

经典酵母转化试剂盒 使用说明书

储存条件: Carrier DNA -20 °C保存, 其它组分可室温保存, 未开封有效期 24 个月。

产品内容:

Components	SK2400-200T
PEG Solution	50 mL
10 × LiAc Solution	50 mL
Carrier DNA	1 mL × 2
说明书	1 份

产品说明:

Coolaber 出品的经典酵母转化试剂盒主要用于酿酒酵母质粒转化实验, 该试剂盒遵循广大用户的使用习惯, 分别提供 PEG、LiAc 和 Carrier DNA 溶液, PEG、LiAc 均经过滤除菌, Carrier DNA 经特殊优化处理, 更有助于提高质粒 DNA 的转化效率。该试剂盒可根据实际需要灵活配制 1 × LiAc 溶液和转化预混液, 既方便使用, 又经济实惠。

感受态细胞制备:

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. 待酵母单菌落长至直径 2 mm 时, 把酵母细胞接种到 3 mL YPDA 液体培养基中, 30 °C过夜培养。
4. 第二天转接到含有 30-50 mL YPDA 液体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。
5. 沉淀用 30-50 mL 的无菌的去离子水悬浮。3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。
6. 沉淀用 1.5 mL 1 × LiAc (150 μL 10 × LiAc Solution 加 1350 μL 无菌水)重悬后转移至 1.5 mL 离心管中, 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清。

注意: 10 × LiAc Solution 经过 pH 缓冲, 无需添加 TE 作为缓冲剂。

7. 加入 1 mL 1 × LiAc 重悬, 小体积转化按照每管 100 μL 分装, 用于文库转化不分装。
8. 3000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 感受态细胞即制备完毕。

注意: 制备好的感受态最好立即使用, 在第 8 步离心前, 室温放置不应超过 5 小时。

转化预混液配制:

成分	质粒转化预混液	文库转化预混液
PEG Solution	240 μ L	1680 μ L
10 \times LiAc Solution	36 μ L	252 μ L
Carrier DNA	10 μ L	40 μ L
质粒	5 μ L (\approx 200 ng/ μ L)	5-15 μ g (文库质粒)
总体积	360 μ L (ddH ₂ O 补足体积)	2520 μ L (ddH ₂ O 补足体积)

酵母质粒转化:

1. 将 360 μ L 预混液加入 1 支感受态细胞中，反复吹吸沉淀，使酵母细胞彻底悬浮于预混液中。
2. 30 $^{\circ}$ C 的水浴锅中孵育 30 min，每 10 min 混匀一次。
3. (加入 20 μ L DMSO，可选) 42 $^{\circ}$ C 的水浴锅中热击 30 min，每 10 min 混匀一次。
4. 12000 rpm 离心 15 s，弃上清液。
5. (可选步骤) 用 1 mL YPD Plus Liquid Medium 重新悬浮，30 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 30-60 min。12000 rpm 离心 15 s，弃上清液。
6. 加入 0.1-1 mL 无菌去离子水或 0.9% 氯化钠溶液重悬沉淀，涂筛选培养基平板，30 $^{\circ}$ C 培养 2-4 天。

酵母文库转化: (需用 15-50 mL 离心管)

1. 将 2520 μ L 预混液加入到感受态细胞 (未分装) 沉淀中，震荡使感受态细胞充分重悬。
2. 放置在 30 $^{\circ}$ C 的水浴锅中孵育 50 min，每 10 min 混匀一次。
3. (加入 160 μ L DMSO，可选) 放置在 42 $^{\circ}$ C 的水浴锅中热击 30 min，每 10 min 混匀一次。
4. 3000 rpm 离心 5 min，弃上清液。
5. (可选步骤) 用 3 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30 $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 90 min，3000 rpm 离心 5 min，弃上清液。
6. 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 (50 个平板左右)，30 $^{\circ}$ C 培养 2-4 天。

注意事项:

1. 转化全程需无菌操作。
2. 初次使用 Carrier DNA，请把装有 Carrier DNA 的管子在沸水中煮沸 5 min，然后立即放在冰上，用后 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。下次使用前在冰上解冻 Carrier DNA。反复冻融 3-5 次后需重新变性 Carrier DNA。
3. PEG 溶液在低温环境下会析出，请于常温环境下完全溶解后使用。
4. 根据质粒浓度增减体积，增加酵母质粒的纯度和浓度可以提高转化效率。