

## 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 10mlYPD 液体培养基中 , 30°C 摆床震荡过夜 ;
- 3 ) 过夜培养后按 1% 左右的接种量接种到 100mlYPD 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 4mlA 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 10mlYPD 液体培养基中 , 30°C 摆床震荡过夜 ;
- 3 ) 过夜培养后按 1% 左右的接种量接种到 100mlYPD 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，一旦拿出就不在放回，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 CaCl<sub>2</sub>

④ CaS : 1M 山梨醇 , 10mM Tris-HCl , pH7.5 , 10mM CaCl<sub>2</sub>

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 CaCl<sub>2</sub>

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 摆床震荡过夜 ;

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的细胞 ;

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 =  $100 - \{ (T \text{ 时间 } OD800 - 0 \text{ 时间 } OD800 \text{ 值}) \times 100 \}$
- 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 , 0.6mlCaS 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 150ulSOS 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<sup>+</sup> 和 Mut<sup>s</sup> 表型的判断

待转化子在平板上生长一段时间后 , 进行 Mut<sup>+</sup> 和 Mut<sup>s</sup> 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<sup>s</sup> 表型 , 其余为 Mut<sup>+</sup> 表型。

- Mut<sup>+</sup> 的诱导表达

- 1) 挑取单菌落，摇菌，在 25mIMGY 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 摆瓶中，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<sup>s</sup> 的诱导表达

- 1) 挑取单菌落，摇菌，在 25mIMGY 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 摆瓶中，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。

# 更多优质服务推荐



SingleB® mAb Discovery Service

## SingleB®单B细胞快速单抗发现

德泰生物提供SingleB®单B细胞快速单抗发现服务，利用SmartFlow® FACS记忆B细胞筛选平台与DeepLight®浆细胞筛选平台，实现记忆B细胞与浆细胞的双筛选。平台适用于小鼠、兔、羊驼、人源化小鼠、绵羊等多种免疫对象，从动物免疫到获得单抗，快至29天，比传统杂交瘤技术至少节省120天。

### 平台优势

- 支持蛋白、多肽、细胞、病毒等**多种类型抗原免疫**
- 记忆B细胞 & 浆细胞双筛选，**保证B细胞多样性**
- 单细胞扩增阳性率高，无需刺激培养，减少多样性损失
- 重轻链天然配对，**亲和力更优**
- 高通量，周期短，单抗发现**快至29天**
- ELISA、FACS、WB、IHC等**多平台验证**

### 可开发单抗物种



小鼠

兔

羊驼

人源化小鼠



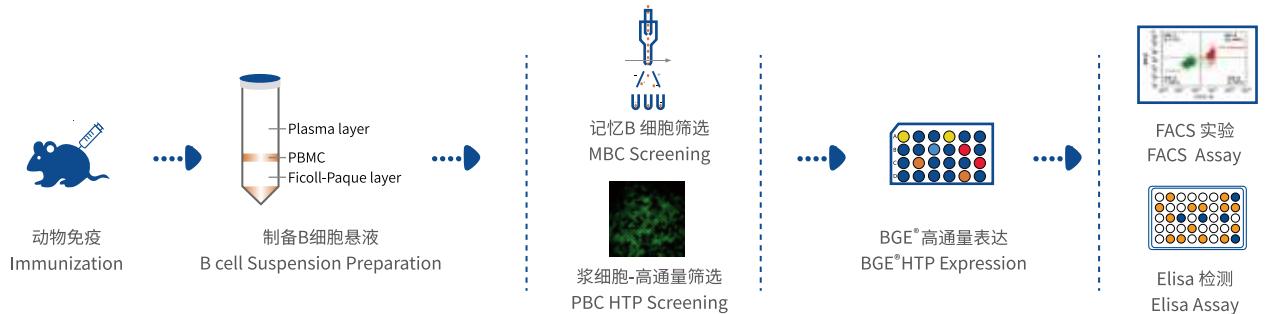
猪

犬

绵羊

人

### 服务流程





Recombinant Antibody Expression Service

## 重组抗体表达

德泰生物拥有完善的重组抗体表达与纯化体系、抗体多工艺质量验证体系。已交付的重组抗体项目种类包括scFv、Fab、(Fab')<sub>2</sub>、VHH、嵌合抗体、双特异性抗体、Fc融合蛋白、全长IgG、IgM。cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器用于HEK293/CHO细胞的小试及大量培养。HPLC纯度、内毒素、浓度等要求均可以根据您的下游应用进行定制。

### 服务优势



### 服务流程

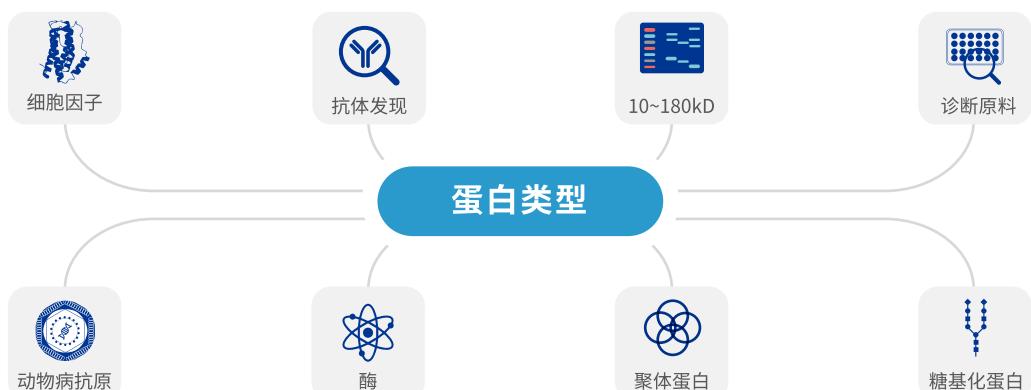


Recombinant Protein Expression Service

## 重组蛋白表达

原核蛋白表达系统、哺乳动物细胞蛋白表达系统

德泰生物拥有完善的原核蛋白表达与纯化体系和哺乳动物细胞蛋白表达与纯化体系。基于细胞因子、酶、诊断原料蛋白的工业化需求，我们配备了发酵设备并推出了大规模发酵制备服务；我们还配备了cGMP标准的百级洁净细胞房及生物反应器，用于HEK293/CHO等真核细胞的小试及大量培养。



# 4

Hybridoma Antibody Gene Sequencing Service

## 杂交瘤抗体基因测序

德泰生物拥有mRNA全长测序平台和Failsafe®假基因排除技术，能够提供快速、可靠的杂交瘤抗体基因测序服务。

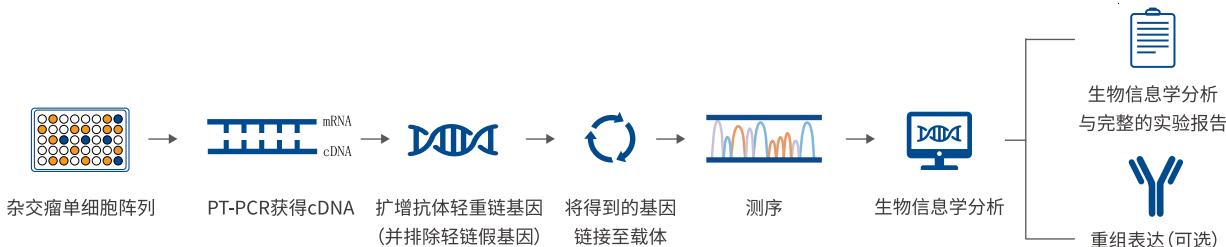
### 应用场景

- 抗体序列保护：获取抗体基因序列后可通过专利对CDR区进行保护。
- 生产方式备份：杂交瘤存在退化转阴风险，抗体序列可通过基因工程方式轻松转化为抗体样品。
- 抗体工程改造：获得的抗体序列可用于抗体人源化、双特异性抗体等抗体工程改造。

### 服务优势

- 极速体验：测序5天，表达5天，全程高通量
- 细胞需求少：只需1~5个细胞，可以接收孔板样品
- 保证测序结果准确：采用Failsafe®假基因排除技术，可排除κ轻链假基因
- 测序范围广：可测小鼠、大鼠、兔、羊等物种的IgM和IgG的所有亚型
- 一站式服务：德泰生物拥有丰富经验，可提供表达验证服务

### 服务流程



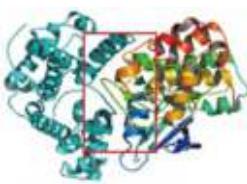
# 5

Biomolecular Interaction Analysis Service

## 分子间相互作用检测

德泰生物提供的分子间相互作用检测服务基于表面等离子共振(SPR)平台及生物膜干涉技术(BLI)平台，能够实现对分子间亲和力的定量和定性分析。与传统的GST pull down, 免疫共沉淀, 酵母双杂交等相比，具有更高的灵敏度、检测通量及较低的样品要求等优点。

### 检测范围



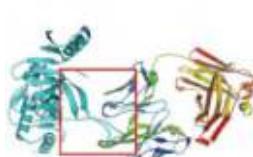
蛋白和蛋白



蛋白和小分子



蛋白和抗体



蛋白和抗体Fab片段

检测范围包括蛋白-蛋白、抗体-抗原、抗体片段-抗原、蛋白-抗体、蛋白-小分子、抗体-多肽、蛋白-DNA、DNA-DNA间的相互作用。



Antibody Humanization Service

## 抗体人源化

德泰生物人源化改造服务基于人工智能之深度学习算法,通过构建抗体结构模型、CDR移植与回复突变、识别关键氨基酸及人源化运算,获得人源化程度高且突变能低的抗体序列。

### 服务优势



重链和轻链同时参与优化



改造后的抗体人源化程度&gt;90%



人源化抗体的亲和力与初始抗体相当



可进行多物种的抗体人源化

### 服务流程

- ① Antibody sequence confirmation
- ② Human germline acceptor selection
- ③ CDR grafting
- ④ Back mutation
- ⑤ Mutation energy ranking
- ⑥ Antibody expression
- ⑦ Affinity ranking



Stable Cell Line Development Service

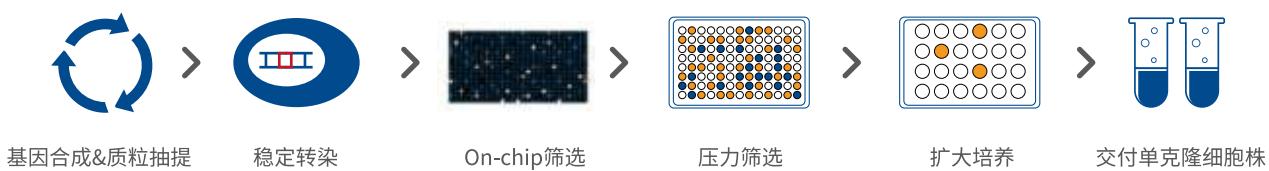
## 生产型稳转细胞株构建

德泰生物提供高表达哺乳动物稳定细胞株构建服务,筛选过程使用先进的可视化DeepLight®单克隆细胞筛选平台,较传统筛选流程快近100天,大大缩短了稳定细胞株的开发周期。

### DeepLight®细胞筛选平台的优势

	有限稀释法筛选	DeepLight® On-chip筛选
筛选时间	8周	1天
细胞分离效率	低	高
筛选通量	低	高
单细胞水平筛选	否	是

### 服务流程



### 服务优势



更快的筛选速度

从DNA到细胞株  
较传统方法快近100天

百k级筛选通量

一次筛选640k细胞  
优选高表达细胞株

可视化筛选结果

先进DeepLight®平台  
高表达细胞株实时成像

稳定高产

可稳定转代50代  
重组单抗可达5 g/L