

**FUJIFILM****Wako**

〈For Research Use Only〉 Code No. 296-64303(100 reactions)

for Genetic Research  
***S. pombe* Direct Transformation Kit Wako**

**[Introduction]**

The *S. pombe* Direct Transformation Kit *wako* is specially designed for rapid and easy transformation of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*.

The *S. pombe* Direct Transformation Protocol allows for successful transformation simply by mixing plasmid DNA and the kit reagents with overnight yeast cell cultures without complicated competent cell preparation.

The traditional yeast transformation methods require repeated centrifugation or washing steps, thus are problematic for high-throughput transformation. The *S. pombe* Direct Transformation Kit *wako* is well suited for high-throughput transformation of a large number of yeast strains grown in 96-well plates. You may choose either a "96-well plate protocol" or a "tube protocol" for your purpose.

**[Features]**

- Direct transformation : One-step procedure by mixing your plasmid and the kit reagents with yeast culture.
- Simply : No need to prepare competent cells.
- High-throughput: Suitable for transformation of a large number of yeast strains using a 96-well plate.

**[Transformation Efficiency]**

≥ 250 cfu/μg

Transformation efficiency is calculated as the number of colonies per microgram of plasmid DNA.

**[Kit contents]**

(1) <i>Sp</i> Transformation Reagent	11.5 mL × 1
(2) Carrier DNA (5 μg/μL)	0.5 mL × 1

**[Storage]**

Store at -20°C

\*The number of times of freeze-thaw should not exceed 10 times. If you do freeze-thaw more than 10 times, dispense the reagents and store at -20°C.

**[Protocol]****I. Protocol 1 (96-well plate protocol)****I-1. Preparation of yeast culture****< Required Reagents and Equipment >**

- Incubator (28-30°C)
- Sterile 96-well microtiter plate (Nunc Cat# : 267245)
- Microplate sealing tape
- Sterile 96-pin replicator (GENETIX, UK. Cat# : X5052)
- Square plate (14 × 10 cm) (Eikenkizai Co., Ltd. Cat# : AW2000)

- Sterile water

- YPD agar medium

[Preparation of YPD agar medium, 1 L]

Dissolve the following in distilled water to 1 L.

Yeast extract 10 g

Peptone 10 g

D(+) Glucose 20 g

Add 20 g agar for plates.

Autoclave at 121°C for 20 minutes.

- YES medium

[Preparation of YES medium, 1 L]

Dissolve the following in distilled water to 1 L.

Yeast extract 10 g

D(+) Glucose 30 g

L-Histidine 250 mg

L-Leucine 250 mg

L-Lysine 250 mg

Adenine 250 mg

Uracil 250 mg

Autoclave at 121°C for 20 minutes.

**< Before Starting >**

Inoculate a square YPD plate<sup>1)</sup> with *S. pombe* strains from glycerol stock using a sterile 96-pin replicator. Incubate the plate at 28-30°C for 2-7 days<sup>2)</sup>.

- 1) We recommend a YPD plate, because a YES plate shows a decreasing trend of transformation efficiency.
- 2) Cultured YPD plate can be stored at 4-10°C for 1 month without decreasing transformation efficiency.

**< Yeast culture Protocol >**

1. Aliquot 25 μL of YES medium into each well of a 96-well microtiter plate.
2. Pick *S. pombe* strains from the YPD plate culture using a 96-pin replicator and inoculate YES medium in a 96-well plate.
3. Seal the plate with a microplate sealing tape and incubate at 28-30°C for 18-24 hours without shaking.

**I-2. Transformation****< Required Reagents and Equipment >**

- Incubator (28-46°C)
- Multi channel pipettor
- Sterile 25 mL reserver
- Appropriate selective plates and plasmid
- Sterile water

**< Before Starting >**

Thaw the *Sp* Transformation Reagent and Carrier DNA completely at room temperature.

< Transformation Protocol >

- Add 1  $\mu$ g of plasmid DNA<sup>1)</sup> and 4  $\mu$ L of Carrier DNA to 90  $\mu$ L of *Sp* Transformation Reagent<sup>2)</sup>, and then add sterile water to give a final volume of 100  $\mu$ L per well. In the case for preparing multiple wells, the pre-mix can be prepared as follows.

	1 well	96 wells	X wells
<i>Sp</i> Transformation Reagent <sup>1)</sup>	90 $\mu$ L	108 mL	90 $\times$ 1.25 $\times$ X $\mu$ L
plasmid DNA <sup>2)</sup>	1 $\mu$ g	120 $\mu$ g	1 $\times$ 1.25 $\times$ X $\mu$ g
Carrier DNA (5 $\mu$ g/ $\mu$ L)	4 $\mu$ L	480 $\mu$ L	4 $\times$ 1.25 $\times$ X $\mu$ L

Sterile water up to 100  $\mu$ L 12 mL 100  $\times$  1.25  $\times$  X  $\mu$ L

- Suspend the precipitated cells in the cultured 96-well microtiter plate using a plate mixer<sup>3)</sup>. Immediately add 100  $\mu$ L of the DNA mixture (Step 1) to each well of yeast culture using a multi-channel pipetter. Seal the plate and mix using a plate mixer<sup>3)</sup>.
- Incubate at 46°C for 2 hours<sup>4)</sup>.
- Spot 10  $\mu$ L of the mixture on the appropriate selection plate.
- Incubate the selection plate at 28-30°C for 5-7 days.

- The quality of DNA used for this method plays an important role in transformation efficiency. We recommend the use of the kits that have high purification performance for preparation of plasmid DNA.
- Slow pipette operation is required because of the viscosity of this reagent.
- If you do not have a plate mixer, a multi-channel pipetter can be used.
- It is possible to incubate at 42°C for 4 hours or 37°C for 6 hours. You can choose the proper condition for your purpose.

**II . Protocol 2 (Tube protocol)**

**II-1. Preparation of Yeast culture**

< Required Reagents and Equipment >

- Shaking incubator (28-30°C)
- Sterile petri dish
- Sterile two position type tube (14 mL)
- YPD agar medium (See Section I for preparation (p. 2))
- YES medium (See Section I for preparation (p. 2))

< Before Starting >

Streak a YPD plate<sup>1)</sup> with *S. pombe* strain and incubate the plate at 28-30°C for 2-7 days<sup>2)</sup>.

- We recommend a YPD plate, because a YES plate shows a decreasing trend of transformation efficiency.
- Cultured YPD plate can be stored at 4-10°C for 1 month without decreasing transformation efficiency.

< Yeast Culture Protocol >

- Inoculate the colonies of your *S. pombe* strain into 2 mL of YES medium. Measure its OD at 600 nm. After adjusting the OD<sub>600</sub> to 0.2 with medium, transfer the 1 mL of its suspension to the 14 mL two position type tube. Cover the tube with the lid loosely.

Note : One mL of culture can be used for approximately 30 transformations (25  $\mu$ L per transformation). If you want to prepare over 30 transformations, increase the number of culture tubes but not the volume, because the volume of culture significantly affects the aeration and growth conditions.

- We highly recommend to perform yeast culture with a reciprocal or rotary shaking incubator at 150 rpm for 24 hours. However, yeast cell growth may vary from strain to strain, the value of OD<sub>600</sub> should be between 6.0 and 7.0 at the end of culture. Cell concentration plays an important role in transformation efficiency.
- The OD<sub>600</sub> should be measured by 10-fold to 50-fold dilution of the culture.

- Incubate at 28-30°C for ~24 hours with vigorous shaking. The culture should reach a cell density to an OD<sub>600</sub> of 6.0-7.0.

**I-2. Transformation**

< Required Reagents and Equipment >

- Incubator or water bath (37°C)
- Incubator (28-30°C)
- Sterile microcentrifuge tube (1.5 mL)
- Appropriate selective plates and plasmid
- Sterile water

< Before Starting >

Thaw the *Sp* Transformation Reagent and Carrier DNA completely at room temperature.

< Transformation Protocol >

- Add 1  $\mu$ g of plasmid DNA<sup>1)</sup> and 4  $\mu$ L of Carrier DNA to 90  $\mu$ L of *Sp* Transformation Reagent<sup>2)</sup> in a microtube, and then add sterile water to give a final volume of 100  $\mu$ L. Mix by vortexing.
- Add 25  $\mu$ L of yeast culture<sup>3)</sup> to the mixture and mix by vortexing.
- Incubate at 37°C for 2 hours.
- Spread on an appropriate selection plate using a sterile spreader. If you want to obtain single colonies, dilute the mixture to 2-fold to 10-fold with sterile water and spread 100  $\mu$ L of the diluted mixture on an appropriate selection plate.
- Incubate the plate at 28-30°C for 5-7 days.

- The quality of DNA used for this method plays an important role in transformation efficiency. We recommend the use of the kits that have high purification performance for preparation of plasmid DNA.
- Slow pipette operation is required because of the viscosity of this reagent.
- When yeast culture is concentrated 5-fold by centrifugation, transformation efficiency is increased to approximately 5-fold.

### [Appendix (Flow Chart of the Experiments)]

### I. 96-well plate protocol

## 96 microtiter well

- ← 25  $\mu$ L of YES medium
- ← Inoculate yeast strains into each well
- Incubate at 28-30°C for 18-24 hr. without shaking
- Suspend precipitated cells using plate mixer
- ← 100  $\mu$ L of plasmid / reagent solution<sup>1)</sup>
- Mix with plate mixer
- / Incubate at 46°C for 2 hr.<sup>2)</sup>

↓ Incubate at 28-30°C for 5-7 days  
 Transformed yeast

## II. Tube protocol

2 mL of YES medium

↓ ← Inoculate yeast colonies  
Adjust OD<sub>600</sub>: 0.2 by medium

↓  
Transfer the 1 mL of the suspension to a 14 mL two position type tube  
↓ Incubate at 28-30°C with shaking until OD<sub>600</sub> : 6.0-7.0

Yeast culture...①

1.5 mL of microcentrifuge tube

- ← 100  $\mu$ L of plasmid/reagent solution<sup>1)</sup>
- Mix by vortexing
- ← 25  $\mu$ L of yeast culture (①)
- Incubate at 37°C for 2 hr.

- ↓ Incubate at 37°C for 2 hr.
- Plating
- ↓ Incubate at 28-30°C for 5-7 days
- Transformed yeast

### Transformed yeast

- 1) plasmid/reagent solution (per well, per tube)

<i>Sp</i> Transformation Reagent	90 $\mu$ L
plasmid DNA	1 $\mu$ g
Carrier DNA	4 $\mu$ L
Sterile water up to 100 $\mu$ L	
- 2) It is possible to incubate at 42°C for 4 hours or 37°C for 6 hours.

## 【Application】

**Higher transformation efficiency method (centrifugal concentration method)**

```

graph TD
    A[2 mL of YES medium] --> B[Inoculate yeast colonies]
    B --> C[Adjust OD600 : 0.2 by medium]
    C --> D[Transfer the 1 mL of the suspension to a 14 mL two position type tube]
    D --> E[Incubate at 28-30°C with shaking until OD600 : 6.0-7.0]
    E --> F[500 × G, 5 min., RT]
    F --> G[Remove 800 µL of supernatant]
    G --> H[Suspend by vortex mixer]
    H -- centrifugal concentration (× 5) --> I[Yeast culture: ①]
  
```

The flowchart details the steps for yeast culture preparation. It starts with 2 mL of YES medium, followed by inoculating yeast colonies and adjusting the OD<sub>600</sub> to 0.2. The next step is transferring 1 mL of the suspension to a 14 mL two-position type tube and incubating at 28-30°C with shaking until the OD<sub>600</sub> reaches 6.0-7.0. This leads to a centrifugation step at 500 × G for 5 minutes at room temperature. After centrifugation, 800 µL of supernatant is removed and suspended by vortex mixer. The final result is yeast culture ①, which undergoes centrifugal concentration (× 5).

- 1.5 mL of microcentrifuge tube
  - ↳ 100  $\mu$ L of plasmid/reagent solution
  - Mix by vortexing
  - ↳ 25  $\mu$ L of yeast culture (①)
  - ↓ Incubate at 37°C for 2 hr.
- Plating
  - ↓ Incubate at 28-30°C for 5-7 days
- Transformed yeast

#### Allied products

Wako catalog No.	Description	Package Size
049-31165	D (+)-Glucose	500 g
084-00702	L-Histidine Hydrochloride Monohydrate	25 g
124-00852	L-Leucine	25 g
010-19612	Adenine Sulfate	25 g
212-00062	Uracil	25 g
010-15815	Ager, Powder	500 g
318-90105	Distilled Water, Deionized, Sterile	500 mL

FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation

1-2, Doshomachi 3-Chome, Chuo-Ku, Osaka 540-8605, Japan  
Telephone : +81-6-6203-3741  
Facsimile : +81-6-6201-5964  
<http://www.fujifilm.co.jp>

**FUJIFILM Wako Chemicals**  
 1600 Bellwood Road  
 Richmond, VA 23237  
 U.S.A.  
 Telephone : +1-804-271-7677  
 Facsimile : +1-804-271-7791  
<http://www.wakousa.com>

**FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH**  
Fuggerstrasse 12  
D-41468 Neuss  
Germany  
Telephone : +49-2131-311-0  
Facsimile : +49-2131-311100  
<http://www.wako-chemicals.de>

コード No. 296-64303 (100 回用)

### 遺伝子研究用

## S. pombe Direct Transformation Kit Wako

本キットは、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) を形質転換するための試薬キットで、酵母培養液に、目的のプラスミドと専用試薬を、直接加えるだけの簡単ワンステップタイプです。コンピテント細胞の調製なしに、直接一晩培養した細胞にプラスミドを導入する独自の技術により、従来法では困難であった多種変異株への同時導入が、簡便に行えるようになりました。

*S. pombe* Direct Transformation Kit Wako は、多種検体向けの 96 ウエルプレート法と少数検体向けのチューブ法の 2 通りのプロトコールがあり、目的に応じて使い分けることができます。

#### 【形質転換効率】

250cfu/ $\mu$ g 以上

#### 【特 長】

- 目的プラスミドと専用試薬をダイレクトに加えるだけのワンステップタイプ
- コンピテント細胞の調製が不要：一晩培養した細胞への直接導入
- 96 ウエルプレートを用いることで、多検体処理が可能
- HTS 向けに分注しやすい低粘性試薬を採用

#### 【キット内容】

(1) Sp Transformation Reagent	11.5mL × 1
(2) Carrier DNA (5 $\mu$ g/ $\mu$ L)	0.5mL × 1

#### 【保 存】

-20°C 保存

注) 凍結融解は 10 回までにして下さい。凍結融解を避けるため、あらかじめ小分け分注して -20°C 保存することをお奨めします。

#### 【使 用 方 法】

##### (1) プロトコール 1 (96 ウエルプレート法)

###### 分裂酵母の培養

###### <必要な試薬および器具>

- インキュベーター (28 ~ 30°C)
- 滅菌済み 2 号角シャーレ (例、栄研器材、AW2000)
- 滅菌済み 96 ウエルプレート丸底タイプ (例、Nunc、No. 267245)
- プレートシール
- 滅菌済み 96pin レプリケーター (例、BM 機器、X5052)
- 滅菌水

#### ・YPD 寒天培地

[YPD 寒天培地の作製、1L]  
900mL の水に溶解  
Yeast Extract 10g  
Peptone 10g  
D (+)-Glucose 20g  
↓  
1L にメスアップ  
↓  
寒天 20g を添加  
↓  
オートクレーブ (121°C、20 分間)

#### ・YES 液体培地

[YES 液体培地の作製、1L]  
900mL の水に溶解  
Yeast Extract 10g  
D (+)-Glucose 30g  
L-Histidine 250mg  
L-Leucine 250mg  
L-Lysine 250mg  
Adenine 250mg  
Uracil 250mg  
↓  
1L にメスアップ  
↓  
オートクレーブ (121°C、20 分間)

#### 【準 備】

形質転換したい菌株を滅菌済み 96pin レプリケーターを用いてグリセロールストックから YPD 寒天培地プレート<sup>\*1</sup> に植菌した後、28 ~ 30°C で 2 ~ 7 日間培養し、菌体コロニーを準備する<sup>\*2</sup>。

\*1 : 寒天培地には YPD 寒天培地を使用して下さい。YES 寒天培地を用いると形質転換効率が低下する傾向があります。

\*2 : 培養後プレートは冷蔵で 1 カ月間保存しても形質転換効率に影響しません。

#### 【方 法】

- 96 ウエルプレートの各ウェルに YES 液体培地 25  $\mu$ L を分注する。
- 各ウェルに滅菌済み 96pin レプリケーターを用いて酵母を植菌する。
- プレートの上部にプレートシールを貼り、28 ~ 30°C で 18 ~ 24 時間 静置培養する。

#### 【形質転換】

###### <必要な試薬および器具>

- インキュベーター (28 ~ 46°C)
- マルチチャンネルピッペッター
- 滅菌済み 25mL 容リザーバー
- 滅菌水
- 目的に応じた選択培地プレート

#### 【準 備】

キット内の Sp Transformation Reagent および Carrier DNA を解凍し室温に戻す。

### <方 法>

① 1 ウエルあたり  $90\mu\text{L}$  の *Sp* Transformation Reagent<sup>\*1</sup>、 $1\mu\text{g}$  の plasmid DNA<sup>\*2</sup>、 $4\mu\text{L}$  の Carrier DNA、滅菌水を加えて総量  $100\mu\text{L}$  にして、プラスミド・試薬混合液を調製する。多検体処理の場合は、下表をご参照下さい。

	1 ウエル	96 ウエル	X ウエル
<i>Sp</i> Transformation Reagent <sup>*1</sup>	$90\mu\text{L}$	$10.8\text{mL}$	$90 \times 1.25 \times X\mu\text{L}$
plasmid DNA <sup>*2</sup>	$1\mu\text{g}$	$120\mu\text{g}$	$1 \times 1.25 \times X\mu\text{g}$
Carrier DNA ( $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	$4\mu\text{L}$	$480\mu\text{L}$	$4 \times 1.25 \times X\mu\text{L}$
滅菌水	計 $100\mu\text{L}$	$12\text{mL}$	$100 \times 1.25 \times X\mu\text{L}$

② 96 ウエルプレートの底に沈んだ菌体をプレートミキサー<sup>\*3</sup>で懸濁後、速やかにマルチチャンネルピッパーを用いて、①で調製した  $100\mu\text{L}$  のプラスミド・試薬混合液を各ウェルに添加する。

③ プレートミキサー<sup>\*3</sup>で 30 秒間攪拌し混合する。

④  $42^\circ\text{C}$  で 2 時間<sup>\*4</sup> インキュベートする。

⑤ 反応液  $10\mu\text{L}$  をマルチチャンネルピッパーを用いて選択培地にスポットティングする。

⑥ スポットティングしたプレートを  $28 \sim 30^\circ\text{C}$  で 5 ~ 7 日間インキュベートする。

※1 : *Sp* Transformation Reagent は、粘性が高いのでピッティング操作はゆっくり行って下さい。

※2 : plasmid DNA の調製には、精製度の高い plasmid DNA 精製キットなどを使用して下さい。RNAなどの混入により plasmid DNA 含量が低いと、形質転換効率が低下します。

※3 : プレートミキサーがない場合は、マルチチャンネルピッパーを用いたピッティング操作により混合して下さい。

※4 : インキュベーションは、 $42^\circ\text{C}$  で 4 時間、または  $37^\circ\text{C}$  で 6 時間で行うこともできます。目的に合わせて使い分け下さい。

### (2) プロトコール2 (チューブ法)

#### 分裂酵母の培養

##### <必要な試薬および器具>

・ インキュベーターシェーカー ( $28 \sim 30^\circ\text{C}$ )

・ 滅菌済みシャーレ

・  $14\text{mL}$  容ツーポジションチューブ (滅菌済み)

・ YPD 寒天培地

調製法はプロトコール 1 (p.7) を参照

・ YES 液体培地

調製法はプロトコール 1 (p.7) を参照

#### <準 備>

目的の菌株を、グリセロールストックから白金耳で掻き取り YPD 寒天培地プレート<sup>\*1</sup>にストロークした後、 $28 \sim 30^\circ\text{C}$  で 2 ~ 7 日間培養し、菌体コロニーを準備する<sup>\*2</sup>。

※1 : 寒天培地には YPD 寒天培地を使用して下さい。YES 寒天培地を用いると形質転換効率が低下する傾向があります。

※2 : 培養後プレートは冷蔵で 1 カ月間保存しても形質転換効率に影響しません。

#### <方 法>

①  $2\text{mL}$  の YES 液体培地にコロニーを植菌し、菌体濃度 ( $\text{OD}_{600}$ ) を測定後、YES 液体培地で希釈して濃度  $\text{OD}_{600} = 0.2$  に調製する。この濃度調製済み酵母懸濁 YES 培地  $1\text{mL}$ <sup>\*1</sup> を  $14\text{mL}$  容ツーポジション

チューブに移し、好気的な条件にするために、チューブのフタを 1 ポジション締める。

② 菌体がチューブの底に沈まないように菌体濃度  $\text{OD}_{600} = 6.0 \sim 7.0$  となるまで  $28 \sim 30^\circ\text{C}$  で振とう培養する<sup>\*2</sup>。

※1 :  $1\text{mL}$  の培養液で、約 30 回形質転換が行えます ( $25\mu\text{L} / 1\text{sample}$ )。これ以上のサンプル数で行う場合は培養液量を増やすごとにチューブ数を増やして下さい。また、サンプル数が少ない場合も、同様に  $1\text{mL}$  の培養液量で、培養を行って下さい。培養液量の変化により増殖スピードが変化する可能性があります。

※2 : 培養の目安はレシプロ式振とう培養器で  $150\text{rpm}$ 、24 時間です。ただし、菌株により増殖スピードが異なる可能性がありますので、菌体濃度 ( $\text{OD}_{600}$  値) のチェックは必ず行って下さい。

菌体濃度により形質転換効率が大きく低下しますので、 $\text{OD}_{600}=6.0 \sim 7.0$  の範囲内で使用して下さい。菌体濃度 ( $\text{OD}_{600}$  値) のチェックは培養液を  $10 \sim 50$  倍希釈後測定して下さい。

#### 形質転換

##### <必要な試薬および器具>

・ インキュベーターまたはウォーターバス ( $37^\circ\text{C}$ )

・ インキュベーター ( $28 \sim 30^\circ\text{C}$ )

・ 滅菌済み  $1.5\text{mL}$  容マイクロチューブ

・ 滅菌水

・ 目的に応じた選択培地プレート

#### <準 備>

キット内の *Sp* Transformation Reagent および Carrier DNA を室温で解凍する。

#### <方 法>

①  $90\mu\text{L}$  の *Sp* Transformation Reagent<sup>\*1</sup>、 $1\mu\text{g}$  の plasmid DNA<sup>\*2</sup>、 $4\mu\text{L}$  の Carrier DNA、滅菌水を加えて総量  $100\mu\text{L}$  にして、プラスミド・試薬混合液を調製する (Vortex Mixer 使用)。

② ①で調製した  $100\mu\text{L}$  のプラスミド・試薬混合液に  $25\mu\text{L}$  の酵母培養液<sup>\*3</sup> を添加、混合する (Vortex Mixer 使用)。

③  $37^\circ\text{C}$  で 2 時間インキュベートする。

④ インキュベーション後の混合液全量を選択培地にプレーティングする。また、シングルコロニーを取得したい場合はインキュベーション後の混合液を滅菌水で  $2 \sim 10$  倍希釈した希釈液  $100\mu\text{L}$  を選択培地にプレーティングする。

⑤ プレートを  $28 \sim 30^\circ\text{C}$  で 5 ~ 7 日間インキュベートする。

※1 : *Sp* Transformation Reagent は、粘性が高いのでピッティング操作はゆっくり行って下さい。

※2 : plasmid DNA の調製には、精製度の高い plasmid DNA 精製キットなどを使用して下さい。RNAなどの混入により plasmid DNA 含量が低いと、形質転換効率が低下します。

※3 : 酵母培養液を遠心操作により 5 倍濃縮して用いると形質転換効率を 5 倍程度上昇させることができます。

### フローチャート I. (96 ウェルプレート法)

96 ウェルプレート

- ← YES 液体培地 25 μL / ウェル
- ← コロニーを植菌
- 静置培養, 28 - 30°C, 18 - 24hr.
- 菌体懸濁 (プレートミキサー)
- ← プラスミド・試薬混合液<sup>※1</sup> 100 μL / ウェル  
混合 (プレートミキサー)
- ↓ インキュベート, 46°C, 2hr. <sup>※2</sup>
- スポットティング 10 μL
- ↓ インキュベート, 28 - 30°C, 5 - 7 日

形質転換酵母

### フローチャート II. (チューブ法)

YES 液体培地 2mL

- ↓ ← コロニーを植菌
- YES 液体培地で OD<sub>600</sub> : 0.2 に調製
- ↓ 1mL を 14mL 容ツーポジションチューブに移す
- ↓ 振とう培養, 28 - 30°C, OD<sub>600</sub> : 6.0 - 7.0 まで

培養酵母…①

1.5mL 容マイクロチューブ

- ← プラスミド・試薬混合液<sup>※1</sup> 100 μL
- 混合 (ボルテックス)
- ← 培養酵母 (①) 25 μL

↓ インキュベート, 37°C, 2hr.

プレーティング

↓ インキュベート, 28 - 30°C, 5 - 7 日

形質転換酵母

※ 1 : プラスミド・試薬混合液 (1 ウェル・1 チューブあたり)

Sp Transformation Reagent	90 μL
プラスミド DNA	1 μg
Carrier DNA	4 μL

滅菌水で 100 μL に調製

※ 2 : インキュベートは 42°C, 4 hr. または 37°C, 6 hr. で行うことも可能。

### 【アプリケーション】

#### 高効率形質転換法 (菌体濃縮法)

- YES 液体培地 2mL
- ↓ ← コロニーを植菌
- YES 液体培地で OD<sub>600</sub> : 0.2 に調製
- ↓ 1mL を 14mL 容ツーポジションチューブに移す
- 振とう培養, 28 - 30°C, OD<sub>600</sub> : 6.0 - 7.0 まで
- 500 × G, 5 分間, 室温
- ↑ 上清を 800 μL 除去
- 5 倍濃縮
- 懸濁 (ボルテックス)

培養酵母…①

- 1.5mL 容マイクロチューブ
- ← プラスミド・試薬混合液 100 μL
- 混合 (ボルテックス)
- ← 培養酵母 (①) 25 μL
- ↓ インキュベート, 37°C, 2hr.
- プレーティング
- ↓ インキュベート, 28 - 30°C, 5 - 7 日

### 関連製品

Code No.	品名	容量
527-00305	酵母エキス, 粉末	500g
528-00575	ペブトン	500g
049-31165	D (+)-グルコース	500g
084-00702	L-ヒスチジン塩酸塩一水和物	25g
124-00852	L-ロイシン	25g
595-06741	L-リシン塩酸塩	100g
010-19612	アデニン硫酸塩	25g
212-00062	ウラシル	25g
010-15815	寒天, 粉末	500g
318-90105	脱イオン蒸留水, 無菌	500mL

製造発売元

富士フィルム 和光純薬株式会社

大阪市中央区道修町三丁目1番2号

Tel : 06-6203-3741

2308KA3