

一种简化的巴斯德毕赤酵母基本培养基

孔艺萌^{1*} 孔庆忠^{1,2}

(1. 山东大学生命科学学院 山东 济南 250100)
(2. 山东蓝金生物工程有限公司 山东 济南 250100)

摘要: 通过逐步减少巴斯德毕赤酵母基本培养基中生长因子和微量元素的组成种类, 最终确认维持巴斯德毕赤酵母在平板上的生长, 除生物素外其它生长因子和微量元素不必额外添加。据此提出了一种简化的巴斯德毕赤酵母基本培养基 SPMD, 其成分为 6 种无机盐、生物素和葡萄糖。除葡萄糖单独灭菌外, 配制时可以高温高压灭菌。使用该培养基用于转化子的筛选实验中, 获得了与使用常规 MD 培养基基本相当的转化效率。

关键词: 巴斯德毕赤酵母, 基本培养基, 转化

A Simplified Minimal Medium for *Pichia pastoris*

KONG Yi-Meng^{1*} KONG Qing-Zhong^{1,2}

(1. School of Life Science, Shandong University, Jinan, Shandong 250100, China)
(2. Shandong Lanjin Pharmaceuticals Co., Ltd., Jinan, Shandong 250100, China)

Abstract: In this study, by gradually reducing the kinds of the trace elements and growth factors from the minimal medium of *Pichia pastoris*, the result showed that to maintain the normal growth of *P. pastoris* on agar plate, trace elements and growth factors except biotin don't need to be added specially. A simplified minimal medium of *P. pastoris*, SPMD was presented, containing six kinds of inorganic salt, biotin and glucose. All components can be sterilized by autoclave except glucose which should be sterilized separately. This medium was used in screening for transformants and got a transformation rate comparable to that using MD medium.

Keywords: *Pichia pastoris*, Minimal medium, Transformation

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是重要的真核蛋白表达系统, 也用于蛋白分泌途径、代谢工程等的基础性研究, 在科研和生产中有重要意义^[1,2]。在实验中, 比如缺陷型的验证、转化子的筛选, 往往需要基本培养基。现有报道的两种基本培养基 MD^[3]和 SD^[4]均需要使用 YNB(Yeast nitrogen base)。YNB 所含组分约有 20 种, 自行配制非常繁琐。虽然已经有商品化 YNB 供应, 但一方面价格略贵, 另一方面

仍然需要过滤除菌, 过程仍显繁琐。

本文探索对 *P. pastoris* 基本培养基(Minimal medium)进行简化, 报道了一种简化的基本培养基。这种培养基所含组分较少, 配制方便, 可进行高压蒸汽灭菌, 减少了实验材料成本和操作工作量。使用这种培养基进行筛选转化子实验, 获得的转化效率与使用常规 MD 培养基的转化效率相当。

* 通讯作者: Tel: 86-531-88365051; ✉: kongyimeng@163.com
收稿日期: 2009-03-27; 接受日期: 2009-06-01

1 材料与方 法

1.1 菌种、质粒与试剂

菌种与质粒均来自相应公司, *P. pastoris* GS115(*his4*)和 KM71(*arg4, his4, aox1::ARG4*) (Invitrogen)、大肠杆菌 DH5 α (TaKaRa)、质粒 pPIC3.5K (Invitrogen)。实验过程为分子生物学与微生物学的基本实验方法^[5], 酵母转化使用电转化^[3]。所用试剂均为国产分析纯试剂或生化试剂。

1.2 培养基

MD培养基: 每升含 13.4 g YNB, 0.4 mg 生物素, 20 g 葡萄糖。参照文献^[3]配制。YNB 具体由十余种成分组成, 包括生长因子微量元素盐等。

SPMD 培养基(Simplified *Pichia* minimal dextrose medium): 每升含有(NH₄)₂SO₄ 10 g, K₂HPO₄·3H₂O 1.7 g, KH₂PO₄ 0.3 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, NaCl 0.2 g, CaCl₂·6H₂O 0.2 g, 生物素 0.4 mg, 葡萄糖 20 g。1 × 10⁵ Pa 灭菌 30 min, 葡萄糖单独灭菌并于使用前加入。必要时添加需要的生长因子或氨基酸等。配制固体培养基时添加 2%琼脂。

2 实验过程与实验结果

2.1 简化基本培养基

在保留 MD 培养基中碳源、氮源和大量元素盐并维持其大致比例的基础上, 逐步减少 YNB 配方中的微量元素盐以及生长因子的种类, 分别以 *P. pastoris* GS115(*his4*)和 KM71(*arg4, his4, aox1::ARG4*)作为实验菌株, 用划线培养的方法, 与在 MD 培养基上的生长情况相对比, 鉴定对 *P. pastoris* 正常生长所必需的成分。

最终确认, 维持 *P. pastoris* 正常生长, 仅需要添加生物素作为生长因子(如图 1 所示)。其他生长因子不必额外添加, 这一点与参考文献^[6]中的描述相符合。微量元素盐也不需要额外添加, 使用去离子水和自来水配制都可以获得较好的效果。根据这些结果, 我们提出了 SPMD 培养基的配方。

配置过程中可能产生少量沉淀, 可能是钙镁或微量元素金属离子的磷酸盐, 琼脂培养基灭菌后可能呈褐色。这些现象均不影响使用。

2.2 进一步简化配制过程

在进行 MD 培养基配制时, 生物素往往采用过滤除菌, 单独加入的方法^[3]。但我们进一步查阅文

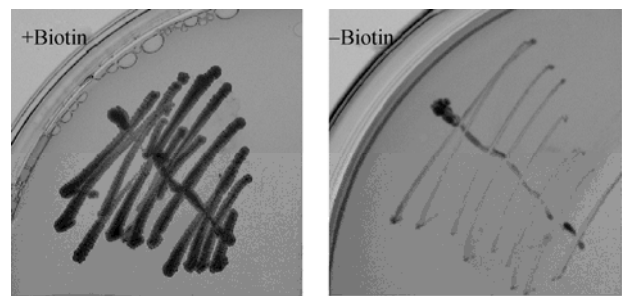


图 1 *P. pastoris* GS115 在 SPMD 培养基平板上的生长情况(均已添加组氨酸)

Fig. 1 The growth condition of *P. pastoris* GS115 on SPMD agar plate with or without biotin (With histidine adding both)

献发现, 生物素在烹饪中对加热是有一定的稳定性的^[7]。因此, 我们尝试将生物素与 SPMD 培养基中的其他成分(除葡萄糖外)一起蒸汽灭菌, 最终验证培养基可以维持 *P. pastoris* 的正常生长, 说明蒸汽灭菌后的生物素损失有限。据此, 我们对配制和灭菌过程进一步进行简化, 仅葡萄糖单独灭菌外, 其他组分常规高压蒸汽灭菌。

2.3 使用 SPMD 培养基用于转化子的筛选实验

质粒 pPIC3.5K 电击转入 GS115 和 KM71 后, 分别使用不含组氨酸的 MD 培养基与 SPMD 培养基筛选原典型转化子。

如表 1 所示, 用限制酶 *Bgl* II 或 *Sal* I 处理后的 pPIC3.5K 转化 *P. pastoris* GS115 和 KM71。同一批次转化, 使用 SPMD 培养基筛选, 转化效率与使用常规的 MD 培养基的转化效率是基本相等的。

3 讨论

根据上述实验结果, SPMD 培养基可以作为 MD 培养基的替代品, 进行转化实验。可以预见, 如果在 SPMD 培养基中添加不同的氨基酸或者核苷酸, 也可以用于营养缺陷性的鉴定筛选等实验。如果使用甲醇代替葡萄糖为碳源, 即成为 SPMM 培养基(Simplified *Pichia* minimal methanol medium), 可以用于 Mut⁺/Mut^S 表型的鉴定。总之, 这种简化的 *P. pastoris* 培养基材料简单、配制方便, 可以用于多种实验, 具有很好的利用价值。

培养基配制时, 我们发现使用去离子水和自来水配制都可以获得较好的效果。自来水中含有的微量杂质不仅无害且有可能成为营养物质被微生物吸收利用。如果进行筛选转化子等要求不是很高的实

表 1 使用 MD 或 SPMD 培养基获得的转化子数和转化效率
Table 1 Count of transformants and transformation efficiency using MD medium or SPMD medium

限制酶-培养基 Restriction endonuclease-medium	菌种 <i>P. pastoris</i> strains	稀释度 Dilution		转化效率 Transformation efficiency (μg^{-1})
		10^0	10^1	
<i>Bgl</i> II - MD	GS115	57, 62	6, 6	2.98×10^2
<i>Bgl</i> II - SPMD	GS115	67, 64	6, 8	3.28×10^2
<i>Sal</i> I - MD	GS115	189, 180	18, 16	9.23×10^2
<i>Sal</i> I - SPMD	GS115	175, 182	12, 15	8.93×10^2
<i>Sal</i> I - MD	KM71	220, 208	23, 19	1.07×10^3
<i>Sal</i> I - SPMD	KM71	221, 216	22, 21	1.09×10^3

注: 2 μg 酶切后的质粒 pPIC3.5K 分别转入 GS115 和 KM71, 获得 1 mL 菌悬液, 取其中 100 μL 细胞悬液涂布于筛选培养基。

Note: 2 μg digested plasmid pPIC3.5K were transformed into GS115 and KM71 separately and got 1 mL whole suspension. 100 μL were spreaded onto selective media.

验, 则可以使用自来水代替去离子水进行培养基的配制, 这一解释与参考文献[8]的描述相符合。但各地的自来水可能会有所不同, 可能需要在正式实施实验之前进行预实验测试。

YNB 中所含多种生长因子和微量元素, 可以满足多种酵母的生长需要。但对于某一特定的酵母菌株来说, 不是每一种生长因子都是必需的。对于其它的酵母菌株, 研究者可以参考本实验的简化思路, 根据不同的需要进行培养基的优化, 也可能获得相应的简化培养基配方, 最终简单工作流程又能降低成本。

致谢: 感谢杨俊杰在实验和写作中提供的指导和帮助。

参 考 文 献

[1] 章如安, 杨 晟, 邱荣德, 等. *P. pastoris* 表达体系研究及进展. 微生物学通报, 2000, 27(5): 371-373.

[2] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22(4): 249-270.

[3] Invitrogen, Ltd. Manual of multi-copy *Pichia* expression kit (version F)[EB/OL].[2008-2-20] http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/pichmulti_man.pdf.

[4] Li DY, Ji XS, Yu J, et al. PCR based cloning and sequence analysis of the *Pichia pastoris* cystathionine beta-synthase gene. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* (Shanghai), 2001, 33(6): 600-606.

[5] 钱存柔. 微生物学实验教程. 第 2 版. 北京: 北京大学出版社, 2008.

[6] 巴尼特 JA, 佩恩 RW, 亚罗 D 著. 胡瑞卿译. 酵母菌的特征与鉴定手册. 青岛: 青岛海洋大学出版社, 1991, pp.158-159.

[7] 邓泽元. 食品营养学. 南京: 东南大学出版社, 2007, p.104.

[8] 赵 斌, 何绍江. 微生物学实验. 北京: 科学出版社, 2002, p.78.

稿件书写规范

论文中计量单位的表示方法

为执行国务院发布的《关于在我国统一实行法定计量单位的命令》的规定, 计量单位和单位符号按国家技术监督局发布的《量和单位》GB3100-3102-93 执行。单位符号均用英文小写(正体), 不允许随便对单位符号进行修饰。现将本刊常用计量单位和符号介绍如下, 希望作者参照执行。

时间: 日用 d; 小时用 h; 分钟用 min; 秒用 s 等表示。

溶液浓度: 用 mol/L, 不用 M (克分子浓度)和 N(当量浓度)等非许用单位表示。

旋转速度: 用 r/min, 不用 rpm。

蒸汽压力: 用 Pa 或 kPa、MPa 表示。

光密度: 用 OD(斜体)表示。

生物大分子的分子量: 蛋白质用 D 或 kD, 核酸用 bp 或 kb 表示。

图表中数值的物理量和单位: 物理量符号采用斜体, 单位用正体并用括号括起, 例如: $t(\text{h})$ (表示时间, 单位是小时)。带数值的计量单位: 计量单位不能省略, 跟数字之间加一空格 (和%除外), 例如: 20 cm \times 0.3 cm, 不能写成 20 \times 0.3 cm; 3 ~5 不可写成 3~5 ; 3%~6%不可写成 3~6%等。

<http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>