



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology  
 订货热线: 400-1683301或800-8283301  
 订货e-mail: order@beyotime.com  
 技术咨询: info@beyotime.com  
 网址: http://www.beyotime.com

## 毕赤酵母KM71甘油菌

产品编号	产品名称	包装
D0413	毕赤酵母KM71甘油菌	200μl

### 产品简介:

- 碧云天生产的毕赤酵母KM71甘油菌(*Pichia Pastoris* KM71 Yeast Glycerol Stock) 是取对数生长期的毕赤酵母KM71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小量、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[1]。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(*Saccharomyces cerevisiae*)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(Mannose residue), 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[2]。
- 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(Methylotrophic 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。乙醇氧化酶(Alcohol oxidase, 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[3]。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(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)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<sup>s</sup>)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<sup>+</sup>)基因型[4]。毕赤酵母KM71为Mut<sup>s</sup>基因型。
- 毕赤酵母KM71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KM71属于组氨酸缺陷型菌株(His<sup>-</sup>); 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KM71基因型: arg4 his4 aox1::ARG4, 表型: Mut<sup>s</sup>, Arg<sup>+</sup>。
- 本甘油菌适宜的生长温度是28-30°C, 温度超过32°C不利于蛋白的表达, 并可能导致细胞的死亡。
- 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。
- 关于碧云天不同甘油菌菌种的比较和选择, 可参考碧云天的相关网页: <http://www.beyotime.com/support/strain.htm>

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0413	毕赤酵母KM71甘油菌	200μl
—	说明书	1份

### 保存条件:

-80°C保存, 至少2年有效。须注意避免反复冻融。

### 注意事项:

- 使用本甘油菌时不必完全融解, 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酵母菌的活力会逐渐下降。在没有结冻的情况下, 菌体会逐渐沉淀至管底, 请务必注意适当混匀后使用。
- 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。

### 使用说明:

#### 1. 划平板接种:

取出甘油菌置于冰上, 并置于超净台内, 后续操作都在超净台内操作。

- 用镊子和塑料枪头操作:** 镊子的顶端在70%酒精中蘸一下, 并且在酒精灯上略略烧一下, 使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的200μl塑料枪头, 蘸取少量甘油菌, 然后把蘸有菌液的塑料枪头, 以尽量和YPD平板接近平行的角度, 连续作S形或Z形划动, 再用一个无菌的200μl塑料枪头, 在原先的划线上以90°或120°角, 再在YPD平板上连续作S形或Z形划动。通常

换枪头重复操作2-3次即可。30℃倒置培养2-4天。

**b. 用接种环操作：**将接种环在酒精灯上略略烧一下，使接种环处于无菌状态。微冷后，蘸取少量甘油菌，在YPD平板上连续作S形或Z形划动。把接种环再烧一下，微冷后，在原先的划线上以90°或120°角，再在YPD平板上连续作S形或Z形划动。通常用接种环重复操作2-3次即可。30℃倒置培养2-4天。

## 2. 直接培养：

取出甘油菌置于冰上，并置于超净台内，后续操作都在超净台内操作。把镊子的顶端在70%酒精中蘸一下，并且在酒精灯上略略烧一下，使镊子的顶端处于无菌状态。用镊子夹取一个无菌的塑料枪头或牙签，蘸取甘油菌，然后把蘸有菌液的塑料枪头或牙签放到装有3ml YPD培养基内或装有100ml或更大体积YPD培养基内。28-30℃摇床过夜培养。

## 参考文献：

1. LiuY, SuC, Hu YH, Ouyang KQ, Cai SX. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2005. 21(3):430-4.
2. Grinna LS, Tschopp JF. Yeast. 1989. 5(2):107-15.
3. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Cold Spring Harb Protoc. 2021. 2021(1).
4. Orman MA, Calik P, Ozdamar TH. Biotechnol Appl Biochem. 2009. 52(Pt 3):245-55.

## 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D0412	毕赤酵母GS115甘油菌	200μl
D0413	毕赤酵母KM71甘油菌	200μl
D0414	毕赤酵母X-33甘油菌	200μl
D2881-1μg	pAOX1-MCS-His-Zeocin	1μg
D2881-100μg	pAOX1-MCS-His-Zeocin	100μg
D2882-1μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Zeocin	1μg
D2882-100μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Zeocin	100μg
D2883-1μg	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	1μg
D2883-100μg	pAOX1-MCS-His-Amp&Zeo	100μg
D2884-1μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Amp&Zeo	1μg
D2884-100μg	pAOX1-α factor-MCS-His-Amp&Zeo	100μg

Version 2022.08.22