

酿酒酵母感受态制备及转化试剂盒

储存条件：

Carrier DNA -20℃保存，YPD Plus 4℃保存，其他室温保存，有效期 1 年

| Component | PT1183-200T |
|------------------|-------------|
| TE/LiAc 酵母感受态制备液 | 30 ml |
| PEG/LiAc 酵母转化液 | 100 ml |
| Carrier DNA | 1 ml |
| YPD Plus (送) | 50 ml |
| 说明书 | 1 份 |

酵母感受态细胞的制备：

1. 活化菌种。-80℃保存的菌种在 YPDA 固体培养基上划线，30℃培养 2-4d。
2. 挑取酵母单菌落接种到 3ml YPDA 液体培养基中，30℃过夜培养。
3. 第二天转接到含有 30ml YPDA 液体培养基的三角瓶中继续培养，等到 OD600 到 0.5-0.6 范围内。收集细胞，4000rpm，离心 5min，去上清。
4. 沉淀用 30-50ml 的无菌的去离子水悬浮。4000rpm，离心 5min，去上清。
5. 沉淀用 300μl 的 TE/LiAc 酵母感受态制备液悬浮。
(每 30ml 的酵母菌对应 300μl TE/LiAc 酵母感受态制备液)。
6. 把酵母细胞悬浮液分装到 1.5ml 离心管中，每管分装 100μl，用于转化一个质粒即一个反应。感受态细胞应现做现用或于 4℃放置不超过 12h。

酵母转化：

1. 取一支无菌的 1.5ml EP 管，依次加入目的质粒 1-3 μ g，Carrier DNA 5 μ l，100 μ l 感受态细胞，PEG/LiAc 酵母转化液 500 μ l，轻轻翻转混匀 6-8 次；
(文库转化对应：文库质粒：10 μ g，Carrier DNA：20 μ l，诱饵感受态细胞：600 μ l，PEG/LiAc 酵母转化液：3ml)
2. 30 $^{\circ}$ C 水浴 30min，每 10min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
3. 每支加入 20 μ l 的二甲基亚砷；(文库转化对应：二甲基亚砷：160 μ l)
4. 42 $^{\circ}$ C 水浴 15min，每 5min 轻轻翻转混匀 6-8 次；
5. 12000rpm 瞬时离心弃上清，每支加入 1ml 的 YPD Plus 于 30 $^{\circ}$ C，200rpm 复苏 1h；(文库转化对应：YPD Plus：3ml)
6. 12000rpm 瞬时离心弃上清，用 100 μ l 0.9% NaCl 重悬，涂板，30 $^{\circ}$ C 培养 48-96h。

注意事项：

1. YPDA 固体培养基配制时加入 2% 的 Agar。
2. 每次使用 Carrier DNA 前，请把装有 Carrier DNA 的管子在沸水中煮沸 5min，然后立即放在冰上，用后放在 -20 $^{\circ}$ C 储存备用。
3. 全程均要无菌操作。
4. 12000rpm 瞬时离心指离心速度升到 12000rpm 时立即停止离心。