

酿酒酵母感受态制作/转化试剂盒说明书

- 产品规格 (CAT#: YCK1010S, 50T; YCK1010M, 200T)

- 产品组分:

包装名称	YCK1010S	包装数量	YCK1010M	包装数量	保存
1.1XTE/LiAc Solution	50ml	1 瓶	200ml	1 瓶	4°C/24 个月
TE/LiAc 储存液	5ml	1 瓶	20ml	1 瓶	4°C/24 个月
PEG/LiAc Solution	25ml	1 瓶	100ml	1 瓶	4°C/24 个月
Carrier DNA (鲑鱼精 DNA 10mg/mL)	0.5ml	1 管	1ml	2 管	-20°C/2 年
DMSO (过滤除菌)	1.5ml	1 管	5ml	1 瓶	4°C/24 个月
0.9% (w/v) NaCl Solution	15ml	1 瓶	50ml	1 瓶	4°C/24 个月

- 产品说明

酿酒酵母感受态制作/转化试剂盒提供了制作和转化酵母感受态的六种试剂：1.1XTE/LiAc Solution、TE/LiAc 储存液、PEG/LiAc Solution、Carrier DNA、DMSO（过滤除菌）、0.9% (w/v) NaCl Solution；客户需要准备 YPDA 营养液和酵母菌种平板。本试剂盒适用于 AH109、Y187、Y2HGold、Y1HGold、EGY48、NMY51、INVSC1、R5421、Mav203 等几乎所有酿酒酵母感受态的制作和转化。1.1XTE/LiAc Solution 是一种制作酿酒酵母感受态的 buffer，TE 起缓冲液的作用，提供稳定的 PH 值环境，LiAc 可使酵母细胞处于一种短暂的感受状态，此时酵母能够摄取外源 DNA；DMSO 可以保护感受态细胞，提高热激后酵母细胞的成活率；PEG/LiAc 和 Carrier DNA 用于酵母感受态的转化试验。使用唯地生物的酿酒酵母感受态制作/转化试剂盒制作酵母感受态细胞，用 pGADT7 质粒检测转化效率可达 10^4 - 10^6 cfu/ μ g DNA。

- 操作方法

一、感受态制作方法

1. 酵母菌种在 YPDA（唯地货号：YM1020S）平板上划线，挑新鲜的单菌落到 3ml YPDA Broth（唯地货号：YM1020L、用 50ml 离心管）中 30 度，250rpm 摇菌 12-24h，OD600>2.0 即可。
2. 按 2% 的比列接菌到 100ml YPDA Broth（用 500ml 三角瓶）中，30 度，250rpm 摇菌到 OD600=0.4-1.0，提高酵母细胞浓度可增加转化效率，为了提高菌体浓度可将菌液浓度提高到 OD600=1.5。
3. 室温 700-1000g，5min 离心收集菌体，弃上清，用 50ml 无菌 ddH₂O 重悬。
4. 室温 700-1000g，5min 离心收集菌体，弃上清，插入冰中，用 5-10ml 4°C 预冷的 1.1 XTE/liAc 重悬，插入冰中静置 5min。1500g，30S 离心，弃上清，用 0.6ml TE/LiAc 储存液重悬，此时可以用来转化酵母文库；也可用 1ml TE/LiAc 储存液重悬，分装 10-20 支感受态，此时可插入冰中直接转化酵母质粒，也可放入 -80 度超低温冰箱长期保存。

二、感受态转化方法

1. Carrier DNA 在每次使用前要通过加热处理使其变性为单链状态，步骤如下：取一管（1.5ml 离心管、体积小于 200ul）Carrier DNA 放 95°C 水浴或金属浴 3 min，快速插入冰中，静置 3 min 以上。

	酵母文库质粒	普通酵母质粒
2.准备不同大小的离心管，插入冰中-----	15ml 离心管	1.5ml 离心管
依次加入预冷的目的质粒-----	5-15ug	0.1-2ug
Carrier DNA -----	40 μ l	5-10 μ l
酵母感受态-----	0.6ml	50-100ul
PEG/LiAc-----	2.5ml	250-500 μ l
吹打几次混匀，30°C水浴-----	45 min	30 min
(文库质粒每隔 15min 翻转 6-8 次混匀一次；普通质粒每隔 10min 翻转 6-8 次混匀一次。)		
3.加入无菌的 DMSO-----	80ul	10ul
4.将管放 42°C水浴-----	20min	15min
(文库质粒每隔 10min 翻转 6-8 次混匀一次；普通质粒每隔 7.5min 翻转 6-8 次混匀一次。)		
5. (可选步骤) 4000 rpm 离心 40s 弃上清，加入 2XYPD 或 YPD Plus 重悬--	3ml	1ml
30°C，200rpm 摇菌 1.5h。离心 30s 弃上清。		
6.加入 0.9% (w/v) NaCl 重悬，涂板，30°C培养 48-120 h-----	5-10ml	0.05ml

● 注意事项

1. 制作不同数量的感受态，按比例使用各种试剂，本试剂盒可制作 100ul/支感受态 200 支，50ul/支感受态 400 支。
2. 100ul/支感受态转化时需加入 carrier DNA 10ul、PEG/LiAc 500ul；50ul/支感受态需加入 carrier DNA 5ul、PEG/LiAc 250ul
3. 此种方法制作的酵母感受态可在-80 度长期保存。
4. 不开封的试剂盒各组分可保存两年，开封后若发现染菌，停止使用。