



快捷型毕赤酵母高效感受态制备试剂盒

Pichia pastoris positive clone assay kit

Cat.NO. ZC136

试剂组成	ZC136-1 (20T)	ZC136-2 (100T)
溶液 A1 (制备液)	105 mL	525 mL
溶液 A2 (冻存液)	3 mL	12 mL
溶液 B (转化液)	30 mL	75 mL×2
溶液 C (悬浮液)	25 mL	110 mL
Carrier DNA	250 μ L	1.5 mL
说明书	1 份	1 份

储存: -20 °C 保存, 未开封有效期 24 个月。

适用范围: 适用于毕赤酵母。

使用说明: 本公司使用的离心机 4000rpm 转速 =1660g 离心力, 推荐使用 g 值来参考离心条件。

(一) 酵母感受态细胞的制备:

1. 活化菌种: -80°C 保存的菌种在固体 YPD 培养基平板上划线, 30°C 培养 2-4 天。
2. 选取酵母菌落接种到 10mL 液体 YPD 培养基中, 30°C 摇床过夜培养后将培养物按 1% 的接种量接种到 100mL 液体 YPD 培养基中三角瓶中培养至 OD 值为 0.7-1.0。
注: 每 10mL 菌液可用于一次转化。以下操作步骤适于用于 10 mL 菌液。
3. 4,000rpm 离心 3min 收集菌体沉淀。
4. 加入 5mL 溶液 A1 重悬菌体, 4,000 rpm 离心 3min 收集菌体沉淀。
5. 再加入 100 μ L 溶液 A2 重悬菌体, 转移到无菌 1.5mL 离心管, 即为制备好的感受态细胞, 可直接用于转化或冻存备用。
6. 制备好的感受态细胞需缓慢冷冻后, 再置于 -80°C 冰箱长期保存。将感受态细胞放入程序降温盒, 或用多层纸包裹放入泡沫盒中, 先置于 -80°C 冰箱过夜后, 再取出感受态置于 -80°C 冰箱, 可保存半年使用前冰上解冻或直接用于转化。

注: 缓慢冷冻会保证良好的转化效率。扩大酵母菌培养体积, 相应增加制备剂和冻存液的使用量, 可以一次性制备多支酵母感受态细胞。

(二) 酵母转化:

1. 取 100 μ L 感受态细胞, 依次加入预冷的线性化质粒 2-10 μ g (加入 DNA 的体积不超过 10 μ L, DNA 纯度越高越好), 预变性的 Carrier DNA 10 μ L, 轻轻吸打混匀。
2. 加入 1.4mL 溶液 B 颠倒混匀。30°C 水浴 60min, 每 30 min 翻转 6-8 次混匀。
3. 42°C 水浴 20 min, 每 10 min 颠倒 6-8 次混匀。
4. 4,000rpm 离心 3min 弃上清留菌体沉淀, 加入 1mL 溶液 C 重悬菌体。
5. 4,000rpm 离心 3min 弃上清留菌体沉淀, 加入 100 μ L 溶液 C 重悬菌体。
6. 将 100 μ L 菌液全部涂布到相应的平板培养基, 30°C 恒温培养 3-5 天, 直至平板出现酵母克隆。

注: 初次使用 Carrier DNA, 请把装有 Carrier DNA 的管子在水中煮沸 5min 或使用金属浴 100°C 处理 10min, 然后立即放在冰上, 用后放在 -20°C 储存备用。下次使用前请于冰上解冻 Carrier DNA。反复冻融 3-5 次后需重新变性 Carrier DNA。