

BY4741 Elec-Library Competent Cell 产品说明书

● 产品规格和内容 (CAT#: YEL1060)

内容名称	包装含量	货号	包装数量	保存条件, 时间
BY4741 Elec-Library Cell	400 μ l /支	YEL1060S/M	5 支/20 支	-80 $^{\circ}$ C (3 个月)
pYES2 (control vector, 10ng/ μ l)	10 μ l	YEL1060S/M	1 支	-80 $^{\circ}$ C (12 个月)
YB 溶液 (0.45 μ m 过滤除菌)	50ml	YEL1060S/M	1 瓶/4 瓶	4 $^{\circ}$ C (3 个月)

● 基因型

MATa his3 Δ 1 leu2 met15 Δ ura3-52

● 产品说明

BY4741 菌株来源于酿酒酵母原始菌株——S288C, 是实验室的常用菌株, 为配子 MATa 型, 广泛应用于钠, 钾离子平衡; 细胞抗盐; 各种金属离子的吸收; 重金属毒性; 各种糖类, 碳源对真核生物细胞生长的影响; 过氧化物, 超氧化物的吸收与运输的研究中。BY4741 酿酒酵母为组氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、尿嘧啶缺陷型菌株, pYES2 质粒为常用配套质粒, 筛选标记为 URA, 可用 SD-URA 平板进行筛选。唯地生物生产的 BY4741 Elec-Library Cell 为超高效率文库级别感受态, 经特殊工艺制作, -80 $^{\circ}$ C 可保存三个月, pYES2 质粒 (5857bp, Amp^R) 检测转化效率 >0.5 \times 10⁶ cfu/ μ g DNA。

● 操作方法

1. 取适量 YB 溶液 (0.45 μ m 过滤除菌) 放 30 度预热, 每管感受态准备 10ml。
2. 0.2 cm 电击杯和杯盖从储存液中拿出倒置于干净的吸水纸上 5 分钟沥干水分, 正置 5 分钟, 待乙醇挥发干净立即插入冰中, 压实冰面, 电击杯顶离冰面 0.5 cm 以方便盖上杯盖, 冰中静置 5 分钟充分降温。
3. 取 -80 $^{\circ}$ C 保存的 BY4741 电击感受态细胞插入冰中 2-5 分钟, 待其融化, 加入预冷的目的质粒 2-15 μ g (加入 DNA 的体积不超过 40 μ l, DNA 纯度越高越好, 保证尽可能低的离子含量)。
4. 用 200 μ l 枪头 (用刀切除 0.5cm 枪尖) 将感受态-DNA 混合物缓慢吹打两次, 除去气泡, 快速转移到电击杯中 (避免产生气泡), 轻轻晃动电击杯使液面保持水平状态, 盖上杯盖, 插入冰中。
5. 启动电转仪, 设置参数: C=25 μ F, PC=200 Ω , V=2.5kV, 将电击杯从冰中拿出, 用吸水纸擦拭吸干表面水渍, 放入电转槽中, 电击完成后拿出电转杯放室温, 打开杯盖, 10 秒内加入 1ml 预热的 YB 溶液, 转移到无菌的 50ml 离心管中, 再加入 1ml YB 溶液清洗电转杯并转移到离心管中, 补加 8ml YB 溶液, 30 $^{\circ}$ C 250rpm 摇菌 1.5h。
6. 3000 rpm 离心 2 min 弃上清, 加入 1-10ml 0.9% 的氯化钠重悬涂板, 29 $^{\circ}$ C 培养 48-96 h。

● 培养基配制

① YPDA (1L) (唯地 CAT#: YM1020):

Tryptone 20g

Yeast extract 10g

0.2% adenine 15ml

补水到 950ml, 用盐酸调 PH 到 6.5;

Agar 20g(for plates only)

121°C, 15 min 高压灭菌;

待培养基温度降到 55°C 时, 加入已过滤

的 40% 葡萄糖 50 ml。

② SD medium (1L)(唯地 CAT#: YM3101-3611):

Yeast Nitrogen base 6.7g

葡萄糖 20g

Dropout 适量 (按说明书)

补水到 1L, 调 PH 至 5.8;

Agar 20g(for plates only)

121°C, 15 min 高压灭菌。

③ 0.2% adenine (1L) (唯地 CAT#: YC6030)

Adenine 2g; 补水到 1L; 溶解后高压灭菌或 0.22μm 滤膜过滤除菌。

● 注意事项

1. 感受态细胞最好在冰上融化, 加入质粒 DNA 的体积不超过 40ul, 文库质粒纯度越高越好。
2. 文库用酵母感受态的转化效率数据是在加入不超过 100ng 标准质粒的试验中获得, 若加入质粒过多, 虽然得到的菌落数会增加, 但是由此计算的转化效率会下降。
3. BY4741 酵母菌株对高温敏感, 最适生长温度为 27-30°C; 高于 31°C, 生长速度和转化效率呈指数下降。
4. 酵母为真核生物, 不易长期保存, 随感受态在-80°C 保存时间的延长, 转化效率会不断下降, 建议保存时间不超过 90 天。
5. 酵母在缺陷培养基中生长速度比 YPDA 培养基慢, 培养基中缺陷成分越多, 生长越慢, 以转化涂板为例: 涂 YPDA 平板 29°C, 48 h 培养可见直径 1 mm 克隆; 涂 SD 单缺平板 29°C, 48-60 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 双缺平板 29°C, 60-80 h 培养可见直径 1 mm 克隆, 涂 SD 三缺或四缺平板 29°C, 80-90h 培养可见直径 1 mm 克隆。