

## 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 OD<sub>600</sub> 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。

- 加入 1 mL Y2 溶液重悬，按 50  $\mu$ L 分装于 1.5 mL 无菌冻存管，转文库按 600  $\mu$ L 分装，感受态细胞即制备完毕，可直接用于转化。
- 制备好的感受态细胞需缓慢冷冻后，再置于 -80  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C 冰箱过夜后，再取出感受态置于 -80  $^{\circ}$ 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 $\mu$ L	2520 $\mu$ L
质粒	5-10 $\mu$ L ( $\approx$ 200 ng/ $\mu$ L)	5-15 $\mu$ g (文库质粒)
总体积	360 $\mu$ L (ddH <sub>2</sub> O 补足体积)	2592 $\mu$ L (ddH <sub>2</sub> O 补足体积)

**酵母质粒转化：**

- 吸取 360  $\mu$ L 预混液加入 50  $\mu$ L 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。
- 30  $^{\circ}$ 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。
- 12,000 rpm 离心 15 s，弃上清。
- (可选步骤) 用 0.5 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30  $^{\circ}$ C 摇床震荡培养 30-60 min。12000 rpm 离心 15 s，弃上清。
- 加入 400  $\mu$ L 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  $^{\circ}$ C 培养 2-4 天。

**酵母文库转化：** (需用 15-50 mL 离心管)

- 将 2592  $\mu$ L 预混液加入到 600  $\mu$ L 感受态细胞中，震荡使感受态细胞充分悬浮于预混液中。
- 30  $^{\circ}$ 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。
- 3000 rpm 离心 5 min，弃上清。
- (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。
- 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  $^{\circ}$ 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。