

毕赤酵母 GS115(甘油菌)

产品编号: MB15024-1

规格: 200μL

产品内容:

产品组成	MB15024-1
毕赤酵母 GS115(甘油菌)	200μL
说明书	1 份

产品简介:

毕赤酵母 GS115 甘油菌是取对数生长期的毕赤酵母 GS115 菌液, 加入等体积 30%(v/v)甘油制备而成。本甘油菌可以直接平板划线或少量、大量培养。

毕赤酵母具有真核细胞表达系统多方面的优势, 包括较好的蛋白翻译后剪切、蛋白折叠以及翻译后修饰等。与昆虫细胞表达系统和哺乳动物细胞表达系统相比, 毕赤酵母表达系统快速、高效且经济, 通常外源蛋白还具有较高的表达水平。与酿酒酵母相比, 毕赤酵母的外源蛋白表达水平往往高 10-100 倍, 并且能进行分泌蛋白的 N-连接糖苷键修饰。但表达分泌蛋白进行糖基化修饰时的糖链长度是有差别的, 毕赤酵母修饰的分泌蛋白的糖链长度通常是 8-14 个甘露糖残基, 而酿酒酵母修饰的分泌蛋白的糖链长度通常是 50-150 个甘露糖残基, 此外, 毕赤酵母很少对分泌蛋白进行 O-连接糖苷键的修饰。

毕赤酵母表达系统中高水平重组蛋白表达的宿主是甲基营养型(即甲醇利用正常型)毕赤酵母(Methylophilic yeast *Pichia Pastoris*)。在没有葡萄糖的情况下, 毕赤酵母使用甲醇作为碳源。AOX1 启动子控制乙醇氧化酶的表达, 是催化甲醇代谢的第一步。通常, 甲醇诱导的细胞中总可溶性蛋白质的 30%是乙醇氧化酶。一些毕赤酵母表达载体利用强大的 AOX1 启动子, 并使用甲醇诱导目的基因的高水平表达。如果更倾向于不依赖于甲醇诱导的表达, 可以使用 GAPDH 基因的启动子实现组成型表达。诱导型和组成型表达构建物均整合到毕赤酵母基因组中, 形成稳定的宿主, 产生极高的蛋白质表达水平。AOX1 基因突变丧失功能时, 乙醇氧化酶活性缺失, 产生 Methanol utilization slow (Mut^s)基因型, 也称 Methanol utilization minus (Mut⁻)基因型, 而 AOX1 基因表达正常则被称为 Methanol utilization plus (Mut⁺)基因型。毕赤酵母 GS115 为 Mut⁺基因型。

毕赤酵母 GS115 的组氨酸脱氢酶基因(Histidinol dehydrogenase, *his4*)发生突变, 阻止其合成组氨酸, 所以 GS115 属于组氨酸缺陷型菌株(His⁻); 如果表达载体上携带有组氨酸脱氢酶基因, 就可补偿宿主菌的组氨酸缺陷, 因此可以在不含组氨酸的培养基上筛选转化子, 适用于筛选带有 *his4* 基因的表达载体。

毕赤酵母 GS115 基因型: *Aox1*⁺, *his4*⁻, 即 Mut⁺, *his4*⁻, 即为 Methanol utilization plus and histidinol dehydrogenase mutation。

本甘油菌适宜的生长温度是 28-30℃, 温度超过 32℃不利于蛋白的表达, 并可能导致细胞死亡。

本甘油菌可以在复合培养基如 YPD 中生长, 或者在补充有组氨酸的基础培养基中生长。

操作方法:

(一) 实验前准备:

1. 将毕赤酵母 GS115 甘油菌保种管置于冰盒中, 全程需在超净工作台内实施无菌操作。
2. 准备不含抗生素的 YPD 固体培养基平板或 YPD 液体培养基, 使用前室温平衡 30 分钟。

(二) 菌种培养:

a. 划平板接种:

1. 接种环灭菌: 将接种环置于酒精灯外焰灼烧灭菌, 使接种环处于无菌状态, 冷却至室温后使用。
2. 初代划线: 接种环蘸取少量已解冻的菌液, 使接种环与 YPD 固体培养基呈 30-40° 夹角, 在不含抗生素的 YPD 平板上连续作 S 形或 Z 形轻轻划动, 进行不重叠来回划线, 首区覆盖面积约占整个平板的 1/5-1/6。
3. 继代划线: 每完成一个划线区后重新灼烧灭菌接种环, 冷却至室温, 与前次轨迹呈 90° 或 120° 夹角, 依次进行第二至第四象区的交替划线。



4. 培养条件：倒置平板于 30°C 恒温培养箱，培养 2-4 天。

b. 直接培养：

1. 使用 70%乙醇浸润镊子尖端，经酒精灯外焰灼烧灭菌，待冷却后夹取无菌塑料枪头或牙签，蘸取少量已解冻菌液，将带菌接种物转移至含 3mL YPD 液体培养基试管内或者 100mL 及以上体积 YPD 液体培养基的细菌培养瓶中。

2. 置于恒温振荡培养箱中 28-30°C，200rpm 振荡培养 12-16 小时。

保存条件：-20°C 保存，3 个月有效。 -80°C 可以长期保存。

运输条件：湿冰运输。

注意事项：

- 使用本甘油菌时可以不必要完全融解，在甘油菌表面蘸取少量涂板或进行液体培养即可。也可以完全融解后使用，但随着冻融次数的增加细菌的活力会逐渐下降。
- 为保证菌种纯正，避免其它细菌污染，尽量先划平板然后再挑单克隆菌落进行后续操作。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

S250401

