【T-easy Vector Ligation】

Ratio between Vector & Insert DNA:

$$\frac{\text{Vector 量}}{\text{大小}} : \frac{\text{Insert 量}}{\text{大小}} = 1:3 \rightarrow \frac{25\,ng}{3k} : \frac{x}{0.3k} = 1:3$$

$$\rightarrow x = 7.5\,ng$$

$\frac{25}{3} : \frac{x}{1.6} = 1:3$

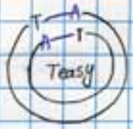
$x = 25 \times 1.6$

$= 40\,ng$

Concentration of the Insert DNA: (measuring by Nanodrop)

NLP2 PB1 = 11.2 ng/uL

NLP4 PB1 = 7.29 ng/uL



$\frac{40}{255.5} = 0.157$

$\frac{40}{244.4} = 0.164$

$\frac{40}{219.5} = 0.182$

→ Volume of the Insert DNA:

NLP2 PB1 = $\frac{7.5}{11.2}$ = 0.67 uL

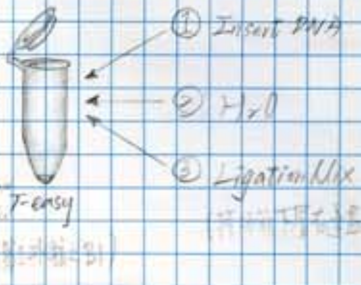
NLP4 PB1 = $\frac{7.5}{7.29}$ = 1.03 uL

> 取 1 uL

T-easy Vector	0.5 uL
Insert DNA	1.0 uL
H₂O	3.5 uL
Ligation Mix	5.0 uL
Total	10.0 uL

PCR時 HF mix中 有帶enzyme 可做出

Ligase則是把5'與3'之磷酸鍵接起來



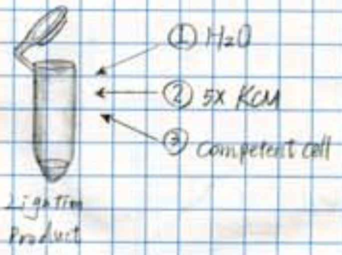
⟶ 將 eppendorf 置入水箱 40分鐘至1小時 即完成。(16°C)

【Transformation of Plasmid】

KCM method:

	5× KCM	20 uL
	H₂O	70 uL
(Ligation Product)	T-easy DNA	10 uL
(E.coli)	competent cell	108 uL

存於-80°C冰箱



⟶ 將 eppendorf 於冰上靜置 40分鐘至1小時，使 plasmid 附著於 competent cell 之 membrane。

⟶ 將 eppendorf 置於室溫 10分鐘，使 plasmid 完全進入 competent cell

⟶ 於 eppendorf 中加入 1mL LB(不含Amp.)，並在 37°C 生長箱中培養 1小時 (40min~1hr)

不可過久：不是selective stress 非被加入之E.coli 生長太好

⟶ 配製 substrate：
- X-gal : 60 uL/plate
- IPTG : 10 uL/plate

(保存於-20°C)

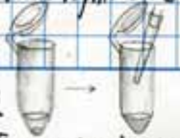
吹plate後

取 120 uL X-gal + 20 uL IPTG 混合於 eppendorf。

⟶ 於 Amp. medium 中加入 70 uL 混合液，並放入5顆玻璃珠垂直及水平搖晃，使混合液均勻分布。使用後之玻璃珠倒入裝有75%酒精塑膠盒。至無水痕

⟶ 將培養好的 E. coli 菌液離心 9000 r.p.m 30s

⟶ 倒去上清液至約剩下 100 uL 後以 pipetting 方式將菌體回溶，之後 (70 uL) 全部吸起加入 plate 中，以玻璃珠塗布均勻後於 37°C 培養。



TITLE　　DATE 2014.07.08
BOOK NO.

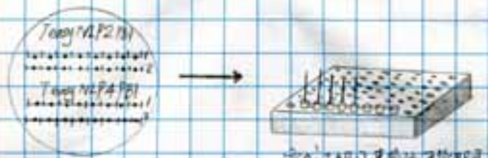
【Blue white screening & Colony PCR】

將前日培養於37°C之E.coli取出，
即可觀察到藍色及白色之菌落。
(白色菌落方表示sequence有成功插入Teasy vector)

↓

以滅菌牙籤沾取白色菌落(每個clone取16點)
繼代於畫好標線的Amp. medium，隨即將牙籤
插於分裝於4組八連管的混合液以進行Colony PCR

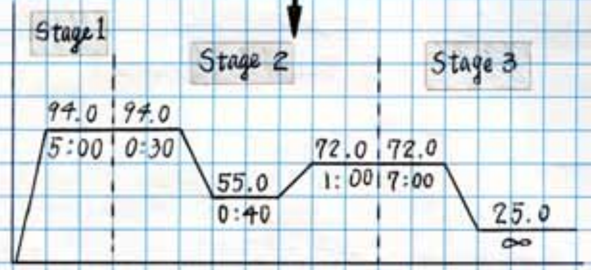
※正常Teasy以T7、SP6擴出的片段為150bp，若DNA有成功插入，則片段約為450bp。



完成1組八連管後牙籤即可以[illegible]。

	每1小管所含:		需配32管(+4)=36
T7+SP6	primer	0.5+0.5 μL	→ 18+18
	H_2O	9 μL	→ 324
	2X mix	10 μL	→ 360
	Total	20 μL	720

先將[illegible]全部混[illegible]再分裝至八連管，八連管需標記[illegible]。



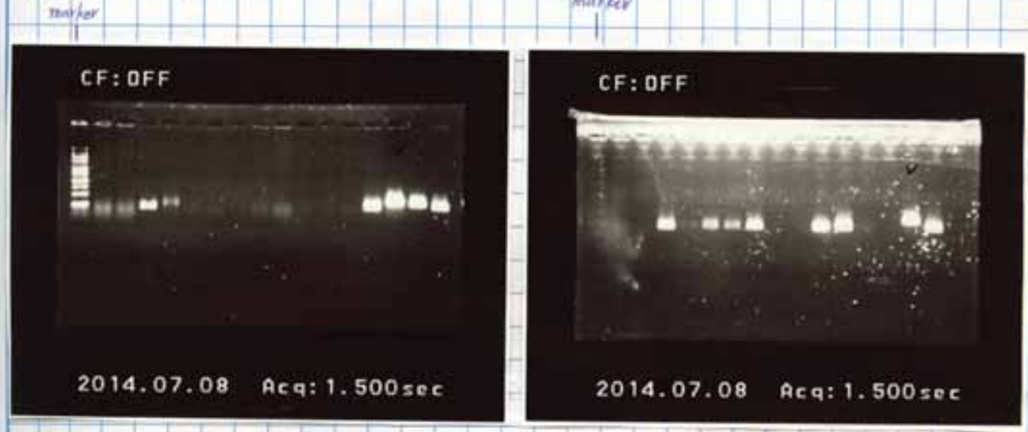
TITLE 200 mL TBE buffer(x0.5)
2 g Agarose
2 μL EtBr
DATE 2014.07.08
BOOK NO.

Electrophoresis：

一個clone有16管，取17個well之gel×2
(NLP2、NLP4→×2)

marker：10 μL (需load在2個gel的不同位置以便區別)
Colony PCR product：3 μL

NLP2 PB1：　　NLP4 PB1：



※由於跑膠結果發現不盡理想，因此重新再做一次
NLP2 PB1、NLP4 PB1之Teasy Ligation & Ligation Product
Transformation。

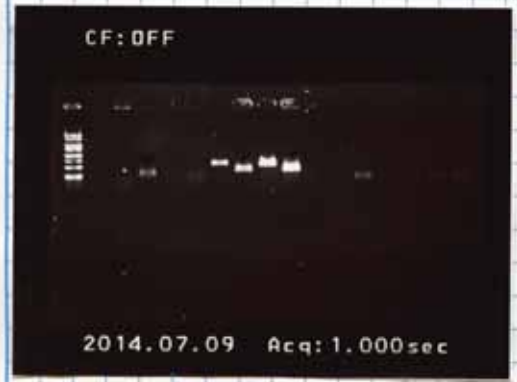
TITLE

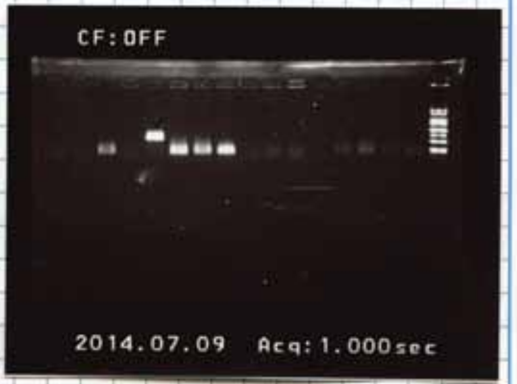
DATE 2014. 07. 09

BOOK NO.

※將前日(7/8)重新 Transformation 的 product 進行 Colony PCR
並且進行 Electrophoresis。其結果如下：

NLP2-PBI： 492 bp　　　　NLP4 PBI： 498 bp





選取之菌落編號：

NLP2-PBI 3　　NLP4-PBI 5
NLP2-PBI 7
NLP2-PBI 9　　共四隻。

→進行 LB+Amp之液培：

取一罐LB 並於其中添加 100 uL之Amp.
(可依照 (50 mL 加1) [illegible])
(plate的Amp 稍濃一些)

→

以電動pipette 分裝到試管 2500 uL

→

沾取菌落後 將Tip 與LB輕拌混合即完成接種。以pipette分裝到試管並 蓋子上需貼上標籤。

→ 培養於37°C搖箱。

TITLE

DATE 2014. 07. 09

BOOK NO.

【Streak out of Stock culture】

A 470	pDL2-Nx	Amp. Medium
A 471	pNubI (positive control)	
A 472	pNubG (negative control)	
A 1080	pDL2-Nx-NLP7-PB1	
A 1635	pDL2-Nx-NLP6-PB1	
A 466	pTMBV4	Kan. Medium
A 578	pTMBV4-CHL1 full length	

將上述 Stock culture 由-80°C 冰箱取出，置於藍冰。

↓

取5個 Amp. Medium，2個 Kan. Medium 及 Stock culture
於 Lab外左手邊之 laminar flow 內進行劃線培養.

↓

以 Tip 略微戳碎冰凍之 Stock culture 並挑起一小塊碎冰.

↓

以 3區或 4區劃線方式劃入plate (明確標註菌名、plate種類 & 日期)

↓

1 μ/mL

放入 37°C 生長箱培養 24hr。

DATE 2014.07.10

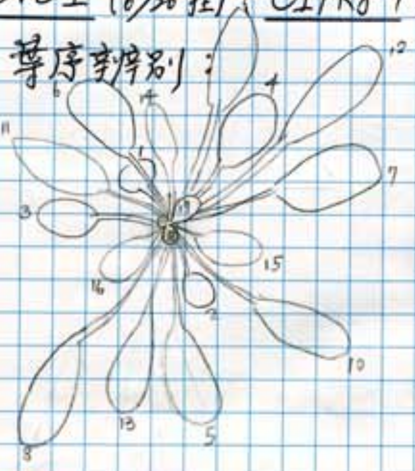
BOOK NO.

【Leaf nitrate content analysis】→ practice

※使用之Arabidopsis：

NC1 (6/20種)；CIPK8-1 (6/23種)

① 葉序辨別：



DATE 2014.07.10

BOOK NO.

1606
1607

※將前日(7/9)之LB+Amp液培由37°C生長箱取出
進行plasmid extraction.

菌落編號：

Teasy
NLP2-PB1 3
NLP2-PB1 7
NLP2-PB1 9

NLP4-PB1 5

共四隻.

(或直接用倒的)
由LB液培抽取 2mL 菌液(1次取 1mL)加入 2mL Tube
↓
離心 9000 rpm 2 min
↓
以pipette去除上清液
↓
※在冰箱! 加入200µL MX1後Vortex
以充分打散菌液
↓
加入250µL MX2後
gently invert 8~10次
靜置 2(2)~5 min. 以破細胞
<勿過久,因MX2含SDS,可使
protein變性後與DNA分開>
↓
時間快到時
先配置
[illegible]
速加否則
[illegible]
迅速加入350µL MX3後 invert 5次
以中和pH, 使protein precipitate.
↓
離心 14000 rpm 10 min
↓
不可晃動,將上清液取700µL至column
離心 9000 rpm 1 min
倒去液體

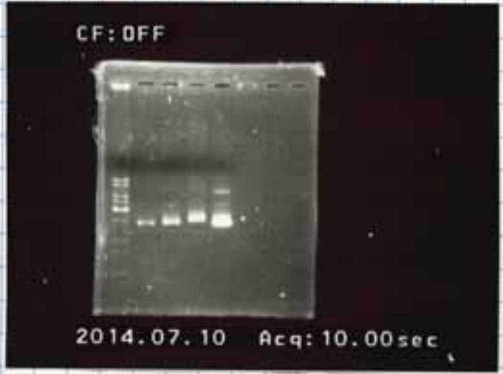
↓
加入500µL WN
離心 9000 rpm 1 min
倒去液體
↓
加入700µL WS
離心 9000 rpm 1 min
倒去液體
↓
空離 14000 rpm
3 min
以去除殘留ethanol
↓ 換Tube
加入50µL H_2O
並靜置1 min
↓
離心 14000 rpm
2~3 min
得到plasmid
存於4°C冰箱。

DATE 2014.07.10

BOOK NO.

Plasmid extraction Product electrophoresis :

marker : 10 µL
plasmid : 1µL + 1µL dye + 4µL H_2O



Plasmid extraction Product Nano drop :

	$A_{260/280}$	$A_{260/230}$	Concentration (ng/µL)	DNA 全量 (Total volume = 50µL)
NLP2-3	1.86	1.23	62.3	3.115 µg
NLP2-7	1.78	1.26	90.4	4.52 µg
NLP2-9	1.97	2.12	126.2	6.31 µg
NLP4-5	1.88	1.49	200.2	10.01 µg

↓ DNA ≒ protein

↓ DNA : 有機鹽類 應要大於2較佳

↓ 此 protocol 之 Max. 產量 為 40 µg ∴ 除 NLP4-5 外, 其餘皆偏低

DATE 2014.07.10

BOOK NO.

※ 將 7/9 劃線之 Stock culture 進行液培 :

A 470 pDL2-Nx
A 471 pNubI
A 472 pNubG
A 1080 pDL2-Nx-NLP7-PBI
A 1635 pDL2-Nx-NLP6-PBI
Amp. Medium

A 466 pTMBV4
A 578 pTMBV4-CHL1 full length
Kan. Medium

取 7 支試管、LB、Kan.、已配好之 LB + Amp.

→ LB + Kan. (Kan. 稀釋 1000 倍)

→ 每支試管分裝 2500 µL Medium。

DATE 2014.07.11
BOOK NO.

【Teasy Vector cutting】

37°C 約1hr

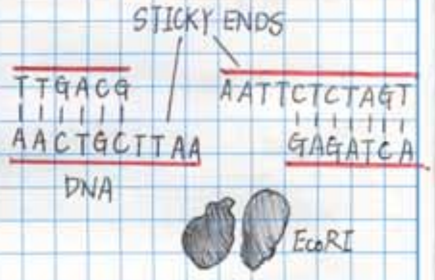
使用 EcoRI restriction enzyme
→若切成功將有兩個 band。

		加入順序
10X Buffer (fast digest)	2 μL	②
DNA plasmid	1 μL	③
Enzyme (EcoRI)	0.5 μL	④
H_2O	16.5 μL	①
Total	20 μL	

green 不需加dye

此步驟 check

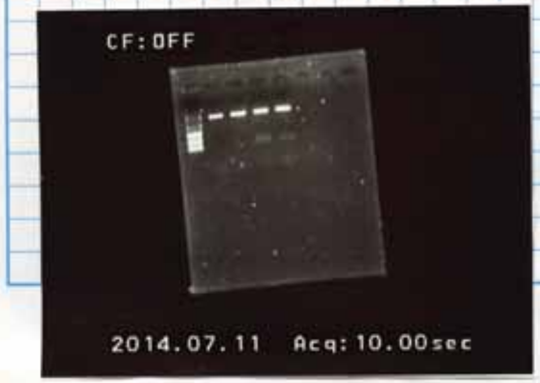
若是要切下insert時則加多於1uL



菌名：
NLP2-3、NLP2-7、NLP2-9
NLP4-5

【Electrophoresis】

Load 10 μL 跑約 10 min



結果：
NLP2-7、NLP2-9、NLP4-5
切成功機率較高，
故送3隻定序。

DATE 2014.07.11
BOOK NO.

【Sequencing】

NLP2-7: 0.0904 ug/uL
NLP2-9: 0.1262 ug/uL
NLP4-5: 0.2002 ug/uL

送定序之 plasmid DNA 需 0.5ug～0.75ug
故 3 DNA 之濃度配製如下：
NLP2-7: 8 μL 原液 + 2 μL H_2O
NLP2-9: 5 μL 原液 + 5 μL H_2O
NLP4-5: 3 μL 原液 + 7 μL H_2O

0.75÷0.0904=8.30
0.75÷0.1262=5.94
0.75÷0.2002=3.75

※定序單邊可定 800～1000 bp
Teasy-NLP7、4 約 300 bp
⇒故單邊即足夠，填寫 T7。

0.75÷0.1955=3.84→3uL
0.75÷0.194=3.80→3uL
0.75÷0.0512=14.65
0.75÷0.1402=5.35→5uL

【Plasmid Extraction + Nanodrop】

將 7/10 培養之液培進行 plasmid extraction，並測其濃度，如下：

	260/280	260/230	Concentration (ng/uL)
pDL2-Nx	1.85	2.17	243.0
pDL2-Nx-NLP6-PB1	1.87	2.20	209.3
pDL2-Nx-NLP7-PB1	1.86	2.33	202.7
pNubI	1.87	2.37	269.1
pNubG	1.88	2.38	277.0
TMBv4	1.88	2.33	274.0
TMBv4-CHL1	1.88	2.07	244.4

2k 0.75÷0.186=3.62

【Sequencing Results】

※將定序之NLP2-7、NLP2-9、NLP4-5結果與$\overset{\text{NLP4-PB1}}{\text{NLP2-PB1}}$做alignment

→ 點選桌面之ContigExpress Project

→ 將定序結果之ab1檔 & NLP2-PB1、NLP4-PB1之檔案拖入頁面。

→ 同步點選欲比對之對象。

→ Assemble selected

→ 檢查SfiI之cut site ⎧GGCC(ATTAC)GGCC
⎩GGCC(GCCTC)GGCC

※結果：

⎧NLP2-7未比對出相同序列
★NLP2-9比對出為NLP4-PB1且Sequence & cutsite正確
⎩NLP4-5比對出為NLP2-PB1但Sequence & cutsite有缺漏

※討論：

推測NLP2及NLP4可能在過去操作過程中，未注意下發生調換（如在colony PCR過程中），因而造成相反之結果。另外由於NLP2並未成功Sequencing，故重新做NLP2之Teasy vector ligation、transformation。

【Arabidopsis planting】(Yu Hsuan)

※7/3種植之SALK_123264，Δ14×nlp7-1 homo #3已明顯發芽
Δ14×nlp7 F_2 #30卻未能明顯發芽。

※花寶配製：

每盒倒入約700 mL溶液，共3盒故配2000 mL。
花寶位於最後一台冰箱右下方玻璃罐。稀釋100倍使用
故20 mL花寶加至2000 mL。

【Arabidopsis $\underset{\text{疏苗}}{\text{Thinning}}$】(Shan Hua)

※7/7種植之NC1，$54E_n$-2，$55E_n$-0，$69G_r$-1，$85I_m$-0
已長出第2片真葉後開始疏苗，挑選較為茁壯者保留，
其餘以鑷子&小剪刀除去。

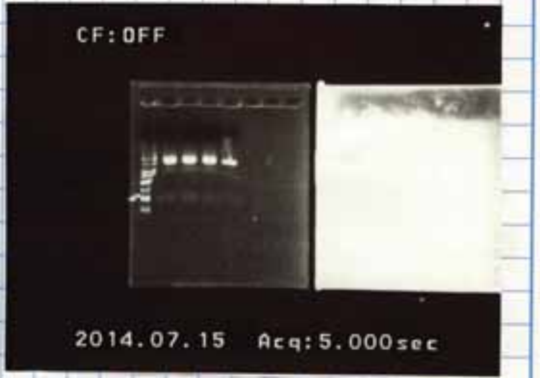
※加入蓋液。

【Sequence Splicing】

《Insert DNA-NLP4-PB1》 (Teasy)

DNA	10 uL	1
[illegible] enzyme (SfiI)	1 uL	0.5
Buffer 4	5 uL	2
需稀釋 stock 稀釋 10倍 BSA	5 uL	2
H_2O	29 uL	14.5
Total	50 uL	20

Result:



《Vector-pDL2-Nx》

DNA	3 uL
enzyme (SfiI)	1 uL
Buffer 4	5 uL
BSA	5 uL
H_2O	36 uL
Total	50 uL

→ 將(2mL) eppendorf 放入 50°C 烘箱 (2hr~4hr

→ 將 Insert 之 Splicing Product 進行 electrophoresis
(50uL Product + 10uL Dye = 60uL)
共 load 約 3~4 個 will

【Gel cutting】

※ 將 Insert-NLP4PB1 electrophoresis 之 gel 攜至暗房.

→ 開啟 UV 確認剪切 sequence 之位置 (位於 250~500)

→ (由於不夠明顯) 先左右切開約略位置

→ 取出置於照膠系統再明確觀察相對位置
(約在標板倒數 5 條線)

→ 回到 Lab 將 sequence 所在位置之 Gel 完全切下挑出

【Gel DNA sequence Isolation】

※ 將切下之 Gel 切割成小塊分裝入 2 個 1.5mL eppendorf

→ 每管加入 500 uL GP Buffer，並上下 invert

→ 將 eppendorf 放入 60°C 烘箱約 10min 使其完全溶解.

→ 分 2 次(管) 進行後續之離心步驟 (每次加入 700uL 於 column tube)

→ 加入 0.5 mL WN Buffer 並 9000 rpm 1min 離心倒除液體 (7000 rpm 1min 倒除液體)

→ 加入 0.5mL WS Buffer 並 9000 rpm 1min 離心倒除液體

→ 空離 14000 rpm 3min，並換置新 eppendorf，靜置 3~5 min

→ 加入 20uL H_2O elute DNA，靜置 3 min

→ 空離 14000 rpm 3min.

→ 取得 DNA (儲存於 4°C)

※ 同時也進行 pBL2-Nx 之 Splicing Product 之 DNA Isolation