

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, 未开封有效期 24 个月。Y3 避免多次冻融; Y1、Y2 溶液可 2-8 °C保存。

产品内容:

Components	SK2401-200T	SK2402-200T
Y1 溶液 (制备液)	50 mL× 2	SK2401-200T
Y2 溶液 (冻存液)	5 mL× 2	
Y3 溶液 (转化液)	20 mL× 4	
YPD Plus Liquid Medium	-	YT0004-100 mL
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) 可以完成酿酒酵母感受态制备, 感受态冻存, 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, 其转化效率可以提高 50-100%。

使用方法:

感受态细胞的制备: (按小体积转化制备 20 支感受态计, 可按比例扩大)

1. 活化菌种。-80 °C保存的菌种在 YPDA 培养基平板上划线, 30 °C培养 2-4 天。
2. 挑取酵母单菌落在 YPDA 培养基平板上划 3-5 mm 的短线, 30 °C培养 2-4 天。
3. 待酵母单菌落直径长至 2 mm 时, 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 50 mL 液体 YPDA 培养基的三角瓶中继续培养, 待 OD₆₀₀ 达到 0.4-0.5, 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。(4 °C保存 1 周内的酵母菌液, 用 3 mL 接种 50 mL YPDA 培养基过夜培养)
5. 用 10 mL Y1 溶液重悬沉淀, 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。
6. 加入 1 mL Y2 溶液重悬, 按 50 μL 分装于 1.5 mL 无菌冻存管, 转文库按 600 μL 分装, 感受态细胞即制备完毕, 可直接用于转化。
7. 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，可保存一年。使用前室温融化后用于转化。

转化预混液配制：

成分	质粒转化预混液	文库转化预混液
Y3 溶液	350 μL	2450 μL
质粒	5-10 μL ($\approx 200 \text{ ng}/\mu\text{L}$)	5-15 μg (文库质粒)
总体积	360 μL (ddH ₂ O 补足体积)	2520 μL (ddH ₂ O 补足体积)

酵母质粒转化：

1. 吸取 360 μL 预混液加入 50 μL 感受态细胞中，反复吹吸沉淀，使酵母细胞完全悬浮于预混液中。
2. 30 °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。
3. 12,000 rpm 离心 15 s，弃上清。
4. (可选步骤) 用 1 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30 °C 摇床震荡培养 30-60 min。12000 rpm 离心 15 s，弃上清。
5. 加入 400 μL 无菌去离子水或 0.9% 氯化钠溶液重悬菌体，涂筛选培养基平板，30 °C 培养 2-4 天。

酵母文库转化：(需用 15-50 mL 离心管)

1. 将 2450 μL 预混液加入到 600 μL 感受态细胞中，震荡使感受态细胞充分悬浮于预混液中。
2. 30 °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。
3. 3000 rpm 离心 5 min，弃上清。
4. (可选步骤) 用 3 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30 °C 摇床震荡培养 90 min，3000 rpm 离心 5 min，弃上清。
5. 加入 15 mL 无菌去离子水或 0.9% 氯化钠溶液重悬菌体，涂筛选培养基平板，30 °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，务必缓慢冻存感受态，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。