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 ℃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 ℃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 ℃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 ℃保存的菌种在 YPDA 培养基平板上划线，30 ℃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 ℃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 ℃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_{600} 达到 0.4-0.5，3000 rpm 离心 5 min，弃上清。（4 ℃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。

6. 加入 1 mL Y2 溶液重悬，按 50 μL 分装于 1.5 mL 无菌冻存管，转文库按 600 μL 分装，感受态细胞即制备完毕，可直接用于转化。

7. 制备好的感受态细胞需缓慢冷冻后，再置于-80 ℃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 ℃冰箱过夜后，再取出感受态置于-80 ℃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 μL	2520 μL
质粒	5-10 μL（≈200 ng/μL）	5-15 μg（文库质粒）
总体积	360 μL（ddH_2O 补足体积）	2592 μL（ddH_2O 补足体积）

酵母质粒转化：

1. 吸取 360 μL 预混液加入 50 μL 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。
2. 30 ℃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。
3. 12,000 rpm 离心 15 s，弃上清。
4. （可选步骤）用 1 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30 ℃摇床震荡培养 30-60 min。12000 rpm 离心 15 s，弃上清。
5. 加入 400 μL 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 ℃培养 2-4 天。

酵母文库转化：（需用 15-50 mL 离心管）

1. 将 2592 μL 预混液加入到 600 μL 感受态细胞中，震荡使感受态细胞充分悬浮于预混液中。
2. 30 ℃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。
3. 3000 rpm 离心 5 min，弃上清。
4. （可选步骤）用 3 mL YPD Plus Liquid Medium 重悬沉淀，30 ℃摇床震荡培养 90 min，3000 rpm 离心 5 min，弃上清。
5. 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 ℃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。