

# Super 酵母感受态制备与转化试剂盒 (Plus) 使用说明书

储存条件: -20°C保存, 有效期 2 年。Y3 避免多次冻融; Y1、Y2 溶液 4°C可长期保存。

产品内容:

Components	SK2401-200T	SK2402-200T
Y1 溶液 (制备液)	60 mL×2	SK2401-200T
Y2 溶液 (冻存液)	1 mL×10	
Y3 溶液 (转化液)	20mL×4	
YPD Plus Liquid Medium	-	YT0004-100ml (25mL×4)
说明书		1 份

产品说明:

Coolaber 的 Super 酵母感受态制备与转化试剂盒 (SK2401) 可以完成酵母感受态制备, 酵母感受态冻存, 酵母转化实验。最突出的优点可一次性制备 200 支感受态, -80°C冰箱可冻存一年, 后续酵母转化实验无需重新制备感受态, 操作简单而快速, 该试剂盒的转化效率与经典酵母转化试剂盒 (SK2400) 基本相同。如需进一步提高酵母转化效率, 可选用 Coolaber 的 Super 酵母感受态制备与转化试剂盒 Plus (SK2402) 或单独购买 YPD Plus Liquid Medium (YT0004), 转化产物用 YPD Plus 复苏, 其转化效率可以增加 50-100%。

使用方法:

## (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 YPDA 培养基上划线, 30°C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, 30°C培养 2-4 天。
3. 待酵母单菌落长至 2 mm 长时, 首先把酵母细胞接种到 3 mL 液体 YPDA 培养基中, 30°C过夜培养。
4. 第二天转接到含有 30-50mL 液体 YPDA 培养基的三角瓶中继续培养, 待 OD<sub>600</sub> 到 0.4-0.5 范围内。收集细胞, 1,000 g, 离心 5 min, 去上清。

**注意:** 4°C保存一周之内的酵母菌培养产物, 可用 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 Y2 溶液悬浮, 即感受态细胞。按 50 μL 分装于 1.5 mL 无菌冻存管 (可用于转化)。
7. 将感受态缓慢冷冻后置于-80°C冰箱保存。建议将感受态细胞放入程序降温盒, 或者用多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。保存一年基本不影响其转化效率。使用时, -80°C冰箱取出, 室温融化后用于转化。

**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) 酵母质粒转化：**

1. 配制预混液，每转化一个质粒即一个反应需要 360  $\mu\text{L}$  预混液。

Y3 溶液	350 $\mu\text{L}$
质粒 ( $\approx 200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )	5-10 $\mu\text{L}$ (根据质粒浓度加入相应体积)
总体积	360 $\mu\text{L}$ (不足体积用 ddH <sub>2</sub> O 补充)

2. 吸取 360  $\mu\text{L}$  预混液加入感受态细胞中，用枪头反复吹吸沉淀，使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 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 小时。
4. 3000 g 离心 3 min，弃上清。
5. (可选步骤): 用 1 mL YPD Plus Liquid Medium 重新悬浮，30 $^{\circ}\text{C}$  摇床震荡培养 30-60 min。
6. 3000 g 离心 3 min，弃上清。
7. 加入 400  $\mu\text{L}$  无菌去离子水或 0.9%氯化钠溶液重悬菌体。
8. 将重悬的菌体涂到相应的酵母筛选培养基平板上，30 $^{\circ}\text{C}$  培养 2-4 天。

## **(三) 酵母文库转化：**

1. 配制预混液，用于文库转化 (需用 15-50mL 的离心管)。

Y3 溶液	2450 $\mu\text{L}$
文库质粒	5-15 $\mu\text{g}$
总体积	2520 $\mu\text{L}$ (不足体积用 ddH <sub>2</sub> O 补充)

2. 将上述预混液加入到 600  $\mu\text{L}$  感受态细胞沉淀中，震荡使感受态细胞充分重悬。
3. 放置在 30  $^{\circ}\text{C}$  的水浴锅中热激 90 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 小时。
4. 3000 g 离心 3 min，弃上清。
5. (可选步骤: 用 3 mL YPD Plus Liquid Medium 重新悬浮，30 $^{\circ}\text{C}$  摇床震荡培养 90 min。)
6. 3000 g 离心 3 min，弃上清。
7. 加入 15 mL 无菌去离子水或 0.9%氯化钠溶液重悬菌体。
8. 将重悬的菌体涂到相应的酵母筛选培养基平板上，30 $^{\circ}\text{C}$  培养 2-4 天。

### **注意事项：**

1. 转化全程要求无菌操作。
2. 为了保证转化效率，感受态不宜直接用液氮冻存。
3. 增加酵母质粒的纯度和浓度可以提高转化效率。

注：更多筛选培养基及相关产品详见 [www.coolaber.com](http://www.coolaber.com)