

【T-easy Vector Ligation】

Ratio between Vector & Insert DNA:

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

$$\rightarrow x = 7.5 \text{ ng}$$

(measuring by Nanodrop)

Concentration of the Insert DNA:

$$NLP2 \text{ PBI} = 11.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

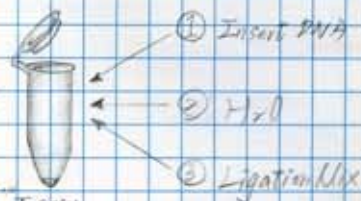
$$NLP4 \text{ PBI} = 7.29 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

→ Volume of the Insert DNA:

$$NLP2 \text{ PBI} = \frac{7.5}{11.2} = 0.67 \mu\text{L}$$

$$NLP4 \text{ PBI} = \frac{7.5}{7.29} = 1.03 \mu\text{L} \rightarrow \text{取 } 1 \mu\text{L}$$

T-easy Vector	0.5 μL
Insert DNA	1.0 μL
H ₂ O	3.5 μL
Ligation Mix	5.0 μL
Total	10.0 μL



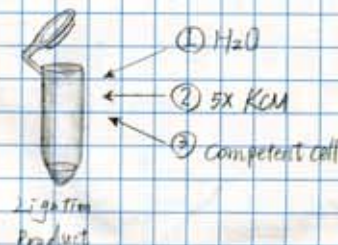
→ 將 eppendorf 置入冰箱 40 分鐘至 1 小時即完成。
(16°C)

【Transformation of Plasmid】

KCM method:

5X KCM	20 μL
H ₂ O	70 μL
(Ligation Product) T-easy DNA	10 μL
(E. coli) Competent cell	108 μL

於 -80°C 凍存



→ 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 1 mL LB (不含 Amp)，
並在 37°C 生長箱中培養 1 小時 (40 min ~ 1 h)

→ 配製 substrate: $\begin{cases} \text{X-gal} = 60 \mu\text{L}/\text{plate} \\ \text{IPTG} = 10 \mu\text{L}/\text{plate} \end{cases}$ (保存於 -20°C)

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

→ 於 Amp. medium 中加入 70 μL 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. 30 s

→ 倒去上清液至約剩下 100 μL 後
以 pipetting 方式將菌體回溶，之後
(70 μL)

全部吸起加入 plate 中，以玻璃珠塗布均勻後於 37°C 培養。

【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組入連管的混合液以進行 Colony PCR



完成工組入連管後即可
以進行 Colony PCR。

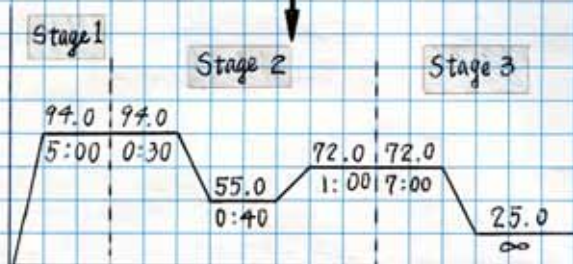
每小管所含:

T7 SP6 primer	0.5 + 0.5 μ L	$\rightarrow 18 + 18$
H ₂ O	9 μ L	$\rightarrow 324$
XX mix	10 μ L	$\rightarrow 360$
Total	20 μ L	720

共取 32 管 (+) = 36



至此是全部工組分裝到入連管
以進行 Colony PCR。



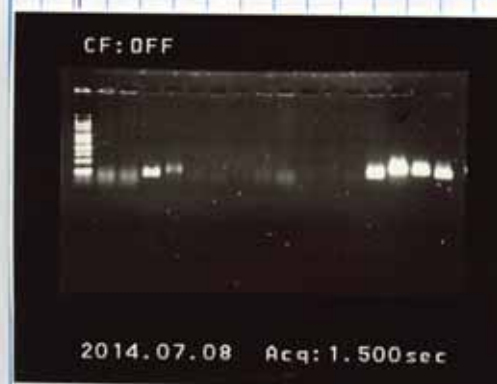
Electrophoresis:

一個 clone 有 16 管，取 17 個 well 之 gel X 2
(NLP2, NLP4 $\rightarrow$ X2)

marker: 10 μ L (每個 lane 有 2 個 gel 的不同位置以便區別)
Colony PCR product: 3 μ L

NLP2 PB1:
marker

NLP4 PB1:
marker



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.

* 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: 492 bp



選取之菌落編號:

NLP2-PBI 3

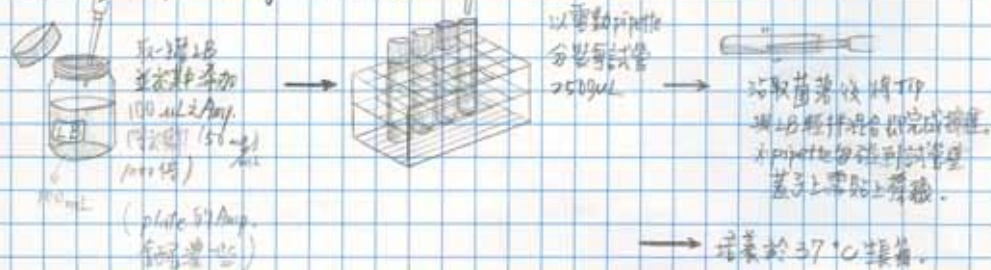
NLP2-PBI 7

NLP2-PBI 9

NLP4-PBI 5

共四隻。

→ 進行 LB + Amp 之液培:



【Streak out of stock culture】

A 470 pDL2-Nx

A 471 pNubI (positive control)

A 472 pNubG (negative control)

A 1080 pDL2-Nx-NLP7-PBI

A 1635 pDL2-Nx-NLP6-PBI

Amp. Medium

A 466 pTM BV4

A 578 pTM BV4-CHL1 full length

Kan. Medium

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)



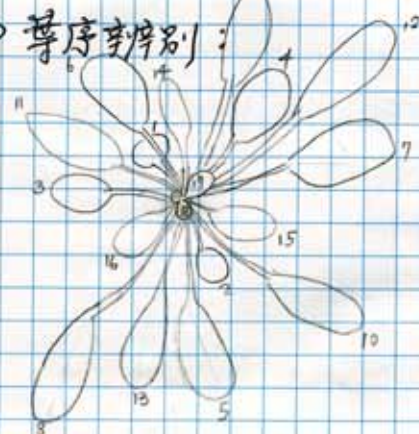
放入 37°C 生長箱培養 24 hr。

【Leaf nitrate content analysis】→ practice

* 使用 Arabidopsis:

NC1 (6/20 種) CIPK8-1 (6/23 種)

① 葉序序別:

* 將前日(7/9)之 LB+Amp 菌液由 37°C 生長箱取出
進行 plasmid extraction.

菌落編號:

NLP2-PB1 3

NLP4-PB1 5

NLP2-PB1 7

NLP2-PB1 9

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 200 μ L MX1 後 vortex
以充分打散菌液↓
加入 250 μ L MX2 後
gently invert 8~10 次
靜置 2~5 min. 以破細胞
<勿過久, 因 MX2 含 SDS, 可使
protein 變性後與 DNA 分開>

時間快到的

先倒置

使菌液

迅速加入 350 μ L 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 700 μ L 至 Column離心 9000 rpm 1 min
↓
倒去液體↓
加入 500 μ L W1V
離心 9000 rpm 1 min
↓
倒去液體↓
加入 700 μ L W5
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 50 μ L H₂O
並靜置 1 min↓
離心 14000 rpm 2~3 min
↓
得到 plasmid
存於 4°C 冰箱.

Plasmid extraction product electrophoresis:

marker: 10 μ Lplasmid: 1 μ L + 1 μ L dye + 4 μ L H₂O

Plasmid extraction product Nano drop:

	A _{260/280}	A _{260/230}	Concentration (ng/ μ L)
NLP2-3	1.86	1.23	62.3
NLP2-7	1.78	1.26	90.4
NLP2-9	1.97	2.12	126.2
NLP4-5	1.88	1.49	200.2

DNA = protein

DNA: 有機鹽類
應大於2較佳DNA 含量 (Total volume = 50 μ L)3.115 μ g4.52 μ g6.31 μ g10.01 μ g

此 protocol 之 Max. 含量

為 40 μ g

∴ 除 NLP4-5 外,

其餘皆偏低

※ 將 1/9 劃線之 Stock culture 進行液培:

A 470 pDL2-NX

A 471 pNubI

A 472 pNubG

A 1080 pDL2-NX-NLP7-PB1

A 1635 pDL2-NX-NLP6-PB1

A 466 pTMbv4

A 578 pTMbv4-CHL1 full length

Amp. Medium

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 μ L Medium.

【Teasy Vector Cutting】

使用 EcoRI restriction enzyme

37°C 27 hr

→ 若切成功將有兩個 band。

加入順序

green 不需用	10X Buffer (fast digest)	2 μL	②
→	DNA plasmid	1 μL	③
此步為 check	Enzyme (EcoRI)	0.5 μL	④
若是要 切下 insert 時 則加多 1 μL	H ₂ O	16.5 μL	①
	Total	20 μL	

菌名:

NLP2-3, NLP2-7, NLP2-9

NLP4-5

【Electrophoresis】

Load 10 μL 跑約 10 min



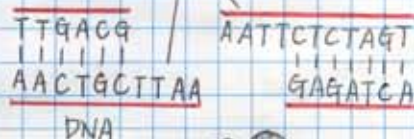
結果:

NLP2-7, NLP2-9, NLP4-5

切成功機率較高。

故送3隻定序。

STICKY ENDS



【Sequencing】

NLP2-7: 0.0918 μg/μL
NLP2-9: 0.062 μg/μL
NLP4-5: 0.002 μg/μL

送定序之 plasmid DNA 需 0.5 μg ~ 0.75 μg

故 3 DNA 之濃度配製如下:

NLP2-7: 8 μL 原液 + 2 μL H₂O

$$0.75 \div 0.0918 = 8.15$$

NLP2-9: 5 μL 原液 + 5 μL H₂O

$$0.75 \div 0.1262 = 5.94$$

NLP4-5: 3 μL 原液 + 7 μL H₂O

$$0.75 \div 0.2002 = 3.75$$

* 定序單邊可定 800 ~ 1000 bp

Teasy-NLP2, 4, 約 300 bp

$$0.75 \div 0.1955 = 3.84 \rightarrow 3 \mu L$$

→ 故單邊即足夠, 填寫 T7。

$$0.75 \div 0.194 = 3.89 \rightarrow 3 \mu L$$

$$0.75 \div 0.0512 = 14.65$$

$$0.75 \div 0.142 = 5.35 \rightarrow 5 \mu L$$

【Plasmid Extraction + Nanodrop】

將 1/10 培養之液培進行 plasmid extraction, 並測其濃度, 如下:

	260/280	260/230	Concentration (μg/μL)
pDL2-Nx	1.85	2.17	243.0
pDL2-Nx-NLP6-PBI	1.87	2.20	209.3
pDL2-Nx-NLP7-PBI	1.86	2.33	202.7
pNubI	1.87	2.37	267.1
pNubG	1.88	2.38	277.0
TMBV4	1.88	2.33	274.0
TMBV4-CHL1	1.88	2.07	244.4

$$2 \times 0.75 \div 0.186 = 2.62$$

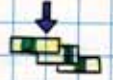
【Sequencing Results】

※ 將定序之 NLP2-7、NLP2-9、NLP4-5 結果與 ^{NLP4-PB1} 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 $\begin{cases} GGCC(ATTAC)GGCC \\ GGCC(GCCTC)GGCC \end{cases}$

※ 結果：

{ NLP2-7 未比對出相同序列

* NLP2-9 比對出為 NLP4-PB1 且 Sequence & cut site 正確

{ NLP4-5 比對出為 NLP2-PB1 但 Sequence & cut site 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， $\Delta 14 \times nlp7-1$ homo #3 已明顯發芽
 $\Delta 14 \times nlp7$ F2 #30 卻未能明顯發芽。

※ 花寶配製：

每盒倒入的 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* Thinning】(Shan Hua)

※ 7/7 種植之 NCL，54En-2，55En-0，69Gr-1，85Im-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。

※ 加入養液。

【Sequence Splicing】

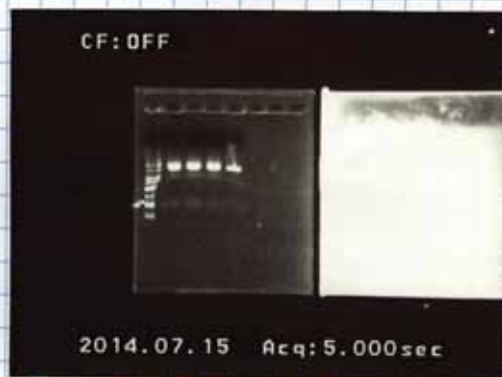
《^{Teasy} Insert DNA-NLP4-PB1》

DNA	10 μ L	1
enzyme (SfiI)	1 μ L	0.5
Buffer 4	5 μ L	2
BSA	5 μ L	2
H ₂ O	29 μ L	14.5
Total	50 μ L	20

Result =

《Vector-pDL2-Nx》

DNA	3 μ L
enzyme (SfiI)	1 μ L
Buffer 4	5 μ L
BSA	5 μ L
H ₂ O	36 μ L
Total	50 μ L



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

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

【Gel Cutting】

* 將 ^{Insert-NLP4-PB1} 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) 先在右切開的略位置

→ 取出置於照膠系統再明確觀察相對位置

(約在模板位置數 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 1.5 mL eppendorf

→ 每管加入 500 μ L GP Buffer, 並 5x invert

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

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

→ 加入 0.5 mL HN Buffer 並 9000 rpm 1 min 離心倒掉液體

→ 加入 0.5 mL WS Buffer 並 9000 rpm 1 min 離心倒掉液體

→ 空跑 14000 rpm 3 min, 並換置新 eppendorf, 靜置 30 min

→ 加入 20 μ L H₂O elute DNA, 靜置 3 min

→ 空跑 14000 rpm 3 min.

→ 取待 DNA (儲存於 4°C) * 同時也進行 pBL2-Nx 之 Splicing Product 之 DNA Isolation