

酵母蛋白表达步骤/实验流程

本文主要讲述了酵母蛋白表达步骤，详细酵母表达流程。从感受态细胞制备，转化方法选择及操作，从化学试剂 PEG1000 转化，电击转化，原生质体法转化三个方法入手及转化子的筛选及最终的蛋白表达，全套酵母蛋白表达标准操作流程。

质粒线性化

在酵母表达系统中已经介绍了酵母蛋白表达原理，因此线性化是酵母转化的第一步，采用不同的限制酶酶切可以得到不同的表型。

转化方法

转化方法	转化效率	是否会多拷贝整合	操作
原生质体法	10^5	是	操作复杂
电穿孔法 (电击)	10^5	是	操作方便
PEG 诱导转化	10^5	否	操作方便

毕赤酵母 PEG1000 转化及感受态制备

配置缓冲液

- 1) 缓冲液 A : 1.0M 山梨醇, 10mM 甘氨酸, pH8.35, 3% (v/v) 乙二醇, 滤膜过滤, -20°C 保存;
- 2) 缓冲液 B : 40% (w/v) PEG1000, 0.2M 甘氨酸, pH8.35, 滤膜过滤, -20°C 保存;
- 3) 缓冲液 C : 0.15M NaCl, 10mM 甘氨酸, pH8.35, 滤膜过滤, -20°C 保存;
- 4) 未污染的新鲜、试剂级 DMSO, -70°C 保存

将 DNA 直接加在冻结的酵母细胞上是本实验的关键之处 (即使在冰上解冻的待转化细胞, 其摄取外源 DNA 的能力也在解冻过程中迅速下降; 样品的转化, 进行多组试验。

- 感受态制备

- 1) 接种酵母受体菌单菌落于 YPD 平板 (YPD : 蛋白表达试剂配置), 30°C 培养 2 天;

- 2) 挑取平板上的单菌落接种于 10ml YPD 液体培养基中，30°C 摇床震荡过夜；
- 3) 过夜培养后按 1% 左右的接种量接种到 100ml YPD 培养基中震荡培养至 OD 值从 0.1 至 0.5~0.8；
- 4) 3000~5000rpm 离心收集沉淀菌体，用 50ml 预冷 A 液洗涤，并重悬与 4ml A 液中；
- 5) 根据每次使用量（0.1-0.2ml 左右）分装与 1.5ml 离心管中，每管加入 10ul 的预冷 DMSO，混合后迅速-80°C /液氮（感受态可以放到-80°C，但是酵母表达建议感受态现做现用）

- 酵母转化

- 1) 线性化质粒 50ug（可预冷）溶于 200ul 的 TE 中，直接加入冻存的酵母感受态中；
- 2) 37°C 水浴 5min，过程混合样品 2 次；
- 3) 取出加入 1.5ml 缓冲液 B，彻底混匀；
- 4) 30°C 水浴 1 小时；
- 5) 室温 2000rpm 离心 10min，去上清，得沉淀，重悬菌体与 1.5ml 缓冲液 C 中；
- 6) 再次离心，去上清，得沉淀，轻轻加入 0.2ml 缓冲液 C 重悬；
- 7) 将重悬的转化液涂与选择性培养基（根据抗性配置）中，30°C 孵育 3-4 天，进行鉴定。

毕赤酵母电击感受态细胞制备及转化

- 感受态制备

- 1) 接种酵母受体菌单菌落于 YPD 平板，30°C 培养 2 天；
- 2) 挑取平板上的单菌落接种于 10ml YPD 液体培养基中，30°C 摇床震荡过夜；
- 3) 过夜培养后按 1% 左右的接种量接种到 100ml YPD 培养基中震荡培养至 OD 值 1.2~1.5；
- 4) 4°C，5000rpm 离心 5min 收集沉淀菌体，用 100ml 预冷无菌水重悬菌体；
- 5) 4°C，5000rpm 离心 10min 收集沉淀菌体，用 100ml 预冷无菌水重悬菌体；
- 6) 再次 4°C，5000rpm 离心 10min 收集沉淀菌体，用 100ml 预冷无菌水重悬菌体；
- 7) 20ml，1mol/L 山梨醇洗涤 1 次；
- 8) 将菌体溶于 200ul，1mol/L 预冷山梨醇中，不加甘油，-80°C 放置几小时，待转化

- 酵母电转

- 1) 准备好 80ul 的酵母感受态与线性化的质粒 1-5ug (冰上预冷 15min) 混合, 迅速放入 0.2cm 的电击杯中 (电击杯冰上预冷灭菌), 电击;
- 2) 电击结束, 迅速加入 1ml 山梨醇, 涂平板 (在摇床上培养 1h 后涂平板也可);
- 3) MD 培养基生长 3-4 天, ROB 培养基上生长 4-5 天后, 鉴定。

- 电击注意点

- 1) 线性化质粒的含量在 1-5ug, 纯度越高越好, 量要有保证, 很多人找不到阳性转化子可以考虑是否是这个因素造成;
- 2) 感受态菌液收集, 确定 OD 值在 1.2-1.5 之间, 可以稀释不同倍数, 判断是否是线性关系, 菌液浑浊单 OD 值不高, 可能是 OD 稀释倍数不够;
- 3) 感受态保存, 感受态制备但其他还没处理好, 冰上放置的时间对转化效率也会有影响, 因此还是那个原则: 现做现用; 且分装成每次够用的量, 一旦拿出就不再放回, 也避免每次吸取造成污染;
- 4) 电击杯清洗, 先洗净吹干, 浸泡在 75%乙醇中, 使用前超净台紫外灭菌, 重复使用对实验也会有一定影响;
- 5) 电击参数, 电压及电击时间可以摸索, 适当增加电压或延长电击时间, 电击过程冰上操作

毕赤酵母原生质体法转化及感受态制备

- 原生质转化原理

酵母细胞具有细胞壁, 细胞壁会组织其对外源 DNA 的摄入, 因此, 去除掉部分的细胞壁有利于酵母细胞对 DNA 的吸收。利用藤黄节杆菌酶 (为一种葡聚糖酶), 可以部分消化细胞壁。关键在于不能过度的消化细胞壁, 否则将造成细胞死亡。藤黄节杆菌酶的消化能力受到 SDS 的影响, 可以加入 SDS 对其消化进行控制, 以得到消化适度的细胞。消化获得 70% 的原生质细胞时, 效果最好。

- 试剂配制

转化当天, 配制如下溶液:

- ① SE: 1M 山梨醇, 25mM EDTA, pH8.0
- ② SCE: SE: 1M 山梨醇, 1mM EDTA, 10mM 柠檬酸钠缓冲液, pH8.5
- ③ SOS: 1M 山梨醇, 0.3xYPD, 10mM CaCl₂

- ④ CaS : 1M 山梨醇, 10mM Tris-HCl, pH7.5, 10mM CaCl₂
- ⑤ DTT, PEG : DTT 水配制为 1M 浓度, PEG 用水配制 40% (w/v)
- ⑥ CaT : 20mM Tris pH7.5, 20mM CaCl₂
- ⑦ 藤黄节杆菌酶 : 用水配制成 3mg/ml 的浓度
- ⑧ 5%SDS 溶液, RD 融化琼脂 100ml, 1M 山梨醇

每次转化时配制

- ① SED : 19ml LSE 加 1ml DTT
- ② PEG/Cat : 1:1 混合 40%PEG 及 Cat

其他试剂

- ① YPD 培养基 1L, YPD 平板 1L
- ② RDB 平板 1L, RDHB 平板 1L

- 感受态制备及消化细胞壁

- 1) 接种酵母受体菌单菌落于 YPD 平板, 30°C培养 2 天;
- 2) 挑取平板上的单菌落接种于 10mlYPD 液体培养基中, 30°C摇床震荡过夜;
- 3) 取培养的细胞 5ul, 10ul, 20ul 分别加入到含有 200mlYPD 的液体培养基中, 30°C震荡过夜 (300rpm);
- 4) 第二天测每个培养瓶中的 OD600 值, 并取出事先配置好的转化溶液, 室温放置;
- 5) 收集 OD600 值在 0.2-0.3 对应的培养瓶中的细胞, 室温离心 (1500rpm5min 左右), 得到沉淀; 如果没有培养瓶中的 OD 值在 0.3 左右的话, 选择一个培养瓶, 用新配置的培养基以 1 : 4 稀释, 再次培养 (2-3h 左右), 直至出现 OD 值为 0.2-0.3, 收集细胞;
- 6) 准备去除细胞壁, 准备去壁试剂和待去壁细胞;
- 7) 准备去壁试剂: 现配 SED, 保证 DTT (分析级) 的新鲜度, 配完放-20°C;
- 8) 准备带去壁细胞: 先用灭菌水清洗, 转入离心管; 1500rpm 离心 5min, 收集细胞, 用 20mlSED 重悬并洗涤离心; 再次用 1M 山梨醇洗涤, 离心 (同上); 用 SCE 重悬, 分开至两个离心管中 (每管 10ml 左右);
- 9) 准备藤黄节杆菌酶, 取一管酶放置冰上, 以上准备的两管细胞取出一管加入藤黄节杆菌酶, 开始消化细胞 (这一步可确定酶消化的最佳时间);

最佳时间的确定

- ① 准备 20ml 5%SDS 溶液分光光度计调至 800nm，空白对照为 800ul 5% SDS 及 200ul SCE；
 - ② 准备 10 个离心管，编号为 0, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 45, 50 (根据时间编号)；
 - ③ 取上述 8 步中的另一管细胞，取出 200ul 加入至 0 号管中，放置冰上，此为 0 点；
 - ④ 加入 7.5ul 藤黄节杆菌酶在剩余的细胞中，轻混，30°C 孵育 (不要晃动) 用来建立最佳时间所用
 - ⑤ 2min 时取 200ul 悬浮液至 2 号管中，同理 4, 5, 6, 7, 8min 时重复操作，读样品 OD800 值；
 - ⑥ 用公式计算细胞去壁的效率： $\%去壁率 = 100 - \{ (T \text{ 时间 OD800} - 0 \text{ 时间 OD800 值}) \times 100\}$
- 10) 计算出去壁率为 70% 左右时，得出最佳消化时间，同样操作加入 7.5ul 消化酶于另一管中消化细胞
- 11) 室温离心去除悬浮液，1M 山梨醇洗涤一次，0.6ml CaS 悬浮细胞，立即转化，去壁的细胞应立即转化。

- 转化毕赤酵母

- 1) 取 100ul 将去壁细胞，放入 1.5ml 离心管中 (灭菌)；
- 2) 准备 10ug 线性化质粒 (预冷) 与去壁细胞混合，加入 1ml 新鲜 PEG/Cat 溶液，轻混，室温孵育 10min；
- 3) 室温 750rpm 离心 10min，去除 PEG/Cat 溶液；并用 150ul SOS 培养基悬浮转化细胞，室温孵育 20min；
- 4) 加入 800ul 1M 山梨醇，涂平板；
- 5) 取 200ul 转化细胞和 RD (液体) 混匀倒于 RDB 平板上，凝固后导致平板，30°C 培养 4-6 天，出现转化子；
- 6) 取 100ul 稀释细胞，与 RDH (液体) 混匀，涂在 RDHB 上，凝固后倒置生长，30°C 培养 4-6 天，出现克隆，表明去壁细胞可再次生长为分裂细胞。

阳性转化子的筛选与蛋白表达

- Mut⁺和 Mut^s表型的判断

待转化子在平板上生长一段时间后，进行 Mut⁺和 Mut^s的筛选。挑取单克隆，在 MM 及 MD 培养基上划线或点 (先在 MM 平板上点，再在 MD 平板上点，一个克隆换一次牙签)，30°C 培养 2 天。观察，在 MD 培养基上生长而在 MM 培养基上不生长或长的很小即为 Mut^s表型，其余为 Mut⁺表型。

- Mut⁺的诱导表达

- 1) 挑取单菌落，摇菌，在 25mlMGY 或 BMG 或 BMGY 培养基中，30°C，300rpm 培养至 OD600 为 2-6 (培养 15-18h 左右观察)；
- 2) 室温 2000rpm 离心 5min，收集菌体，用上述培养基重悬，使 OD600 为 1.0 左右；将菌液至于 1L 摇瓶中，30°C300rpm 培养，每 24 小时加入 100%甲醇，至终浓度为 0.5-1.0%；
- 3) 根据时间点取样 (1ml) 至于 1.5ml 离心管中，离心收集上清和菌体，分析蛋白表达量和最佳收获时间；
- 4) 可以用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行分析鉴定表达情况。

- Mut^s 的诱导表达

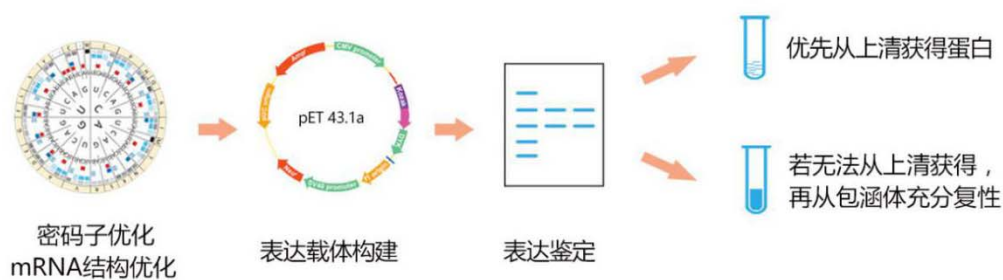
- 1) 挑取单菌落，摇菌，在 25mlMGY 或 BMG 或 BMGY 培养基中，30°C，300rpm 培养至 OD600 为 2-6 (培养 15-18h 左右观察)；
- 2) 室温 2000rpm 离心 5min，收集菌体，用上述培养基重悬，使 OD600 为 1.0 左右；将菌液至于 1L 摇瓶中，30°C300rpm 培养，每 24 小时加入 100%甲醇，至终浓度为 0.5-1.0%；
- 3) 根据时间点取样 (1ml) 至于 1.5ml 离心管中，离心收集上清和菌体，分析蛋白表达量和最佳收获时间；
- 4) 可以用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行分析鉴定表达情况。

南京德泰生物 -- 专注蛋白与抗体

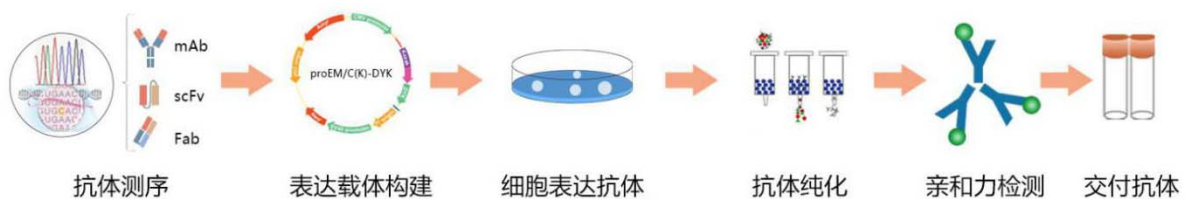
一、蛋白表达（哺乳动物细胞表达）蛋白被细胞充分修饰，活性有保障



二、蛋白表达（大肠杆菌表达）成功率>95%，不成功不收费，成功有保障



三、重组抗体表达 若想改造一个抗体，可以试试重组表达



四、稳定细胞系构建 研究级细胞系构建 & 高表达细胞株开发

