

# 毕氏酵母 (*Pichia pastoris*) 感受态细胞制备及转化

## 1、毕氏酵母氯化锂转化法

### (1) 试剂

1M LiCl (用去离子蒸馏水配制, 滤膜过滤除菌; 必要时用消毒去离子水稀释)

50% PEG3350 (Sigma P3640 用去离子蒸馏水配制, 滤膜过滤除菌, 用较紧的盖子的瓶子分装)

2mg/ml salmon sperm DNA / TE (10mM Tris-Cl, pH8.0, 1.0mM EDTA) -20°C保存

注: 醋酸锂对毕氏酵母无效, 仅氯化锂有效; PEG3350 可屏蔽高浓度 LiCl 的毒害作用;

### (2) 感受态毕氏酵母的制备

接种 *Pachia pastoris* 到 50ml YPD 培养基中, 30°C摇菌过夜 (约 24~28h) 培养到 OD 值为 0.8~1.0 (约 10<sup>8</sup> Cells/ml);

收获细胞, 用 25ml 无菌水洗涤一次, 室温下 1500g 离心 10min;

重悬细胞于 1ml 100mM LiCl 溶液中, 将悬液转入 1.5ml 离心管;

离心机最大速度离心 15 秒沉淀菌体, 重悬菌体于 400ul 100mM LiCl 溶液中;

按 50ul/管分装, 立即进行转化;

注: 不要将感受态酵母菌冰浴;

### (3) 毕氏酵母的转化

煮沸 1ml 鲑鱼精 DNA 5min, 迅速冰浴以制备单链担体 DNA;

将感受态酵母菌离心, 以 Tips 去除残余的 LiCl 溶液;

对于每一个转化, 按以下顺序加入:

50% PEG3350                      240ul

1M LiCl                              36ul

2mg/ml 单链 Salmon sperm DNA      25ul

5 ~ 10ug/50ul H<sub>2</sub>O 质粒 DNA      50ul

剧烈旋涡混匀直至沉淀菌体完全分布均匀 (约 1min) ;

30°C水浴孵育 30min;

42°C水浴热休克 20 ~ 25min;

6000 ~ 8000rpm 离心收集酵母菌体;

重悬酵母于 1ml YPD 培养基, 30°C摇床孵育;

1 ~ 4h 后, 取 25 ~ 100ul 菌液铺选择性培养基平板, 于 30°C培养 2 ~ 3 天鉴定;

## **2、毕氏酵母 PEG1000 转化法**

### **(1) 试剂**

缓冲液 A: 1.0M Sorbitol, 10mM Bicine, pH8.35 (sigma) ,3% (v/v) ethylene glycol

缓冲液 B: 40% (w/v) PEG1000 (sigma) , 0.2M Bicine, pH8.35

缓冲液 C: 0.15M NaCl, 10mM Bicine, pH8.35

未污染的新鲜、试剂级 DMSO, -70°C保存

注:

缓冲液 A、B、C 均用滤膜过滤, -20°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; 如进行多样品的转化, 建议按 6 样品/

组进行) ;

### **(2) 待转化毕氏酵母的制备**

接种环接种 *Pachia pastoris* 于 YPD 平板, 30°C培养 2d;

挑取单克隆酵母菌株于 10mlYPD 培养基中, 30°C振荡培养过夜;

取步骤 2 中小量菌液接种到 100mlYPD 培养基中振荡培养, 待其 OD 值从 0.1 升到 0.5 ~ 0.8;

室温下 3000g 离心收集酵母菌体, 50ml 缓冲液 A 洗涤一次;

重悬菌体于 4ml 缓冲液 A 中,按 0.2ml/管分装于 1.5ml 的离心管中,每管加入 11ulDMSO, 混合后迅速于液氮中冷冻,

-70°C保存

### (3) 毕氏酵母的转化

将约 50ug 线性化质粒 DNA 溶于 20ul TE 或水中, 直接加于冻结的酵母细胞中; 加入担体 DNA (40ug 变性超声线性化鲑鱼精 DNA) 以获得最大转化率;

37°C水浴孵育 5min, 中间混合样品 1 ~ 2 次;

取出离心管, 加入 1.5ml 缓冲液 B, 彻底混匀;

30°C水浴孵育 1h;

室温下 2000g 离心 10min, 去除上清液, 菌体沉淀重悬于 1.5ml 缓冲液 C 中;

离心样品, 去除上清液, 轻微操作将样品重悬于 0.2ml 缓冲液 C 中;

将所有转化液铺于选择性平板, 于 30°C孵育 3 ~ 4 天后, 鉴定;

## 3、毕氏酵母电转化法

### (1) E.coli TOP10F' 感受态细胞的制备

取 10ul TOP10F' 菌液, 接种于 200ml LB 液体培养基中活化培养, 37°C, 200 rpm, 16 ~ 18 小时。取 100ul 菌液接种于 200ml 液体 LB 培养基中。

37°C, 200 rpm, 培养 16 ~ 18 小时。

灭菌 500 ml 离心管, 4°C, 4000 rpm, 20 min。得菌体沉淀。弃上清, 菌体用 10%甘油重悬并洗涤。重复洗涤 3 次。

第三次离心后，弃绝大部分上清，留下约 1ml 液体用于重悬菌体。

从制得感受态细胞中，取 200ul 于灭菌 EP 管中，加入连接反应产物 5ul，混匀，不要产生气泡，在冰上放置 5min。

将混匀后得 200ul 菌液移入电击杯中。

使用电击穿孔仪进行转化，设置为电压 2500 V，时间 5 ms。

电击后，往电击杯中加入 800ul SOC 培养基，冲洗出菌体，转移至灭菌 1.5 ml EP 管中。

37°C，150 rpm，轻摇 45 ~ 60 min。

取全部均匀涂布于含 Zeocin 25 ug/ml 的 LLB - Zeocin 平板上，正放，待涂布液不在流动，37°C 培养 12 ~ 16 小时。

## (2) 线性化质粒 DNA 对 *Pichia pastoris* GS115 的转化

取新鲜制备的（或 - 70°C 冻存的）感受态细胞置于冰浴中，使其完全解冻；

1) 将 100μl 菌体移出至一新的无菌 Eppendorf 管中，加入 5 - 20μg 线性化质粒 (5 ~ 10μl)，轻弹混匀，尽数吸出转移到 0.2cm 型的电穿孔转化杯中；

2) 转化杯置于冰浴中 5 ~ 10 分钟，保持低温。

3) 电穿孔转化电击条件：电压：1500V；电阻：400Ω；电容：25μF；脉冲时间：10mS；一次电击。

4) 电击后，马上在电击转化杯中加入 1ml 4°C 预冷的 1M 的山梨醇溶液，用微量移液枪吹打均匀，置于冰浴中；

5) 取 30°C 烘至表面半干的 MD 培养基平板，在超净工作台上无菌操作涂布平板，400μl/板

## 3.4 毕赤酵母电转化方法

### 3.4.1 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°C、250-300r/min 培养过夜;
2. 取 100-500 $\mu$ l 的培养物接种至含有 500ml 新鲜培养基的 2L 三角摇瓶中, 28~30°C、250-300r/min 培养过夜, 至 OD600 达到 1.3~1.5;
3. 将细胞培养物于 4°C, 1500g 离心 5min, 用 500ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬;
4. 按步骤 3 离心, 用 250ml 的冰预冷的无菌水将菌体沉淀重悬;
5. 按步骤 3 离心, 用 20ml 的冰预冷的 1mol 的山梨醇溶液将菌体沉淀重悬;
6. 按步骤 3 离心, 用 1ml 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 1.5ml;
7. 备注: 可将其分装为 80 $\mu$ l 一份的包装冷冻起来, 但会影响其转化效率 (2 周之内)。

#### 3.4.2 电击转化:

8. 将 5~20 $\mu$ g 的线性化 DNA 溶解在 5~10 $\mu$ l TE 溶液中, 与 80 $\mu$ 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, 加入 1ml 冰预冷的山梨醇溶液将菌体混匀, 转至 1.5ml 的 EP 管中;
12. 将菌体悬液涂布于 MD 或 RDB 平板上, 每 200~600 $\mu$ l 涂布一块平板;
13. 将平板置于 30°C 培养, 直至单个菌落出现。

推荐: 电压 1.5kV; 电容 25 $\mu$ F; 电阻 200 $\Omega$ 。电击时间为 4~10msec