



酵母电转感受态细胞制备试剂盒

Yeast Electro Competent Cell Transformation Kit

Cat.NO. ZC137

版本号: 2021-05-28

试剂盒组成、储存、稳定性:

试剂盒组成	20T (50μl/ 支)	100T (50μl/ 支)
溶液 A (制备液)	50 mL	100 mL x2
溶液 B (冻存液)	15 mL	60 mL
说明书	1 份	1 份

储存: 产品 4℃保存。

适用范围:

适用于酿酒酵母, 毕氏酵母, 裂殖酵母电转感受态细胞制备及转化。

产品说明:

1. 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 余分钟。
2. 制备得到的感受态细胞可以 -80℃保存 6 个月, 方便多次使用, 免去每次转化都要新鲜制备感受态细胞。
(暂时未实现, 建议现制现用)
3. 最高转化效率可达到 $0.2-1 \times 10^6$ 个转化子 /ug 质粒 DNA。
4. 得到的感受态细胞可以用各种线性或环状酵母穿梭质粒 DNA 进行转化, 例如 YIp, YRp, YCp, YEp 和 YAC 等。
5. 可以用于酵母双杂交、定点突变(Site - Directed Mutagenesis)、基因破坏(Gene Disruption)、等位突变基因修复(Mutant Allele Recovery) 等实验。

(一) 酵母电转感受态细胞的制备:

1. 菌种活化。 -80℃保存的菌种在固体 YPDA 培养基上四区划线, 在 30℃培养 2-4 天。待酵母单菌落长至 2 mm 长时, 接种。
注: 4℃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℃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℃过夜培养。
3. 第二天转接到含有 50 mL 液体 YPDA 培养基的三角瓶中继续培养, 待 OD600 到 1.0-1.5 左右(相当于 1×10^7 细胞 /mL)。冰上放置 15 分钟。
注: (1). 可用 4℃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。
(2). 不同菌种对应的最适 OD 值有差异, 不同的 OD 会影响最终电转感受态细胞的转化效率; 如有必要可以摸索最适条件。
4. 收集细胞: 4℃ 3000 g, 离心 5 min, 去上清。用 50ml 的冰冷的灭菌水重悬。建议重复洗涤一次;
5. 用 20 mL 冰冷的溶液 A 悬浮、洗涤沉淀; 4℃ 3,000 g, 离心 5 min, 去上清。
6. 沉淀中加入 0.5 mL 冰冷的的溶液 B 悬浮, 既获得酵母感受态细胞。按 50-100 μL 分装于 1.5 mL 无菌冻存管(可直接用于转化)。



说明:按本方法制备 1 管 100ul 酵母电感受态细胞就需要 OD600 达到 1.0 的新鲜酵母培养液 10 mL, 用户需根据制备的酵母感受态细胞数量决定培养细胞的体积, 根据培养体积改变加入溶液 A 的使用量;

7. 将感受态缓慢冷冻后置于 -80℃冰箱保存。使用时, -80℃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℃冰箱过夜, 后将感受态取出置于 -80℃保存。保存 6 个月基本不影响其转化效率。

(二)酵母转化:

1. 在 100uL 的酵母感受态细胞中, 加入 5uL(100ng)的质粒, 混匀。

注:总体积不要超过感受态体积 1/10;

确保质粒或者连接产物的盐离子浓度, 如有必要需要纯化都进行转化;

2. 转移到预冷的电转槽中, 电击。

注:按电击仪的手册设置电击参数并进行电击处理, 各厂家仪器的使用略有不同, 电击杯间距, 感受态使用量, 电击条件等请严格按电击仪厂家

提供的手册进行操作。

伯乐电击仪参考程序:SC2 SC4(酿酒酵母)

Programmed Functions

	Program	Species	Cuvette Size	Preset Conditions
Bacteria	Ec1	Escherichia coli	0.1 cm	1.80 kV, 1 pulse
	Ec2	Escherichia coli	0.2 cm	2.50 kV, 1 pulse
	StA	Staphylococcus aureus	0.2 cm	2.50 kV, 1 pulse, 2.5 ms
	Agr	Agrobacterium tumefaciens	0.1 cm	2.20 kV, 1 pulse
	Ec3	Escherichia coli	0.2 cm	3.00 kV, 1 pulse
Fungi	Sc2	Saccharomyces cerevisiae	0.2 cm	1.50 kV, 1 pulse
	Sc4	Saccharomyces cerevisiae	0.2 cm	3.00 kV, 1 pulse
	ShS	Schizosaccharomyces pombe	0.2 cm	2.00 kV, 1 pulse
	Dic	Dictyostelium discoideum	0.4 cm	1.00 kV, 1 pulse, 1.0 ms
	Pic	Pichia pastoris	0.2 cm	2.00 kV, 1 pulse

Unless the pulse time is truncated below 5 ms, the unit will deliver the optimal time constant of ~5 ms to samples in high-resistance media.

3. 在电转槽中加入 500uL 预冷的溶液 B, 轻柔混匀。

4. 涂布于相应的筛选培养基上, 28-30℃培养 3-5 天。