



快捷型酿酒酵母高效感受态制备试剂盒

EX-Yeast Transformation Kit

Cat.NO. ZC135

版本号:2020-11-10

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	50T (50μl/支)	100T (50μl/支)	200T (50μl/支)
溶液 A (制备液)	25 mL	50 mL	100 mL
溶液 B (冻存液)	2.5 mL	5 mL	10 mL
溶液 C (转化液)	17.5 mL	35 mL	70 mL
说明书	1 份	1 份	1 份
YPD PLUS (自选)	100mL	-20°C保存	

储存:产品 4°C保存。

适用范围:

适用于酿酒酵母类酵母细胞,不适用毕氏酵母及其他类型酵母。

产品说明:

本试剂盒可以完成酵母感受态制备,酵母感受态储存,酵母转化实验。最大优点是能在 -80°C 长期储存酵母感受态细胞,保存 6 个月基本不影响其转化效率。后续酵母转化操作简单而快速,转化效率与常规的酵母转化试剂盒基本相同。如需进一步提高酵母转化效率,可选用本公司的 YPD Plus,转化后复苏酵母菌,转化效率可以增加 50-100%。

(一) 酵母感受态细胞的制备:

1. 菌种活化。-80°C 保存的菌种在固体 YPDA 培养基上四区划线,在 30°C 培养 2-4 天。待酵母单菌落长至 2 mm 长时,接种。

注: 4°C 保存 2 周内的酵母平板可以直接进行挑菌复苏,保存时间越长,酵母的活性越低;不要使用 4°C 保存一个月以上的平板进行实验。

2. 挑取 2mm 酵母单菌落接种到 3 mL 液体 YPDA 培养基中,30°C 过夜培养。

3. 第二天转接到含有 30-50 mL 液体 YPDA 培养基的三角瓶中继续培养,待 OD600 到 0.4-0.5 范围内。收集细胞,3000 g,离心 5 min,去上清。

注: 可用 4°C 保存一个月内的的酵母菌培养产物 3mL 接种 50mL YPDA 培养基过夜培养后,离心收集细胞,用于下游实验。此步可以节约菌种活化,小摇所需的时间。

4. 用 10 mL 的溶液 A 悬浮、洗涤沉淀,3,000 g,离心 5 min,去上清。

5. 沉淀中加入 0.5-1 mL 的溶液 B 悬浮,既获得酵母感受态细胞。按 50 μL 分装于 1.5 mL 无菌冻存管(可直接用于转化)。

6. 将感受态缓慢冷冻后置于 -80°C 冰箱保存。使用时, -80°C 冰箱取出,室温融化后直接用于转化,操作流程见(二)酵母转化。

注意: 缓慢冻存感受态,是保证冻存后的感受态细胞转化效率的关键步骤。建议将感受态细胞放入程序降温盒,或者几层纸包好放入泡沫盒中,再放于 -80°C 冰箱过夜,后将感受态取出置于 -80°C 保存。保存 6 个月基本不影响其转化效率。



(二) 酵母转化:

1. 配制预混液, 每转化一个质粒即一个反应需要 360 μL 的预混液。

溶液 C	350 μL
质粒 (大约 200 ng/ μl)	5 μL (根据质粒的浓度加入相应的体积)
总体积	360 μL (不足体积用 ddH ₂ O 补充)

2. 吸取 360 μL 的预混液加入到感受态细胞中, 用枪头反复吹吸沉淀, 使离心管底的酵母细胞完全悬浮在预混液中。
3. 放置在 30 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅中热激 45-60 min, 每 10 min 混匀一次。对于部分菌种, 延长孵育时间可提高转化效率, 但不要超过 3 个小时。水浴结束后 3,000 g 离心 3 min。
4. 弃掉上清, 用 0.5 mL YPD Plus 重新悬浮, 30 $^{\circ}\text{C}$ 摇床震荡培养 30-60 min。3,000 g 离心 5 min, 弃掉上清。(选做步骤)
5. 沉淀中加入 1 mL 无菌水或 0.9%NaCl 重悬菌体。
6. 分别稀释 10 倍, 100 倍后涂布于相应的缺陷型培养基上。
7. 30 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养 3-5 天直至平板出现酵母克隆。

注意事项:

1. 转化全程要无菌操作, YPD Plus 开封后易染菌, 需 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。
2. 为了保证转化效率, 感受态不宜直接用液氮冻存。
3. 增加酵母质粒的质量可以提高转化效率。

ZOMANBIO