵母相同, 已证明许多酿酒酵母中基因在毕赤酵母中有交叉功能

2 应在含 recA, endA 突变的 E.coli 菌株如 Top10F' 中构建质粒

3 AOX1 mRNA 的 5' 末端在各多克隆位点都已标注出。如需分析 RNA, 可计算插入基因 mRNA 的大小

4 插入基因的终止密码子或 3' AOX1 序列可使翻译有效终止, 3' AOX1 序列终止密码已标注出

制作者: 陈苗 商汉桥

5 在毕赤酵母及其它真核系统中均发现了“AT 富含区”导致的转录提前终止。如果表达蛋白时出现问题,应检查是否是提前终止及 AT 富含区。如要表达基因则需改变基因序列。

6Ppic9k 中预测的蛋白酶裂解位点如图 (p28) 所示

7 插入成熟基因的开放阅读框, 应克隆进 α -factor 信号序列读码框的下游

一般克隆策略:

1 连接适合的限制性片段

A 直接插入 MCS 上两个不同位点

B 利用相同的限制性末端, 将片段连入单个合适位点

2PCR 扩增插入基因以产生合适的用于连入合适载体的限制性末端

3 扩增含目的基因片段通过 TA 克隆盒进行直接克隆, 再将合适的片段亚克隆进所选择载体

克隆程序:

注意: 如果你要插入 pAO815 上 EcoRI 位点, 而基因中也含有 EcoRI 位点, 我们建议:

1BsaI 可识别以下的限制性识别位点:

5 'GGTCTCN/

3 'CCAGAGNNNNN/

2 将 EcoRI 位点改造成 BsaI 可识别位点

5 'GGTCTCG/AATTC.....

3 'CCAGAGCTTAA/G.....

3 将该序列通过 PCR 整合进 DNA 片段中, 或在体外制造其它限制性位点的适配子接头

4 用 BsaI 消化 PCR 产物或适配连接产物, 这样不用 EcoRI 消化就可产生 EcoRI 的限制性末端。

信号序列加工: Ppic9k 中 α -factor 成熟信号序列加工分两步:

1KEX2 基因产物初步切割信号序列, 在 Glu-lys-arg*glu-ala-glu-ala 中星号位置即 arg 及 glu 之间出现 Kex2 断裂

2STE13 基因产物接着切割 Glu-Ala 重复序列

优化信号切割: 酿酒酵母中, Glu-Ala 重复序列并不是 Kex2 切割时的必需序列, 但 Glu-Ala 重复序列可使该切割更有效。

Glu-Lys-Arg-X-序列中, 在 X 位置上有许多氨基酸都可替代 Glu, 如芳香族氨基酸, 小氨基酸及组氨酸。但脯氨酸会抑制 Kex2 的切割。

许多情况下, Ste13 切割 Glu-Ala 重复片段效率不高, Glu-Ala 重复序列就留在了表达的目的蛋白的 N 端, 这一般与目的蛋白本身性质有关。

细菌转化: 一旦确定克隆策略, 在进行连接反应前应制备好 E.coli 感受态, 可参考电感受态或化学感受态 E.coli 方法或使用本实验室实验程序。

Ppic9k 的 pAOX1 及 MCS:

特殊考虑:

1 目的片段必须克隆进分泌信号序列开放阅读框中

2 信号序列中含 ATG, 翻译从离 mRNA5' 端最近的一个 ATG 开始

3 如果插入片段中有 BglIII 位点, 毕赤酵母转化时, 可选取其它限制性位点来线性化质粒(P30)

转化 E.coli:

介绍: 连接反应之后, 要通过化学或电转的方法转化 E.coli 感受态细胞(Top10F' 或相似菌株)

转化分析:

1 转化后, 将转化混合物涂在含 50-100ug/ul Amp 的 LB 平板上, 选择 Amp 抗性克隆
 2 挑取 10 个 Amp 抗性转化子, 接种含 50-100ug/ul Amp 的培养基, 37 度振荡培养过夜
 3 小量制备分离质粒 DNA 用于分析及测序。pAO815 或 pPIC3.5k 测序时, 用 5' AOX1 及 3' AOX1 测序引物; pPIC9k 测序时, 用 α -factor 引物及 3' AOX1 测序引物。将引物重悬于 20ul 灭菌水中, 制成 0.1ug/ul 溶液。

4 在 0.85ml 过夜培养菌液中加入 0.15ml 灭菌甘油, 以便保存所需克隆, 涡旋混匀转入标记好的储存管中。在液氮或干冰/酒精浴中冷冻后移入-70 度保存。

5 测序证实结构正确后, 可准备转化 DNA

重组克隆测序: 强烈建议转化毕赤酵母前进行测序

1 正确读码框(分泌表达)

2 真核翻译起始所需的 ATG 正确的上下文

P_{AOX1} and Multiple Cloning Site of pPIC9K

The sequence below shows the detail of the multiple cloning site and surrounding sequences. Potential stop codons are shown underlined.

```

AOX1 mRNA 5' end (824)                                5' AOX1 primer site (855-875)
82  TTATCATCAT TATTAGCTTA CTTTCATAAT TGCGACTGGT TCCAATTGAC
87  AAGCTTTTGA TTTTAACGAC TTTTAACGAC AACTTGAGAA GATCAAAAAA
92  CAACTAATTA TTCGAAGGAT CCAAACG ATG AGA TTT CCT TCA ATT
                                     Start (949)   $\alpha$ -Factor Signal Sequence
                                     Met Arg Phe Pro Ser Ile
96  TTT ACT GCA GTT TTA TTC GCA GCA TCC TCC GCA TTA GCT GCT
    Phe Thr Ala Val Leu Phe Ala Ala Ser Ser Ala Leu Ala Ala
100 CCA GTC AAC ACT ACA ACA GAA GAT GAA ACG GCA CAA ATT CCG
    Pro Val Asn Thr Thr Thr Glu Asp Glu Thr Ala Gln Ile Pro
105 GCT GAA GCT GTC ATC GGT TAC TCA GAT TTA GAA GGG GAT TTC
    Ala Glu Ala Val Ile Gly Tyr Ser Asp Leu Glu Gly Asp Phe
109 GAT GTT GCT GTT TTG CCA TTT TCC AAC AGC ACA AAT AAC GGG
    Asp Val Ala Val Leu Pro Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asn Gly
                                      $\alpha$ -Factor primer site (1152-1172)
113 TTA TTG TTT ATA AAT ACT ACT ATT GCC AGC ATT GCT GCT AAA
    Leu Leu Phe Ile Asn Thr Thr Ile Ala Ser Ile Ala Lys
117 GAA GAA GGG GTA TCT CTC GAG AAA AGA  $\nabla$ GAG GCT GAA GCT TAC  $\nabla$ 
    Glu Glu Gly Val Ser Leu Glu Lys Arg Glu Ala Glu Ala Tyr
    Eco RI  Apr II  Not I  Sna B
121 GTA GAA TTC CCT AGG GCG GCC GCG AAT TAA TTCGCCTTAG
    Val Glu Phe Pro Arg Ala Ala Ala Asn ***
                                     Sre13 signal cleavage
125 ACATGACTGT TCCTCAGTTC AAGTTGGGCA CTTACGAGAA GACCGGTCTT
                                     3' AOX1 primer site (1327-1347)
130 GCTAGATTCT AATCAAGAGG ATGTCAGAAT GCCATTTGCC TGAGAGATGC
135 AGGCTTCATT TTTGATACTT TTTTATTTGT AACCTATATA GTATAGGATT
140 TTTTTTGTC A  $\downarrow$  AOX1 mRNA 3' end (1418)
    
```

Special Considerations

- The fragment containing the gene of interest must be cloned in frame with the secretion signal open reading frame.
- An initiating ATG is provided by the signal sequence. Translation will initiate at the ATG closest to the 5' end of the mRNA.
- If your insert has a Bgl II site, please see page 30 for alternate restriction sites to linearize your plasmid for *Pichia* transformation.

制作者: 陈苗 商汉桥

克隆基因后：克隆进 pAO815 后，需在体外构建多插入子

如果克隆进 Ppic3.5k 或 Ppic9k，可准备将质粒 DNA 转入毕赤酵母。转 p28

准备转化 DNA：你应该已经获得正确插入目的基因的毕赤酵母表达载体质粒，以用于表达。下表列出下阶段应做的实验。

步骤	实验	页数
1	准备转化用 DNA	28-30
2	GS115 或 KM71 用于制备去壁细胞	31-34
3	DNA 转化 GS115 或 KM71	35-36
4	选择 His ⁺ 转化子	35
5	如果将基因克隆进 Ppic3.5k 或 Ppic9k，筛选 His ⁺ 转化子的遗传霉素抗性	37-40
6	证实重组菌的 Mut ⁺ Muts 表型	41-43
7	PCR 鉴定基因是否存在	70-71
8	检测基因表达	44-48

建议同时分离 His⁺Mut⁺及 His⁺Muts 毕赤酵母转化子，因为很难预测哪种结构更利于蛋白表达。通过线性化 DNA 5' AOX1 区或 HIS4 基因及使用 GS115 (Mut⁺) 或 KM71 (Muts) 菌株，可方便地分离到 Mut⁺及 Muts 重组子。每次转化时使用约 10ug 线性化 DNA。

质粒 DNA 准备：用于毕赤酵母转化的质粒 DNA 起码纯到可以做酶切，DNA 越纯，转化效率越高。建议用 S.N.A.P MiniPrep Kit 来准备质粒 DNA 用于常规毕赤酵母转化，质粒 DNA 也可通过碱裂解、酚：氯仿抽提及乙醇沉淀来获得。

线性化质粒 DNA：建议使用下列方法线性化载体以获得 Mut⁺及 Muts 重组子，可能其中一个会比另一个更利于表达多拷贝重组子。如果只想得到 Muts 重组子，使用 KM71 菌株。单个十字交换事件可比双重十字交换更容易、更有效地获得 Muts 重组菌（例如：插入 AOX1 或 his4 而不是取代 AOX1）。如果插入片段含有下列任何限制性位点，见 p29-30 以替换位点。

1 如果克隆进 Ppic3.5k，线性化时，

插入 AOX1 用 SacI(GS115, Mut⁺ 或 KM71, Muts)

插入 HIS4 用 SalI(GS115, Mut⁺ 或 KM71, Muts)

2 如果克隆进 pAO815，线性化时，

插入 HIS4 用 SalI 或 StuI (GS115, Mut⁺ 或 KM71, Muts)

注意如果用 pAO815 载体，插入 2 个或更多拷贝子会产生 SacI 酶切位点

3 如果克隆进 Ppic9k，线性化时，

插入 AOX1 用 SacI(GS115, Mut⁺ 或 KM71, Muts)

插入 HIS4 用 SalI(GS115, Mut⁺ 或 KM71, Muts)

程序：

1 酶切新构建载体及亲本载体。将亲本载体转入 GS115 或 KM71 用作表达的背景对照

2 凝胶分析酶切产物以确定是否酶切完全。如酶切不完全，转化数及靶向效率都会降低

3 用酚：氯仿：异戊醇（25：24：1）抽提酶切产物，乙醇沉淀 DNA，用 10-20ul TE 缓冲液重悬。不需要将目的基因片段从线性化质粒中分离纯化出来。

4 贮存于 -20 度直至转化

替换酶切位点：下表列出线性化载体转化毕赤酵母时的可替换酶切位点。

注意 Ppic9k 中 Kan 基因中含 StuI 位点，而 HIS4 上的 StuI 位点则被去除。

pPIC9K. Note that an additional *Stu* I site was added with the inclusion of the *kan* gene, eliminating the unique *Stu* I site in *HIS4*.

Restriction Enzyme	5' <i>AOX1</i>	3' <i>AOX1</i>	Vector backbone	<i>HIS4</i> gene
<i>Sac</i> I	209	--	--	--
<i>Pme</i> I	414	--	--	--
<i>Bpu</i> 1102 I	589	--	--	--
<i>Xcm</i> I	699	--	--	--
<i>Bgl</i> II†	2	6875	--	--
<i>Dra</i> II	414	6713	6855, 8046, 8065, 8757	--
<i>Sal</i> I	--	--	--	3178
<i>Bsp</i> E I	--	--	--	3845

†Restriction sites are used to generate gene replacements at *AOX1* in GS115 only.

对照: 建议转化毕赤酵母时用以下对照:

1 亲代载体与重组载体以相同方式进行酶切, 可在用 PCR 证实整合时作对照, 还有表达分析及定量 dot blot 或 southern 分析时作为背景对照。

2 含有单拷贝目的表达盒的 pAO815、Ppic3.5k 及 Ppic9k。以与多拷贝子同样方式线性化 pAO815 载体。

大多数通过转化重组 Ppic3.5k 或 Ppic9k 而得到的 His⁺重组子只含有单拷贝插入。确保你挑取的转化子只能抗 0.25mg/ml 遗传霉素。pAO815、Ppic3.5k 及 Ppic9k 单拷贝对照应与正检测的假定多拷贝重组子具有相同的 Mut 表型。这些单拷贝重组子可作为与多拷贝子进行表达比较的参照, 也可作为定量 dot blot 及 southern 分析时的参照。这是非常重要的参数, 因为目的基因拷贝数的增加并不一定会增加重组蛋白的表达量。

培养毕赤酵母用于制作原生质细胞:

介绍: 一般, 对大多数的研究者来说, 原生质细胞及电转是效率最高的转化方法 (10^3 - 10^4 转化子/ μ gDNA)。毕赤酵母同样可用 PEG1000 (P68) 或 LiCl (P69) 进行转化。这两种方法, 特别是 LiCl 方法不如原生质法及电转化方法。如果没有电转化装置, 建议使用原生质细胞法或 PEG1000 法。毕赤酵母的转化效率不如酿酒酵母的转化效率高。

原生质细胞的解释: 毕赤酵母细胞壁阻止摄入 DNA, 有必要去除部分细胞壁以吸收 DNA。藤黄节杆菌酶是一种葡聚糖酶, 可在细胞壁水解葡聚糖的 β -1,3 接头, 还可部分地消化细胞壁。该方法的关键在于不能过度消化细胞壁, 否则会导致细胞死亡。藤黄节杆菌酶消化能力受细胞对 SDS 敏感性的影响。等量细胞加入 SDS, 以产生原生质细胞, 该步的结果是溶液变澄清, 其澄清度可由 800nm 处的吸光值获得。

一般经验, 获得 70%原生质细胞时, 消化程度较好。用等渗溶液清洗细胞除去酶并与 DNA 共孵育。将细胞重悬于山梨醇溶液中, 细胞壁再生后再铺板。

准备: 制备下列溶液, 存于 4 度。

YPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) 培养基 1L

YPD 平板 1L

RDB (Regeneration Dextrose Base) 平板 1L

RDHB (Regeneration Dextrose Histidine Base) 平板 1L

转化当天, 配制下列试剂: 存于 4 度

5% SDS 溶液

RD (Regeneration Dextrose) 融化琼脂 100ml

溶液: 细胞去壁及转化试剂

1M 山梨醇

SE: 1M 山梨醇, 25mM EDTA pH8.0

DTT: 用水配制成 1M 浓度

SCE: 1M 山梨醇, 1mM EDTA, 10mM 柠檬酸钠缓冲液 pH5.8

CaS: 1M 山梨醇, 10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM CaCl₂

藤黄节杆菌酶: 用水配制成 3mg/ml 的浓度

40%PEG: 用水配制 40% (w/v) PEG3350(试剂纯)

CaT: 20mM Tris pH7.5, 20mM CaCl₂

SOS: 1M 山梨醇, 0.3×YPD, 10mM CaCl₂

每次转化时配制:

SED: 19mlSE 加 1ml 1M DTT

PEG/CaT: 1:1 混合 40%PEG 及 CaT

程序:

- 1 在 YPD 平板上划线培养 GS115 或 KM71, 28-30 度培养 2 天, 以得到分散的单克隆。
 - 2 在 50ml 离心管或 100ml 摇瓶中, 从 GS115 或 KM71 平板上挑取单个克隆接种 10ml YPD, 28-30 度剧烈振荡 (250-300rpm) 过夜。该培养基可在 4 度保存数天。
 - 3 在 3 个 500ml 培养瓶中加入 200ml YPD, 分别取 5、10 及 20ul 第 2 步中的细胞, 于 28-30 度剧烈振荡 (250-300rpm) 过夜
 - 4 第二天早上, 将试剂盒中的转化溶液 (SE, SCE, 灭菌水, SOS, PEG, CaS, 1M 山梨醇), RDB 平板 (用于转化)、RDHB 平板 (活力对照), 放置于室温下。
 - 5 测每个培养瓶中的 OD600 值
 - 6 收集 OD600 值为 0.2-0.3 瓶中的细胞, 室温, 1500g 离心 5-10min。去除上清, 接下去准备细胞去壁
- 注意: 如果培养基都超过 0.3, 选择一个培养基, 用新鲜培养基以 1: 4 稀释, 28-30 度孵育直至 OD600 值至 0.2-0.3 (2-4 小时)。收集细胞如第 6 步

准备细胞去壁: 取得上述第 6 步细胞

- 1 取 100ml 融化的 RD 琼脂糖, 存于 45 度
 - 2 解冻 1 管 1M DTT
 - 3 为该次去壁细胞试验准备新鲜的 SED
- 无菌条件下, 将 19mlSE 转入合适的灭菌容器中 (如 50ml 离心管), 加 1ml 1M DTT 混合均匀, 为得到最好的效果, SED 现配现用
- 注意: DTT 的质量及新鲜度是成功制备去壁细胞的关键, 1M DTT 分析纯, -20 度保存。

洗涤细胞:

- 1 用 20ml 灭菌水悬浮洗涤细胞, 转入灭菌的 50ml 的离心管中
- 2 室温 1500g 离心 5min, 收集细胞
- 3 将细胞重悬于 20ml 新鲜的 SED 中洗涤, 如 2 离心
- 4 用 20ml 1M 山梨醇洗涤, 离心如 2

5 用 20ml SCE 缓冲液重悬细胞，将悬液分至两个 50 ml 离心管中(10ml/管)

6 取 1 管藤黄节杆菌酶置于冰上，轻弹管壁以混匀，藤黄节杆菌酶以浆液的形式存在，无需配成溶液，将它混匀以确保每次的量是相等的。

加入藤黄节杆菌酶：可先取一管细胞来确定用藤黄节杆菌酶消化细胞的最佳时间，一旦确定时间，取另一管细胞进行裂解。藤黄节杆菌酶消化细胞壁，使细胞变脆，拿样品时要轻柔些，加入藤黄节杆菌酶后，即开始消化细胞壁。

*准备至少 20ml 5%SDS 溶液

*将分光光度计调至 800nm 处，用 800ul 5%SDS 及 200ul SCE 作空白

*准备 10 个灭菌离心管，编号 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50

1 取 5 步中一管细胞，取出 200ul 加入标 0 的管中，置于冰上，此即 0 点

2 加 7.5ul 藤黄节杆菌酶到该管剩余细胞中，轻轻颠倒混匀，30 度孵育，不要晃动样品。该样品可用于建立细胞去壁最佳时间表。将另一管细胞置于室温，用于第六步。将剩余藤黄节杆菌酶放于冰上。

3 监测去壁细胞的形成：2min 时，取 200ul 步骤 2 中的悬浮细胞，加入标 2 的管中。在 t=4,5,6,,50min 时，重复上述操作，读样品 OD800 值

4 用公式确定每个时间点时去壁细胞的形成比例：

$$\%去壁率=100- [(时间 t 时 OD800 值/时间 0 时 OD800 值) \times 100]$$

如 t=0 时，OD800=0.256， t=15 时，OD800=0.032

计算：%去壁率=100- [(0.032/0.256) \times 100] =100- [(0.125) \times 100] =100-12.5=87.5%

5 确定去壁率为 70%时的时间，藤黄节杆菌酶的用量不同，最佳时间也各不相同。

Invitrogen 实验室的最佳去壁时间为 15-40min。

注意：确定获得所需量去壁细胞的最小时间很重要，藤黄节杆菌酶消化时间过长，对细胞有害，效率会降低。

6 在另一管中加入 7.5ul 藤黄节杆菌酶(如步骤 1)，将管放于 30 度，时间为步骤 5 中建立的最佳时间，以获得最佳比例 70%的去壁细胞。

7 室温 750g 离心 10min，收集去壁细胞，去除悬浮液

8 用 1M 山梨醇洗去壁细胞 1 次(轻叩管壁以分散去壁细胞团，不要涡旋)。如上离心

9 用 10ml CaS 洗涤去壁细胞，如 7 中离心，用 0.6mlCaS 重悬细胞。去壁细胞必须立即(至多 30min)用于转化。不能放更长时间，这些细胞共可作 6 次转化

转化毕赤酵母：

开始前：将 RDB 平板放于室温，准备好融化的 RD 上层琼脂，取出线性化 DNA 置于冰上

GS115 中，用 SalI,StuI 或 SacI 线性化的 DNA 可分离 His+Mut+重组子

KM71 中，用 SalI,StuI 或 SacI 线性化的 DNA 可分离 His+Muts 重组子

亲代载体用相同酶线性化

对照包括无 DNA，线性化 PBR322DNA 及质粒(无细胞)涂板来检测是否有污染

程序：

1 取上述 9 中 100ul 去壁细胞到 1.5 ml 灭菌的有盖管中

2 取 10ugDNA，室温孵育 10min

3 同时配制 PEG/CaT 溶液，计算所需用量，加入等量的 40%PEG/CaT(1:1)

4 加 1ml 新鲜的 PEG/CaT 溶液至细胞与 DNA 混合物中，轻轻混匀，室温孵育 10min

5 室温 750g 离心 10min, 小心抽吸 PEG/CaT 溶液, 颠倒管, 轻叩管壁以排出多余的 PEG/CaT 溶液。

6 用 150ul SOS 培养基悬浮转化细胞, 室温孵育 20min

7 加入 850ul 1M 山梨醇, 接下来涂板

涂板: 毕赤酵母去壁细胞需要铺在顶层琼脂糖或琼脂上, 以防止在选择前被裂解

1 接第 7 步, 取 100-300ul 去壁细胞-DNA, 与 10ml 融化的 RD 琼脂糖混匀倒于 RDB 平板上, 直至上层琼脂变硬。注意, 确保有足够的去壁细胞-DNA 铺第二板, 第三板

2 倒置平板, 28-30 度孵育, 转化子会在 4-6 天内出现

3 细胞活性: 用 100ul 去壁细胞加入 900ul 1M 山梨醇

4 取稀释样本 100ul, 加入 10ml 融化的 RDH, 铺在 RDHB 平板上, 等上层琼脂凝固

5 倒置平板, 28-30 度孵育, 4-6 天出现克隆, 表明去壁细胞可再生成分裂细胞

His+转化子分析: 如用 Ppic3.5k 及 Ppic9k 构建载体转化毕赤酵母, 接着做体内筛选多插入子

如用 pAO815 构建载体转化毕赤酵母, 筛选 Mut+及 Muts 转化子

评价转化试验: 使用去壁细胞, 一般转化效率为 10^3 - 10^4 His+转化/ugDNA, 在无 DNA、线性化 PBR322 及只有质粒(无细胞)平板上应均无克隆。

功能分析筛选: 有些研究者通过功能分析直接检测高表达毕赤酵母重组克隆, 而不进行 Mut+及 Muts 表型筛选。检测完高表达后, 最好也检测 Mut 表型, 这可帮助你优化重组克隆的表达。

体内筛选多插入子:

介绍: His+转化子越多越好, 因为只有 1-10% His+转化子可能含有多拷贝插入。这意味着, 如果多拷贝插入概率为 1%, 你必须筛选 1000 个克隆, 才能得到 10 个高遗传霉素抗性克隆, 这需要 1-5 个含 His+转化子的平板。筛选数以千计的克隆并不罕见。如果有抗高遗传霉素抗性的克隆, 可检测重组蛋白的表达(P44), 或者检测 Mut 表型(P41)。

筛选遗传霉素抗性转化子方法:

一、技术上简单, 可筛选大量克隆, 但不那么可信。筛选 HIS+转化子后, 将它们集中起来, 铺在遗传霉素浓度逐渐升高的 YPD 平板上, 可应用于去壁细胞及电转化方法。

二、技术上较难, 只可筛选少量克隆, 但更可信。每个克隆在微量测定板上生长至浓度一致, 将培养基点到 YPD-遗传霉素平板上计算抗遗传霉素抗性。

注意: 用遗传霉素筛选可能会有假阳性。划线挑取假定的抗遗传霉素单克隆, 然后在 YPD-遗传霉素平板上进行证实很重要。如果你真的选择复制平板, 一定要证实遗传霉素抗性。

开始前: 准备 10 个 YPD 平板, 每个的遗传霉素浓度为 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0 及 4.0mg/ml。

(去壁细胞)方法 1: 从含 HIS+转化子的平板开始

1 用灭菌刮片将含有 HIS+转化子的顶层琼脂最上层刮下, 放入无菌的 50ml 离心管中。

2 加入 10-20ml 灭菌水, 量应为琼脂的两倍, 剧烈振荡 1-2min

3 将离心管置于管架上, 让琼脂沉淀(1min)

4 用血球计数计确定上清中细胞浓度。至少要 5×10^5 细胞/ml, 那样在 200ul 或更少溶液中可含 10^5 个细胞。(如果太稀, 可将液体转入另一管中, 离心细胞, 再用适量灭菌水重悬至 5×10^5 细胞/ml)

5 每块含遗传霉素的 YPD 平板涂 10^5 细胞。每个浓度用四块板。

(需要证实在没有遗传毒素的 YPD 板上细胞的滴度, 计算每个遗传毒素抗性平板上抗遗传毒素克隆的比例, 以确定你所得到的多拷贝子是否占平板上转化子的 1-10%, 将收集的转化子稀释到 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 浓度, 每板加 100-200ul)

6 在 30 度孵育平板, 每天检查。抗遗传毒素克隆需 2-5 天出现, 不含遗传毒素的 YPD 平板上克隆需 2-3 天出现。接下来做结果分析。P39

(电转化)方法 1: 电转化毕赤酵母时用以下程序。转化子不需要铺在上层琼脂。从含 HIS+ 转化子平板开始。

1 吸取 1-2ml 灭菌水于所有 HIS+ 转化子平板上

2 用灭菌刮子重悬 HIS+ 转化子, 不要划破琼脂

3 将细胞悬液集中转移至灭菌的 50ml 离心管中, 稍涡旋(5-10S)

4 用分光光度计测定浓度($1OD_{600}=5 \times 10^7$ 细胞/ml)

注意: 混有琼脂会干扰读数

5 在每块含有遗传毒素的 YPD 平板上涂 10^5 细胞。

(需要证实在没有遗传毒素的 YPD 板上细胞的滴度, 计算每个遗传毒素抗性平板上抗遗传毒素克隆的比例, 以确定你所得到的多拷贝子是否占平板上转化子的 1-10%, 将收集的转化子稀释到 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 浓度, 每板加 100-200ul)

6 在 30 度孵育平板, 每天检查。抗遗传毒素克隆需 2-5 天出现, 不含遗传毒素的 YPD 平板上克隆需 2-3 天出现。接下来做结果分析。P39

注意: 如果在以上方法里你将所有细胞都悬浮, 加 15% 灭菌甘油, 存于 -80 度, 可在以后时间里做遗传毒素抗性筛选。

方法 2: 需要三组各两块微量测定板(共 6 块)来筛选 180 个 HIS+ 重组子。通过持续接种, 得到相同浓度的克隆子, 以确保遗传毒素平板上细胞数相等。如将转化子铺于顶层琼脂中, 有必要从琼脂上收集细胞, 重新涂最小组氨酸平板(P42)以收集克隆。记住要有菌株背景对照及单拷贝基因对照。每 180 个克隆, 可选择出 1-10 个抗遗传毒素克隆。

1 无菌条件下, 在每个微量测定板上加入 200ul YPD

2 用灭菌牙签在第一组平板中每孔接种单个 HIS+ 转化子, 轻轻搅动以悬浮细胞

3 盖住微量测定板在 30 度孵育 2 天(不需摇动)

4 2 天后, 取新的微量测定板, 加入 190ul YPD

5 用多道移液器吸取 10ul 培养液于第二组测定板中, 确保第二组板标记好并放置好, 这样可指示细胞所在孔。

6 盖住第二组板, 30 度孵育过夜

7 第二天, 在第三组测定板上重复第 5,6 步

注意: 持续生长及传代可使克隆达到相同细胞浓度

8 孵育后, 取第三组板, 用 100ul 多道移液器上下吹打重新悬浮细胞

9 取 10ul 每孔中液体点在含遗传毒素浓度为 0, 0.25, 0.5……4.0mg/ml 的 YPD 平板上。用多道移液器或在平板底下划线, 确保以规则方式排列。

10 待液体吸收, 将板放于 30 度, 2, 3, 4, 5 天后检测抗遗传毒素克隆, 接着分析结果。

结果分析: 可能只有少数的抗遗传毒素克隆, 大小可能也不一样, 但克隆形态上应一致。挑取抗遗传毒素克隆, 划线培养纯化, 挑取单克隆, 确保记录抗遗传毒素的水平。

可能在 2.0, 3.0, 4.0mg/ml 遗传毒素平板上找不到克隆, 因为抗如此高遗传毒素的“头彩”克隆很少见。需要筛选数以千计的 HIS+ 转化子以分离抗 2-4mg/ml 遗传毒素的克隆。

因为不能保证多拷贝克隆会确实增加蛋白表达量, 许多人选择直接表达来看是否有克隆

可大量表达蛋白。确保有单拷贝插入作为对照，检测所有抗遗传霉素抗性克隆的 Mut 表型 (P41)，以期进行正确诱导表达。

确保划线纯化单克隆，并加入甘油冰冻保存遗传霉素抗性克隆，每次从冻存样本中挑菌开始表达研究而不是从老的平板上挑菌。

确定拷贝数目：如果发现抗遗传霉素 HIS+重组子明显大量表达蛋白，你可能想要知道基因拷贝数。可用 southern blot 或 dot blot 分析拷贝数(P74)。转化空载体或含单拷贝基因载体的毕赤酵母重组菌基因组 DNA 也非常重要，可作为实验的对照。

解决问题：因为有可能挑取假阳性(看起来可抗高浓度遗传霉素，其实并不是)，纯化假定的遗传霉素抗性克隆，并证实其所抗遗传霉素的水平非常重要。

体内方法另一个普遍的问题是，只能分离少数遗传霉素抗性克隆，这意味着需要筛选更多的 HIS+转化子。记住你正分离的多拷贝插入事件，它发生的概率为 1-10%，这意味着需筛选数以千计的克隆而不是区区几百个。另外，为分离含较多拷贝插入基因的重组子，需要筛选更多的 HIS+转化子。连续的多拷贝插入更是少见。

如果你的转化效率很低，尝试用电转化替代去壁细胞方法。这样可增加转化效率，帮助你分离更多 HIS+转化子。

筛选 Mut+及 Muts 转化子

介绍：此处，你可分析 HIS+转化子的 Mut+及 Muts 表型。试剂盒中有两个菌株可提供 Mut+及 Muts 表型对照。GS115 Albumin 是 Muts 表型，GS115 β -gal 是 Mut+表型。HIS+ KM71 重组子不需要筛选重组子表型，因为它们都是 Muts 表型。

记住要用两个对照菌株作为毕赤酵母蛋白表达的背景：一个对照即亲本质粒线性化产生 HIS+ Muts 转化子，另一个对照是亲本质粒线性化产生 HIS+ Mut+转化子。

在 GS115 中筛选 HIS+ Mut+转化子：用 SalI 或 StuI 线性化质粒转化 GS115 后，大多在 HIS4 位点上发生重组，大多数转化子是 Mut+表型；然而由于质粒含有 AOX1 基因序列，有可能在 AOX1 位点发生重组，破坏野生型 AOX1 基因，产生 HIS+ Muts 转化子(P66)。在 MD 及 MM 平板上检测可证实 HIS+ Mut+转化子。

在 KM71 中筛选 HIS+ Muts 转化子：转化 KM71 的 HIS+转化子都是 Muts，因为 AOX1 基因被破坏(aox::ARG4)。不需要检测重组子 Mut 表型，所有都是 Muts。SalI 或 StuI 线性化质粒转化 KM71 在 HIS4 位点重组，SacI 线性化质粒在 AOX1 基因 5'区重组。HIS+重组子需在不含组氨酸的平板上纯化后再进行表达。

准备：下列培养基可提前准备存于+4 度

最小葡萄糖(MD)琼脂板 1L

最小甲醇(MM)琼脂板 1L

灭菌牙签及筛选平板 (P43)

在 MD, MGY 平板上划线培养 GS115 Ablumin(HIS+ Muts)及 GS115 β -gal HIS+ Mut+, 作为 Mut+或 Muts 在 MD 或 MM 平板上生长的对照。

筛选 GS115/HIS+ Mut+ 或 HIS+ Muts：筛选 HIS+转化子的 Mut+或 Muts 表型

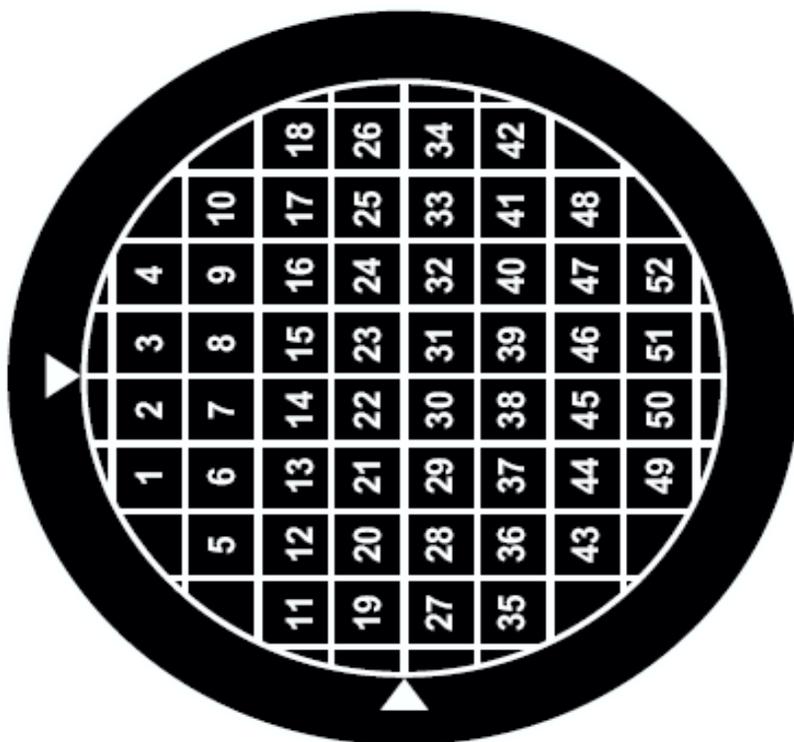
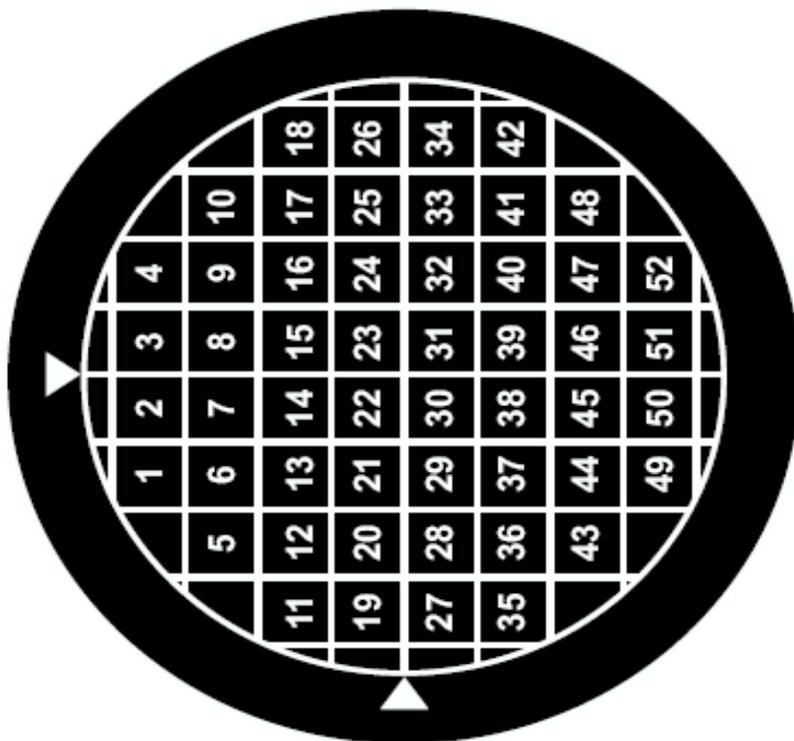
1 用灭菌牙签挑取单克隆，在 MM 及 MD 平板上以一定的方式划线或点 HIS+转化子，确保先在 MM 平板上点

2 每个克隆换一次牙签，点 100 个转化子后再继续向下做(约 2-3 板)

3 为分离 Mut+及 Muts 表型，在 MD 及 MM 平板上各点上对照(GS115/HIS+ Muts Ablumin 及 GS115/ HIS+ Mut+ β -gal)

4 30 度孵育 2 天

5 两天后，计数平板，寻找在 MD 平板正常生长而在 MM 平板上生长很小或不长的菌株。



注意：建议纯化 HIS⁺转化子，确保分离的是单克隆，这可在检测 Mut 表型前后进行。

复制平板程序：该程序错误分离的概率较小，但分离的程序要增加 2 天，需要仪器复制平板。

制作者：陈苗 商汉桥

1 用灭菌牙签,在 MD 平板上(2-3 板) 点 100 个 HIS+转化子,点 GS115/HIS+ Muts Ablumin 及 GS115/ HIS+ Mut+ β -gal 在 MD 上作对照。

2 在 28-30 度孵育 2 天

3 两天后,复制平板至新鲜的 MM、MD 平板, 筛选 Muts

4 28-30 度孵育复制平板 2 天

5 在 28-30 度孵育两天后,计数复制平板,查找在 MD 平板上正常生长而在 MM 平板上长得小或不长的菌落。每块板上的 HIS+Mut s 及 HIS+Mut+对照菌落,可作为 Muts 及 Mut+表型的参照。

转化子更简单的选择方法: 由于铺在上层琼脂,导致转化子中有些在上层有些则包埋琼脂里,无法挑取克隆。下列程序可进行转化子选择,直接将它们铺于板上,而无需用上层琼脂。

1 用灭菌刮子刮取含 HIS+转化子的琼脂置于灭菌的 50ml 离心管中,加入 20ml 灭菌去离子水,剧烈涡旋重悬细胞

2 用 4 层干酪包布过滤上清,室温 1000g 离心 5min。细胞在底部,残留的琼脂在细胞上方

3 仔细去除琼脂,轻轻晃动管子,使琼脂颗粒分散于水中,弃去含琼脂的上清。

4 用 5ml 灭菌去离子水重悬细胞,用小超声头,20-30%输出功率下超声细胞 10 秒,只将细胞超声分散而不是裂解细胞。

5 将细胞稀释至 10^4 ,在 MD 平板上铺 50-100ul。30 度孵育过夜。选择方法进行 Mut 表型筛选。

重组酵母菌表达:

介绍: 确定目的基因表达的最优方法及条件,下面为毕赤酵母表达因素及指导,因为对于任何表达系统,最优化条件因表达蛋白的特征而不同。

培养基: 需要 BMGY/BMMY(缓冲复合甘油或缓冲复合甲醇培养基)BMG/BMM(缓冲最小甘油或缓冲最小甲醇培养基)MGY/MM(最小甘油或最小甲醇培养基)进行表达(P60)。BMG,BMM,BMGY,BMMY 用于分泌蛋白表达,特别是当 PH 对蛋白活性比较重要时。它们是缓冲培养基,这与 MGY、MM 不同。这四种培养基用磷酸盐缓冲,PH 值在一个较大的范围内,可用于蛋白优化表达。BMGY/BMMY 含酵母浸出物及蛋白胨,可稳定分泌蛋白,阻止或减少分泌蛋白的分解。酵母浸出物及蛋白胨作为“混合饲料”,使生长更好并可积累大量表达产物。

蛋白酶: 有些蛋白特别易受在中性 PH 值时有很好活性的蛋白酶的影响。在这种情况下,建议用 MGY,MM 培养基,因为当毕赤酵母在无缓冲培养基如 MM 中表达时,PH 降至 3 或更低,许多中性 PH 蛋白酶都将失活。毕赤酵母对低 PH 值有抗性,因此低 PH 值不会影响生长。与此相对的是,有报道称加入 1%酪蛋白氨基酸(Difco)并将培养基 PH 值缓冲至 6.0,胞外蛋白酶受抑制,增加了小鼠表皮生长因子的表达。

如果你的目的蛋白对中性 PH 蛋白酶敏感的话,可在无缓冲培养基(MM)中表达。如果没有证据证明你的分泌蛋白对中性 PH 值蛋白酶敏感,建议开始表达时用 BMMY。如果表达蛋白降解了,尝试在无缓冲培养基中进行表达。

如果以上条件仍不能有效防止蛋白降解,可将基因转入 SMD1168 中,该菌株表型是 his4pep4,缺失了蛋白酶,转化与表达程序与 GS115 相同,也可用于大规模发酵。

换气: 毕赤酵母高效表达的重要因素是在甲醇诱导时充分换气。基本上在诱导时,培养基不要超过摇瓶体积的 10-30%。建议使用隔板摇瓶,用 2-3 层干酪包布或松散合适的盖子盖住摇瓶,不要用很紧的盖子。(换气在诱导前大量培养时并不那么重要)

生长动力学: 当 Mut+ 及 Muts 在 YPD 或甘油培养基中生长接近相同速度时,加入甲醇,由于 AOX1 基因产物的产生, Mut+ 将比 Muts 生长快。

温度及振荡: 所有表达需在 30 度的摇床中进行。温度不能超过 30 度很重要,如果摇床温度不稳,设置在 28 度。使用落地式摇床,速度为 225-250rpm,如果为台式摇床,速度调至 250-300rpm。

开始前: 先证实重组子及对照重组子(无插入,1 拷贝插入)在 GS115 或 KM71 中的表达情况。进行表达时,选择合适的对照很重要,可以更好地解释你的表达结果。表达对照如下:

GS115/HIS+ Muts Ablumin	Muts 分泌表达对照
GS115/ HIS+ Mut+ β -gal	Mut+胞内表达对照
GS115 或 KM71/载体(无插入)	背景对照
GS115 或 KM71/载体(1 拷贝插入)	单拷贝基因表达水平对照

不同的重组形式均会影响表达,建议挑取 6-10 个克隆进行表达水平筛选。从最新的平板上挑取克隆。克隆子活力随时间而下降,如果有任何怀疑,最好划线纯化菌株。(也可以从冻存的甘油菌中取部分进行培养)

表达指导: 下面信息有关如何开始表达,可能需要改变条件来表达不同蛋白,如可能使用底隔板或边隔板摇瓶。如果分析许多重组子,可用 50ml 离心管。为确保有效换气,可增加摇瓶速度或将离心管以一定角度置于摇床中。

Mut+胞内或分泌表达: 为检测表达条件是否有效,可培养 GS115 β -gal (Mut+)(胞内表达-半乳糖苷酶)。亲载体转化 GS115 或 KM71 作为胞内表达背景对照。

1 挑取单克隆,接种至 25mlMGY, BMG 或 BMGY 中,(250ml 摇瓶),28-30 度,250-300rpm 摇至 OD600=2-6(对数生长,大约 16-18 小时)

2 室温 1500-3000g 离心 5min,收集细胞,去除上清,用 MM, BMM 或 BMMY 重悬细胞至 OD600=1.0,进行诱导表达(大约 100-200ml)

3 在 1L 摇瓶中加入上述培养物,加盖两层灭菌纱布或干酪包布,放入摇床继续生长。

4 每 24 小时,加甲醇至终浓度为 0.5%以继续诱导。检查培养基的量,确保正确加入甲醇,因为蒸发作用会减少培养基的体积。

5 在下列的各个时间点,取 1ml 培养基至 1-5ml 离心管。这些样品用于分析表达水平及确定诱导后收集细胞的最好时间。室温用水平离心机最大转速离心 2-3min。时间点: 0, 6, 12, 24(1 天), 36, 48(2 天), 60, 72(3 天), 84, 96(4 天)。

6 分泌表达时,将上清转移至单独管中,将上清及细胞沉淀存于-80 度直至开始检测。在液 N2 或干冰/酒精浴中快速冷冻

胞内表达时,去除上清将细胞沉淀存于-80 度,直至开始检测。在液 N2 或干冰/酒精浴中快速冷冻

7 用考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE, western blot 或功能分析方法来分析上清及细胞沉淀的蛋白表达(SDS-PAGEp47)。

Muts 胞内或分泌表达:可培养 GS115 Ablumin (Muts, 分泌白蛋白至培养基中)检测培养条件的效率。记住要用转化亲本载体的 GS115 或 KM71 作为胞内表达的背景对照。

1 挑取单克隆,接种至含 100mlMGY, BMG 或 BMGY 的 1L 隔板摇瓶中。在摇床中 28-30 度, 250-300rpm 生长至 OD600=2-6(约 16-18 小时)

2 室温 1500-3000g 离心 5min 收集细胞, 去除上清, 用 1/5-1/10 原培养基体积的 MM, BMM 或 BMMY 重悬细胞(约 10-20ml)

3 置于 100ml 隔板摇瓶中, 用 2 层灭菌纱布或干酪包布盖住瓶口, 放入摇床继续培养。

4 每隔 24 小时, 加入甲醇至终浓度为 0.5% 以继续诱导。

5 在下列的各个时间点, 取 1ml 培养基至 1-5ml 离心管。这些样品用于分析表达水平及确定诱导后收集细胞的最佳时间。室温用水平离心机最大转速离心 2-3min。时间点: 0, 6, 12, 24(1 天), 36, 48(2 天), 60, 72(3 天), 84, 96(4 天)。

6 分泌表达时, 将上清转移至单独管中, 将上清及细胞沉淀存于-80 度直至开始检测。在液 N2 或干冰/酒精浴中快速冷冻

胞内表达时, 去除上清将细胞沉淀存于-80 度, 直至开始检测。在液 N2 或干冰/酒精浴中快速冷冻。

7 用考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE, western blot 或功能分析方法来分析上清及细胞沉淀的蛋白表达(SDS-PAGE p47)。

SDS-PAGE 分析:

介绍: 任何标准 SDS-PAGE 仪器及程序均可用, 如 12% 聚丙烯酰胺凝胶, 5% 浓缩胶用于分离 40-100kDa 蛋白。

样品准备: 需要准备 Breaking 缓冲液(P60)及酸洗 0.5mm 玻璃珠

细胞洗涤准备: (胞内或分泌表达)

1 快速融化细胞沉淀, 置于冰上

2 每 1ml 样品, 加入 100ul 裂解缓冲液(细胞+上清)

3 加入等量的酸洗玻璃珠(0.5mm), 通过置换来估算相等体积

4 涡旋 30s, 冰上孵育 30s, 重复 8 次

5 4 度最大转速离心 10min, 将上清转移至干净的微量离心管中

6 取 50ul 上清(细胞裂解物), 加入 50ul 2×SDS-PAGE 凝胶上样缓冲液(样品 buffer)

7 煮沸 10min, 每孔加 10-20ul, 依胶的厚薄及孔量, 决定点样量。剩下样品存于-20 度, 用于 western blot。细胞裂解物存于-80 度用于分析。

蛋白浓度: Lowry, BCA(pierce)或 Bradford 蛋白分析可用于定量分析细胞裂解物中及培养基上清中蛋白量。一般, 毕赤酵母细胞裂解物含有 5-10ug/ul 蛋白。毕赤酵母培养基上清中蛋白含量各有不同, 基本上与分泌蛋白的量有关。毕赤酵母只分泌很少自身蛋白, 如果培养基中蛋白量大于 50ug/ml, 10ul 培养基在 SDS-PAGE 上通过考马斯亮蓝染色可得一条弱带。

对照: 在 SDS-PAGE 上用下列样品作对照:

1 与所需蛋白相适的分子量标准

2 标准蛋白(如果有的话)

3 含亲本载体的 GS115 或 KM71 样品, 这可显示毕赤酵母胞内自身蛋白背景, 如果在胞内表达, 可帮助你将目的蛋白从背景蛋白中区分开来

4 分析 GS115β-gal 及 Ablumin 对照, 可指示培养基或条件是否有问题

用考马斯亮蓝染色时, 强烈建议进行 western blot 或其它更敏感的分析方法来分析蛋白, 表达蛋白依染色而呈现出来依靠多种因素, 如表达水平, 可溶性, 分子量及胞内相同分子量的蛋白是否掩盖了它等等。Western blot, 酶活分析或特定的纯化方式, 可帮助在自身蛋白中辨认表达蛋白。

分析蛋白表达: 检查考马斯亮蓝染色 SDS-PAGE 时, 会发现随不同时间诱导产生目的蛋白与标准蛋白移行相同距离, 如果没有可见的重组蛋白, 进行 western blot 或功能分析。

*如果重组蛋白的表达量很低, 见(毕赤酵母表达蛋白优化)P49, 优化表达指导。

*用试剂盒自带的两个对照菌检测表达条件

*如果没有检测到表达, 进行 northern blot 分析, 看是否有及有多少被诱导的全长 mRNA。见 P76, RNA 分离程序。

优化毕赤酵母蛋白表达:

介绍: 根据现有数据, 在毕赤酵母中表达可测水平外源蛋白的概率大约为 75%。最大的障碍可能是最初的成功---表达任意水平蛋白, 虽然表达 $\geq 10\text{g/l}$ 的例子很少, 仍有许多表达水平 $\geq 1\text{g/l}$ 的例子, 使得毕赤酵母表达系统成为最高产的真核表达系统之一。也有一些无法在杆状病毒及酿酒酵母中表达而在毕赤酵母中成功表达的例子, 表明毕赤酵母系统是一个很好的替代选择, 如果你最初没有表达或很少的话, 使用下列指导来优化表达。

蛋白酶水解或降解: 作一系列表达时间研究, 检测是否在某一个时间点产生较多比例的全长蛋白。

1 如果分泌表达, 在无缓冲的 MM 培养基中培养, 检测蛋白是否对中性 PH 蛋白酶敏感。另外, 在缓冲培养基中加入 1% 酪蛋白氨基酸, 抑制胞内蛋白酶

2 用 SMD1168(蛋白酶 A 缺陷)进行表达

3 分泌表达水平低: 检测细胞沉淀, 看是否总体表达水平低或蛋白没有分泌。如果不分泌, 尝试不同的信号序列(自身或 α -factor 信号序列)

4 用硫酸铵沉淀或超滤浓缩上清(P52)

5 Mut+, 用高浓度培养物进行诱导表达

表达水平低:

1 检测 Mut+ 及 Muts 重组子以期增加表达, 一些蛋白在一种遗传背景下表达比另一种好

2 如果是分泌表达, 尝试胞内表达, 因为蛋白不能正确加工或不能分泌, 检查细胞沉淀是否有表达。如果胞内表达有困难, 尝试进行分泌表达。可能的糖基化也许是你需要的也许是不需要的, 如果不要, 寡糖苷可用 peptide: N-Glycosidase F 进行去除。(P54)

3 进行大规模发酵(P52), 毕赤酵母是酵母, 当然更适于发酵。致电 Invitrogen 技术服务部寻求帮助。

没有表达:

1 先按前面所列简单方法进行优化, 因为没有表达与表达量极低情况相似。如果这些方法仍不能增加蛋白表达, 进行 northern blot 分析或检查基因转录情况。附录中有毕赤酵母 RNA 分离方法(P76)

2 PCR 分析插入情况(P70)。PCR 选取 12-20 个转化子才可信, 记得用空载体及单拷贝插入载体作对照分析 PCR 结果

3 如果有转录提前终止, 检测基因的 AT 结构, 在酿酒酵母中, 只有很少序列会使转录提前终止, 其中之一 TTTTATA, 与 HIVI-gp120 中 ATTATTTTATAAA 序列相似, 在酵母中表达时, 会出现提前终止。改变该序列, 才能出现更长的转录。

过糖基化: 如果是过糖基化的

1 试用胞内表达, 因为蛋白不经过分泌通路, 不会被修饰

2 用 peptide: N-Glycosidase F 或其它酶进行去糖基化

3 去除基因 N 端糖基化位点

大规模表达:

表达指导: 表达优化后, 可用更大摇瓶或用发酵罐来生产更多蛋白(P79)。用下列指导来进行规模化表达, 纯化蛋白见参考(P53)

Mut+胞内或分泌表达:

1 挑取单克隆, 接种至含 25mlMGY, BMG 或 BMGY 的 250ml 摇瓶中, 28-30 度, 250-300rpm 培养至 OD600=2-6(约 16-18 小时)

2 将 25ml 培养基接种至含 1LMGY, BMG 或 BMGY 的 3-4L 摇瓶中, 28-30 度剧烈振荡(250-300rpm), 至对数生长期(OD600=2-6)

3 用灭菌离心管, 室温 1500-3000g 离心 5min 收集细胞。诱导表达时, 去除上清, 用 MM, BMM 或 BMMY 重悬细胞至 OD600=1.0(2-6L)进行诱导

4 分装培养基至几个 3-4L 隔板摇瓶, 用 2 层灭菌纱布或干酪包布盖住, 放入摇床 28-30 度继续培养

5 每 24 小时, 加甲醇至 0.5% 浓度, 直至到达最佳诱导时间

6 室温, 1500-3000g 离心 5min 收集细胞。胞内表达去除上清, 细胞立即进行处理或存于-80 度。分泌表达, 保留上清, 置于 4 度预冷, 如需要可进行浓缩。接下来进行蛋白纯化或将上清存于-80 度备用。

Muts 胞内或分泌表达:

1 挑取单克隆, 接种至含 10mlMGY, BMG 或 BMGY 的 100ml 隔板摇瓶中, 28-30 度, 250-300rpm 培养至 OD600=2-6(约 16-18 小时)

2 将 10ml 培养基接种至含 1LMGY, BMG 或 BMGY 的 3-4L 摇瓶中, 28-30 度剧烈振荡(250-300rpm), 至对数生长期(OD600=2-6)

3 用灭菌离心管, 室温 1500-3000g 离心 5min 收集细胞。诱导表达时, 去除上清, 将细胞重悬于 1/5-1/10 原体积的 MM, BMM 或 BMMY 培养基中(100-200ml)

4 将培养基加至 1L 隔板摇瓶中, 用 2 层灭菌纱布或干酪包布盖住, 放入摇床 28-30 度继续培养

5 每 24 小时, 加甲醇至 0.5% 浓度, 直至到达最佳诱导时间

6 室温, 1500-3000g 离心 5min 收集细胞。胞内表达去除上清, 细胞立即进行处理或存于-80 度。分泌表达, 保留上清, 置于 4 度预冷, 如需要可进行浓缩。接下来进行蛋白纯化或将上清存于-80 度备用。

建议: 为增加 Muts 重组子的数量, 增加摇瓶数量, 将 200-300ml 培养基加至 3L 摇瓶中或发酵培养。

浓缩蛋白: 分泌进培养基中的蛋白, 同质性>50%, 需要另外进行纯化, 如果蛋白表达水平并不太高, 可优化浓缩蛋白。有几种方法浓缩毕赤酵母分泌蛋白

*硫酸铵沉淀法 *透析 *体积小, 离心集中器 *体积大时, 加压浓缩 *冻干浓缩
细胞裂解: 用玻璃珠进行裂解

发酵: Invitrogen 有发酵指导, 建议曾做过或身边有人曾做过发酵时再尝试发酵。

蛋白纯化与糖基化:

介绍: 你已经优化蛋白表达程序, 也通过大规模培养生产大量蛋白以进行纯化。你也许有蛋白纯化的方法, 由于每种蛋白都不同, 很难推荐统一的技术用于纯化

一些蛋白纯化技术: 确保细胞裂解及纯化蛋白都在 4 度进行

*离子交换色谱 *凝胶过滤 *亲和色谱分析 *聚焦色谱 *等电聚焦免疫沉淀

*可溶性（膜蛋白）Lectin 亲和色谱

细胞裂解程序: 准备 breaking buffer (BB) 见附录 P60

1 用 BB 重悬清洗细胞, 4 度下 3000g 离心 5-10min,

2 用 BB 重悬细胞至 OD600=50-100

3 加入等体积的酸洗玻璃珠 (0.5mm), 通过替代预测体积

4 涡旋混合物 30s, 冰上孵育 30s, 重复 7 次, 间隔涡旋并预冷细胞抽提物减少蛋白变性

5 在 4 度, 12000g 离心 5-10min

6 将上清转至干净容器并分析, 总蛋白含量应在 5-10mg/ml

7 保留细胞沉淀, 用 6M 尿素或 1% Triton X-100 抽提来检测不可溶蛋白

糖基化分析: 在异源表达系统中表达纯化糖基化蛋白, 需要尽快确定是否正确糖基化, 最近发表的一些蛋白碳水结构分析方法, 使得分子生物学家可对糖基化目的蛋白进行分析。

毕赤酵母培养基配方:

贮存液:

*10×YNB (13.4%酵母氮源碱 (YNB) 含硫酸铵不含氨基酸)

溶解 134g YNB 于 1000ml 水中, 过滤除菌, 加热至 YNB 完全溶解, 存于 4 度。或者用 34g YNB (不含硫酸铵不含氨基酸), 100g 硫酸铵进行配制, 可放 1 年。注意毕赤酵母在高浓度 YNB 下生长更好。该试剂盒中所用 YNB 的量是酿酒酵母中的两倍。

*500×生物素 (0.02%)

溶解 20mg 生物素于 100ml 水中, 过滤除菌, 放于 4 度, 可放 1 年

*100×H (0.4%组氨酸)

溶解 400mg L-组氨酸于 100ml 水中, 低于 50 度加热以促溶解, 过滤除菌, 可放 1 年

*10×D (20%葡萄糖)

溶解 200g D-葡萄糖于 1000ml 水中, 高压灭菌 15min 或过滤除菌, 可放 1 年

*10×M (5%甲醇)

混合 5ml 甲醇与 95ml 水, 过滤除菌存于 4 度, 可放 2 个月

*10×GY (10%甘油)

混合 100ml 甘油与 900ml 水, 过滤或高压灭菌, 室温放置, 可存放 1 年以上

*100×AA (0.5%各种氨基酸)

溶解各 50mg L-谷氨酸, L-蛋氨酸, L-赖氨酸, L-亮氨酸, L-异亮氨酸于 100ml 水中, 过滤除菌, 存于 4 度, 可放 1 年

*1M 磷酸钾缓冲液 PH6.0

132ml 1M K₂HPO₄, 868ml 1M KH₂PO₄, 调整 PH 值为 6.0±0.1 (如果需调 PH 值, 用磷酸或 KOH)。过滤或高压灭菌, 室温下可放 1 年以上

*YPD 或 YPED: Yeast Extract Peptone Dextrose Medium(1L)

1% Yeast Extract 2% Peptone 2% Dextrose (glucose)

1 溶解 10g YE, 20g PEP 于 900ml 水中, 如制平板加入 20g 琼脂粉

2 高压 20min

3 加入 100ml 10×D

*YPD-遗传霉素平板:

1% 酵母浸出物, 2% 蛋白胨 2% 葡萄糖 2% 不同量的遗传霉素

100mg/ml 遗传霉素: 用无菌水制备 30ml 100mg/ml 遗传霉素贮存液, 过滤除菌, 存于 -20 度。用来制备含不同终浓度遗传霉素平板: 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 1.75, 2.0, 3.0, 4.0

250ml (8-10 个遗传霉素平板)

- 1 溶解 2.5g 酵母浸出物,5g 蛋白胨,5g 琼脂粉于 225ml 去离子水中
- 2 高压灭菌 20min
- 3 加入 25ml 10×D, 混匀
- 4 待 YPD 冷至 55-60 度, 加入合适量遗传霉素贮存液, 同时也制几个不含遗传霉素的 YPD 平板

5 混匀, 不要产生太多气泡

6 倾倒 10cm 彼得里培养皿, 凝固后, 倒置存于 4 度, 可放至少 6 个月

终浓度	0.25	0.5	0.75	1.0	1.5	1.75	2.0	3.0	4.0
ml 遗传霉素贮存液/250mlYPD	0.625	1.25	1.875	2.5	3.75	4.375	5.0	7.5	10

*MGY 及 MGYH (minimal glycerol medium±histidine) 1L

1.34%YNB 1%甘油 4×10⁻⁵%生物素 ±0.004%组氨酸

1 在 800ml 水中加入 100ml 10×YNB, 2ml 500×B, 100ml 10×GY

2 培养 his4 菌株, 需加入组氨酸 (称为 MGYH), 加入 10ml 100×H 贮存液。

3 存于 4 度, 可放 2 个月

*RD 及 RDH 液体培养基: regeneration dextrose medium±histidine 1L

1M 山梨醇 2%葡萄糖 1.34%YNB 4×10⁻⁵%生物素 0.005%氨基酸 ±0.004%组氨酸

1 溶解 186g 山梨醇于 700ml 水中

2 灭菌 20min

3 放冷并置于 45 度水浴

4 准备预温 (45 度) 的混合液

100ml 10×D

100ml 10×YNB

2ml 500×B

10ml 100×AA

88ml 灭菌水

加至山梨醇溶液中

5 培养 his4 菌株, 需加入组氨酸, 在 4 中 45 度预温混合液在加入 10ml 100×H。4 度保存, 可放几个月

*RDB 或 RDHB 琼脂平板:

1 溶解 186g 山梨醇于 700ml 水中, 加入 20g 琼脂粉

2 灭菌 20min

3 将溶液置于 60 度水浴, 以防止溶液变稠

4 准备 RD 及 RDH 中用到的预热的 (45 度) 混合物, 加至山梨醇/琼脂粉溶液中。如选择 HIS+转化子, 不要加组氨酸。

5 制备平板, 放于 4 度, 可放几个月。

*RD 及 RDH 上层琼脂:

1 溶解 186g 山梨醇于 700ml 水中, 加入 10g 琼脂或琼脂糖

2 灭菌 20min

3 置于 60 度水浴

4 准备 RD 及 RDH 中用到的预热的 (45 度) 混合物, 加至山梨醇/琼脂粉溶液中, 如选择 HIS+转化子, 不要加组氨酸。

5 如立即作转化, 将溶液置于 45 度

6 存于 4 度, 可放几个月

*MD, MDH (minimal dextrose medium ± histidine) 1L

1.34% YNB 4 × 10⁻⁵% 生物素 2% 葡萄糖

1 灭菌 800ml 水

2 于 60 度下加入 100ml 10 × YNB, 2ml 500 × B, 100ml 10 × D

3 制 MDH 时, 加入 10ml 100 × H, 混匀存于 4 度

4 如制备平板, 于第一步加入 15g 琼脂粉

5 倒置平板, 4 度放置几个月

*MM、MMH minimal methanol ± histidine 1L

13.4% YNB 4 × 10⁻⁵% 生物素 0.5% 甲醇

1 灭菌 800ml 水

2 于 60 度下加入 100ml 10 × YNB, 2ml 500 × B, 100ml 10 × M

3 制 MMH 时, 加入 10ml 100 × H, 混匀存于 4 度

4 如制备平板, 于第一步加入 15g 琼脂粉

5 倒置平板, 4 度放置几个月

*BMG、BMM Buffered minimal glycerol (methanol) 1L

100mM 磷酸钾 PH6.0 1.34% YNB 4 × 10⁻⁵% 生物素 1% 甘油或 0.5% 甲醇

1 灭菌 700ml 水,

2 冷至室温, 加入下列: 100ml 1M 磷酸钾缓冲液 PH6.0, 100ml 10 × YNB, 2ml 500 × B, 100ml 10 × GY

3 制 BMM 时, 加入 100ml 10 × M 取代 10 × GY

4 放置于 4 度, 可放 2 个月

*BMGY Buffered Glycerol-complex Medium

BMMY Buffered Methanol-complex Medium 1L

1% 酵母浸出物 2% 蛋白胨 100mM 磷酸钾 PH6.0, 1.34% YNB 4 × 10⁻⁵% 生物素 1% 甘油或 0.5% 甲醇

1 溶解 10g 酵母浸出物, 20g 蛋白胨于 700ml 水中

2 灭菌 20min

3 冷至室温, 加入下列混合液:

100ml 1M 磷酸钾缓冲液 PH6.0

100ml 10 × YNB

2ml 500 × B

100ml 10 × GY

4 制 BMMY 时, 加入 100ml 10 × M 取代 10 × GY

5 存于 4 度, 可放 2 个月

裂解缓冲液:

50mM 磷酸钠 PH7.4

1mM PMSF(或其它蛋白酶抑制剂)

1mM EDTA

5% 甘油

1 准备所需蛋白酶抑制剂贮存液, 正确保存

2 取 900ml 去离子水, 6g 磷酸钠 (单碱), 372mg EDTA, 50ml 甘油

3 用 NaOH 调节 PH, 定容至 1L, 存于 4 度

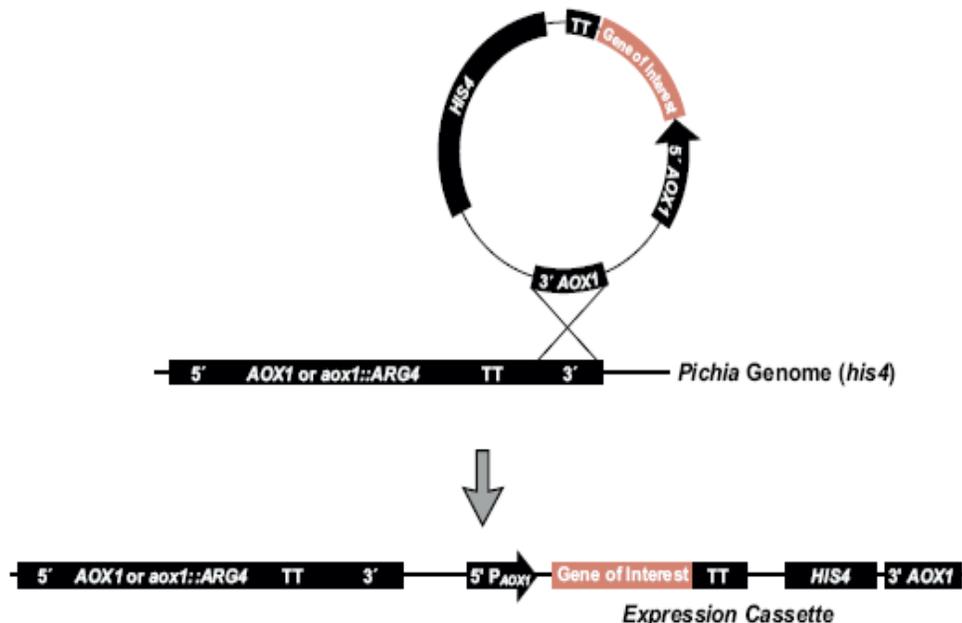
4 使用前, 加入蛋白酶抑制剂

毕赤酵母重组及整合

介绍: 通过转化 DNA 与毕赤酵母基因组中同源序列的同源重组, 毕赤酵母与酿酒酵母一样可产生稳定转化子。这些整合在无选择压力条件下, 即使是以多拷贝出现, 也表现出极度稳定性。常用的表达载体含有选择用 **HIS4** 基因, 这些载体用限制酶线性化后, 可在 **AOX1** 或 **his4** 位点进行重组, 从而产生 **HIS+** 重组子。注意单十字交换事件 (插入) 比双十字交换事件 (替换) 更容易发生, 多拷贝插入事件自发发生率只有单插入事件的 1-10%。

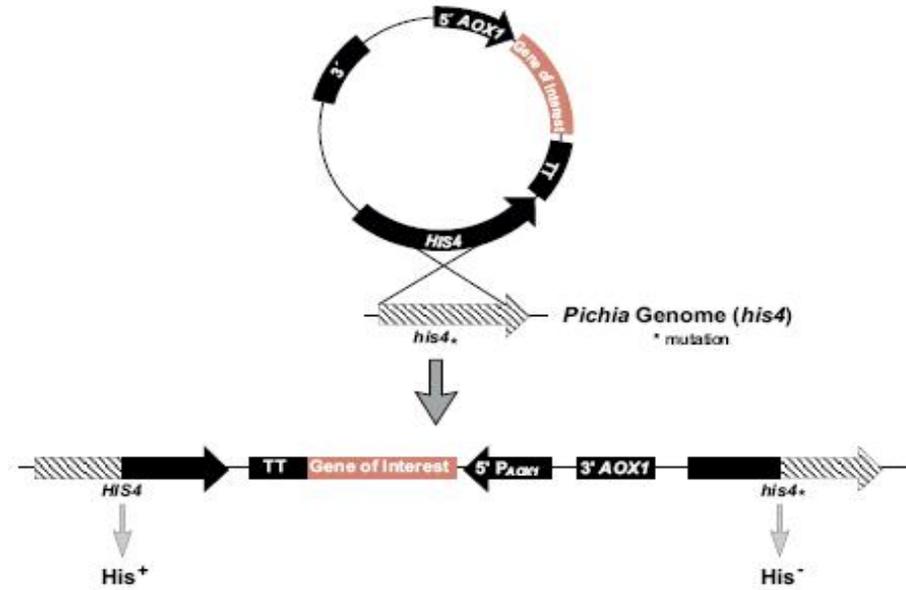
基因插入 AOX1 或 aox1::AGR4 位点: GS115 的 **AOX1** 或 KM71 的 **aox1::AGR4** 位点与载体上三个 **AOX1** 区: **AOX1** 启动子, **AOX1** 转录终止子 (TT) 或 **AOX1** 下游远侧序列 (3' **AOX1**) 中的任一个之间发生单十字交换事件都会形成基因插入。结果在 **AOX1** 或 **aox1::AGR4** 基因的上游或下游插入一个或多个载体。转化子在 GS115 中为 **HIS+** Mut+ 表型, 在 KM71 中为 **HIS+** Muts 表型。在重组质粒 5' 或 3' **AOX1** 区用限制酶进行线性化, 依转化宿主菌的不同, 可方便地产生 Mut+ 或 Muts 重组子。

下图显示质粒 3' 端插入完整的 **AOX1** 位点 (Muts), 增加 p**AOX1**、目的基因、**HIS4** (表达盒)。这也可发生在载体及基因组的 5' **AOX1** 区, 在 5' **AOX1** 位点产生 5' 方向插入。尽管发生频率很低, 该事件也可发生在未线性化载体或自连的载体上。

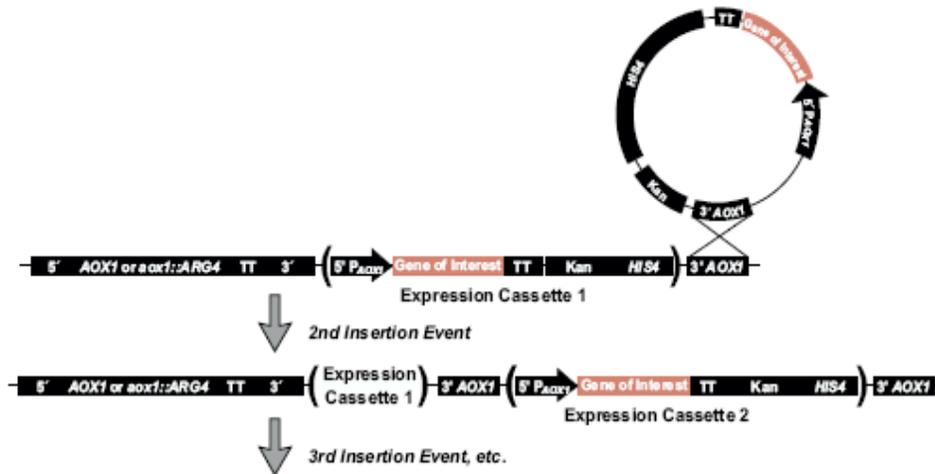


基因插入 His4 位点: GS115 (Mut+) 或 KM71 (Muts) 中, 染色体上 **his4** 位点与载体上 **HIS4** 基因之间发生单十字交换事件后会在 **his4** 位点形成插入。结果在 **his4** 位点插入一个或多个载体。由于基因组上 **AOX1** 或 **aox1::AGR4** 位点未发生重组, 这些 **HIS+** 转化子的表型均与亲本菌株相同。通过 **HIS4** 基因处限制性内切酶线性化, 依转化宿主菌不同, 可方便地产生 Mut+ 或 Muts 重组子。

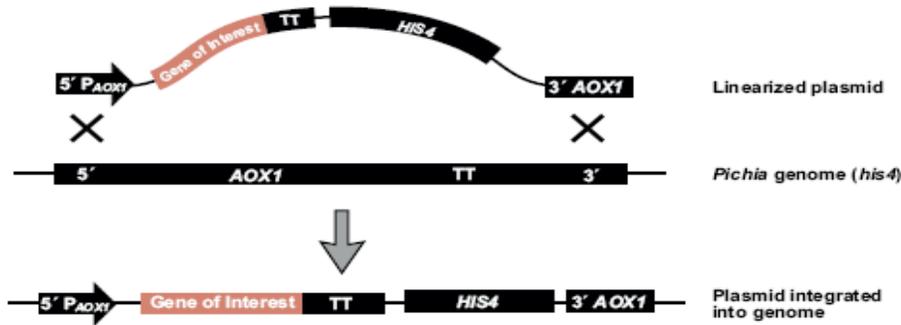
下图显示质粒插入双拷贝 **HIS4**/**his4** 基因。一个为突变子, 另一个为野生型。



基因多拷贝插入事件：细胞中单位点多基因插入确实可自发形成，虽然比例低，占有所有 HIS⁺转化子的 1-10%，但却是可测的。多拷贝插入事件的发生是因为基因可在 AOX1、*aox1::AGR4* 位点或 *his4* 位点进行插入。结果在 GS115 中产生 Mut⁺ 表型，在 KM71 中产生 Muts 表型。定量 dot blot 及 southern blot 分析，差显杂交均可检测到多基因插入事件。（P74 筛选多拷贝插入）



GS115 中基因在 AOX1 处发生替代：在 *his4* 菌株如 GS115 中，载体及基因组中 AOX1 启动子及 3' AOX1 区的双十字交换事件，可产生基因替代（omega 插入）。结果 AOX1 编码区全部被取代，产生 HIS⁺Muts 表型。以 AOX1 位点由于基因替代而产生的 Muts 表型作为指示，可很容易地筛选 HIS⁺转化子的 Mut 表型。基因取代的结果是缺失了 AOX1 位点（Muts），增加了含 pAOX1、目的基因、HIS4 的表达盒。下图显示 AOX1 位点的基因取代。



基因取代（双交换事件）不如插入（单交换事件）发生得多，一般我们建议线性化质粒通过单交换事件产生毕赤酵母重组子。用 GS115 或 KM71 菌株时，Mut 表型与亲本菌相同。

毕赤酵母电转化:

介绍: 该方法无需产生去壁细胞, 是产生毕赤酵母重组子的简便方法。与去壁细胞效率相似。

细胞准备:

- 1 在含 5ml YPD 的 50ml 离心管中, 培养毕赤酵母, 30 度过夜
- 2 取 0.1-0.5ml 过夜培养物, 接种含 500ml 新鲜培养基的 2L 摇瓶, 过夜生长至 OD600 = 1.3-1.5

3 在 4 度, 1500g 离心 5min 收集细胞, 用 500ml 预冷的灭菌水悬浮细胞

4 如上离心, 用 250 ml 预冷的灭菌水悬浮细胞

5 如上离心, 用 20ml 预冷的 1M 山梨醇悬浮细胞

6 如上离心, 用 1 ml 预冷的 1M 山梨醇悬浮细胞, 至终体积约 1.5ml

注意: 可冻存 80ul 等量的电感受态细胞, 但转化效率会下降很多

转化:

1 取 80ul 上述细胞与 5-20ug 线性化 DNA (溶于 5-10ul TE) 混合, 转入预冷的 0.2cm 电转杯中。

2 在冰上放置 5min

3 根据所使用装置推荐的酿酒酵母参数进行电击

4 立即加入 1ml 预冷的 1M 山梨醇至杯中, 将内容物转移至灭菌离心管中

5 分成 200-600ul 等份, 涂于 MD 或 RDB 平板上

6 在 30 度孵育平板至克隆产生, 按 P41 筛选 Mut+/Muts 表型

PEG1000 转化方法:

介绍: 据称 PEG 比 LiCl 方法好, 但不如去壁细胞及电转化法, 但对没有电转装置的人来说, 更方便, 效率为 10^2-10^3 /ugDNA。

溶液准备:

Buffer A: 1M 山梨醇, 10mM bicine (N-二(羟乙基)甘氨酸) pH8.35, 3% (v/v) 乙二醇

Buffer B: 40%(w/v) 聚乙二醇 1000, 0.2M N-二(羟乙基)甘氨酸 pH8.35

Buffer C: 0.15M NaCl, 10mM N-二(羟乙基)甘氨酸 pH8.35

过滤除菌, 存于 -20 度

新鲜的试剂级 DMSO, 未打开或刚配制, 存于 -70 度直至使用。

注意, 当细胞溶解后, 即使放在冰上, 其感受性下降都极快, 加入 DNA 于冰冻的管中

很关键。可进行多个转化，建议每次转化 6 个。

感受态细胞制备:

- 1 在 YPD 平板上划线培养毕赤酵母菌，30 度孵育 2 天
- 2 从平板上挑取单克隆于 10ml YPD 中，30 度振荡过夜
- 3 早上，在 100ml YPD 培养基中接种等量的过夜培养物，至 OD600 达 0.1，在 30 度生长至 OD600 为 0.5-0.8
- 4 室温 3000g 离心收集细胞，用 50ml Buffer A 洗涤细胞 1 次
- 5 用 4ml Buffer A 重悬细胞，分成 0.2ml 等份分装至 1.5ml 离心管中，加入 11ul DMSO 于各管中，混合，并在液氮中快速冷冻细胞
- 6 存于 -70 度

转化: 在 <20ul 水中加入 50ug DNA, 将 DNA 直接加入仍处于冰冻状态的感受态细胞管中。载体 DNA (40ug 变性及超声处理的鲑鱼精 DNA) 中加入 <1ug DNA 样品，检测最大转化效率。

- 2 在 37 度水浴中孵育各管 5min，其间混匀 1-2 次
- 3 取出各管，加入 1.5ml Buffer B，完全混匀
- 4 在 30 度水浴中孵育 1 小时
- 5 室温，2000g 离心样品 10min，去除上清，用 1.5ml Buffer C 重悬细胞
- 6 再次离心，用 0.2ml Buffer C 重悬细胞
- 7 将管中内容物全部涂在选择生长平板上，30 度孵育 3-4 天，筛选 Mut 表型 (P41)，或筛选遗传霉素高抗性克隆 (P37)

LiCl 转化方法:

介绍: 该程序是依酿酒酵母修改的版本，是电转化的替代方法。转化效率为 10^2 - 10^3 cfu/ug 线性化 DNA。

溶液准备: 不能用醋酸锂，一定要用氯化锂

- *用无菌去离子蒸馏水配制 1M LiCl，过滤除菌，用无菌水稀释
- *用无菌去离子蒸馏水配制 50% PEG (3350)，过滤除菌，存于盖紧的瓶中
- *用 TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1.0mM EDTA) 溶解 2mg/ml 变性断裂鲑鱼精 DNA，存于 -20 度

细胞准备:

- 1 在 50ml YPD 中培养毕赤酵母至 OD600=0.8-1.0 (约 10^8 个/ml)
- 2 收集细胞，用 25ml 灭菌水洗涤，室温 1500g 离心 10min
- 3 去除水，用 1ml 100mM LiCl 重悬细胞
- 4 将细胞悬液转至 1.5ml 离心管中
- 5 最大转速沉淀细胞 15s, 用吸头吸去 LiCl
- 6 在 400ul 100mM LiCl 中悬浮细胞
- 7 将 50ul 细胞悬浮液移到 1.5ml 离心管中，每次用一管，现做现用，不要置于冰上或 -20 度保存

转化:

- 1 煮沸单链 DNA 5min，快速放于冰水中使变冷，后置于冰上。注意: 载体 DNA 不需要在每次用之前都煮，在 -20 度保存等份少量样品，每次解冻一管，用 3-4 次后再煮。
- 2 取上面第 7 步中细胞，离心去除 LiCl
- 3 每个转化样品，按顺序加入下列试剂，PEG 可保护细胞免受高浓度 LiCl 的有害作用
240ul 50% PEG, 36ul 1M LiCl, 25ul 2mg/ml 单链 DNA, 溶解于 50ul 灭菌水中的

质粒 DNA (5-10ug)

- 4 剧烈涡旋细胞沉淀至完全混匀 (1min)
- 5 在 30 度孵育 30min (不要摇动)
- 6 在 42 度水浴热击 20-25min
- 7 6000-8000rpm 离心, 将转化溶液转移走
- 8 用 1ml 灭菌水重悬细胞沉淀
- 9 在 RDB 或 MD 平板上涂 25-100ul, 在 30 度孵育 2-4 天, 筛选转化子 Mut 表型及遗传霉素高抗性克隆

PCR 分析毕赤酵母整合:

介绍: 下列程序可分析目的基因是否整合到基因组中, 从 6-10 个 Muts 或 Mut+毕赤酵母克隆中分离基因组 DNA (P73), 从转化亲本质粒的菌株中提取 DNA, 进行整合分析。用 α -factor 引物 (仅用于 pPIC9K) 或 5' AOX1 引物与 3' AOX1 引物配对扩增目的基因。该程序可证实基因插入, 但不能证实插入位点。

更直接的 PCR 筛选方法见 P72**PCR 分析: 设置 PCR 反应如下:**

10×PCR buffer	5ul
基因组 DNA (1ug)	5ul
100mM dNTPs(25mM/个)	1ul
5' AOX1 引物(0.1ug/ul)	5ul
3' AOX1 引物(0.1ug/ul)	5ul
加入灭菌水至	50ul
Taq 多聚酶 (5U/ul)	0.25ul

用 20ul 灭菌水重悬引物, 制成 0.1ug/ul 溶液, 如需要可减少引物量。如 20pmol 引物, 加 2ul 引物进行扩增。

对照: 100ng 重组质粒 (阳性对照), 100ng 不含插入基因的相同质粒 (阴性对照)

2 加入 50ul 矿物油, 如果 PCR 仪有防蒸发系统, 不需要加矿物油。

3 上样, 按下列程序:

步骤	温度	时间 min	循环
热启动	94 度	2	1
变性	94 度	1	25-35
退火	55 度	1	
延伸	72 度	1	
最终延伸	72 度	7	1

4 用 0.8% 琼脂凝胶分析 10ul 样品, 缓冲液为 1×TAE

5 如果筛选 Mut+整合, 可见两条带, 一条与目的基因相关, 另一条为 AOX1 基因 (大约 2.2kb), 如果筛选 GS115 中 Muts 整合, 可见与目的基因相关的一条带。在 KM71 中, 由于 ARG4 插入 AOX1, PCR 产物为 3.6kb。亲代质粒产生下列大小 PCR 产物。在分析 PCR 结果时, 需将这些片段的长度加到最终片段中。

载体	PCR 产物
pPIC3.5k	220bp
pAO815	189bp
pPIC9k(用 5' AOX1 引物)	492bp
pPIC9k(用 α -factor 引物)	195bp

制作者: 陈苗 商汉桥

重要：如使用 α -factor 引物，在 GS115 及 KM71 中都可见一条带。因为染色体 AOX1 基因上没有 α -factor 信号序列。

注意：有时 PCR 会产生假带，这不重要因为它们并不产生什么问题。

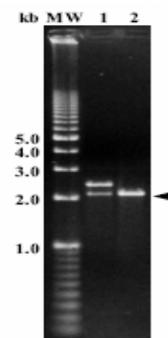
PCR 分析示例：下面是 PCR 分析的典型例子，从毕赤酵母重组菌、合适的对照中分离基因组 DNA，在 0.8% 琼脂糖凝胶上，每个 PCR 样品点 10ul。

泳道 1 含有 1kb 及 100bp 条带。

泳道 2 显示野生型 AOX1 基因 2.2kb 及含目的基因的 2.4kb 产物 (GOI, 1.9kb) 及 GS115/ pPIC9k/ GOI 中 492bp 的 AOX1 基因侧翼序列。

泳道 3 显示 GS115 中野生型 AOX1 基因。

注意：Invitrogen “Easy-DNA” 试剂盒可快速简便地分离毕赤酵母基因组 DNA。



毕赤酵母克隆直接进行 PCR 筛选：

介绍：有报道称可用 PCR 直接检测毕赤酵母克隆中的插入基因，简单讲，通过酶、冷冻及热处理相结合的方法裂解细胞，基因组 DNA 可直接用作 PCR 模板。

开始前：准备下列试剂及仪器

* 毕赤酵母转化子培养基或单克隆 * 1.5ml 离心管 * 5U/ul 溶细胞酶溶液 (Lyticase)
* 30 度水浴，或热击 * 液氮 * PCR 试剂

程序：

1 在 1.5ml 离心管中加入 10ul 毕赤酵母培养物，若培养物很浓，可将 1ul 培养物稀释至 9ul 水中，或直接挑取单克隆，重悬于 10ul 水中。

2 加入 5ul 5U/ul 的溶细胞酶 lyticase, 30 度孵育 10min

3 将样品冻存于 -80 度 10min，或浸入液氮中 1min

4 设立 50ul PCR 反应体系

10×反应 buffer	5ul
25mM MgCl ₂	5ul
25mM dNTPs	1ul
5' AOX1 引物(0.1ug/ul)	1ul
3' AOX1 引物(0.1ug/ul)	1ul
灭菌水	27 ul
细胞裂解液	5 ul
总体积	45ul

5 混合溶液，覆盖 20ul 矿物油

6 将溶液置于热循环器中，95 度孵育 5min

7 加入 5ul 0.16U/ul Taq 聚合酶 (0.8U)

8 按下列参数循环 30 次

步骤	温度	时间 min
变性	95 度	1
退火	54 度	1
延伸	72 度	1
最后延伸	72 度	7

9 在琼脂糖凝胶中分析 10ul 等量样品

毕赤酵母总 DNA 提取

介绍：下列操作可从所需的 HIS+重组子及未转化的 GS115、KM71 中提取 DNA，适用于 southern 分析，dot /slot blot 分析 或基因组 PCR

溶液：需要配制下列溶液，有些试剂在试剂盒中没有

最小培养基 (MD, MGY) 灭菌水

SCED(1M 山梨醇, 10mM 柠檬酸钠 pH7.5, 10mM EDTA, 10mM DTT)

藤黄节杆菌酶 3mg/ml 贮存液 1%SDS 5M 醋酸钾 pH8.9

TE buffer pH7.4 (10mM Tris-HCl pH7.4, 1mM EDTA pH8.0)

7.5M 醋酸铵 pH7.5 酚：氯仿(1: 1, V/V)

准备：

1 在 30 度，在 10mlMD 或 MGY 中培养重组子，在 10mlMDH, MGYH 中培养 GS115 或 KM71 至 OD600=5-10

2 室温，1500g 离心 5-10min

3 用 10ml 灭菌水洗细胞，如 2 中离心

细胞去壁及裂解：

1 在 2mlSCED 缓冲液(pH7.5)中重悬细胞，溶液现配现用

2 加入 0.1-0.3ng 藤黄节杆菌酶(加前混合均匀)，37 度孵育 50min，获得去壁率<80%去壁细胞(监测去壁细胞比例，P33-34)

3 加入 2ml 1%SDS，轻轻混匀，冰上放置 5min(0-4 度)

4 加入 1.5ml 5M 醋酸钾 pH8.9，轻轻混匀

5 在 4 度 1000g 离心 4min，保留上清

DNA 沉淀：

1 从上述 5 中转移上清，加入 2 倍体积乙醇，室温放置 15min

2 在 4 度 1000g 离心 20min

3 用 0.7mlTE pH7.4 轻轻重悬沉淀，转入离心管中

4 以下操作需轻柔，用等量的酚：氯仿(1:1 v/v)抽提取，再用等量的氯仿：异戊醇(24:1)抽提。将上层水相转入两个离心管中。

5 每管中加入 1/2 体积的 7.5M 醋酸铵，2 倍体积的乙醇，干冰上放置 10min，或-20 度放置 60min

6 在 4 度 10000g 离心 20min,用 1ml70%乙醇洗涤沉淀，空气干燥沉淀。用 50ulTE pH7.5 重悬沉淀。测定 DNA 样品浓度。两管可分别存放或合在一起存放于-20 度。

多拷贝重组子拷贝数：

介绍：你若想知道毕赤酵母重组子准确插入数，可用定量 blot 或 southern 杂交来分析拷贝数。需要分离转化有亲代载体、含单拷贝的 pAO815 或 pPIC3.5k 及含多拷贝外源基因的毕赤酵母重组子的基因组 DNA。

定量 dot blot 溶液：需要下列溶液，每个反应 10-15ml, 3MM 纸, 50mM EDTA, 2.5% β -巯基乙醇 pH 9.0, 1mg/ml 藤黄节杆菌酶 100T, 0.1N NaOH, 1.5M NaCl, 2 \times SSC

定量 dot blot 程序：下列为 DNA 快速 dot blot 技术检测多拷贝插入。在滤纸上点等量的细胞对定量拷贝数很重要。另外可提取基因组 DNA，直接点在醋酸纤维膜或尼龙膜上，固定并分析。

1 在 30 度，在 96 孔板上用 200ul YPD 分别培养 Mut+及 Muts 转化子直至到相同浓度，

可能要传几代(p39)。另外可在培养管中培养单个转化子，加入培养基至 OD600 吸收值一致。

2 用多孔道移液器吸取 50ul 样品至安装于 dot blot 装置上的醋酸纤维膜或尼龙膜上，自然干燥膜。

3 裂解膜上细胞，用下列 4 种溶液进行处理：在托盘中放置两块 3MM 纸，用 10-15ml 50mM EDTA, 2.5% β - 巯基乙醇 pH 9.0 进行浸泡。确保纸浸泡一致，不要有气泡。将醋酸膜正面对着 3MM 纸，室温孵育 15min

4 将醋酸膜从 3MM 纸上取走，更换另两张 3MM 纸，用 10-15ml 1mg/ml 藤黄节杆菌酶 100T 浸泡，将醋酸膜正面对着 3MM 纸，37 度孵育 4 小时

5 将膜移走，再换两张 3MM 纸，用 10-15ml 0.1N NaOH, 1.5M NaCl 浸泡，将醋酸膜正面对着 3MM 纸，室温孵育 5min

6 将膜移走，再换两张 3MM 纸，用 10-15ml 2 \times SSC 浸泡，将醋酸膜正面对着 3MM 纸，室温孵育 5min,重复一次

7 在 80 度烘干醋酸纤维膜，或用 UV-crosslink 烘干尼龙膜。膜可用与目的基因互补的非放射性标记或 ^{32}P 标记的随机引物探针进行反应。多拷贝整合可通过与单拷贝对照相关的强烈杂交信号来进行确定。Dot blot 可通过膜或 blot 的密度计量，如用放射性标记的用 β -scanner 来确定拷贝数。

Southern blot:用正确的内切酶消化 DNA 非常重要，消化后凝胶分离基因组 DNA 可用于点膜。如果用 pPIC3.5K 或 pAO815 产生的多拷贝，那样方法可能不一样。消化含多拷贝目的基因的重组子 DNA，会产生一条因插入数目不同而密度不同的带。用单拷贝作对照看密度也非常重要，用密度计量定量条带的密度可预测基因的数量。

对照：用宿主菌(GS115, KM71)DNA，转化亲本载体菌 DNA(pPIC3.5K 或 pAO815)，转化含单拷贝基因载体的 DNA 作对照很重要。用 HIS4 基因探针作为单拷贝及基因的内在对照。注意，如果基因插入 his4 位点，可产生两拷贝 HIS4 基因，一个突变型，一个野生型。(见毕赤酵母重组及整合部分)

基本指导：

1 用分子克隆中 southern 标准溶液

2 分离基因组 DNA，用荧光计定量。确保去除 RNA。确定拷贝数时，点相同量 DNA 很重要。

3 要有 southern 探针，HIS4 基因探针及目的基因探针。注意：如果你的探针完全与野生型基因互补的话，宿主菌中 his4 基因的点突变并不影响杂交。

4 如用 pPIC3.5K 产生多拷贝，用 BglII 消化 DNA。注意：如用 pPIC3.5K，并不是所有多插入子都是以头-尾形式存在。有些可能是头-头、尾-尾形式。建议你们自己思考可能产生的产品。相反方向的表达盒会产生不同的带，Southern blot 时，当拷贝数>2 时，会产生 1 条或 2 条带(根据方向)，这都会增加密度。

5 如用 pAO815 产生多插入子，用 BglII 及 BamHI 消化基因组 DNA，释放多插入子，条带的分子量可帮助确定插入数。如果多插入子很大，可用 SacI 进行消化。这样可产生包含单个目的基因的片段。这样将会产生一条非常亮的带。根据它与单拷贝基因所产生的带的相对亮度，可判断插入数。

6 用 BallI 消化 GS115 基因组。转化 pPIC3.5K 或 pAO815 的 GS115 基因组，用 HIS4 互补探针进行反应时，可产生一条 2.8kb 的带(基因组中 HIS4 基因)及一条约 6.7kb(载体来源的 HIS4 基因)的带。

版权声明:

本站几乎所有资源均搜集于网络, 仅供学习参考, 不得进行任何商业用途, 否则产生的一切后果将由使用者本人承担! 本站仅提供一个观摩学习与交流的平台, 将不保证所提供资源的完整性, 也不对任何资源负法律责任。所有资源请在下载后 24 小时内删除。如果您觉得满意, 请购买正版, 以便更好支持您所喜欢的软件或书籍!



☆☆☆☆☆生物秀[\[http://www.bbioo.com\]](http://www.bbioo.com)

☆☆☆☆☆中国生物科学论坛[\[http://www.bbioo.com/bbs/\]](http://www.bbioo.com/bbs/)

☆☆☆☆☆生物秀下载频道[\[http://www.bbioo.com/Soft/\]](http://www.bbioo.com/Soft/)

生物秀——倾力打造最大最专业的生物资源下载平台!

■■■■ 选择生物秀, 我秀我精彩!! ■■■■

欢迎到生物秀论坛(中国生物科学论坛)的相关资源、软件版块参与讨论, 共享您的资源, 获取更多资源或帮助。