

毕赤酵母重组蛋白试剂盒

产品规格：

Component	PT1230	Store
毕赤酵母富集培养基-A	150g	RT
毕赤酵母富集培养基-B	200 ml	4°C
毕赤酵母筛选培养基	500ml	RT
毕赤酵母高拷贝筛选培养基	500ml	RT
毕赤酵母诱导培养基	10×0.5L	RT
线性化载体回收浓缩试剂盒	50T	RT
毕赤酵母蛋白提取试剂盒	50T	RT/4°C
毕赤酵母基因组提取试剂盒	50T	RT/-20°C
G418 溶液 (100mg/ml)	1ml	-20°C
pPIC3.5K 载体	10ul 质粒	-20°C
pPIC9K 载体	10ul 质粒	-20°C
pPIC3.5K-positive control 载体	10ul 质粒	-20°C
pPIC9K-positive control 载体	10ul 质粒	-20°C
GS115 感受态	100ul×10 支	-80°C
说明书	1 份	/

产品说明：

本试剂盒用于毕赤酵母重组蛋白，包含了重组外源蛋白全部试剂、菌株和载体。

培养基的配制

毕赤酵母筛选培养基：100ml

称 4.8g 毕赤酵母筛选培养基，加水定容至 100ml，121°C 灭菌 15min，冷却至 50°C 倒板。

毕赤酵母高拷贝筛选培养基：100ml

称 7.0g 毕赤酵母高拷贝筛选培养基，加水定容至 100ml，121°C 灭菌 15min，冷却至 50°C，加相应比例的 G418 溶液，并倒板。

注：G418 筛选浓度建议选择 500ng/ml、750ng/ml、1000ng/ml、1250ng/ml、1500ng/ml。

G418 筛选浓度越高，获得的克隆子拷贝数越高。

毕赤酵母富集培养基(A+B)：100ml

称 3.0g 毕赤酵母富集培养基-A，于 80ml 水溶解后，加入 4ml 毕赤酵母富集培养基-B，并加水定容 100ml，121°C 灭菌 15min。

毕赤酵母诱导培养基：100ml (甲醇自备)

称量 5.82g 毕赤酵母诱导培养基，加水定容 99ml，121°C 灭菌 15min；待培养基完全冷却至室温后，使用前补加 1ml 甲醇，并混匀。

实验流程:

实验前请提前合成相关引物。

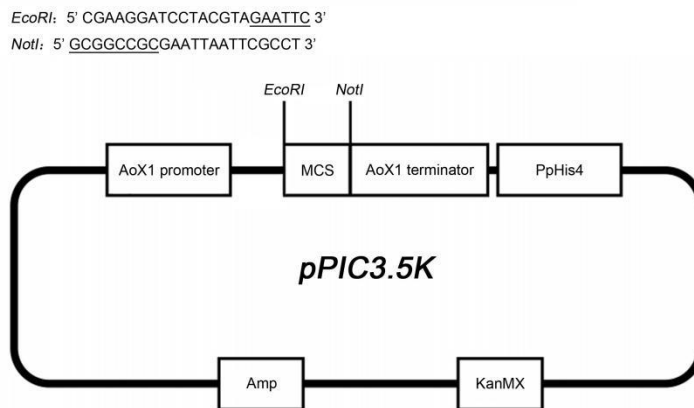
一、载体构建

1. 将待表达基因的 CDS 区构建到 pPIC3.5K 和 pPIC9K 载体的 EcoRI & NotI 之间，即为实验组 pPIC3.5K-gene、pPIC9K-gene

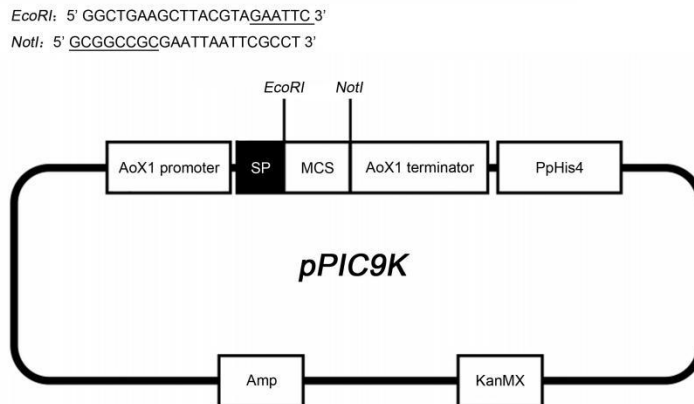
注：为方便后期蛋白纯化，建议去掉 gene 的终止密码子，并在 C 端添加 6×his 标签；

6×his 序列：CATCACCACCATCATCACTGA。

2. pPIC3.5K 载体信息如下：



pPIC9K 载体信息如下：



3. pPIC3.5k 和 pPIC9k 载体构建时，阳性克隆检测通用引物

5'primer: GACTGGTTCCAATTGACAAGC

3'primer: GGCAAATGGCATTCTGACAT

二、载体线性化及回收（线性化载体回收浓缩试剂盒）

1. 取 4 支无菌 200ul PCR 管，分别加入 10-15ug 的 pPIC3.5k-positive control、pPIC9K-positive control、pPIC3.5k-gene、pPIC9K-gene 质粒，选择 Sall / SacI / BglII 中的一个以 100ul 体系进行单酶切；

注：如果 gene 中含有相关酶切位点则不能选用该酶线性化。

2. 将酶切后的产物用移液枪吸至 1.5ml EP 管中，加入 300ul Buffer CP，混匀；

3. 将混匀液用移液枪吸至吸附柱中，套上回收管，11,000rpm，离心 1min；
4. 重复步骤 3 一次；
5. 倒扔回收管中穿透液，加入 200 μ l DNA Wash Buffer，11,000rpm，离心 1min；
6. 倒扔回收管中穿透液，再加入 200 μ l DNA Wash Buffer，11,000rpm，离心 1min；
7. 倒扔回收管中穿透液，11,000rpm，离心 2min；
8. 将吸附柱取出置于 1.5ml EP 管中，室温静置 10min；
9. 加入 10~15 μ l 经过 65 $^{\circ}$ C 水浴的 ddH₂O，11,000rpm，离心 2min。

三、线性化载体转化毕赤酵母 GS115 感受态

1. 将毕赤酵母促转化剂沸水煮 5min，迅速放置冰上，
2. 取 4 支无菌 1.5ml EP 管，各加 5 μ l 毕赤酵母促转化剂，1~4 管分别加入 1-5 μ g 线性化后的 pPIC3.5k-positive control、pPIC9K-positive control、pPIC3.5k-gene、pPIC9K-gene（体积不高于 15 μ l）；
3. 于每个 EP 管中分别加入 100 μ l GS115 感受态及毕赤酵母转化液 500 μ l，轻轻翻转混匀 6-8 次；
4. 30 $^{\circ}$ C 水浴 30min，每 10min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
5. 每支加入 20 μ l 的二甲基亚砜；
6. 42 $^{\circ}$ C 水浴 15min，每 7.5min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
7. 5000rpm 离心 5min 弃上清，每支加 1ml 的 YPG Plus（或 YPG）于 30 $^{\circ}$ C 复苏 1h；
8. 5000rpm 离心 5min 弃上清，每支用 100 μ l 0.9%NaCl 重悬；
9. 涂布毕赤酵母筛选培养基平板，30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3~7d；
10. 挑取长出的克隆于 20 μ l 的 0.9%NaCl 中，混合均匀后，取 2.5 μ l 分别点斑至不同浓度 G418 的毕赤酵母高拷贝筛选培养基平板上，30 $^{\circ}$ C 倒置培养 3-7d。（可于平板上画 1 \times 1cm 的小格，方便点斑和标记）

注：G418 筛选浓度建议选择 500ng/ml、750ng/ml、1000ng/ml、1250ng/ml、1500ng/ml。

G418 筛选浓度越高，获得的克隆子拷贝数越高。

四、毕赤酵母阳性转化子鉴定

1. 吸取 5 μ l 酵母快速裂解液加入 PCR 管中；
2. 用 10 μ l 枪头刮取适品酵母菌落(直径 1-2 mm)于裂解液中；
3. 吹打或者震荡混匀后室温静置 5 min，即为裂解产物；

注：鉴定大于 2000 bp 的基因片段时，建议将裂解产物再于 -20 $^{\circ}$ C 冷冻 10 min 或 -80 $^{\circ}$ C 速冻 1 min，可有效提高 PCR 产率。

4. 向裂解产物中加入 18 μ l ddH₂O、1 μ l P1(特异性引物 F)、1 μ l P1(特异性引物 R)、25 μ l 2 \times Yeast direct PCR Mix，按照以下反应条件 PCR 扩增。

反应温度	反应时间	循环
95 $^{\circ}$ C	5min	1
95 $^{\circ}$ C	45s	30
56 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	1kb/min	
72 $^{\circ}$ C	5min	1

五、毕赤酵母小量表达检测

1. 挑取不同的阳性转化子、以及阳性对照单菌落分别于 3ml 毕赤酵母富集培养基 (A+B) 的试管中, 30°C, 220rpm, 培养 24h 左右, OD600 值 2~6;
2. 将菌液移入 5ml EP 管中, 6000rpm, 5min, 4°C 离心, 去上清;
3. 用 1ml 无菌 ddH₂O 重悬菌体, 6000rpm, 5min, 4°C 离心, 去上清;
4. 从大试管中吸取 1ml 毕赤酵母诱导培养基重悬菌体, 并将重悬后的菌液全部转移至该大试管中 (提前灭好含有 3ml 毕赤酵母诱导培养基的大试管), 加入 30ul 甲醇, 30°C, 220rpm, 培养;
5. 每 24h 向培养体系的大试管中加入 15ul 甲醇;
6. 重复步骤 5 两次;
7. 小量表达鉴定:

A. pPIC9K-positive control 和 pPIC9K-gene 的酵母诱导菌液:

直接取 100μl 培养物 12000rpm 离心 5min 后, 取 80μl 上清于 1.5ml 离心管中, 加入 20μl 5×Loading Buffer, 沸水浴 10min, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白分泌表达情况。

B. pPIC3.5K-positive control 和 pPIC3.5K-gene 的酵母诱导菌液:

直接将全部培养物 12000rpm 离心 5min, 将全部沉淀保留 2ml 离心管中, 加入 50-80mg 玻璃珠, 立刻用塑料研磨棒反复向下按压扭转研磨 1-2min, 再加入 150ul 酵母蛋白提取裂解液, 继续研磨 30s-1min。12000rpm 离心 5min 后, 取 80μl 上清于 1.5mL 离心管中, 加入 20μl 5×Loading Buffer, 沸水浴 10min, 利用 SDS-PAGE 和 Western blot 检测蛋白分泌表达情况。

注意: 塑料研磨棒可以重复使用, 用 70% 的酒精彻底冲洗干净, 用纸巾擦干即可。

小量表达除了阳性对照, 还应添加阴性对照, 可选择阳性转化子不诱导作为阴性对照。

六、毕赤酵母放大培养

1. 挑取小量表达较好的单菌落于 3ml 毕赤酵母富集培养基 (A+B) 的试管中, 30°C, 220rpm, 培养 24h;
2. 将菌液移至含有 400ml 毕赤酵母富集培养基 (A+B) 的 2000ml 三角烧瓶中, 30°C, 220rpm, 培养 24h, OD600 值 2~6;
3. 将菌液移至 500ml 离心瓶管中, 6000rpm, 4°C, 离心 5min, 去上清;
4. 用 100ml 无菌 ddH₂O 重悬菌体, 6000rpm, 4°C, 离心 5min, 去上清;
5. 用 200ml 毕赤酵母诱导培养基重悬菌体, 并将菌液转移至 1000ml 的三角烧瓶中, 加入 2ml 甲醇, 30°C, 220rpm, 培养;
6. 每 24h 向培养体系中加入 2ml 甲醇;
7. 重复步骤 6 两次;
8. 根据使用的表达载体选择保留上清或沉淀, 并根据实际情况完成后续蛋白纯化。

注意: 使用 pPIC9K 载体表达选择保留上清, 使用 pPIC3.5K 载体表达选择保留沉淀。

注意事项:

所有实验步骤均需要在无菌条件下进行!