

## 酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D0310S	酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	50次
D0310M	酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	250次

### 产品简介:

- 碧云天生产的酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒(Competent Cell Preparation and Transformation Kit for *Saccharomyces Cerevisiae*)是一种快速、便捷、高效地制备高活性酿酒酵母感受态细胞并进行质粒转化的试剂盒。本试剂盒提供了感受态制备和转化除培养基以外所需的几乎全部试剂, 无须稀释和配制, 操作简单快捷, 酵母完成培养后30分钟内即可完成感受态细胞的制备, 可以用于酵母杂交实验以及酵母文库构建实验。进行酿酒酵母转化时, 使用试剂盒中提供的缓冲溶液培养酵母细胞, 使其处于待转化状态, 然后将感受态细胞与待转化的质粒DNA和Carrier DNA混合再使用转化溶液孵育进行转化。Carrier DNA是短的线形单链DNA, 在酵母细胞摄取外源质粒DNA过程中能促进质粒进入酵母细胞, 还可以保护质粒免于被DNA酶降解。
- 酿酒酵母是单细胞真核微生物, 属于酵母属(*Saccharomyces*)酿酒酵母种(*Saccharomyces cerevisiae*)。酿酒酵母是一种被广泛研究和使用的真核生物模型, 基因组约 $1.2 \times 10^7$ bp, 细胞核内含有16条染色体, 约6000个ORF, 仅4%的酵母基因有内含子, 遗传背景简单[1]。酿酒酵母具有类似原核生物的生长特性, 便于培养和进行遗传操作, 是一种模式真核生物, 被称为真核生物的“大肠杆菌”。酿酒酵母能够以单倍体状态存在, 更容易进行基因型表型分析, 以及高效的同源重组, 从而可以轻松编辑基因组序列, 进行高通量遗传分析。酿酒酵母表达系统表达外源基因时具有一定的翻译后加工能力, 收获的外源蛋白质在一定程度上进行了折叠加工和糖基化修饰, 有利于保持蛋白的活性和稳定性, 并且外源基因可在酿酒酵母中可以分泌表达, 表达产物分泌至胞外不仅有利于纯化, 还避免了产物在胞内大量蓄积[2]。
- 在酿酒酵母转化时可以根据菌株的营养缺陷型突变选择适当质粒。一般来说, 如果缺少特定的培养基成分(氨基酸、嘌呤或嘧啶), 突变菌株无法生长, 使用与菌株突变基因互补的质粒可以使转化子在缺乏特定成分的培养基上生长。通常, 转化 $1\mu\text{g}$ 质粒可产生 $>10^3$ 个转化子, 不同酿酒酵母菌株的转化效率会有所不同。
- 使用碧云天生产的酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒的转化效果请参考图1。

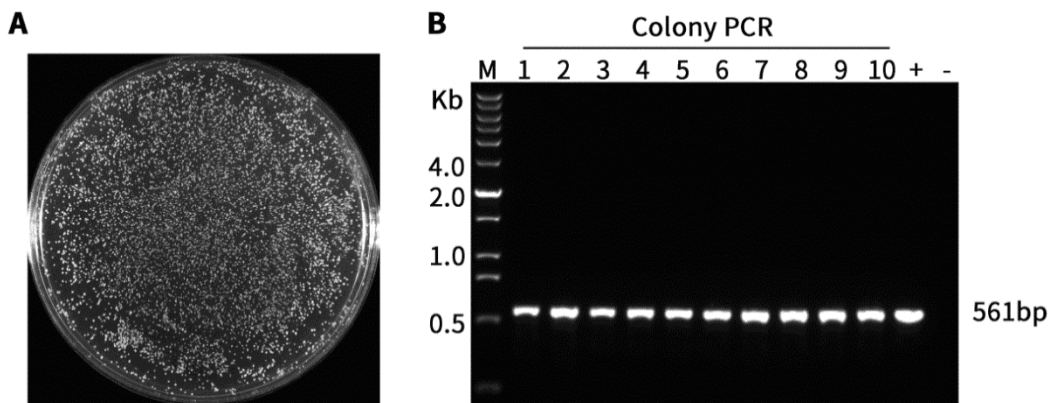


图1. 碧云天酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒(D0310)的转化效果图。A. 使用碧云天酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒(D0310)制备的酿酒酵母INVSc1感受态细胞转化pGAL1,10- $\alpha$  factor-MCS-His-MCS-Flag-URA载体(D2892)培养48小时后的平板。B. 图A中的菌落使用碧云天D7279 酵母菌落PCR试剂盒(酶解法)进行菌落PCR后的电泳图。将 $1\mu\text{g}$ 质粒DNA和 $10\mu\text{l}$ 加热变性的Carrier DNA吹打混匀后加入到使用本试剂盒制备的 $100\mu\text{l}$ 感受态细胞中, 用手指轻弹管底混匀; 加入 $600\mu\text{l}$  Buffer C,  $30^\circ\text{C}$ 水浴孵育30分钟。孵育结束后加入 $70\mu\text{l}$  DMSO, 轻轻上下颠倒混匀,  $42^\circ\text{C}$ 水浴孵育15分钟, 随后立即置于冰浴孵育3-5分钟。室温约 $12000-14000g$ 离心10秒, 弃上清, 轻缓加入 $100\mu\text{l}$  Buffer A并重悬菌体, 最后全部涂布于不含Uracil的营养缺陷型培养基平板,  $30^\circ\text{C}$ 倒置培养2-3天, 直至出现单菌落。随后用碧云天D7279 酵母菌落PCR试剂盒(酶解法)进行PCR验证。561bp是目的基因片段的扩增条带。M, DNA Ladder (D0110)。1-10, 实验组(PCR模板为酵母单菌落裂解后的菌液), +, 阳性对照; -, 阴性对照。本产品的实际使用效果会因实验条件、实验材料等的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 本试剂盒可以分多次使用, 小包装和中包装分别可以制备并用于足够进行50次和250次转化的感受态细胞。

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D0310S-1	Buffer A	105ml

D0310S-2	Buffer B	5ml
D0310S-3	Buffer C	30ml
D0310S-4	Carrier DNA	500 $\mu$ l
D0310S-5	DMSO	3.6ml
—	说明书	1份

产品编号	产品名称	包装
D0310M-1	Buffer A	525ml
D0310M-2	Buffer B	25ml
D0310M-3	Buffer C	150ml
D0310M-4	Carrier DNA	2.5ml
D0310M-5	DMSO	18ml
—	说明书	1份

### 保存条件：

-20°C保存，至少一年有效。除Carrier DNA外，4°C保存，3个月有效。DMSO也可以室温保存。

### 注意事项：

- 使用Carrier DNA时，可根据转化数量，取出所需用量的Carrier DNA在100°C加热15分钟，然后立即置于冰浴，15分钟后即可使用。使用后的多余量可以在-20°C储存，下次使用时解冻Carrier DNA并再次煮沸变性。如果每次的使用量很小，可以适当分装后再使用，避免反复冻融。加热处理可以使Carrier DNA变短并变性为单链，而加热后立即置于冰浴可以保持单链状态。Carrier DNA不建议全部一次性进行100°C加热15分钟处理，多次处理后可能会导致Carrier DNA变得过短。
- 待转化样品的体积通常不宜过大，样品体积过大会导致转化效率下降。
- 感受态细胞对于温度变化非常敏感，需要避免出现不应有的使用说明之外的温度变化。
- 感受态细胞对于机械力非常敏感。加入待转化样品时应轻柔操作，不能使用移液器吹打混匀。
- 通常建议取部分样品进行转化，万一遇到转化失败的情况，还留有样品可以再次进行转化。
- 本试剂盒各组份均经无菌处理，使用时请在超净台中操作，使用完毕注意密封保存，避免污染。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

### 使用说明：

#### 1. 菌种活化：

取-80°C保存的酿酒酵母甘油菌在YPD平板培养基上划线，30°C倒置培养2-4天以活化菌种。

#### 2. 接种：

使用接种环或无菌吸头挑取一个新鲜的酵母单菌落接种到10ml YPD液体培养基中。

#### 3. 培养：

28-30°C, 250rpm培养过夜。

#### 4. 再接种培养：

将过夜培养的菌液转接至50ml YPD液体培养基中培养，使其起始OD<sub>600</sub>介于0.2-0.3之间。30°C, 250-300rpm培养2-3小时，使OD<sub>600</sub>达到0.4-0.6。注：每10ml菌液可制备4管100 $\mu$ l的感受态。以下操作步骤适用于10ml菌液，感受态具体用量可根据实际情况进行制备。

#### 5. 制备感受态细胞：

- a. 当新鲜培养的菌液OD<sub>600</sub>达到0.4-0.6时，室温3000 $\times$ g离心3分钟，弃上清，保留菌体。
- b. 取7ml Buffer A充分重悬离心收集的菌体，室温3000 $\times$ g离心3分钟弃上清，保留菌体。
- c. 取400 $\mu$ l Buffer B重悬菌体，室温孵育10分钟。孵育10分钟结束后，酵母感受态细胞就制备完毕了，后续就可以按照100 $\mu$ l每管分装于1.5ml无菌离心管中并进行酵母感受态细胞的转化了。注：制备好的感受态最好立即使用；也可以在4°C下保存1周，但是效果会逐渐下降；或者可以添加甘油至终浓度至15%并混匀，随后冻存于-80°C冰箱，至少3个月内有效。

#### 6. 酿酒酵母转化：

- a. 将0.1-1 $\mu$ g质粒DNA和10 $\mu$ l加热变性的Carrier DNA吹打混匀后加入到100 $\mu$ l感受态细胞中并用手轻弹混匀。
- b. 加入600 $\mu$ l Buffer C溶液，上下颠倒混匀。在30°C的水浴孵育30分钟。
- c. 上一步骤结束后加入70 $\mu$ l DMSO，轻轻上下颠倒混匀，在42°C的水浴孵育15分钟，随后立即置于冰浴孵育3-5分钟。
- d. 室温12000-14000g离心10秒，弃上清，用100 $\mu$ l Buffer A重悬菌体。
- e. 将重悬的菌液全部涂布于相应的筛选培养基平板，30°C倒置培养2-3天，直至出现单个菌落。

### 常见问题：

#### 1. 转化效率低的影响因素。

- a. 酿酒酵母的转化效率会因为菌株差异以及细胞生长条件而变化。

- b. 使用高纯的质粒有助于提高转化效率，并且不同载体的转化效率也会有所差异。
- c. 42°C水浴孵育前加入DMSO将使转化效率提高2至5倍。

参考文献：

1. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, et al. Science. 1996. 274(5287):546, 563-7.
2. Bussineau CM, Shuster JR. Dev Biol Stand. 1994. 83:13-9.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
D0308S	毕赤酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	50次
D0308M	毕赤酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	250次
D0310S	酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	50次
D0310M	酿酒酵母感受态细胞制备及转化试剂盒	250次
D7278S	酵母菌落PCR试剂盒(碱裂解法)	100次
D7278M	酵母菌落PCR试剂盒(碱裂解法)	500次
D7279S	酵母菌落PCR试剂盒(酶解法)	100次
D7279M	酵母菌落PCR试剂盒(酶解法)	500次
ST961-5L	BeyoPure™ YPD Broth (premixed powder)	10×500ml
ST963-5L	BeyoPure™ YPD Broth with Agar (premixed powder)	10×500ml
ST965-500ml	BeyoPure™ YPD Broth (YPD肉汤培养基)	500ml

Version 2024.03.07