

毕赤酵母电转化方法及转化子的筛选

菌体的准备:

1. 挑取酵母单菌落，接种至含有 5ml YPD 培养基的 50ml 三角瓶中，30℃、250-300r/min 培养过夜；
2. 取 100-500 μ l ($\leq 1:100$) 的培养物接种至含有 50ml 新鲜培养基的 200mL 三角摇瓶中，28~30℃、250-300r/min 培养过夜 (约 20h)，至 OD600 达到 1.3~1.5；
3. 将细胞培养物于 4℃，1500g 离心 5min，用 50ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬；
4. 按步骤 3 离心，用 25ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬
5. 按步骤 3 离心，用 2-5ml，1M 的冰预冷山梨醇溶液将菌体沉淀重悬；
6. 按步骤 3 离心，用 160 μ l 的冰预冷的 1mol 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬，其终体积约为 240 μ l；

备注：可将其分装为 80 μ l 一份的包装-70 冷冻起来，2 周之内使用，但会影响其转化效率。比如常见的 pPIC9K 的载体转 GS115 一般先用 MD 平板初筛，然后长出的克隆子可以挑到不同浓度的含 G418 抗性的 YPD 平板上筛选高拷贝。对正确筛选出的单菌落接 YPD 小瓶摇活后，转大瓶 BMGY 摇瓶发酵。一般对于甲醇诱导菌株，摇瓶一天左右后开始补加甲醇，就类似 BMMY 的功能了。

- ✓ KM71 比 GS115 生长的要慢。毕赤酵母都应该是白色菌落的
- ✓ 对于 LOX 家族蛋白的表达，可尝试在酵母培养基中加入 Cu²⁺ 离子，提高表达量和蛋白活性？

菌种保存:

挑单克隆到 YPD 中培养 18-24h，然后取菌液以 1:1 加入 30%灭菌甘油，-80℃ μ l/管冻存

(一般用 10 μ g 以上质粒用 SalI 酶切，然后直接加乙醇沉淀，70%乙醇洗一遍，约 20 μ l ddH₂O 重溶。转化效率一般大于 100 个克隆每 μ gDNA。建议你不要用胶回收 kit，回收的 DNA 可能还有盐，导致电击时放电时间很短。

乙醇沉淀主要步骤如下:

- 1) 酶切体系 (80 μ l) 中 2 倍体积的无水乙醇加 1/10 体积的 PH5.2 NaAC，混匀
- 2)-20℃ 20 分钟沉淀
- 3)13200rpm, 20min, 离心后弃上清
- 4)75%乙醇 300 μ l 轻轻洗，同上离心 5min，弃上清
- 5)37 度烘箱至无乙醇气味 (或是用摇床的出风口吹出的暖风吹)。
- 6)20 μ l ddH₂O 重溶)

电击转化:

8. 将 5~20 μ g 的线性化 DNA 溶解在 5~10 μ l TE 溶液中，与 80 μ l 的上述步骤 6 所得的菌体混匀，转至 0.2cm 冰预冷的电转化杯中；
9. 将电转化杯冰浴 5min；
10. 根据电转化仪提供的资料，参考其他文献及多次摸索，确定合适的电压、电流、电容等参数，按优化的参数，进行电击；
11. 电击完毕后，马上加入 1ml 1M 的冰预冷的山梨醇溶液将菌体混匀，转至 1.5ml 的 EP 管中；(置于 30 度摇床低速培养 1h，再涂板)
12. 将菌体悬液涂布于 MD 平板上，每 200~600 μ l 涂布一块平板；
13. 将平板置于 30℃ 倒置培养，直至单个菌落出现 (3-4 天)。

推荐：电压 1.5kV；电容 25 μ F；电阻 200 Ω 。电击时间为 4 ~10msec。

Pichia 酵母表达直接 PCR 鉴定重组子的方法

1. 平板上的菌落长到肉眼可见时（约 12 小时）；
2. 取 1ml 酵母悬液 4000rpm 离心，pbs 重悬，煮沸 5mins，放到冰上 5mins，直接就可以用做 pcr 的模板了
3. 将除了模板之外的其它 PCR 反应液的组分准备好，并分装。
3. 用灭菌的牙签挑取菌落，在 PCR 管中涮一下， PCR 扩增，利用 5'AOX 1 和 3'AOX 1 引物对转化子进行 PCR 复筛,同时检测基因插入(如果重组质粒以单交换的方式整合到 Pichia pastoris 基因组，则会扩增到两条带，一条为 2.2kb（KM71 为 3.6kb）宿主菌 AOX1 基因，另一条为包括目的基因和成熟肽序列和 a-factor 信号肽序列的片段。)
Each 50 μ l aliquot of competent Pichia cells with 3 μ g linearized plasmid DNA will yield 50 colonies on selective medium.

Muts 表型重组酵母的诱导表达实验

As a general rule when inducing expression, never allow cultures to be more than **10-30%** of your total flask volume.

1. 挑选一单菌落，置于装有 50ml MGY、BMG 或 BMGY 培养基的 500ml 摇瓶中，于 28-30°C /250-300 rpm 培养至 OD600 = 2-6 (~16-18 h)；
2. 室温下 1500~3000g 离心 5min，收集菌体，用 1/5 到 1/10 原培养体积的 MM, BMM 或 BMMY 重悬菌体（约 2.5~5ml）；
3. 将步骤 2 所得的菌液置于 100ml 的摇瓶中，用双层纱布或粗棉布封口，放置于 28-30 °C/250-300 rpm 的摇床上继续生长；
4. 每 24h 向培养基中添加 100 % 甲醇至终浓度为 0.5 ~1.0%；
5. 按时间点分别取菌液样品，取样量为 1ml，置于 1.5ml EP 管中，最大转速离心 2~3min，分别收集上清和菌体，分析目的蛋白的表达量和菌液最佳收获时间。时间点一般取：0、24、48、72、96 和 120h；
6. 对分泌表达，分离样品的上清液；对胞内表达，分离样品的菌体沉淀，带检测样品用液氮或干冰速冻后，于 -80 °C 保存备用；
7. 可以用 SDS-PAGE、Western-Blot 及活性实验检测与鉴定重组蛋白的表达。

Mut+表型重组酵母的诱导表达实验

1. 挑选一单菌落，置于装有 25ml MGY、BMG 或 BMGY 培养基的 250ml 摇瓶中，于 28-30°C /250-300 rpm 培养至 OD600 = 2-6 (~16-18 h)；
2. 室温下 1500~3000g 离心 5min，收集菌体，用 MM、BMM 或 BMMY 重悬菌体，使 OD600 =1.0 左右（约 100~200ml）；
3. 将步骤 2 所得的菌液置于 1L 的摇瓶中，用双层纱布或粗棉布封口，放置于 28-30 °C/250-300 rpm 的摇床上继续生长；
4. 每 24h 向培养基中添加 100% 甲醇至终浓度为 0.5~1.0%；
5. 按时间点分别取菌液样品，取样量为 1ml，置于 1.5ml EP 管中，最大转速离心 2~3min，分别收集上清和菌体，分析目的蛋白的表达量和菌液最佳收获时间。时间点一般取：0、6、12、24、36、48、60、72、84 和 96h；
6. 对分泌表达，分离样品的上清液；对胞内表达，分离样品的菌体沉淀，带检测样品用液氮或干冰速冻后，于 -80 °C 保存备用；
7. 可以用 SDS-PAGE、Western-Blot 及活性实验检测与鉴定重组蛋白的表达。

BMGY 和 BMMY 的换液方式有 2 种:

- 1) 一种是离心换液, 即在生长培养结束后, 转移到灭菌大离心管中, 4000rpm 室温离心 5 分钟后, 用 BMMY 洗下菌体, 再转移到摇瓶, 整个过程均用灭菌移液管操作。
 - 2) 另一种是静止换液, 即在生长培养结束后, 将摇瓶在无菌室静止 4 小时后, 直接在酒精灯旁倾倒培养液, 再加入诱导培养基, 此种方法的缺点有少量生长培养基残留。
- 是离心换液或者静止换液, 到底那个好, 只有根据自己的实验结果来考量。如果只是从防治污染的角度来说, 静止换液也好一些, 因为操作毕竟少一些, 速度也快。

用新开启的分析纯甲醇, 一直放在无菌室里面, 每次直接用灭菌 TIP 吸取加入摇瓶就可以了。也有人试过用膜过滤, 结果膜都溶解了。

菌体是在 BMMY 中培养的, 可以不用 BMMY 做对照, 在 600nm 处测 OD 值, 培养基和 PBS 光吸收都很低, PBS 更方便。

麦芽浸提液培养酵母 (不换液, 补料), 生长阶段结束后, 密度可达到 10-12, 诱导培养结束后, 密度可达到 18 左右。

如果用 1 体积的 BMGY, 在生长阶段结束后, 换液时, 加入 1/10-1/2 体积的 BMMY 进行诱导培养 (即浓缩培养), 细胞密度也可达到 20 以上。

通常, 真正的高密度发酵只有在发酵罐里才能实现, OD600 可达到 40-60 及以上。摇瓶很难达到那样的密度, 不过可以采取浓缩培养的方式实现高密度。

摇瓶不能像发酵罐那样保证通气量, 但可以通过装量来暂时替代这个指标。

Mut⁺/Mut^s 的筛选

用 *Sac I*, *Sal I* or *Stu I* 线性化插入 *HIS4* 位点的载体转化 GS155 后, 多数转化子应为 Mut⁺, 但也有 His⁺Mut^s 的转化子存在 (见 Invitrogen protocol p36), *Not I* or *Bgl II* 线性化插入 *AOX I* 位点的载体转化 GS155 后, 用 MD/MM 平板可区分 Mut⁺/Mut^s。

Use the plates containing the His⁺ transformants and screen for the Mut⁺ and Mut^S phenotype as described below.

1. Using a sterile toothpick, pick one colony and streak or patch one His⁺ transformant in a regular pattern on both an MM plate and an MD plate, making sure to patch the MM plate first.
2. Use a new toothpick for each transformant and continue until 100 transformants have been patched (2-3 plates).
3. To differentiate Mut⁺ from Mut^S, make one patch for each of the controls (GS115/His⁺ Mut^S Albumin and GS115/His⁺ Mut⁺ β-gal) onto the MD and MM plates.
4. Incubate the plates at 30°C for 2 days.
5. After 2 days or longer at 30°C, score the plates. Mut⁺ transformants will grow well on both MD and MM plates. Mut^S transformants will grow well on MD plates, but show little or no growth on the MM plates.

We recommend purifying your His⁺ transformants to ensure isolation of a pure clonal isolates. You may do this before or after testing for the Mut phenotype.

Replica-Plating Procedure

This procedure gives a lower rate of misclassifications, but it increases the overall Mut⁺/MutS screening procedure by 2 days. You will need equipment to replica-plate.

1. Using sterile toothpicks, patch 100 His⁺ transformant on MD plates (2-3 plates). For controls, make one patch from each of the strains GS115/His⁺ MutS Albumin and GS115/His⁺ Mut⁺β⁻gal onto the MD plates.
2. Incubate the plates at 28-30°C for 2 days.
3. After 2 days, replica-plate the patches from the MD plates onto fresh MM and MD plates to screen for MutS transformants.
4. Incubate the replica plates at 28-30°C for 2 days.
5. After 2 days at 28-30°C, score the replica plates. Look for patches that grow normally on the MD replica plates but show little or no growth on the MM replica plates. Including His⁺ Mut⁺ and His⁺ MutS control patches on each plate will provide examples of Mut⁺ and MutS phenotypes.

Screening by Functional Assay

Some researchers have used a functional assay to directly screen for high expressing Pichia recombinant clones without first screening for MutS or Mut⁺ phenotypes. If you elect to screen directly for high-expressing recombinants, be sure to also check the Mut phenotype. This will help you optimize expression of your recombinant clone.

毕赤酵母基因组提取方法

- (1) 接种重组和空质粒转化子于 5ml YPD+k 抗生素培养基，GS115 菌于 YPD 培养基作对照，30°C，培养 16~18 小时。
- (2) 室温下，1500 g 离心 5-10min 收集菌体
- (3) 100 ul TE (pH 7.0) 重悬，加入 300 ul EDTA (pH 8.0)，0.07M Tris-HCl，3 ul β-巯基乙醇，1ul Lyticase，37°C 水浴 30 min。
- (4) 10000g 离心 5~10min，取沉淀，加 90ul TE 重悬。
- (5) 200ul 饱和酚，200ul 氯仿，混匀，离心 30s，取上层水相。
- (6) 加入两倍体积无水乙醇以及 1/10 体积的 NaAC，-20°C 放置 30min；
- (7) 10000g 离心 20min，弃上清；75%乙醇漂洗沉淀一次；
- (8) 干燥后，加入 15 μl 的 TE 或 H₂O 溶解，-20°C 备用。

重组菌株传代次数太多，确实可能存在菌株退化的现象。所以一定要保存好最原始的重组菌株，每次从中划板，挑单克隆表达，尽量减少菌株传代次数。不行的话再用相同的方法重新转化筛选高表达菌株。

Pichia 菌落 PCR 破壁方法 (史飞):

30 ul 培养液，0.2% SDS

Vortex 15 sec

离心 1min

取上清，稀释 5-10 倍

用于 PCR 模板

GS115 的鉴定方法

接种 GS115 于 5ml YPD 液体培养基，30℃，200rpm 振荡过夜，涂布 YPD 平板，30℃培养 48 小时，用 YNB 基本培养基和含 His 的补充培养基作点种分离纯化，挑选在补充培养基上生长而在基本培养基上不生长的单菌落划 YPD 平板，4℃保存。GS115 的 his4 基因突变了，不能在组氨酸缺陷型培养基上生长，一般的 YPD 培养基营养丰富，什么都有了，而 YNB 却只含基本氮源，GS115 应该在上面不长，就是从 YPD 上挑菌落，在 YNB 和补充了 HIS 的平板上对应的点一下，在 HIS 上长而 YNB 上不长的是 GS115，这样能挑到纯的，以防突变

毕赤酵母表达常用溶液及缓冲液的配制

10*YNB（含有硫酸铵、无氨基酸的 13.4%酵母基础氮源培养基） 4℃保存。

34g 酵母基础氮源培养基（无硫酸铵）+100g 硫酸铵，溶于 1000ml 水中，过滤除菌，或 134g YNB 固体溶于 1L 蒸馏水，过滤除菌 or 115℃ 15-20 min 灭菌。

注意毕赤酵母在高浓度 YNB 下生长更好，所用 YNB 的量是酿酒酵母中的两倍。

500*B（0.02%生物素 Biotin） 20mg 的生物素溶于 100ml 水中，水浴加热溶解，温度不能高于 50 度。过滤除菌。 4℃保存 保存期为 1 年。

D-生物素是具有生物活性的生物素，也就是 vitamin H。在毕赤酵母代谢过程中，作为多种酶的辅基起作用。天然培养基中一般可以不单独添加，因为 YNB 中、酵母粉、蛋白胨中均含有一定量的生物素，但是做高密度发酵还是必须要添加的。MD、MM 属于基础培养基，没有哪种成分会含有微量生长因子（如生物素），所以肯定要加的。

100*H（0.4%Histidine 组氨酸） 4℃保存 保存期为 1 年。400mg 的 L-组氨酸溶于 100ml 水中，（加热至 50℃以促进溶解），过滤除菌。

10*D（20%Dextrose 葡萄糖）保存期为 1 年。200g 葡萄糖溶于 1000ml 水中，115℃灭菌 15-20min 或过滤除菌。

10*M（5%Methanol 甲醇）保存期为 2 个月。将 5ml 的甲醇与 95ml 水混匀，过滤除菌。

10*GY（10%Glycerol 甘油）保存期为 1 年以上。将 100ml 甘油和 900ml 水混匀后，高压灭菌或过滤除菌。

100*AA（0.5% of each Amino Acid，各种氨基酸）4℃保存 保存期为 1 年。分别将 500mg 的 L- 谷氨酸、L-蛋氨酸、L-赖氨酸、L-亮氨酸和 L- 异亮氨酸溶于 100ml 水中，过滤除菌。

1M 磷酸钾溶液（potassium phosphate buffer, pH6.0），将 1mol/L 的 K_2HPO_4 溶液 132ml 与 1mol/L 的 KH_2PO_4 溶液 868ml 混匀，其 pH 为 6.0，如需调节 pH，则使用磷酸和氢氧化钾调节 pH。

1M 山梨醇

毕赤酵母表达的培养基配制

2.1 LB（Luria-Bertani）培养基：

Trypton 1%
Yeast Extract 0.5 %
NaCl 1 %

PH 7.0 制作平板时加入 2%琼脂粉。121℃高压灭菌 20min。可于室温保存。

2.2 LLB (Low Salt LB) 培养基:

Trypton 1 %
Yeast Extract 0.5 %
NaCl 0.5 %

PH 7.0 制作平板时加入 2%琼脂粉。121℃高压灭菌 20min。可于室温保存数月。

2.3 YPD 完全培养基 (又称 YEPD) (Yeast Extract Peptone Dextrose Medium, 酵母浸出粉/ 胰蛋白胨/ 右旋葡萄糖培养基)

Yeast extract 1% 10g/L
Trypton 2% 20g/L
dextrose (D glucose) 2% 20g/L
+agar 2% 20g/L

液体 YPD 培养基可常温保存; 琼脂 YPD 平板在 4℃可保存几个月。

YPD 或 YEPD: Yeast Extract Peptone Dextrose Medium(1L), 又叫酵母浸出粉葡萄糖培养基, 加入琼脂的又叫酵母膏葡萄糖(YPD)琼脂培养基.

YPD 培养基配制方法:

- 1.溶解 10gYeast Extract(酵母膏), 20gPeptone(蛋白胨)于 900ml 水中, 如制平板加 20g 琼脂粉
- 2.高压 121 度 20min
- 3.加入 100ml 20% (10X, 共 20g) 的 Dextrose (glucose)(葡萄糖), (葡萄糖溶液灭菌后加入)

注: 葡萄糖, yeast extract ,peptone 溶液混合后在高温下可能会发生化学反应, 导致培养基成分变化, 所以要分别灭菌后再混合。葡萄糖可以过滤除菌, 也可以 115℃15-20min 灭菌。YPD 培养基用途: 用于酵母菌的培养, 及供药品和生物制品含王浆和蜂蜜的合剂酵母菌数测定。YPEG: 除了用 3%乙醇和 3%甘油代替葡萄糖作为碳源外, 其他成分同 YPD;YPDZ 是在 YPD 的基础上加上 ZEOCIN 抗生素;YPDA 是在 YPD 的基础上加 0.003%的腺嘌呤硫酸盐。

2.4 MD 与 MDH 选择培养基

Minimal Dextrose Medium + (Histidine) 最小葡萄糖培养基 + (0.004 %组氨酸) (含有: 1.34%YNB; 4X10⁻⁵% 生物素; 2%葡萄糖)

1. 灭菌 800ml 的 ddwater, 冷却到 60℃左右, 加入
2ml 的 500*B,
100ml 的 10*YNB
100ml 的 10*D 母液, 4 °C 保存
2. 如配制 MDH , 可在上述的 MD 中加入 10ml 的 100*H 即可, 4 °C 保存;
3. 如配制平板, 可无菌水的灭菌前, 加入 15g 的琼脂。4 °C 可保存数月。

2.5 MM 和 MMH 培养基

Minimal Methanol Medium + (Histidine) (含有: 1.34%YNB; 4X10⁻⁵% 生物素; 0.5%甲醇)

1. 灭菌 800ml 的 ddwater, 冷却到 60℃左右, 加入

2ml 的 500*B,
100ml 的 10*YNB
100ml 的 10*M, 4 °C 保存

2. 如配制 MMH , 可在上述的 MM 中加入 10ml 的 100*H 即可, 4 °C 保存;
 3. 如配制平板, 可无菌水的灭菌前, 加入 15g 的琼脂。4 °C 可保存数月。
- MM or MD 是筛选 mutS 和 mut⁺表型的。

2.6 BMG 和 BMM 培养基

Buffered Minimal Glycerol, Buffered Minimal Methanol (含有 100mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34%YNB; 4X10⁻⁵% 生物素 1% glycerol or 0.5% methanol)

1. 灭菌 700ml 的 ddwater, 冷却到室温, 加入
2ml 的 500*B,
100ml 的 10*YNB
100 ml 的 1M potassium phosphate buffer
100ml 的 10*GY, 4 °C 保存
2. 如配制 MMH , 可在上述的 BMG 中用 100ml 的 10*M 取代 100ml 的 10*GY 即可, 4 °C 保存, 可保存 2 个月。

2.7 BMGY 和 BMMY

Buffered Glycerol complex Medium, Buffered Methanol complex Medium (含有 1% yeast extract, 2% peptone, 100mM potassium phosphate pH 6.0, 1.34%YNB; 4X10⁻⁵% 生物素 1% glycerol or 0.5% methanol)

1. 溶解 10g 的 yeast extract (1%), 20g peptone (2%) 在 700ml 的 ddwater, 灭菌
2. 冷却到室温, 加入
2ml 的 500*B,
100ml 的 10*YNB
100 ml 的 1M potassium phosphate buffer
100ml 的 10*GY, 4 °C 保存
3. 如配制 BMMY , 可在上述的 BMGY 中用 100ml 的 10*M 取代 100ml 的 10*GY 即可, 4 °C 保存, 可保存 2 个月。

YPD: 最基本的培养用; BMGY: 诱导表达前培养用; BMMY: 诱导表达用; MD: 电转化后筛选 his⁺用。

YEPD 是不能代替 BMGY 的, 因为有葡萄糖, 这样残留的葡萄糖会影响下一步的诱导表达。不过有一种方法是可行的, 就是用 YPG 培养基代替, 只是把 YEPD 中的葡萄糖用 3%的甘油代替, 也可以降低成本。摇瓶毕竟不能和发酵罐比, 甘油残余会抑制甲醇利用。

BMGY、BMMY 灭菌后才能加甲醇、磷酸钾、生物素。配制 BMMY 时也没必要用 5%过滤除菌的甲醇, 在灭菌后使用前加 100%甲醇至你要的浓度。

You will need either BMGY/BMMY (buffered complex glycerol or methanol medium), BMG/BMM (buffered minimal glycerol or methanol medium) or MGY/MM (minimal glycerol or minimal methanol medium) for expression. **BMG, BMM, BMGY, and BMMY are usually used for the expression of secreted proteins,** particularly if pH is important for the activity of your protein.

Unlike MGY and MM, they are all buffered media. Because these media are buffered with phosphate buffer, a wide range of pH values may be used to optimize production of your protein. BMGY/BMMY contain yeast extract and peptone which may help stabilize secreted proteins and prevent or decrease proteolysis of secreted proteins. Inclusion of yeast extract and peptone act as a "mixed feed" allowing better growth and biomass accumulation.

2.8 YPDS 培养基(Yeast Extract Peptone Dextrose sorbitol Medium 酵母浸出粉/ 胰蛋白胨/ 右旋葡萄糖培养基/山梨醇): 山梨醇:稳定的渗透压, 在电击过程中保护宿主细胞, 改变细胞膜的通透性

yeast extract	1%
peptone	2%
dextrose (glucose)	2%
sorbitol	1 M
+agar	2%

不管是液体 YPDS 培养基, 还是 YPDS + G418 培养基, 必须存放 4℃ 条件下, 有效期 1 ~2 周。

2.9 MGY

Minimal Glycerol Medium (最小甘油培养基)(34%YNB; 1% 甘油; 4*10⁻⁵%生物素)。将 800ml 灭菌水、100ml 的 10*YNB 母液、2ml 的 500*B 母液和 100ml 的 10*GY 母液混匀即可, 4 °C 保存, 保存期为 2 个月。

2.10 MGYH

Minimal Glycerol Medium + Histidine(最小甘油培养基 + 0.004% 组氨酸) 在 1000ml 的 MGY 培养基中加入 10ml 的 100*H 母液混匀, 4℃ 保存, 保存期为 2 个月。

2.11 RDB 转化培养基 (酵母原生质体转化用)

Regeneration Dextrose Medium (葡萄糖再生培养基) (含有: 1mol/L 的山梨醇; 2%葡萄糖; 1.34%YNB; 4*10⁻⁵% 生物素; 0.005%AA 氨基酸)

1. 将 186g 的山梨醇定容至 700ml , 高压灭菌;
2. 冷却后于 45℃ 水浴;
3. 将 100ml 的 10*D、100ml 的 10*YNB; 2ml 的 500*B; 10ml 的 100*AA 等母液和 88ml 无菌水混匀, 预热至 45℃ 后, 与步骤 2 的山梨醇溶液混合。4 °C 保存。

2.12 RDH Regeneration Dextrose Medium + Histidine (酵母原生质体转化用) (葡萄糖再生培养基 + 0.004% 组氨酸) 在 RD 培养基配制的第三步中, 在加入 10ml 的 100*H 母液, 同时无菌水的体积减少至 78ml 即可, 其余配制方法与 RD 相同。4 °C 保存。

2.9 RDB 及 RDH 平板的制备 (酵母原生质体转化用)

1. 将 186g 的山梨醇和 15-20g 琼脂粉定容至 700ml , 高压灭菌; 冷却后于 60℃ 水浴;
2. 参照 RD/RDH 液体培养基配制的步骤 4, 将 100ml 的 10*D、100ml 的 10*YNB; 2ml 的 500*B; 10ml 的 100*AA 等母液、(10ml 的 100*H 母液) 和 88 (78) ml 无菌水混匀, 预热至 45 °C 后, 与步骤 1 的山梨醇/ 琼脂液混匀;
3. 迅速制备平板。4 °C 可保存数月。

2.13 RD 及 RDH 的 TOP 琼脂的制备（常用于酵母菌的包被）（酵母原生质体转化用）

- 1.将 186g 的山梨醇和 7.5~10g 琼脂粉定容至 700ml，高压灭菌；冷却后于 60℃水浴；
- 2.参照 RD/RDH 液体培养基配制的步骤 4，将 100ml 的 10*D、100ml 的 10*YNB；2ml 的 500*B；10ml 的 100*AA 等母液、（10ml 的 100*H 母液）和 88（78）ml 无菌水混匀，预热至 45℃后，与步骤 1 的山梨醇/琼脂液混匀；
- 3.将该 TOP 琼脂置于 45℃水浴冷却、保温，备用。

Pichia yeast culture details

The growth temperature of *Pichia pastoris* is 28-30°C for liquid cultures, plates, and slants. Growth above 32°C during induction can be detrimental to protein expression and can even lead to cell death. Other important facts: Doubling time of log phase Mut+ or MutS *Pichia* in YPD is ~2 hours

- ï Mut+ and MutS strains do not differ in growth rates unless grown on methanol
- ï Doubling time of log phase Mut+ *Pichia* in methanol medium (MM) is 4-6 hours
- ï Doubling time of log phase MutS *Pichia* in MM is ~18 hours
- ï One OD600 = ~5 x 10⁷ cells/ml

Note: Growth characteristics may vary depending on the recombinant strain.

To store cells for weeks to months, use YPD medium or YPD agar slants (see page 55).

- Streak for single colonies of GS115, KM71, or a His+ transformant on YPD.
- Transfer one colony to a YPD stab and grow for 2 days at 30°C.
- The cells can be stored on YPD for several weeks at +4°C.

To store cells for months to years, store frozen at -80°C.

- Culture a single colony of GS115, KM71, or a His+ transformant overnight in YPD.
- Harvest the cells and suspend in YPD containing 15% glycerol at a final OD600 of 50-100 (approximately 2.5-5.0 x 10⁹ cells/ml).
- Cells are frozen in liquid nitrogen or a dry ice/ethanol bath and then stored at -80°C.

After long-term storage at +4°C or -80°C, we recommend checking the His+ transformants for correct genotype and viability. Streak on MM, MD or MGY plates before using again.

TCA 沉淀方法；

培养基上清直接电泳跑出来的条带经常很难看，可以 TCA 沉淀浓缩后跑电泳。表达上清很少有直接考染能看得到条带的，1ml 表达上清浓缩到 20ul 直接电泳。一般表达量大于 1mg/ml 可以看到明显条带，但重复性不好。

具体步骤：

0. make 100% (M/V)TCA:454 ml H₂O/Kg TCA, maintain in dark bottle at 4 °C, Be careful, use gloves!

- 1.菌液 10000g,离心 5 分钟，收集表达上清。
- 2.取 500-1000ul 上清于 EP 管中，加入 1/9 体积的 100%TCA (Trichloroacetic acid)，颠倒 10 次混匀。
- 3.样品置于冰浴中大于 0.5 小时，过夜效果更好。
- 4.15000g,离心 10—20 分钟,可见有棕黑色沉淀，倒掉上清，将 EP 管倒扣在吸水纸上轻轻控几下，除去残余在管口的液体。
- 5.将 EP 管倒置于吸水纸长，37 度烘箱 10—20 分钟，待管底无明显液体残留，如果管壁还

残留有液体，可以吸水纸吸掉。可以改成室温或用电吹风，关键是除去管底和管壁残余液体。

- 6.15000g,离心 10—20 分钟,用 20ul 枪头尽量吸去管底残余的液体，此步骤要快，不然沉淀容易散开，降低蛋白回收率，一般最多几 ul 或者没有，注意不要吸到沉淀。
- 7.EP 管倒置于吸水纸长，37 度烘箱 5 分钟，确认管壁和管底没有液体残留。
- 8.加入 20—50ul Loading buffer，95 度加热 10min，一般沉淀会自动溶解，如果不溶，用手指轻弹管壁或用 20ul 枪头轻轻吸打，注意整个操作尽量不要碰到管壁，因为管壁可能沾有残余 TCA。如果蓝色的 Loading buffer 不变成黄色，说明残余 TCA 吸弃了干净，如果变黄，一般不影响电泳。此方法连丙酮洗这一步都省了，而且不影响电泳效果。

或者第 5 步和第 6 步改为丙酮洗：

- 5.加入 200ul 冰冷的丙酮，用手指轻弹 EP 管，洗去管底和管壁残余的 TCA。
- 6.15000g,离心 10—20 分钟,倒掉上清，将 EP 管倒扣在吸水纸上轻轻控几下，除去残余在管口的液体。

For PAGE-SDS, resuspend samples in a minimal volume of sample buffer. (The presence of some TCA can give a yellow colour as a consequence of the acidification of the sample buffer ; titrate with 1N NaOH or 1M TrisHCl pH8.5 to obtain the normal blue sample buffer colour.)

样品是酵母细胞超声后离心获得的上清，用 Loading buffer 溶解蛋白沉淀，始终不能溶解，而且加热超过 10 分钟以后也依旧不溶解，很可能是 TCA 没有除干净。Typtone 做 TCA 沉淀效果不好，沉淀很多，颜色是绿的，不好溶，Peptone 沉淀是黑色的，比较少，一般用丙酮洗一步后很好溶。

胞内蛋白：

反复冻融多次，然后 15000 rpm 离心 4 度即可

ELISA protocol; 原位双膜法快速检测阳性表达株

用 BMMY 培养基一般表达 1—2 天收集表达上清，稀释一定比例铺板做 ELISA 检测

- 1.取 5—10ul BMMY 表达上清用 0.05M NaHCO₃ 稀释到 100ul 铺 ELISA 板，37 度或室温振荡大于 1 小时。注意一定要做一个 GS115 空菌株表达上清作为阴性对照，最好还找一个带有 histag 的蛋白作为阳性对照。
- 2.TPBS 洗板 3 次，方法：倒掉铺板液，倒置于毛巾上轻轻拍打几次，加 TPBS 至满，重复。
- 3.加封闭液（TPBS 加 1%脱脂奶粉）350ml/孔，室温下放置 40 分钟—1 小时，TPBS 洗 3 次。
- 4.加封闭液稀释的 histag 一抗 100ul/孔，ELISA 板于室温振荡 0.5—1 小时，TPBS 洗 3 次。很多公司都有 histag 的单抗，个人觉得 Qiagen 和 Pharmacia 单抗较好，Invitrogen 和 Labvision 的一般般，一般 1: 1000—5000 稀释，不同公司的抗体效价不同。
- 5.加封闭液稀释的 HRP 标记的羊抗鼠二抗 100ul/孔，ELISA 板于室温振荡 0.5—1 小时，TPBS 洗 3 次。二抗很多公司有，国产的华美都可以，1: 500—1000。如果是 HRP 标记的 histag 抗体，不加二抗直接显色。
- 6.加入 OPD 显色液 100ul/孔，避光反应约 10—30 分钟。显色液配方：1mg/ml OPD 于 0.1M 柠檬酸钠，PH5.5，0.1%H₂O₂，—20 度避光保存。也可以用 DAB 显色。
- 7.1M H₂SO₄ 100ul/孔终止反应，酶标仪测 OD490nm。

TCA 沉淀考染看不到条带，可以打算作 ELISA，但可能上清里面杂蛋白太多，抗原（目的蛋白）不可能包被到板子上，所以几乎不可能检测到的。他们建议作点杂交，就是把少许上清点到 PVDF 膜上，以后就按照 western blot 就可以了。ELISA 使用多抗，意义不是很大，因为确实阴性对照也显色，和阳性结果差不了太多，特别是蛋白表达水平不高的话，两者区别很不明显，一抗是自己制备的多抗，空白值在 0.2 左右，阴性对照（即空白宿主自身表达的上清）OD 值大约在 0.35-0.4 之间，目的蛋白测的值却在 0.6-0.65。可见效果还是比较明显的。因为是多抗阴性对照难免会对结果产生影响。没有单抗也只能这样了。

原位双膜法快速检测阳性表达株：

- 1 将醋酸纤维素薄膜置于 MD/His -平板的 His + 转化子菌落上，用涂布棒轻压使醋酸纤维素薄膜完全湿润并赶尽气泡，使所有菌落转移到醋酸纤维素薄膜上。
- 2 在 BMMY 板上置一同样大小的硝酸纤维素薄膜，并将醋酸纤维素薄膜菌落向上置于硝酸纤维素薄膜上。30 °C 孵育 18 h 后，将醋酸纤维素薄膜移至 MDP2His 平板上，4 °C 保存
- 3 将硝酸纤维素薄膜取下，6 %小牛血清 37 °C 封闭 2 h，TBS-T (Tris-NaCl 缓冲液加 0.105 %吐温 20) 洗 3 次(每次 10 min) 。加一抗室温孵育 2 h，TBS-T 洗膜 3 次。然后二抗室温孵育 2 h，TBS2T 洗膜 3 次。最后显色。

在强弱不等的颜色中挑选染色最强的克隆，做诱导表达进一步验证。操作时，一定要记好位置，以免不能将膜上的克隆和板上的克隆对上。

以后的步骤就基本上是做 western，所以用硝酸纤维素膜通过虹吸将醋酸纤维素膜上的菌落分泌的液体转到硝酸膜上，相当于 western 的转膜过程。

蛋白降解

分泌表达的目标蛋白比胞内蛋白确实容易被降解。可以尝试以下几种办法：1、尽可能降低培养液的 pH 值减少酶活，酵母生长 pH 值比较广，4~7 都可以试一下；2、多试几种蛋白添加剂，充当酶解底物（比如酵母酸）；实在没办法，只好换菌株或做 pcr 突变酶切位点（当然不能影响表达和蛋白活性）。

- 1)、 The first is adding to the culture medium of amino-acid rich supplement such as peptone or casamino acid, which reduce product degradation possibly by acting as excess substrates for one or more problem proteases.
 - 2)、 The second strategy to minimize proteolytic degradation is to optimize the culture pH between pH 3.0 and pH7.0.
 - 3)、 The third strategy involves elevating the level of ammonium in the culture broth adequately, which is explained by the hypothesis that protease activity is induced under nitrogen starvation.
- The fourth strategy is let the culture temperature 28 deg instead of 30 deg.