



酵母感受态制备试剂盒

Cat.NO. ZC132

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	保存	20T×10支
溶液A	4°C	24ml
溶液B	4°C	20ml
鲑鱼精DNA (10mg/ml)	-20°C	1ml
DMSO	常温	2ml

储存:产品4°C保存。

产品介绍及特点:

本酵母化学感受态细胞制备试剂是一种通过化学处理,高效快速制备酵母化学感受态细胞,用于长期冻存以备后续转化的产品,它具有下列特点:

- 一次制备, -80°C保存,多次使用。
- 操作简单,单溶液制备,除酵母培养的时间外,整个操作只需要30分钟
- 试剂盒含高效转化液,即开即用。
- 得到的感受态细胞的最高转化效率在 $0.2-1 \times 10^5$ 个转化子/ug质粒DNA。
- 适用于各种实验用酵母菌株,包括*S. cerevisiae*、*C. albicans*、*S. pombe*、*Pichia pastoris*等。也可用于携带有选择性质粒的酵母。
- 得到的感受态细胞可即刻转化各种线性或环状酵母穿梭质粒,例如YIp, YRp, YCp, YEp和YAC等。
- 可以用于定点突变 (Site - Directed Mutagenesis)、基因破坏 (Gene Disruption)、等位突变基因修复 (Mutant Allele Recovery)、酵母双杂交系统等实验。

注意事项:

1. 转化效率与很多因素有关,酵母活力是一个重要因素,一般制备酵母感受态的细胞必须是没有经过4°C保存的,活化过的,从培养箱中取出的新鲜酵母。

2. 在制备酵母感受态时,不要超过上述的OD值,要让酵母一直处在生长最旺盛的时期,特别是最后一次培养,OD600的值不要超过0.5。

3. 酵母转化过程中,没有抗生素,极易染菌,所有实验都在超净台中进行,超净台需提前一天用70%酒精棉擦拭,将第二天用到的物品(如,试剂,试管,架子等)都放入超净台,灭菌过夜,每次进入超净台操作时,需用70%酒精棉擦手消毒。

4. 由于酵母生长周期较长,平板一般在培养箱中要放3天左右,所以在倒板时,不可吹得太干,小板晾干10min左右,大板晾干15min左右即可。

5. 有些筛选培养基需要加入3-AT,必须是在培养基冷却到55°C以下才可加入。



操作步骤：（实验前请先阅读注意事项）

A：酵母感受态制备

1. 从平板上或保种管中，挑少许酵母，在YPDA平板上划单克隆30℃培养3天左右；
2. 从平板上挑取单克隆（直径2-3mm）到含有5ml YPDA液体培养基过夜培养；
3. 将培养好的菌液按1:200转接至100ml YPDA培养基中，30℃，200rpm培养直到OD600=0.4-0.5（3-5小时）；
4. 将菌液倒入2个50ml离心管，1500-2000g，室温离心10min，弃上清，每个离心管用10ml灭菌水重悬；
5. 重复步骤4洗涤细胞一次；
6. 弃上清，每管用600ul 溶液A重悬，将两管重悬菌液并入一管，准备进行转化。

注：新鲜制备的酵母感受态细胞转化效率最高

如果短时间内使用，且只转化质粒可直接置于4℃ 5天内使用

如果想长期保存可添加终浓度15%的甘油或8%的DMSO，速冻后置于-80℃保存6个月

B：酵母质粒转化

1. 取100ul感受态细胞分别加入：
质粒DNA 100-500ng
鲑鱼精DNA(变性的，10mg/ml) 5ul（变性条件：水浴煮沸20min，立即插入冰浴2-3min）
轻弹混匀
2. 加入600ul 溶液B，剧烈震荡（能提高转化效率），30℃水浴，30min；
3. 加入70ul DMSO，轻弹混匀（不能震荡），42℃水浴热休克15min，迅速插入冰浴冷却2-3min；
4. 加入800ul液体YPDA培养基，30℃，230rpm，培养90min；
5. 室温14000rpm离心5sec，弃上清，用200ul YPD/无菌水重悬，取100ul涂板在相应的筛选培养基上；
6. 30℃倒置培养3天待菌落长出。