

酵母感受态细胞的制备

- (1) 取少量酵母菌株 Y2H 冻存物在 YPDA 平板培养基上划线培养，30℃ 倒置。
- (2) 挑取酵母单菌落于 2.0 ml 离心管，加入 1 ml YPD 液体培养基，剧烈振荡使菌块散开。
- (3) 1: 100 比例转接到适量的 YPD 液体培养基中，30℃，220rpm 培养 18-24 h，至稳定期， $OD_{600} > 1.5$ 。
- (4) 取培养物以 1:4 的比例转接到 YPD 液体培养基中，30℃，220rpm 培养 3 h 至 $OD_{600}=0.2-0.3$ 。
- (5) 将酵母培养物转移至 1.5 ml 离心管中，室温 12000rpm 离心 1 min，弃上清。
- (6) 加入 1ml TE 缓冲液，重悬沉淀，12000rpm 离心 30 s，弃上清。
- (7) 加入 0.1ml TE-LiAc 溶液，重悬沉淀。

酵母热激转化

- (1) 用沸水煮鲑鱼精(10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)10-20 min，冰上放置 10 min。
- (2) 将 10 μl 鲑鱼精加入 100 μl 酵母感受态细胞中，再加入 5 μl (20 μg)质粒，混匀。
- (3) 加入 600 μl TE-LiAc-PEG 溶液，涡旋混匀。
- (4) 30℃，200rpm 培养 30 min。
- (5) 加入 70 μl DMSO，缓慢混匀。
- (6) 42℃热激 15 min，冰浴 2-10 min。
- (7) 12000rpm 离心 1 min，弃上清。
- (8) 加入 100 μl 1×TE，重悬沉淀。

阳性克隆的筛选

将转化后的酵母分别涂抹于不同的缺陷培养基上。pGBKT7载体作为阴性对照，而pCL1作为阳性对照。pGBKT7-CmMYB1、pGBKT7-CmMYB2和pGBKT7空载体涂抹在SD/-Trp，而阳性对照涂抹于SD/-Leu培养基上，30℃，倒扣培养2-4 d。然后把长出的酵母菌落转到SD/-His-Ade上进行筛选。30℃培养2 d，检查生长情况。