



# 酵母高效化学感受态细胞制备试剂盒

## High Efficient Yeast Chemically Competent Cell Prep Kit

Cat.NO. ZC132

版本号:2018-08-21

### 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	2×1ml

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 / $\mu\text{g}$  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、Y Cp、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, 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, OD<sub>600</sub> 的值不要超过 0.5。如果不需要太高的转化效率, OD<sub>600</sub> 值在 0.4-1.5 均能成功让酵母细胞处于感受态状态, 如果需要较高的转化效率, 建议 OD<sub>600</sub> 为 0.5 时, 进行制备操作, 转化效率最高。
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°C 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°C 200rpm 培养直到  $OD_{600}=0.4-0.5$ （3-5 小时）。

注：以酿酒酵母 AH109 为例，按上述条件 3-5h  $OD_{600}$  即可达到 0.5。

不同的菌株生长速度不一样，其他类型酵母请根据实际情况决定生长时间。

4. 将菌液倒入 2 个 50ml 离心管，1500-2000×g，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 600μl 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°C 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°C 保存 6 个月。

### B: 酵母质粒转化

1. 取 100μl 感受态细胞分别加入：

质粒 DNA 100-500ng；

鲑鱼精 DNA(变性的, 10mg/ml)5μl (变性条件: 水浴煮沸 20min, 立即插入冰浴 2-3min)；  
轻弹混匀。

2. 加入 600μl 溶液 B，剧烈震荡（能提高转化效率），30°C 水浴，30min。
3. 加入 70μl DMSO，轻弹混匀（不能震荡），42°C 水浴热休克 15min，迅速插入冰浴冷却 2-3min。
4. 加入 800μl 液体 YPDA 培养基，30°C 230rpm 振荡培养 90min。
5. 室温 14000rpm 离心 5s，弃上清，用 200μl YPD/ 无菌水重悬，取 100μl 涂板在相应的筛选培养基上。
6. 30°C 倒置培养 3 天待菌落长出。