

<For Research Use Only>

Code No. 296-62701 (20 reactions)
292-62703 (100 reactions)
290-62704 (500 reactions)

Wako

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

[Introduction]

The *S. cerevisiae* Direct Transformation Kit *Wako* is specially designed for rapid and easy transformation of the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*.

The *S. cerevisiae* Direct Transformation Protocol allows for successful transformation simply by mixing a plasmid DNA and the kit reagent with overnight yeast cell cultures. No complicated competent cell preparation is required. The traditional yeast transformation methods require repeated centrifugation or washing steps, thus are problematic for high-throughput transformation. The *S. cerevisiae* 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 Tube protocol or a 96-well plate protocol for your purpose.

[Features]

- Direct transformation : One-step procedure by mixing your plasmid and the kit reagent 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]

Table 1. Transformation efficiency of BY4737 strain with pRS316 plasmid (*URA3*, *CEN/ARS*).

	Transformation efficiency (cfu/ μ g)
96-well plate protocol	$> 5 \times 10^2$
Tube protocol	$> 5 \times 10^3$

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

[Kit contents]

	(20 reactions)	(100 reactions)	(500 reactions)
1) <i>Sc</i> Transformation Reagent	500 μ L	2.5 mL	12.5 mL
2) Carrier DNA (5 μ g/ μ L)	50 μ L	250 μ L	1.25 mL

[Storage]

Store at -20°C

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

[Protocol]

I. Protocol 1 (Tube protocol)

I-1. Preparation of Yeast culture

< Required Reagents and Equipments >

- Shaking incubator (28-30 °C)
- Sterile two position type tube (14 mL)
- YPD medium

[Preparation of YPD medium, 1L]

Dissolve the following in distilled water to 1 L. Add 20 g agar for plates.

Yeast extract	10 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g

Autoclave for 20 minutes at 121 °C.

< Before Starting >

Streak a YPD plate with your *S. cerevisiae* strain and incubate the plate at 28-30 °C for 2-3 days.

< Yeast Culture Protocol >

1. Inoculate the colonies of your *S. cerevisiae* strain into 2 mL of YPD medium. Measure its OD at 600 nm. After adjusting the OD₆₀₀ to 0.01 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 μ L/transformation). If you want to prepare over 30 transformations, increase the number of culture tubes but not the volume. 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 18-21 hours. However, yeast cell growth may vary from strain to strain, the value of OD₆₀₀ should be between 3.5 and 5.0 at the end of culture. Cell concentration plays an important role in transformation efficiency.
- The OD₆₀₀ should be measured by 10-fold to 50-fold dilution of the culture.

2. Incubate at 28-30 °C for ~24 hours with vigorous shaking. The culture should reach a cell density to an OD₆₀₀ of 3.5-5.0.

I-2. Transformation

< Required Reagents and Equipments >

- Incubator or water bath (42 °C)
- Incubator (28-30 °C)
- Sterile microcentrifuge tube (1.5 mL)
- Appropriate selective plates for your strain and plasmid
- Sterile water

< Before Starting >

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

< Transformation Protocol >

1. Add 1 μg of plasmid DNA¹⁾ and 2 μL of Carrier DNA to 20 μL of *Sc* Transformation Reagent²⁾ in a microtube, and then add sterile water to give a final volume of 25 μL . Mix by vortexing.

- 1) The quality of DNA used for this method plays an important role in transformation efficiency. We recommend the QIAGEN plasmid Kit, EndoFree Plasmid Kit, or CONCERT™ High Purity Plasmid Prep Purification System for plasmid DNA purification.
- 2) Slow pipette operation is required because of the viscosity of this reagent.

2. Add 25 μL of yeast culture to the mixture and mix by vortexing.
3. Incubate at 42 °C for 2 hours.
4. Add 150 μL of sterile water to the mixture and spread on an appropriate selection plate using a sterile spreader. If you want to obtain single colonies, dilute the mixture to 20-200 fold with sterile water and spread 100 μL of the diluted mixture on an appropriate selection plate.
5. Incubate the plate at 28-30 °C for 2-3 days.

II. Protocol 2 (96-well plate protocol)

II-1. Preparation of Yeast culture

< Required Reagents and Equipments >

- 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 (Nissui Pharmaceutical Co., LTD: Nissui Kaku Schale)
- Sterile water
- YPD medium (See Section I for preparation (p.2))

< Before Starting >

Inoculate a YPD plate with your *S. cerevisiae* strain from glycerol stock using a sterile 96-pin replicator. Incubate the plate at 28-30 °C for 2-3 days.

< Yeast culture Protocol >

1. Aliquot 25 μL YPD medium into each well of a 96-well microtiter plate.
2. Pick *S. cerevisiae* strains from a square YPD plate culture using a 96-pin replicator and inoculate YPD 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.

II-2. Transformation

< Required Reagents and Equipments >

- Incubator (28-37 °C)
- Multi channel pipettor
- Sterile 25 mL reserver
- Appropriate selective plates for your strain and plasmid
- Sterile water

< Before Starting >

Thaw completely Sc Transformation Reagent and Carrier DNA at room temperature.

< Transformation Protocol >

1. Add 1 μg of plasmid DNA¹⁾ and 2 μL of Carrier DNA to 20 μL of Sc Transformation Reagent²⁾, and then add sterile water to give a final volume of 25 μL per 1 well. In the case for preparing multiple wells, the premix can be prepared as follows.

	1 well	96 wells	X wells
Sc Transformation Reagent ¹⁾	20 μL	2.4 mL	$20 \times 1.25 \times X \mu\text{L} =$
plasmid DNA ²⁾	1 μg	120 μg	$1 \times 1.25 \times X \mu\text{g} =$
Carrier DNA (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	2 μL	240 μL	$2 \times 1.25 \times X \mu\text{L} =$
Sterile water	up to 25 μL	3 mL	$25 \times 1.25 \times X \mu\text{L} =$

2. Suspend precipitated cells in the cultured 96-well microtiter plate using a plate mixer³⁾. Immediately add 25 μL of the DNA mixture (Step 1) to each well of yeast culture using multi-channel pipetter. Seal the plate and mix using a plate mixer.
3. Incubate at 37 °C for 2 hours.
4. Spot 5-10 μL of the mixture on the appropriate selection plate.
5. Incubate the selection plate at 28-30 °C for 2-3 days.

1) The quality of DNA used for this method plays an important role in transformation efficiency. We recommend QIAGEN plasmid Kit, EndoFree Plasmid Kit, or CONCERT™ High Purity Plasmid Prep Purification System for plasmid DNA purification.

2) Slow pipette operation is required because of the viscosity of this reagent.

3) If you do not have a plate mixer, a multi-channel pipetter can be used.

[Appendix (Flow Chart of the Experiments)]

I. Tube protocol

2 mL of YPD medium
| ← Inoculate yeast colonies
Adjust OD₆₀₀ : 0.01 by medium
|
1 mL of the suspension
| Incubate at 28-30 °C with shaking
Yeast culture

1.5 mL of microcentrifuge tube
| ← 20 µL of Sc Transformation Reagent
| ← 1 µg of plasmid DNA
| ← 2 µL of Carrier DNA
| Up to 25 µL by sterile water
| Mix by vortexing
| ← 25 µL of yeast culture
| Incubate at 42 °C for 2 hr.
| ← 150 µL sterile water

Plating
| Incubate at 28-30 °C for 2-3 days
Transformed yeast

II. 96-well plate protocol

96 microtiter well
| ← 25 µL of YPD
Inoculate yeast strains into each well
| Incubate at 28-30 °C for 18-24 hr. without shaking
Yeast culture

96 microtiter well for reserver
| ← 20 µL of Sc Transformation Reagent
| ← 1 µg of plasmid DNA
| ← 2 µL of Carrier DNA
| Up to 25 µL per 1 well by sterile water
| Mix with plate mixer
| ← 25 µL of yeast culture
| Incubate at 37 °C for 2 hr.

96 microtiter well containing yeast culture
|
Spotting 5-10 µL
| Incubate at 28-30 °C for 2-3 days
Transformed yeast

Allied products

Wako catalog No.	Description	Package Size
047-00592	D(+)-Glucose	25 g

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.

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

Wako Chemicals USA, Inc.

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

Wako Chemicals GmbH

Nissanstraße 2
D-41468 Neuss
Germany
Telephone : + 49-2131-3111-0
Facsimile : + 49-2131-311100
<http://www.wako-chemicals.de>

遺伝子研究用

***S. cerevisiae* Direct Transformation Kit Wako**

〔はじめに〕

本キットは、出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)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。独自の技術により、コンピテント細胞の調製が不要となり、一晚培養した細胞に直接導入が可能になったため、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. cerevisiae Direct Transformation Kit Wakoは、少数検体向けのチューブ法とHTS向けの96ウェルプレート法の2通りのプロトコルがあります。

〔形質転換効率〕

表. BY4737株にpRS316を導入した場合の形質転換効率

	形質転換効率 (cfu/ μ g)
チューブ法	5,000以上
96ウェルプレート法	500以上

〔特 長〕

1. 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
2. コンピテント細胞の調製が不要：一晚培養した細胞への直接導入
3. 96ウェルプレートを用いることで、多検体処理が可能
4. HTS向けに試薬が取り扱い易い

〔キット内容〕

(20回用) (100回用) (500回用)

- | | | | |
|--------------------------------------|-------------|-------------|---------|
| (1) Sc Transformation Reagent | 500 μ L | 2.5 mL | 12.5 mL |
| (2) Carrier DNA (5 μ g/ μ L) | 50 μ L | 250 μ L | 1.25 mL |

〔保 存〕

-20℃保存

注)凍結融解の繰り返しは10回までにして下さい。それ以上の場合は、あらかじめ小分け分注して-20℃保存して下さい。

〔使用方法〕

(1) プロトコール1(チューブ法)

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(28~30℃)
- 14 mL容ツーポジションチューブ(滅菌済み)
- YPD培地

[YPD培地の作製、1L]

1 Lの水に溶解

Yeast Extract	10 g
Peptone	10 g
Glucose	20 g



オートクレーブ(121℃、20 min.)

<準備>

形質転換したい菌株をグリセロールストックから白金耳で掻き取りYPDプレートにストリークした後、培養(28~30℃、2~3日間)し、菌体コロニーを準備する。

<方法>

- ① YPD液体培地2 mLにコロニーをイノキュレートし、菌体濃度(OD₆₀₀)を測定後、YPD液体培地で希釈して濃度OD₆₀₀ = 0.01に調製する。14 mL容ツーポジションチューブに濃度調製済み酵母懸濁YPD培地1 mL^{*1}を移し、チューブのフタをゆるめる。
- ② 菌体がチューブの底に沈まないように菌体濃度OD₆₀₀ = 3.5~5.0となるまで振とう培養(温度28~30℃)する^{*2}。

※1: 培養液1 mLで、形質転換、約30回分の酵母が準備できます(25 μL/1 sample)。これ以上のサンプル数で行う場合は培養液量を増やさず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、同様に培養液量1 mL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 rpm、18~21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(OD₆₀₀値)のチェックは行って下さい。

菌体濃度により形質転換効率が大きく低下しますので、OD₆₀₀ = 3.5~5.0の範囲内で使用して下さい。 菌体濃度(OD₆₀₀値)のチェックは培養液を10~50倍希釈して測定して下さい。

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(42℃)
- インキュベーター(28~30℃)
- 滅菌済み1.5 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>

Sc Transformation ReagentおよびCarrier DNAを解凍し室温に戻す。

<方法>

- ① Sc Transformation Reagent ※1 20 μL に plasmid DNA ※2 1 μg 、Carrier DNA 2 μL 、滅菌水を添加混合し総量25 μL の混合液を作製する(Vortex Mixer使用)。
- ② 上記混合液(25 μL)に酵母培養液25 μL を添加混合する(Vortex Mixer使用)。
- ③ 42℃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に滅菌水150 μL を添加混合し、100～200 μL 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20～200倍希釈した希釈液100 μL を選択培地にプレーティングする。
- ⑤ プレートに28～30℃で2～3日間インキュベートする。

※1 Sc Transformation Reagentは、粘性が高いためピペッティング操作はゆっくり行って下さい。

※2 plasmid DNAはQiagen社plasmid DNA精製キットなどを使用した精製度の高いものを用いて下さい。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。

(2) プロトコール2(96ウェルプレート法)

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℃)
- 滅菌済み96ウェ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96 pinレプリケーター(例、BM機器、X5052)
- 滅菌水
- YPD培地

(YPD培地の作製法は第1項(p.8)を参照)

<準備>

形質転換したい菌株を滅菌済み96 pinレプリケーターを用いてグリセロールストックからYPDプレートに植菌した後、培養(28～30℃、2～3日間)し、菌体コロニーを準備する。

<方法>

- ① 96ウェルプレートの各ウェルにYPD培地25 μL を分注する。
- ② 各ウェルのYPD培地に滅菌済み96 pinレプリケーターを用いて酵母を植菌する。
- ③ 96ウェルプレートの上部にプレートシールを貼り18～24時間静置培養(温度28～30℃)する。

形質転換

<必要な試薬および器具>

- インキュベーター(28-37℃)
- マルチチャンネルピペッター
- 滅菌済み25 mL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>

Sc Transformation ReagentおよびCarrier DNAを解凍し室温に戻す。

<方法>

- ① 1ウェルあたりSc Transformation Reagent ※1 20 μ Lに plasmid DNA※2 1 μ g、Carrier DNA 2 μ L、滅菌水を添加混合した総量25 μ Lの混合液を用意する(複数ウェル分の混合液を用意する場合は必要量の1.25倍量を準備する)。
(例) 96ウェル分ではSc Transformation Reagent 2.4 mLに plasmid DNA 120 μ g、Carrier DNA 240 μ L、滅菌水を添加混合した総量3 mLの混合液を滅菌済みリザーバーに用意する。
- ② 培養96ウェルプレートの底に沈んだ菌体をプレートミキサー※3で懸濁後、速やかにマルチチャンネルピペッターを用いて①の混合液25 μ Lを培養96ウェルプレートの各ウェルに添加する。
- ③ プレートミキサー※3で30秒間攪拌し混合する。
- ④ 37℃で2時間インキュベートする。
- ⑤ 反応液5～10 μ Lをマルチチャンネルピペッターにより選択培地にスポッティングする。
- ⑥ スポッティングしたプレートを28～30℃で2～3日間インキュベートする。

※1 Sc Transformation Reagentは、粘性が高いためピペッティング操作はゆっくり行って下さい。

※2 plasmid DNAは、Qiagen社plasmid DNA精製キットなどを使用した精製度の高いものを用いて下さい。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ペッターを用いたピペッティング操作により混合を行って下さい。

フローチャート I. (チューブ法)

YPD培地 2 mL

↓ ←コロニーを植菌

YPD培地でOD₆₀₀ : 0.01に調製

↓

1 mL

↓ 浸透培養, 28-30 °C, OD₆₀₀ : 3.5-5.0まで

培養酵母

1.5 mL容マイクロチューブ

↓ ←Sc Transformation Reagent 20 μL

↓ ←プラスミドDNA 1 μg

↓ ←Carrier DNA 2 μL

↓ ←滅菌水で 25 μL

混合(ボルテックス)

↓ ←培養酵母 25 μL

インキュベート, 42 °C, 2 hr.

↓ ←滅菌水 150 μL

プレーティング

↓ インキュベート, 28-30 °C, 2-3 days

形質転換酵母

フローチャート II. (96ウェルプレート法)

96ウェルプレート

↓ ←YPD培地 25 μL

コロニーを植菌

↓ 静置培養, 28-30 °C, 18-24 hr.

培養酵母

96ウェルマイクロプレート

↓ ←Sc Transformation Reagent 20 μL

↓ ←プラスミドDNA 1 μg

↓ ←Carrier DNA 2 μL

↓ ←滅菌水で25 μL/ウェル

混合(プレートミキサー)

↓ ←培養酵母 25 μL

インキュベート, 37 °C, 2 hr.

スポッティング 5-10 μL

↓ インキュベート, 28-30 °C, 2-3 days

形質転換酵母

関連製品

Code No.	品 名	容 量
047-00592	D(+)-Glucose	25 g
527-00305	Yeast Extract	500 g
528-00575	Peptone	500 g
572-38641	試薬リザーバー, 25 mL, 滅菌済	10×10個

製造発売元

和光純薬工業株式会社

大阪市中央区道修町3-1-2
電話(06)6203-3741(代表)

0505K01