

[T-easy Vector Ligation]

Ratio between Vector & Insert DNA:

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

$\frac{25}{3} = \frac{x}{0.3} \rightarrow x = 7.5 \text{ ng}$

Concentration of the Insert DNA: (measuring by Nanodrop)

NLP 2 PBI = 11.2 ng/μL

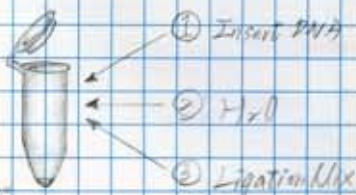
NLP 4 PBI = 7.29 ng/μL

→ Volume of the Insert DNA:

NLP 2 PBI = $\frac{7.5}{11.2} = 0.67 \mu\text{L}$

NLP 4 PBI = $\frac{7.5}{7.29} = 1.03 \mu\text{L}$ → 取 1.0 μL

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



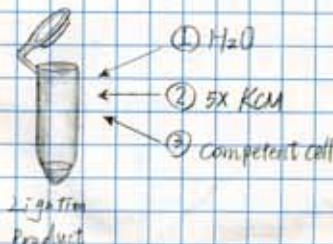
→ 將 eppendorf 置入冰箱 40 分鐘至 1 小時即完成。
(16°C)

[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 hr)

→ 配製 substrate: { X-gal = 60 μL / plate (保存於 -20°C)
IPTG = 10 μL / plate (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。使用後之玻璃珠倒於裝有 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

* 正常 Teasy 以 T7 SP6 去出的片段為 150bp
若 24A 有成功插入，則片段約為 450bp。

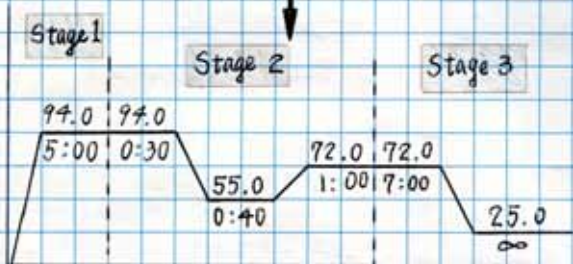


完成上述工作後牙籤即可以進行菌落 PCR。

每小管所含:		共取 32 管 (+/-) = 36
T7 + SP6 primer	0.5 + 0.5 μL	→ 18 + 18
H ₂ O	9 μL	→ 324
XX mix	10 μL	→ 360
Total	20 μL	720



完成上述工作後，將 PCR 混合液加入連管，以進行菌落 PCR。



Electrophoresis:

一個 clone 有 16 管，取 17 個 well 之 gel x 2
(NLP2, NLP4 → x2)

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

NLP2 PBI:
marker

NLP4 PBI:
marker



* 由於跑膠結果發現不盡理想，因此重新再做一次
NLP2 PBI、NLP4 PBI 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

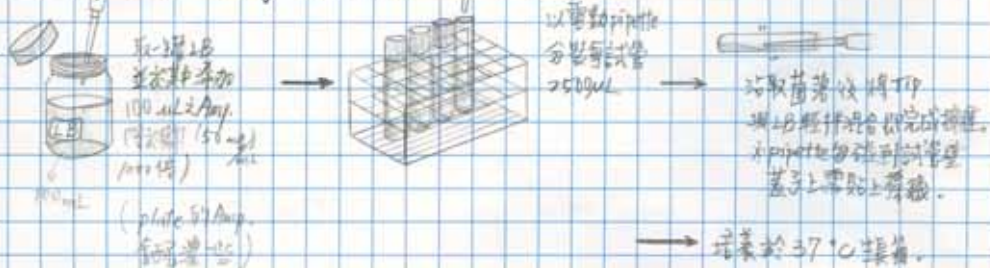
NLP4-PBI 5

NLP2-PBI 7

共四隻。

NLP2-PBI 9

→ 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 pTMBV4

A 578 pTMBV4-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)

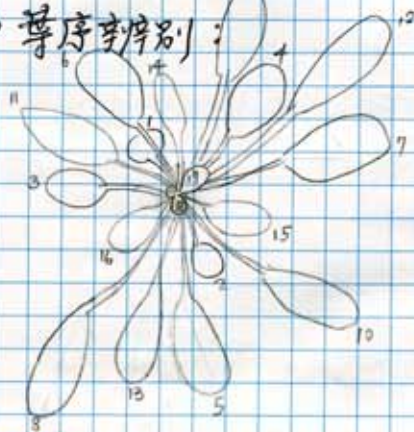
放入 37°C 生長箱培養 24 hr.

【Leaf nitrate content analysis】→ practice

* 使用之 Arabidopsis:

NCI (6/20 種) & CIPK8-1 (6/23 種)

① 葉序序別:

* 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:

NLP2-PB13

NLP4-PB15

NLP2-PB17

NLP2-PB19

共四隻.

由 LB 液培抽取 2ml 菌液 (或直接用傳的) (一次取 1ml) 加入 2ml Tube

↓
離心 9000 rpm 2 min↓
以 pipette 去除上清液* 在冰箱! 加入 200 μl MX1 後 vortex
以充分打散菌液↓
加入 250 μl 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

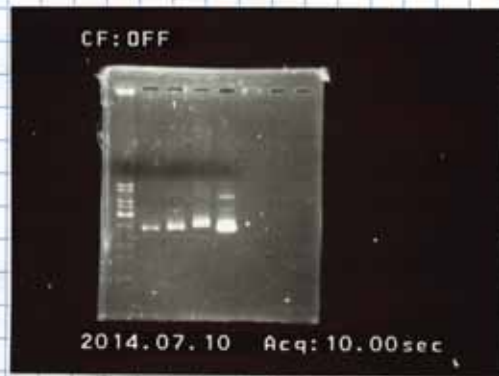
先靜置

使細胞破

↓
迅速加入 350 μl 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 μl 至 Column↓
離心 9000 rpm 1 min
倒去液體↓
加入 500 μl W1V
離心 9000 rpm 1 min
倒去液體↓
加入 700 μl W5
離心 9000 rpm 1 min
倒去液體↓
空離 14000 rpm
3 min
以去除 protein↓ 換 Tube
加入 50 μl 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 量 (Total volume = 50 μ L)3.115 μ g4.52 μ g6.31 μ g10.01 μ g

此 protocol 之 Max. 容量

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 2hr

→ 若切成功將有兩個 band。

加入順序

green 加 10X Buffer (fast digest)	2 μL	②
→ DNA plasmid	1 μL	③
Enzyme (EcoRI)	0.5 μL	④
H ₂ O	16.5 μL	①
Total	20 μL	

此步為
check
若是要
切下 insert 時
則加 5 μL

菌名:

NLP2-3, NLP2-7, NLP2-9

NLP4-5



【Electrophoresis】

Load 10 μL 跑的 10 min



結果:

NLP2-7, NLP2-9, NLP4-5

切成功機率較高。
故送了 3 隻定序。

【Sequencing】

NLP2-7: 0.391 μg/μL
NLP2-9: 0.062 μg/μL
NLP4-5: 0.200 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

$0.75 = 0.0907 = 8.30$

NLP2-9 = 5 μL 原液 + 5 μL H₂O

$0.75 = 0.1262 = 5.94$

NLP4-5 = 3 μL 原液 + 7 μL H₂O

$0.75 = 0.2002 = 3.75$

* 定序單邊可定 800 ~ 1000 bp

Teasy-NLP2, 4, 約 300 bp

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

→ 故單邊即足夠, 填寫 T7。

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

$0.75 = 0.0512 = 14.65$

$0.75 = 0.14 = 5.35 \rightarrow 5 \mu L$

【Plasmid Extraction + Nano drop】

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

$2 \times 0.75 = 1.5 \mu g \rightarrow 2.62$

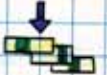
【Sequencing Results】

* 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:

每盆倒入的 700 mL 溶液, 共 3 盆故配 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)
疏苗

* 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 Splitting】

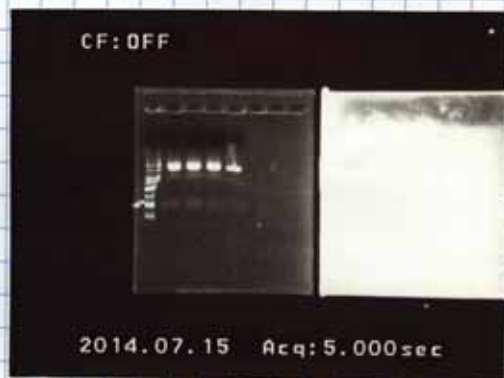
Teasy
《Insert DNA-NLP4-PBI》

DNA	10 μ L	1	
enzyme (SfiI)	1 μ L	0.5	
Buffer 4	5 μ L	>	
BSA	5 μ L	>	
H ₂ O	29 μ L	14.5	unit = 100 μ L
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 Splitting 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-PBI} 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 1.5 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 W1 Buffer 並 9000 rpm 1 min 離心倒液體

→ 加入 0.5 mL W5 Buffer 並 9000 rpm 1 min 離心倒液體

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

→ 加入 20 μ L H₂O elute DNA, 靜置 3 min

→ 空離 14000 rpm 3 min.

→ 取待 DNA (儲存於 4°C) * 同時也進行 pDL2-Nx 之 Splitting Product 之 DNA Isolation