

超级酵母转化试剂盒 II 型使用说明书

储存条件： 4℃保存，有效期 1 年，YPD Plus 开封后-20℃保存。

产品内容：

Components	SK2402-200	SK2402-20
Y1 溶液（制备液）	100 mL	10 mL
Y2 溶液（冻存液）	10 mL	1 mL
Y3 溶液（转化液）	70 mL	7 mL
YPD Plus	100 mL	10 mL
说明书	1 份	1 份

产品说明：

Coolaber 的超级酵母转化试剂盒 II 型可以完成酵母感受态制备，酵母感受态储存，酵母转化实验。最突出的优点是能储存酵母感受态细胞，可长达一年。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（SK2400）基本相同。如需进一步提高酵母转化效率，可选用 Coolaber 的 YPD Plus（Cat: YT0004），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. 活化菌种。-80℃保存的菌种在固体 YPDA 培养基上划线，在 30℃培养 2-4 天。
2. 挑取酵母单菌落在固体 YPDA 培养基上划 3-5 mm 的短线，在 30℃培养 2-4 天。待酵母单菌落长至 2 mm 长时，接种。
3. 首先把酵母细胞接种到 3 mL 液体 YPDA 培养基中，30℃过夜培养。
4. 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，1,000 g，离心 5 min，去上清。

注意：可用 4℃一周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。

5. 用 10 mL 的 Y1 溶液 悬浮、洗涤沉淀，1,000 g，离心 5 min，去上清。
6. 沉淀中加入 0.5-1 mL 的 Y2 溶液悬浮，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）。
7. 将感受态缓慢冷冻后置于-80℃冰箱保存。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。保存一年基本不影响其转化效率。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。

（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。

Y3 溶液	350 μL
质粒 (大约 200 ng/ μl)	5-10 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 ddH₂O 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。
4. 3,000 g 离心 3 min。
5. 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。
6. 1,000 g 离心 5 min，弃掉上清。沉淀中加入 1 mL 无菌水或 0.9%NaCl 重悬菌体。
7. 分别稀释 10 倍，100 倍后涂布于相应的缺陷型培养基上。
8. 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。

特别推荐： 酵母培养基可选用 Coolaber 产品。

中文名称	产品货号	包装规格
YPD Medium	PM2010-250g/500g	250g/500g
YPDA Medium	PM2011-250g/500g	250g/500g
Minimal SD Base	PM2030-267g	267g
Minimal SD Agar Base	PM2040-467g	467g
Minimal SD Base Gal/Raf	PM2050-185g	185g
Minimal SD Agar Base Gal/Raf	PM2060-270g	270g
D0 Supplement - Ade/ - His/ - Leu/ - Trp	PM2110-20g	20g
D0 Supplement - His	PM2120-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Leu	PM2130-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Leu/ - Met/ - Trp	PM2140-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Leu/ - Trp	PM2150-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Leu/ - Trp/ - Ura	PM2160-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Leu/ - Ura	PM2170-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Trp/ - Ura	PM2180-20g	20g
D0 Supplement - His/ - Ura	PM2190-20g	20g
D0 Supplement - Leu/ - Met/ - Trp	PM2210-20g	20g