

## 酿酒酵母感受态制备及转化试剂盒（冻存型）

### 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-DC
TE/LiAc 冻存酵母感受态制备液	20 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 冻存酵母感受态制备液悬浮。  
(每 30ml 的酵母菌对应 300μl TE/LiAc 冻存酵母感受态制备液)。
6. 把酵母细胞悬浮液分装到 1.5ml 离心管中，每管分装 100μl，直接于-80℃冷冻保存或直接使用。该感受态可于-80℃长期保存，建议 3 个月内使用。

## 酵母转化：

1. 取一支无菌的 1.5ml EP 管，依次加入预冷的目的质粒 1-3 $\mu$ g, Carrier DNA 5 $\mu$ l, 100 $\mu$ l 冰上融化的感受态细胞, PEG/LiAc 酵母转化液 500 $\mu$ l, 轻轻翻转混匀 6-8 次;
2. 30 $^{\circ}$ C 水浴 30min, 每 10min 轻轻翻转混匀 6-8 次;
3. 每支加入 20 $\mu$ l 的二甲基亚砷;
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;
6. 12000rpm 瞬时离心弃上清, 用 100 $\mu$ l 0.9% NaCl 重悬, 涂板, 30 $^{\circ}$ C 培养 48-96h。

## 注意事项:

1. 制备好的可冻存酵母感受态直接放在-80 $^{\circ}$ C 缓慢冷冻保存即可, 不需要液氮速冻, 切忌反复冻存;
2. YPDA 固体培养基配制时加入 2%的 Agar。
3. 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。
4. 全程均要无菌操作。
5. 12000rpm 瞬时离心指离心速度升到 12000rpm 时立即停止离心。