

酵母转化试剂盒

货号: YT0010

存储条件: E、F 组分-20 保存, 其他组分常温保存

产品说明

酵母转化试剂盒提供了一种高效的聚乙二醇(PEG)/ LiAc 为基础的方法来制备和转化活性酵母细胞, 本试剂盒可以用于任何酵母的转化实验。本试剂盒提供了比许多其他常用方法更高和更可靠的转化效率。库包含的克隆越多, 就越有可能发现罕见的和潜在的新的互作。本试剂盒可最多进行 50 次小规模酵母转化或者 15 次文库的转化。

产品组分:

货号	名称	规格
YT0010-A	1M 醋酸锂溶液	50ml
YT0010-B	50% PEG3350 溶液	2*50ml
YT0010-C	YPD Plus 培养基 干粉	5g
YT0010-D	10*TE buffer	50ml
YT0010-E	10 mg/ml 鲑鱼精 DNA (已变性处理)	1ml
YT0010-F	pGBT9 (positive control plasmid), 0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	20ul

实验前试剂准备:

1.1X TE/醋酸锂 溶液配置:

转化前使用试剂盒提供的原液配置溶液 (现用现配): 将 1.1ml 10*TE buffer 和 1.1ml 1M 醋酸锂溶液混合, 用无菌去离子水定容到 10ml。

PEG 醋酸锂 溶液配置:

用试剂盒提供的储存液配置溶液 (现用现配): 取 8ml 50% PEG3350 溶液 (终浓度 40%)、1ml 10*TE buffer、1ml 1M 醋酸锂溶液, 混合均匀。

0.9% (w/v) 氯化钠溶液:

取 0.9g 氯化钠溶于去离子水中, 过滤除菌。

自备: DMSO

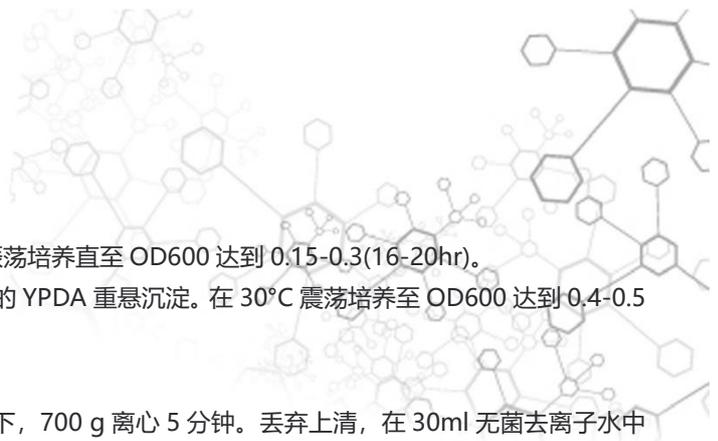
实验步骤:

一、感受态细胞的制备

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. 待酵母单菌落长至直径 2-3 mm 时, 把酵母细胞接种到 15ml 无菌培养管中的 3 mL YPDA 液体培养基中, 在 30 °C 下以 250 rpm 摇匀孵育 8-12 小时。

注: 设置四组单独的 3ml 培养管分别接种 4 个单独的酵母菌落, 选择其中生长最快的一组进行培养, 实验表明生长快的菌落往往会有更高的转化效率。





4. 将 5 μ l 菌液转移到含有 50 ml YPDA 的 250ml 培养瓶。振荡培养直至 OD600 达到 0.15-0.3(16-20hr)。
5. 在室温下, 700 g 离心 5 分钟。丢弃上清, 用 100 ml 新鲜的 YPDA 重悬沉淀。在 30°C 震荡培养至 OD600 达到 0.4-0.5 (3-5hr)

注: 培养直达到 OD 值, 但不要过度培养。

6. 将培养后的培养基分成两个 50ml 无菌离心管中。在室温下, 700 g 离心 5 分钟。丢弃上清, 在 30ml 无菌去离子水中重悬沉淀。

7. 在室温下, 700 g 离心 5 分钟。丢弃上清, 用 1.5 ml 1.1X TE/醋酸锂溶液 (见实验前试剂准备步骤) 重悬两份沉淀。

8. 将重悬后的细胞悬液分别转移到两个 1.5 ml 的微离心管中, 高速离心 15 秒。丢弃上清, 每份细胞悬液加 600 μ l 1.1X TE/醋酸锂溶液 中重悬处理。处理后的细胞即可以进行质粒 DNA 的转化。

注: 为了获得最好的结果, 感受态细胞应该立即用于转化。

二、感受态细胞转化

准备预冷的 1.5 ml/15 ml 离心管, 按照以下比例配置转化体系 (添加顺序按照表格依次向下) :

	小规模转染 1.5 ml tube	文库转染 15 ml tube
Plasmid DNA (为保证效率, 请使用高质量的质粒)	100 ng	5-15 μ g ¹
鲑鱼精 DNA (变性处理: 10 μ g/ μ) ³	5 μ l	20 μ l
感受态细胞 (轻轻混匀)	50 μ l	600 μ l
PEG/醋酸锂 (轻轻混匀)	500 μ l	2.5 ml
30° C 震荡培养,	30 min (每 10 min 用 votex 轻轻混匀)	45 min (每 15 min 用 votex 轻轻混匀)
DMSO	20 μ l	160 μ l
42° C 水浴	15 min (每 5 min 用 votex 轻轻混匀)	20 min (每 10 min 用 votex 轻轻混匀)
离心沉淀细胞, 去掉上清	高速 15 s	700 g, 5 min
添加 YPD plus 液体培养基 ²	1 ml	3 ml
30° C 震荡培养	可选	90 min
离心沉淀细胞, 去掉上清	高速 15 s	700 g, 5 min
加 0.9% 氯化钠溶液重悬细胞	1 ml	15 ml

注 1: 例如可使用 5 μ g bait + 10 μ g prey 载体进行酵母双杂交文库共转化;

注 2: YPD Plus 是专门为促进转化而配制的, 可将效率提高 50 - 100%。此步请不要使用标准 YPD 培养基;

注 3: 为了使鲑鱼精 DNA 变性, 可 95-100°C 加热 5 分钟, 然后在冰浴中迅速冷却。使用前再重复一次。





三、转化及效率计算

1. 将 100 μ l 的 1/10 和 1/100 稀释液涂抹在含有适当 SD 选择培养基的 100 mm 板上, 30 $^{\circ}$ C 倒置孵育, 直至出现菌落(3-5 天)。培养基的选择: pGBKT7, 使用 SD/-Trp (CAT: Y408101) ; pGADT7 使用 SD/-Leu (CAT: Y408104) ;共转使用 SD/-Leu/-Trp (CAT: Y408220) ;

2. 转化效率计算:

转化效率=cfu x 悬液体积 (ml) / (铺板体积 (ml) x DNA 质量 (ug))

若为 1/10 或 1/100 稀释液, 则分别乘以 10 和 100。

例: 100ng pGBT9(试剂盒中的对照质粒)转化后, 用 100 μ l 1/10 稀释液(从总的 1ml 中吸取), 在 SD/Trp 上培养 3 天后产生 300 个菌落, 则转化效率为: [300 x 1/(0.1 x 0.1)] x10=3 x 10⁵ cfu/ug。

注意事项:

- 1、 4 $^{\circ}$ C 条件下, 酵母菌株在 YPD 或 YPDA 培养基中用 Parafilm 密封添加下可储存长达 2 个月。但当接种液体培养物时, 新鲜菌落(1-3 周)将获得更好的结果。
- 2、 本产品仅用于科研使用。

