RDFZ-China

Protocol

1. 【配置 M9 固体培养基 150mL (75mL 加 IPTG，75mL 不加 IPTG)】**在生物新馆 103 做**

先取 2 个 300mL 锥形瓶，2 个 50mL 离心管（量液体用）

在**超净台中**（每 1 个瓶）用 50mL 离心管量取 M9 液体培养基 75mL。盖好 M9 液体培养基，将 2 个锥形瓶拿出超净台，称取琼脂 Agar 12g/L=0.9g 分别加入锥形瓶中。扎封口膜，瓶身标记 RDFZ，121oC 高压蒸汽灭菌 20 min。

放入超净台，待冷却至 50-60 度，戴手套可以摸液体。

一个瓶加入 Amp 抗生素和 Cm 抗生素各 75uL（1000X），摇晃混匀。

另一个瓶中加入 Amp 抗生素，Cm 抗生素和 IPTG 各 75uL（1000X），摇晃混匀。

在平板侧面用红色（Amp），绿色（Cm）和黑色（IPTG）马克笔标记竖线，每个培养皿倒入约 15mL 培养基，待冷却后收走。

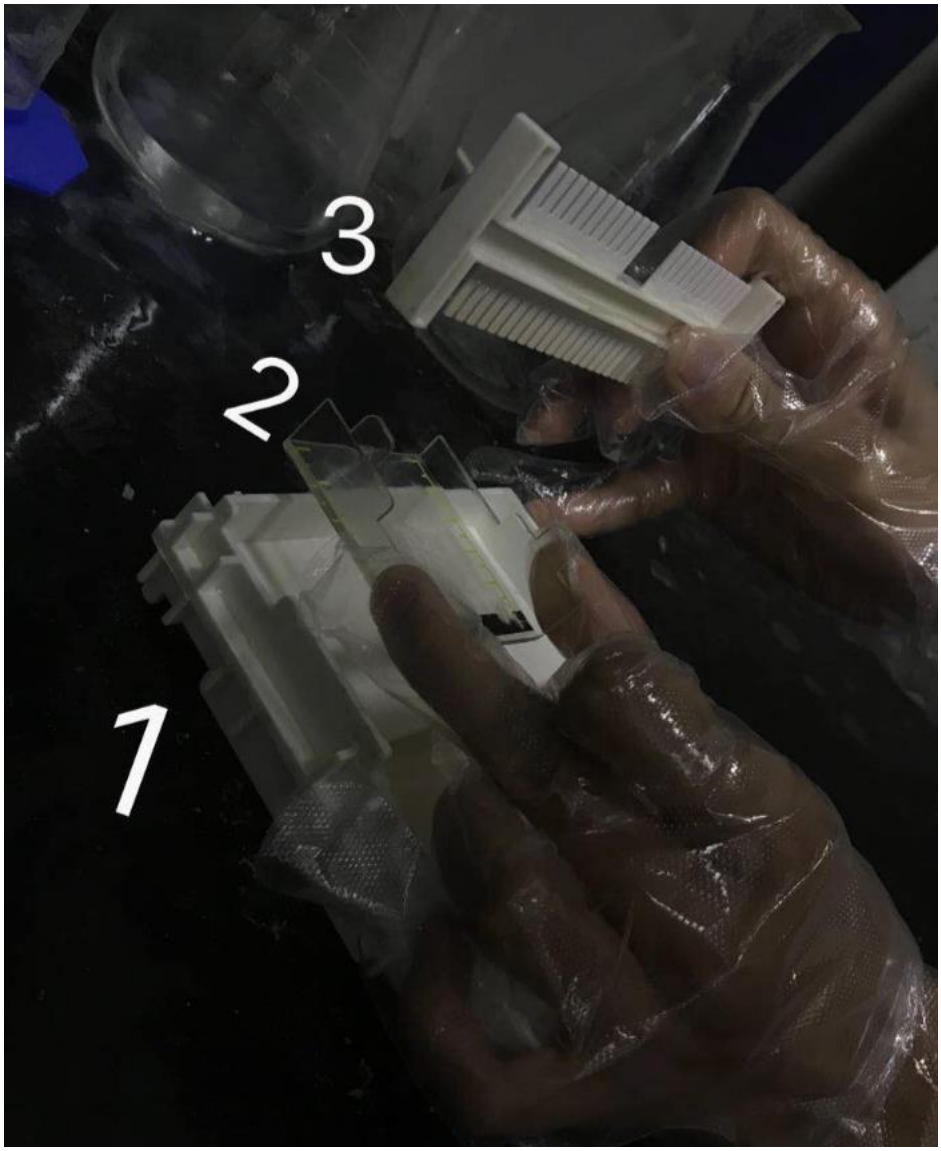
2. 【电泳胶配置】配制一块 25 孔鉴定胶和一块 6 孔回收胶。

配制质量体积分数为1%的凝胶，称取0.8g的Agarose粉末，量取80mL的TAE缓冲液中于300mL锥形瓶中，用微波炉加热融化至肉眼看不到琼脂糖颗粒（约2min）。

注意：融化琼脂糖时，第一次需完全沸腾30s，之后，用纸巾夹取出锥形瓶，摇晃数秒，之后继续加热。反复沸腾3次，一次5s，直至看不到琼脂糖颗粒。

待冷却2min至戴手套的手背感受不到烫，加入8ul的安全染料（sybrsafe）。混匀，再倒入胶板***（25孔胶倒50mL，6孔胶到30mL）。静置30min制胶。

***胶板放置顺序见下一页，先确认放好，再倒液体。



3. 【电泳及胶回收】

- 准备胶：轻轻拔掉 25 孔胶的梳子，将琼脂糖浸泡在 TAE 缓冲液里，注意样品孔朝负极放置。
- 准备样品和 marker：

  找到 Trans5K DNA ladder 和 6X loading buffer（蓝紫色，进门第一或第二个 4 度冰箱，从上至下第三层），取出备用。

样品放在第三个 4 度冰箱，从上至下第三层 or 附近，是一个有 RDFZ 盖子标记的 96 孔黄色板。上面会有 12 个 200uL Tube（1 个 8 联管，里面是 30uL 蓝色液体；4 个单独的管，里面是 50uL 透明液体），取出备用。

再从制胶台下面抽屉取出一个 PE 塑料手套平放至台面。取 6X loading buffer 1uL 至 PE 手套上，再加 5uL 透明样品至 1uL 溶液中混匀，依次有 4 个样品。

然后用 10uL 移液枪，量程调至 6uL，吸取样品，加入 DNA 胶中（孔的排序见下），注意要把枪头插入胶孔中，但是不要戳破。

按照下图的排列加样。从左到右分别是：1 号孔: 5K DNA Ladder （取 5uL）（PE 手套的 4 个样品） 2.-5 号孔：S、M、C、B（取 6uL）

6 号空着

（8 联排的 8 个样品）7-14 号孔： 1、2、3、4、5、6、7、8 （取 5uL）

15 号孔：5K DNA Ladder（取 5uL）

----------DNA 电泳槽----------

(墙)

-极

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	…

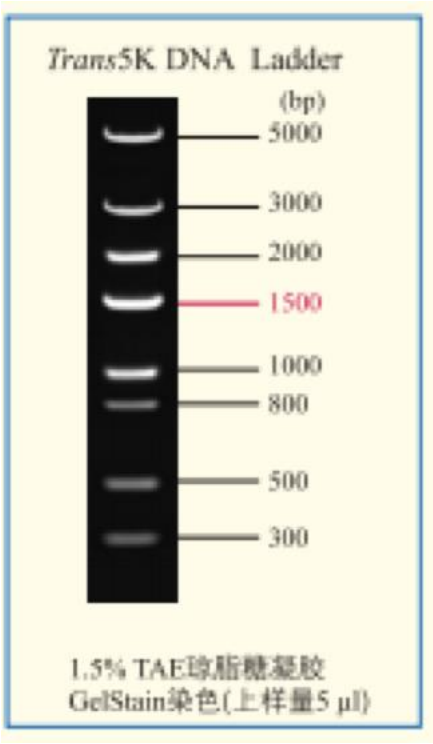
+极

(人)

----------DNA 电泳槽----------

【一定注意安全】打开电泳仪，开始跑胶（正负极会有气泡出现），**10min 按停止。确定电泳液中没有气泡后**，带上橡胶手套和 PE 手套，取出胶，放到蓝光照胶

仪中，打开仪器，用手机照相。如果不够亮，轻轻把胶从底板上推出，再观察拍照。



预测的条带大小为：

【回收】

【连接】

【转化】

转 mNeonGreen 和 sRNA 的质粒，观察 sRNA 的抑制效率。如果效率高，菌的绿色荧光就很弱。

组合为 mNeonGreen X sRNA1/3/4/6/7/9 （共 6 组）

1. 用冰盒取大半盒冰，取感受态细胞 3 管（每管 100mL）放到冰上。 取 3 个灭菌的 1.5mL EP 管，**在超净台中**，分别分装 50uL 感受态细胞至这 3 个管里。

2. 在超净台中，擦净盖子上的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标注需要做的转化组合。例如 Neon+1。
3. 在超净台中，以“Neon+1”为例。从质粒管中取 mNeonGreen 1uL 至感受态细胞中，注意 1uL 体积小，确实有液体吸入枪头中。手握枪用枪头轻轻搅拌 10 下，再取另外 1 管 sRNA1 的质粒 1uL 打入感受态细胞，用枪头轻轻搅拌 10 下。其他组合同样。
4. 超净台外，放回冰上，冰浴 30min。 插入浮漂 在 42 度热激 45s。放回冰上冰浴 2min。
5. 放回超净台，去干净的 LB 液体培养基 200uL 打入每一管中（此时共 502uL），注意不要污染 LB 液体培养基，每一次都换枪头。
6. 插入浮漂，放入 108 的 37 度摇床复苏 1h。此时可以取 6 个培养皿，将凝固好的 LB 固体培养名底部标注“Neon+sRNA1 RDFZ 7.26”。 然后取 150uL 菌液，打到培养基表面（注意不要戳培养基），然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）将菌液涂布至表面干燥为止（中途可以将涂布棒置于平板中，盖上盖，然后先涂下一个）。

背景：
分子克隆：要测试 mNeonGreen 和其他 GFP 的区别，需要把其他 GFP 接到与 mNeonGreen 同一个骨架上
目的：
回收 sfGFP、mWasabi 和质粒骨架【胶回收】
重组反应，产生 pSB4C5-mWasabi 和 pSB4C5-sfGFP【连接】
转化进 DH5a 感受态【转化】

胶回收
材料：
胶回收试剂盒【生物旧馆 108 我们的 bench 上】
异丙醇【生物旧馆 108 我们的 bench 上】
金属浴锅【生物旧馆 108 第三条 bench 靠近电脑一侧 50°C】
Nanodrop【生物旧馆 103】
离心机【13000rpm】
7.31 被自动胶回仪融的胶【生物新馆 王宣的四度冰箱里有个标着 RDFZ 的橙色 EP 管架子】

步骤：
去王宣那儿拿我们的 EP 管架，拿到生物旧馆 108，同时去生物新馆 107，-20°C 冰箱找到王宣那层，WX iGEM 的盒子中，下排，找到 Exnase II 的酶，带去生物旧馆 110 进门第一间冰箱-20 区【下层】的第一层，放入 RDFZ Enzyme 中
注意：吸附柱是粉红色的

从胶回收试剂盒中拿出三个收集管【圆底】
将试管架上的吸附柱放入收集管中
从 bench 架子上的 nuclease free water 里取出 1ml 的水，放入另一个 EP 管中 管子放入金属浴锅 打开开关 长按旋钮 调整至 65°C 再按一下 开始】
将 2ml 离心管中黄色的液体按照对应的标注加入吸附柱内
液体打入吸附柱时慢一点 小心漫出来
加满了就把没加进去的先放回对应的 2ml 离心管
离心 60 秒【注意配平】
倒掉废液
将没加完的加完
离心 60 秒【注意配平】
倒掉废液
加入 750 微升 Buffer PE【闻一闻有没有酒精味】
离心 60 秒【注意配平】
倒掉废液
再离心 60 秒【注意配平】 这时是空转 吸附柱上没有东西
倒掉废液
将吸附柱放入标注好了的 EP 管中【注意注意注意注意是空的 EP 管，有几个曾经装过胶的光下有痕迹】
金属浴锅中取出水
向吸附柱中心加入 30μl 的水

离心 60 秒【注意配平】
拿出 带上 2.5 微移液枪 去旧馆 103 【108 对面】nanodrop 那边测浓度
记录浓度于 EP 管壁上粗糙区域
记录样品名称、浓度、260/280 260/230 于此

连接:
材料:
PCR 管【第一条 bench 的离心机左侧】
五个氯霉素板子【生物新馆 103 王宣那儿】绿边
PCR 黄色盒子【桌上】
PCR 仪
水【胶回用的那个就行】
片段【刚回收完的 M 代表 mWasabi s 代表 sfGFP】
骨架【B 代表 Backbone】
Exnase II 在酶盒中

步骤:
打开 PCR 仪的开关【身后的 bench】
算 100ng 质粒骨架【B 管】需要多少微升
算 32ng 片段【s 管和 m 管分别算】需要多少微升
总体积需要 10μl,里面包括酶，所以算一算 10μl 减去 5μl 酶和骨架和片段后还剩多少体积，配液时用水补齐。
PCR 管标注 M【意味 mWasabi】S【意味 sfGFP】C1【对照组 1】C2【对照组 2】C3【对照组 3】
向 M 和 S 中加入对应体积片段和骨架，加入相应体积的水
向 C1 中加只加入 B
C2 只加 M
C3 只加 S
三个管子补水至 10μl
去 110 冰箱内找到酶，放入旁边的冰盒中后拿回 108
向每个管中加入 5μl 的酶
放入 PCR 仪中
选取 RDFZ Infusion
开始反应
收拾东西 酶放回原位
冰盒转化用

转化

材料:
刚刚反应完的产物

DH5a 感受态【生物旧馆 103 进门右手边卖冰棍一样的-80°C 冰箱内，写着秦宸睿的袋子里】
1.5ml EP 管 x2【标注 M 和 S】
涂布棒【在生物旧馆 1083 号抽屉中】
PE 手套
转刚刚连接完测产物

用冰盒取大半盒冰，取感受态细胞 1 管（每管 100mL）放到冰上。两个 EP 管，**在超净台中**，分别分装 50uL 感受态细胞至这 2 个管里。

在超净台中，擦净培养皿盖子上的水，用笔的细投在盖子上标注 sfGFP 和 mWasabi

从反应产物中取 5uL 至对应管的感受态细胞中用枪头轻轻搅拌 10 下。。

放回冰盒上，冰浴 30min

此时去调金属浴锅至 42°C
冰浴 30 分钟后
在 42 度热激 45s。放回冰上冰浴 2min。

放回超净台，取干净的 LB 液体培养基 500uL 打入每一管中（此时共 502uL），注意不要污染 LB 液体培养基，每一次都换枪头。

插入浮漂，放入 110 的 37 度摇床复苏 1h。
取出菌液
在超净台中，放入之前标记好的培养皿
取 150uL 菌液，打到培养基表面（注意不要戳培养基）
然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）
将菌液涂布至表面干燥为止
边转边涂
用过的涂布棒放入 PE 手套中
涂下一个

涂完的板子放入 37°C 培养箱
菌液放入 110 进门第三个冰箱 4°C 第三层
收拾台面

背景：

sfGFP 和 mWasabi 已经连接上，需要进行菌落 PCR 验证连接效果。

CcdB 测序已出，挑取对应的菌进入液体培养基进行培养。

sRNA 的板子没亮，现在需要看一看是 M9 板子的问题还是什么问题，昨天已经用 C 抗划线了，今天看荧光

TlpA36 的板子也没亮，昨天划线了，看荧光

M4 送测的量不够，一整管都拿王宣那儿去

试验场地：

生物旧馆 108

生物旧管 110

菌落 PCR：

材料：

8.1 转化的板子

记号笔

新的对应抗性的板子【生物新馆 103】

GoTaq Long PCR mix【生物旧管 110 人大附中酶盒】

RDFZ 25 和 VF2 引物【生物新馆 104 4°C 冰箱】

步骤：

观察昨日转化结果

一个人去生物新馆 104 的 4°C 冰箱 王宣那层拿引物 一个比较大的盒子里装着

小心别把冰箱里别的东西撞倒了

另一个人去生物新馆培养箱内找到昨天涂的板子 去 103 用切胶仪看有没有荧光 板子都要单独拍照

回到旧馆 108

抽屉 2 里的实验记录本里找出相应的 protocol

配 Mix

引物用 RDFZ25 和 VF2

23μl 的水

1μl RDFZ 25

1μl VF2

25μl 的 GoTaq Long PCR Mix

在平板上用 10μl 的枪头挑取单克隆

在新的板子上划线

做标记

把新的板子放入 37°C 培养箱中

然后把枪头放入 PCR Mix 里，吹吸

PCR 程序

94°C 5 分钟

94°C 30s

58°C 30s

72°C 2min30s

--

72°C 2min

12°C 无限

黄色部分重复 30 cycles

跑上 PCR 仪后去配胶

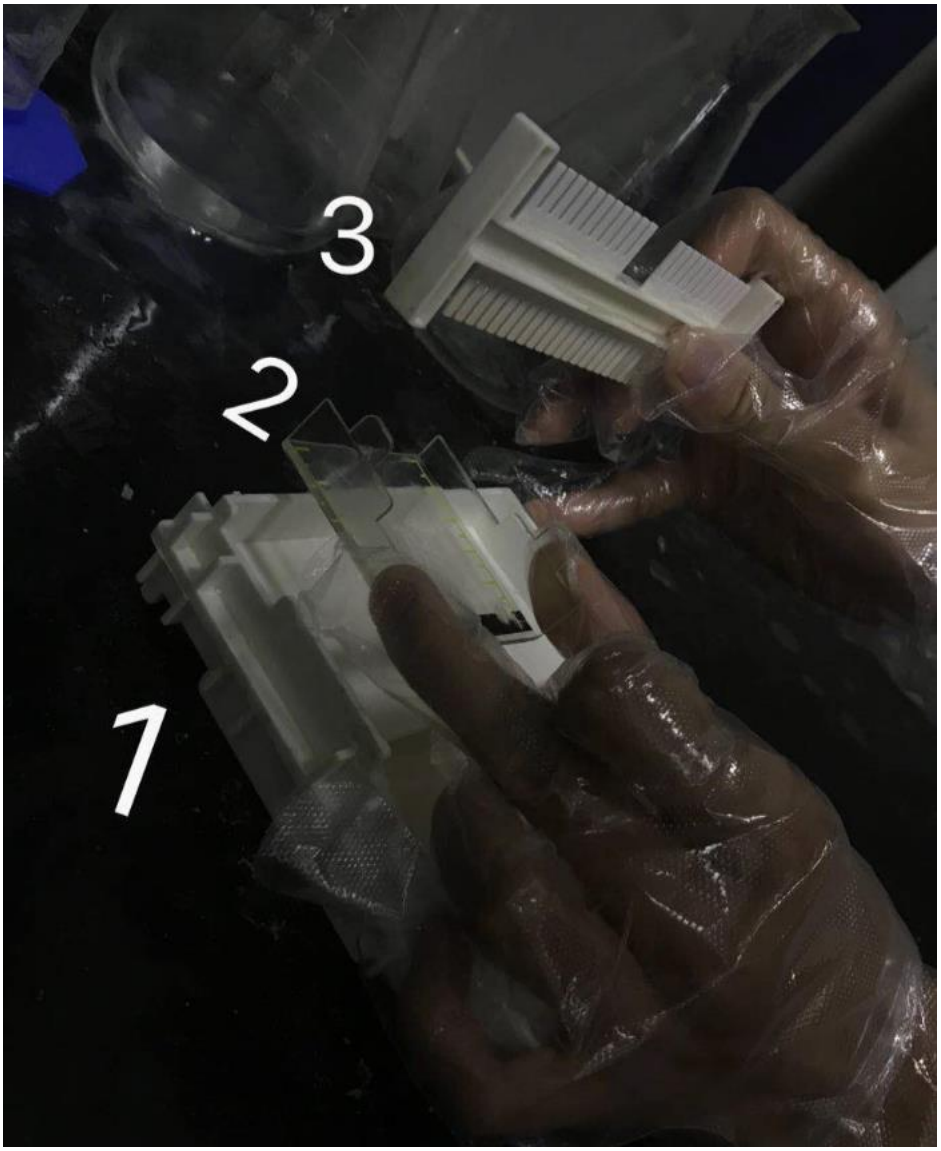
1. 【电泳胶配置】配制一块小的鉴定胶和一块 6 孔回收胶。

配制质量体积分数为1%的凝胶，称取0.3g的Agarose粉末，用50毫升离心瓶【上面标着SHSBNU TAE】量取30mL的TAE缓冲液中于100mL锥形瓶中，用微波炉加热融化至肉眼看不到琼脂糖颗粒（约2min）。

注意：融化琼脂糖时，第一次需完全沸腾30s，之后，用纸巾夹取出锥形瓶，摇晃数秒，之后继续加热。反复沸腾3次，一次5s，直至看不到琼脂糖颗粒。

待冷却2min至戴手套的手背感受不到烫，加入3ul的安全染料（sybrsafe）。混匀，再倒入胶板。静置30min制胶。

***胶板放置顺序见下一页，先确认放好，再倒液体。



2. 【电泳及胶回收】

- 准备胶：轻轻拔掉胶的梳子，将琼脂糖浸泡在 TAE 缓冲液里，注意样品孔朝负极放置。
- 准备样品和 marker：

  找到 Trans5K DNA ladder 和 6X loading buffer（蓝紫色，进门第一或第二个 4 度冰箱，从上至下第三层），取出备用。

  再从制胶台下面抽屉取出一个 PE 塑料手套平放至台面。取 6X loading buffer 1uL 至 PE 手套上，再加 5uL 透明样品至 1uL 溶液中混匀，依次有 4 个样品。

  然后用 10uL 移液枪，量程调至 6uL，吸取样品，加入 DNA 胶中（孔的排序见下），注意要把枪头插入胶孔中，但是不要戳破。

  按照下图的排列加样。从左到右分别是：1 号孔: 5K DNA Ladder （取 5uL）

（PE 手套的 4 个样品） 2.-5 号孔：sfGFP-1【意味菌落 1】 sfGFP-2 sfGFP-3 mWasabi-1

----------DNA 电泳槽----------

（墙）

-极

1	2	3	4	5

+极

（人）

----------DNA 电泳槽----------

【一定注意安全】打开电泳仪，开始跑胶（正负极会有气泡出现），**10min 按停止。确定电泳液中没有气泡后**，带上橡胶手套和 PE 手套，取出胶，放到蓝光照胶仪中，打开仪器，用手机照相。如果不够亮，轻轻把胶从底板上推出，再观察拍照。

挑菌:

材料:

12ml 摇菌管【生物新馆 103 超净台右侧】*2

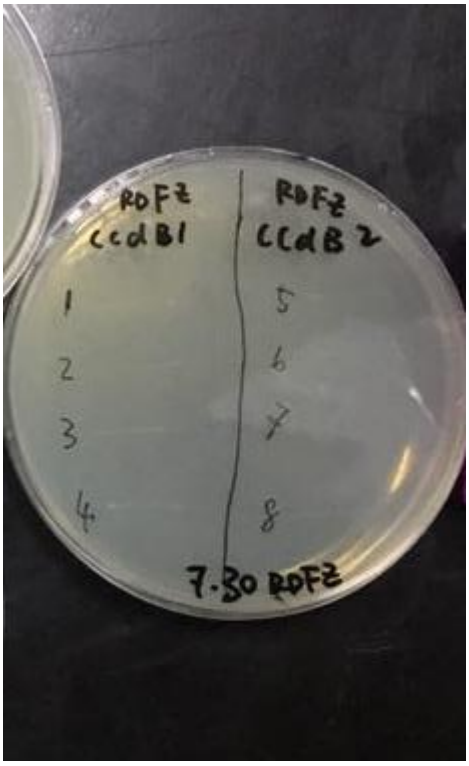
LB 培养基【生物新馆 103 进门第二个 bench 上 取个锥形瓶里的】

抗生素【绿色瓶管子 氯霉素】【生物新馆 103 进门冰箱左侧公共抽屉里】

CcdB 的板子【生物新馆 104 的 4°C 冰箱 王宣那层】

步骤：

找出板子



在超净台中

点酒精灯

向 LB 中 1：1000 加入抗生素

摇匀

向两个离心管中加入 7ml LB

标注 ccdB-1 和 ccdB-2

用小枪头挑相应菌落

直接将枪头打入摇菌管中

锥形瓶封好膜和橡皮筋 放入超净台右后方的架子上

收拾桌面 倒掉垃圾

摇菌管带回生物旧馆 110 的摇床

背景：
ccdB 已经转化进 TOP10,可挑菌培养、保菌，之后进行自杀基因效果比对
sRNA 已经涂板，可以观察荧光结果
sRNA 已挑菌培养，需保菌

实验场地：
生物旧馆 110

ccdB 挑菌：
材料：
LB 液体培养基【旧馆 110 内 8.1 分装】
摇菌管
氯霉素【旧馆 110 RDFZ Antibiotic 盒内 Cm】

实验场地：
生物旧馆 110

步骤：
从培养箱取出 ccdB-1 的板子
放入旧馆 110 超净台
摇菌管标注 ccdB-1 Top10
往摇菌管中加入 4 毫升液体培养基
加入 4 μl 抗生素
用枪头在 ccdB-1 挑取单克隆
将枪头打入摇菌管中
摇菌管放入 37°C 培养

sRNA 保菌：
材料：
sRNA+mNeon 的菌液
EP 管
甘油
EP 管架

场地：
生物旧馆 110 超净台

步骤：
在 EP 管上分别标记 sRNA1\3\4\6\7\9
取 600 微升的菌液加入 EP 管中
取 400 微升的甘油加入 EP 管中
轻轻的吹打混匀
放入生物旧馆 103 公共区域立式-80°C 冰箱最下层【先放入生物旧馆 108 我们的 Bench 上有个盒子，再把盒子放进冰箱】

背景：
CcdB 已经转化上了【假设它转化出来了】，EndoG 和 GBSV1 已经划线，可以对比各种自杀基因的效果了。

Suicide Gene Characterization:
材料：
M9+氯霉素+IPTG 平板【生物新馆 104 4°C 冰箱 王宣那层】*1
M9+氯霉素平板*1
深孔板
呼吸膜
氯霉素【生物新馆 103 -20°C 冰箱公用试剂区】
马克笔

地点：
生物新馆

步骤：
找到
取出昨天转化的 ccdB 和划线过的 EndoG 和 GBSV1 的平板
取出 mNeonGreen 划过线的平板【8 月 1 日划线，在 4°C 冰箱内】
打开超净台
标注平板
平板用马克笔分为四个区域
GBSV1 ccdB EndoG Neon
挑取单菌落
在对应区域划线
在另一块 M9 板子上重复以上步骤
包上 PE 手套
放入 108 培养箱培养

打开深孔板
在四个格子中加入
M9 培养基 1ml
氯霉素 1μl
分别挑入一个菌落
培养过夜
s

背景：

之前重新连接的 sfGFP 已部分测序正确，之前连接的 mWasabi 也完成了大部分测序。

mWasabi 已经是在 Top10 中，sfGFP 是在 DH5a 中。

CcdB 在那管质粒丢失后，已经重新挑菌摇菌，今天可以进行提质粒+转化。

实验场地：

生物旧馆 108

CcdB 提质粒与转化：

材料：

提质粒试剂盒

EP 管

2ml 离心管【圆底】

Nuclease free water

离心机 12000rpm、

CcdB 的菌液【新馆 108 摇床中】

步骤：

拿出要用的所有试剂，逐一确认

吸附柱放进收集管

标记吸附柱【注明里面将要放什么】

加入 500μl 的平衡液 BL

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

在 2ml 离心管中加入 2ml 菌液

离心 60 秒【注意配平】

去除上清

再加 2ml 菌液

离心 60 秒【注意配平】

去除上清

重复至菌液加完

在 2ml 离心管中加入 250μl buffer P1【4°C 冰箱中】

Vortex 10 秒【此时另一名同学调出出另一把 350μl 的移液枪】

加入 250μl buffer P2

温和的上下翻转 8 次

加入 350μl buffer P3

温和的上下翻转 8 次 此时将出现白色絮状沉淀

离心 10 分钟【注意配平】

此时去打开金属浴锅，将分装好的水放入金属浴锅中，调至 65°C

如有未沉淀的白色物体 继续离心 5 分钟【注意配平】

取上清放入吸附柱中【注意不要吸到任何沉淀】

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

向吸附柱加入 600μl Buffer PW【闻一闻有没有酒精味】

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

向吸附柱加入 600μl Buffer PW

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

离心 60 秒【注意配平】

将吸附柱放入 EP 管中

静置 15 分钟

加入 40μl 的 Nuclease Free Water

静置一分钟

离心 60 秒【注意配平】

Nanodrop 测浓度

CcdB 转化：

材料：

Top10 感受态【新馆 108 -80°C 冰箱内】

M9 培养基无抗【王宣 4°C 冰箱】

M9 固体培养基【王宣 4°C 冰箱右边小框内袋子装着的】

涂布棒

冰盒

步骤

取生物旧馆 110 的-20 度中的冰盒 or 生物新馆 103 的泡沫盒+生物新馆 112 借冰（其他实验室，客气一点）

从新馆 108 的—80 度冰箱王宣层取的 Top10 感受态细胞 1 管，擦干离心管上的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 ccdB1。取 1uL ccdB-1 的质粒放入感受态细胞中。

注意 1uL 体积小，保证确实有液体吸入枪头中。手握枪用枪头轻轻搅拌 10 下，然后盖上盖子。超净台外，放回冰上，冰浴 30min。

擦干平板底部的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 ccdB1 RDFZ 8.7。

冰浴 30min 后，插入浮漂 在 42 度（103 的水浴锅）热激 45s。放回冰上冰浴 2min。

放回超净台，取干净无抗的 M9 液体培养基 150uL 打入每一管中（此时共 251uL），插入浮漂，放入 108 的 37 度摇床放平板的地方复苏 1h。然后取 150uL 菌液，打到培养基表面（注意不要戳培养基），然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）将菌液涂布至表面干燥为止（中途可以将涂布棒置于平板中，盖上盖，然后先涂下一个）。

在 108 摇床身后，取 1 个 PE 塑料手套，套上拧一下口，放入 108 的 37 度培养箱上层（不用摇）。

sfGFP 挑菌：

材料：

sfGFP 的板子

左边 S1

M9 培养基

氯霉素

摇菌管

IPTG

步骤：

在超净台中标注摇菌管 一管不加 IPTG 一管加 1E-2 一管加 1E-3

向摇菌管倒入 5ml 氯霉素 M9 培养基 如果没有氯霉素的 M9 就现场加入 5μl 的抗生素进加了

培养基的摇菌管

向 1E-2 加入 50μl 的 IPTG 向 1E-3 加入 5μl 的 IPTG

用枪头分别挑入一个菌落进一个管子中

枪头可留在摇菌管中

摇菌管放入 108 摇床上层培养

背景：

CcdB 有蜜汁菌落，先做菌落 PCR 鉴定是不是我们的菌落

sfGFP 已摇菌，可以提质粒并转进 Top10

sRNA 已挑菌诱导，可以上酶标仪

sRNA

材料：

PBS+Kana【4 度冰箱】

M9 培养基【C+A 抗】

96 孔板

步骤：

在 96 孔板中每个有数字的位置加入 180 微升的 PBS

左手持大的枪 调到 800μl 右手持 20μl 的枪

在深孔板中，左手吹打对应的孔五下，右手迅速取 20μl 的菌液

加入相应的 96 孔板 的孔中

重复至每个数字加完

96 孔板上酶标仪

另一名同学在深孔板每个有菌的孔下加入 1ml M9【C+A】

左手持大的枪 调到 800μl 右手持 20μl 的枪

在深孔板中，左手吹打对应的孔五下，右手迅速取 20μl 的菌液

加入正下方的液体培养基中

培养 1 小时后

左手持大的枪 调到 600μl 右手持 200μl 的枪

加入相应的 96 孔板的孔中

上酶标仪

ccdB 挑菌：

M9 培养基

氯霉素

摇菌管

IPTG

步骤：

在超净台中标注摇菌管 一管不加 IPTG 一管加 1E-2 一管加 1E-3

向摇菌管倒入 5ml 氯霉素 M9 培养基 如果没有氯霉素的 M9 就现场加入 5μl 的抗生素进加了培养基的摇菌管

向 1E-2 加入 50μl 的 IPTG 向 1E-3 加入 5μl 的 IPTG

用枪头分别挑入一个菌落进一个管子中

枪头可留在摇菌管中

摇菌管放入 108 摇床上层培养

背景：

ccdB 转出了个神奇的菌落，进行菌落 PCR 来确认是不是 ccdB，PCR 已经完成，需要进行跑胶验证

sfGFP 和 mWasabi 测序成功，可以将 sfGFP 提质粒转化，mWasabi 划线

pTac-LuxR 已经 PCR 线性化，进行跑胶、胶回收、连接、转化

sRNA 重新上酶标仪

跑胶：

实验场地：生物旧馆 110

材料：

PCR 产物

步骤

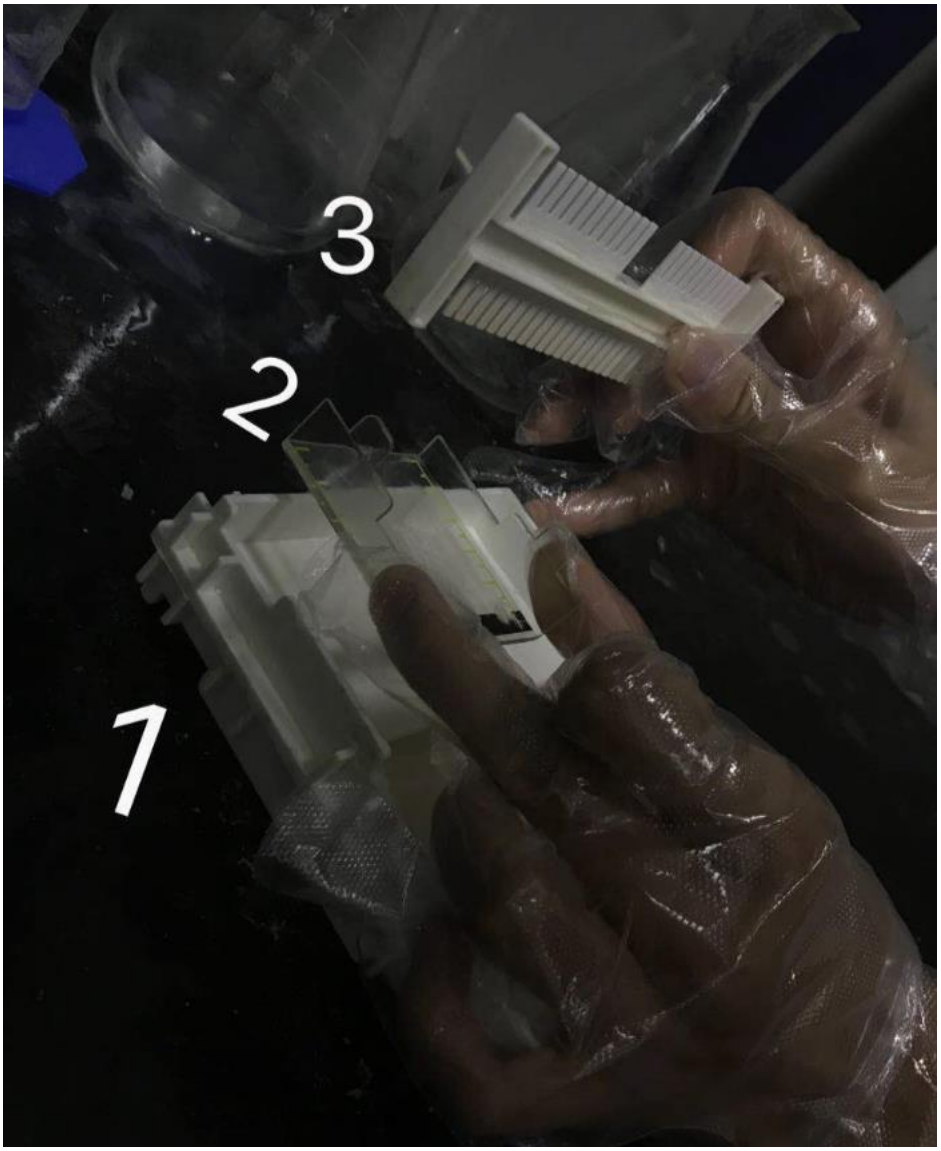
【电泳胶配置】配制一块 6 孔回收胶。

配制质量体积分数为1%的凝胶，称取0.3g的Agarose粉末，用50毫升离心瓶【上面标着SHSBNU TAE】量取30mL的TAE缓冲液中于100mL锥形瓶中，用微波炉加热融化至肉眼看不到琼脂糖颗粒（约2min）。

注意：融化琼脂糖时，第一次需完全沸腾30s，之后，用纸巾夹取出锥形瓶，摇晃数秒，之后继续加热。反复沸腾3次，一次5s，直至看不到琼脂糖颗粒。

待冷却2min至戴手套的手背感受不到烫，加入3ul的安全染料（sybrsafe）。混匀，再倒入胶板。静置30min制胶。

***胶板放置顺序见下一页，先确认放好，再倒液体。



1. 【电泳及胶回收】

准备胶：轻轻拔掉胶的梳子，将琼脂糖浸泡在 TAE 缓冲液里，注意样品孔朝负极放置。

准备样品和 marker：

找到 Trans5K DNA ladder 和 10X loading buffer（蓝紫色，进门第一或第二个 4 度冰箱，从上至下第三层），取出备用。

调出一把 5μl 和 30μl 的移液器

将 5μl 的 10X loading buffer 加入 PCR 产物中，用 30μl 的枪混匀后，加入孔中

按照下图的排列加样。从左到右分别是：1 号孔: 5K DNA Ladder （取 5uL）

2.-4 号孔：LuxR TlpA36 ccdB

----------DNA 电泳槽----------

(墙)

-极

1	2	3	4

+极

(人)

切胶回收

材料:

跑完的胶

EP 管

马克笔

刀【切胶仪正上方的架子上】

QIAGEN Gel Extraction 试剂盒

QIAGEN Gel Extraction 说明书

步骤:

在分析天平称 EP 管

重量标注在管子上

胶放上切胶仪

确认条带长度

拿刀切相应的条带 轻轻的推进 EP 管中

不要切到隔壁的条带！！

切完照下 EP 管 看看有没有亮

每个样品孔切一管

切完标注瓶盖里面是啥

然后再去称量 算出胶的重量

然后按照说明书加样、离心

顺便补齐这个 Protocol

洗脱用 50μl 的水

融胶要融彻底

背景：
ccdB 已经挑菌，可保菌待用
GFP 们已经挑进深孔板，明天可对每个 GFP 进行表征
换抗性已经转化，可挑菌培养

GFP 表征：
材料：
96 孔板【新馆 103 进门右手边顶上的绿色盒子里】
超净台
酶标仪
8.12 在深孔板中的菌液
M9 培养基+C 抗
IPTG

步骤：
先把深孔板拿到新馆 103 的切胶仪
打开荧光 看看该亮的有没有亮
如果都没亮

那就得重新挑了

如果该亮的没全亮 确认是哪些没亮
如果一切正常或者部分正常

绿色区域为 8.12 的菌液孔
灰色区域为新的孔
往新的孔里加与孔上相同的培养基与 IPTG 的组合【1ml M9+1ul IPTG】
加完后
左手持 1000 的移液器，调到 700 右手持 20 的移液器 调到 20
都插上枪头
700 的移液器吹吸一个孔 5 下 20 的移液器迅速在孔的中下部取 20ul 菌液 转至正下方的含有培养基的孔中
37°C 培养一个小时
一个小时后
左手持 1000 的移液器，调到 700 右手持 200 的移液器 调到 200
都插上枪头

700 的移液器吹吸一个孔 5 下 200 的移液器迅速在孔的中下部 取 200ul 的菌液
加入 96 孔板中

	S1	S2	S3	W1	W2	W3	N1	N2	N3	M9			
	S1	S2	S3	W1	W2	W3	N1	N2	N3	M9			

绿色为诱导过的
白色为未诱导过的
用酶标仪 scan
导出数据
处理完后 取剩下的 sfGFP 菌液保菌

培养换抗性产物:
材料:
昨天转化的平板
Amp 抗生素【旧馆 110 -20 冰箱内】
LB 培养液【旧馆 110 超净台内分装过的】
摇菌管【旧馆 108 bench 的抽屉里】

步骤:
往摇菌管中加入 5ml 的 LB 培养基
加入 5ul 的抗生素
用枪头挑一个菌落
枪头直接打入摇菌管
盖上盖子
摇两管
做好标记
放入 37°C 摇床过夜

甘油保菌:
保完的放入新馆王宣 iGEM 的-80 中
EP 管用 8.11 灭菌的
注意要在超净台中拿烧过的镊子取 EP 管

背景：
ccdB 已经转化上了，可以挑菌
sfGFP 似乎有问题？可以考虑重新转化

M9 配置

M9 配置：

M9 medium 配置（本次拟配 1L M9 medium）

【成分】

5X M9 salts, 1mM thiamine hydrochloride, 0.4% glucose（已有 600g/L glucose 母液）, 0.2% casamino acids, 2mM $MgSO_4$, and 0.1mM $CaCl_2$

【设备耗材】

500mL、1L 量筒，2L 烧杯，500mL 蓝口瓶 1 个，50mL 离心管 2 个，，泵，1mL 移液器，1mL 枪头，称量天平，称量纸，药匙，新买的过滤器【旧馆 108 我们的 bench 的抽屉里】

1. 500mL 5X M9 salt 配置

依次加 32g $Na_2HPO_4.7H_2O$ 7.5g KH_2PO_4 1.25g NaCl 2.5g NH_4Cl，用 dH_2O 定容至 500mL，放入蓝口瓶备用，瓶身标记 500mL 5X M9 salt，日期和 RDFZ。

2. 200mM $MgSO_4$（100X）配置（分子量 120，水合物需要注意）

取 0.48g $MgSO_4$ 溶于 20mLdH_2O，放于 50mL 离心管中备用，管壁标记 100X $MgSO_4$，日期和 RDFZ。

3. 100mM $CaCl_2$（1000X）配置（分子量 111，水合物需要注意）

取 0.222g $CaCl_2$ 溶解至 20mLdH_2O，放于 50mL 离心管中备用，管壁标记 1000X $CaCl_2$，日期和 RDFZ。

4. M9 medium 预混

配置 1L M9 medium，依次用量筒/移液器量取下列溶液

序号	溶液	体积（mL）
1	5X M9 salts	200
2	200mM $MgSO_4$（100X）	10
3	100mM $CaCl_2$（1000X）	1
4	600g/L glucose	6.7
5	Casamino acids 粉末	2g
6	thiamine hydrochloride（VB1）粉末	0.33g

混匀，使得粉末溶解，加入 dH_2O 定容至 1000mL。

5. 过滤除菌

在超净台中将干净的容器与过滤器相连（自带 1 个 250mL 的，蓝口瓶等容器也可以装）。将泵插上电，泵管插到过滤器上，倒入混合好的 M9 medium，注意别倒超过容器体积的液体。在超净台中拧开过滤器与容器，盖紧容器，瓶身标记 M9 medium 已灭菌，日期和 RDFZ。

重新连接：
5 ul 的 Exnase
4ul 的片段【TlpA36 回收产物】
1ul 稀释过的骨架
50°C 1 小时
取 5ul 进行转化

用 DH5a【旧馆 103 黄色的冰箱内 写着秦宸睿的袋子里】转化

背景：
sfGFP 已经划线挑菌，要提质粒和保菌。
CcdB 第四次转化，看会不会长出来吧，长出来的就挑菌到深孔板中
换抗性的质粒已经转化上，如果有长出来，就挑菌摇菌
PhiC31 和 Bxb1 需要重新转化
挑菌：
材料：
摇菌管【旧馆 108 我们的 bench 抽屉里 或者新馆 103 超净台右边】
记号笔
C 抗、A 抗【新馆 103 公共冰箱中】
转化完的平板【新馆 108 摇床最上层】
LB 液体培养基【新馆 103 超净台对面的架子上】
步骤：
超净台中
向摇菌管中倒入 5ml 的培养基
每管加入 5ul 的抗生素
CcdB 是 C 抗
换抗性产物是 A 抗
挑取菌落进相应的摇菌管中
枪头可直接打进摇菌管中
做好标记
盖盖子
放入摇床中培养

SfGFP
材料：
1.5ml 的离心管
SfGFP 菌液
步骤：
取 500ul 菌液加入离心管中
标记号对应的摇菌管
13000 转离心 1 分钟
用切胶仪看荧光
如果亮了 那就对相应的菌液保菌和提质粒

转化

从生物新馆 108 的-20 度冰箱王宣层取出 Bxb1 和 PhiC31 的质粒

取生物旧馆 110 的-20 度中的冰盒 or 生物新馆 103 的泡沫盒+生物新馆 112 借冰（其他实验室，客气一点），从 108 的—80 度冰箱王宣层去除未开封的 Top10 感受态细胞 1 管，分装 50ul 进另一个 EP 管，擦干离心管上的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 bx 和 phiC。取 1uL 的质

粒放入感受态细胞中。

注意 1uL 体积小，保证确实有液体吸入枪头中。手握枪用枪头轻轻搅拌 10 下，然后盖上盖子。超净台外，放回冰上，冰浴 30min。

培养基平板先准备好，从新馆 103 的 4 度公用冰箱（电泳槽后面）拿出 2 个 Kana 的平板，擦干平板底部的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 phiC31 RDFZ 8.16 和 bxb1 RDFZ 8.16。

第 3 步 30min 后，插入浮漂 在 42 度（103 的水浴锅）热激 45s。放回冰上冰浴 2min。

放回超净台，从 103 水浴锅上面取干净的 LB 液体培养基 150uL 打入每一管中（此时共 251uL），插入浮漂，放入 108 的 37 度摇床放平板的地方复苏 1h。然后取 150uL 菌液，打到培养基表面（注意不要戳培养基），然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）将菌液涂布至表面干燥为止（中途可以将涂布棒置于平板中，盖上盖，然后先涂下一个）。

在 108 摇床身后，取 1 个 PE 塑料手套，套上拧一下口，放入 108 的 37 度培养箱上层（不用摇）。

背景：
今天七夕
phiC31 没有转化出来，要重新转化
昨天挑了菌，今天需要提质粒

转化：

材料：

提质粒试剂盒

EP 管【饭盒里的*8】

2ml 离心管【圆底】*8

Nuclease free water

离心机 12000rpm、

8 馆菌液【新馆的摇床上层的左侧】

菌液分别是

TlpA36

pTac-LuxR

LuxI-LuxR

PhIF

各两管 最后一共需要 8 管质粒

步骤：

拿出要用的所有试剂，逐一确认

吸附柱放进收集管

标记吸附柱【根据摇菌管注明里面将要放什么】

加入 500μl 的平衡液 BL

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

在 2ml 离心管中加入 2ml 菌液

离心 60 秒【注意配平】

去除上清

再加 2ml 菌液

离心 60 秒【注意配平】

去除上清

重复至菌液加完

在 2ml 离心管中加入 250μl buffer P1【4°C 冰箱中 旧馆 110 进门第一台家用冰箱上层打开侧面 SHSBNU 的也能用如果找不到 RDFZ 的】

Vortex 10 秒【此时另一名同学调出出另一把 350μl 的移液枪】

加入 250μl buffer P2

温和的上下翻转 8 次

加入 350μl buffer P3

温和的上下翻转 8 次 此时将出现白色絮状沉淀

离心 10 分钟【注意配平】

此时去打开金属浴锅，将分装好的水放入金属浴锅中，调至 65°C

如有未沉淀的白色物体 继续离心 5 分钟【注意配平】

取上清放入吸附柱中【注意不要吸到任何沉淀】

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

向吸附柱加入 600μl Buffer PW【闻一闻有没有酒精味】

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

向吸附柱加入 600μl Buffer PW

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

离心 60 秒【注意配平】

将吸附柱放入 EP 管中

静置 15 分钟

加入 40μl 的 Nuclease Free Water

静置一分钟

离心 60 秒【注意配平】

Nanodrop 测浓度

Ep 管盖标注时间和名称【比如 TlpA36 1 8.17，另一管 TlpA36 2 8.17】

管壁标注浓度

每种质粒的管 1 都放旧馆 110 进门右手边的家用冰箱下层第一层里的 RDFZ plasmid 盒中

管 2 交给王宣，快递给 genscript

Bxb1 转化：

材料：

Top10 感受态【新馆 108 -80°C 冰箱内】

LB 培养基无抗【新馆 103 架子上】

LB 固体培养基 K 抗【新馆 103 跑胶区】

Bxb1 质粒【新馆 108 -20°C 冰箱 WXiGEM 中】

涂布棒

冰盒

步骤

取生物旧馆 110 的-20 度中的冰盒 or 生物新馆 103 的泡沫盒+生物新馆 112 借冰（其他实验室，客气一点）

从新馆 108 的—80 度冰箱王宣层取的 Top10 感受态细胞 1 管，擦干离心管上的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 bxb1。取 1uLbxb1 的质粒放入感受态细胞中。

注意 1uL 体积小，保证确实有液体吸入枪头中。手握枪用枪头轻轻搅拌 10 下，然后盖上盖子。

超净台外，放回冰上，冰浴 30min。

擦干平板底部的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 bxb1 RDFZ 8.17。

冰浴 30min 后，插入浮漂 在 42 度（103 的金属浴锅）热激 45s。放回冰上冰浴 2min。

此时把金属浴锅调回 65°C

放回超净台，取干净无抗的 LB 液体培养基 150uL 打入每一管中（此时共 251uL），插入浮漂，放入 108 的 37 度摇床放平板的地方复苏 1h。然后取 150uL 菌液，打到培养基表面（注

意不要戳培养基），然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）将菌液涂布至表面干燥为止（中途可以将涂布棒置于平板中，盖上盖，然后先涂下一个）。

在 108 摇床身后，取 1 个 PE 塑料手套，套上拧一下口，放入 108 的 37 度培养箱上层（不用摇)。

背景：

昨天七夕
实验几乎没动
我也相信大家不会打开每天的实验计划来跟进实验进度
希望大家多注意下队伍
每个人分摊一点 事情就没那么多
最后两个月，一定一定要把握好

phiC31 没有转化出来，要**重新转化**
前天挑了菌，今天需要**提质粒**
【TlpA36 PhlF phiC31 pTac-LuxR LuxI-LuxR】
换抗性的还没做好，要重新做 **PCR、连接、转化**

提质粒【可找王宣学长使用 QIAGEN 的机器 如果没用机器就先把 PhlF 和 LuxI-LuxR 的菌液放进 4°C 冰箱 只提 LuxI-LuxR PhlF】

材料：

提质粒试剂盒

EP 管【饭盒里的*8】

2ml 离心管【圆底】*8

Nuclease free water

离心机 12000rpm、

8 馆菌液【新馆的摇床上层的左侧】

菌液分别是

TlpA36

pTac-LuxR

LuxI-LuxR

PhlF

phiC31【在旧馆 110 两条 bench 之间的摇床中】

各两管 最后一共需要 8 管质粒

步骤：

拿出要用的所有试剂，逐一确认

吸附柱放进收集管

标记吸附柱【根据摇菌管注明里面将要放什么】

加入 500μl 的平衡液 BL

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

在 2ml 离心管中加入 2ml 菌液

离心 60 秒【注意配平】

去除上清

再加 2ml 菌液

离心 60 秒【注意配平】

去除上清

重复至菌液加完

在 2ml 离心管中加入 250μl buffer P1【4°C 冰箱中 旧馆 110 进门第一台家用冰箱上层打

开侧面 SHSBNU 的也能用如果找不到 RDFZ 的】

Vortex 10 秒【此时另一名同学调出出另一把 350μl 的移液枪】

加入 250μl buffer P2

温和的上下翻转 8 次

加入 350μl buffer P3

温和的上下翻转 8 次 此时将出现白色絮状沉淀

离心 10 分钟【注意配平】

此时去打开金属浴锅，将分装好的水放入金属浴锅中，调至 65°C

如有未沉淀的白色物体 继续离心 5 分钟【注意配平】

取上清放入吸附柱中【注意不要吸到任何沉淀】

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

向吸附柱加入 600μl Buffer PW【闻一闻有没有酒精味】

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

向吸附柱加入 600μl Buffer PW

离心 60 秒【注意配平】

倒掉废液

离心 60 秒【注意配平】

将吸附柱放入 EP 管中

静置 15 分钟

加入 40μl 的 Nuclease Free Water

静置一分钟

离心 60 秒【注意配平】

Nanodrop 测浓度

Ep 管盖标注时间和名称【比如 TlpA36 1 8.17，另一管 TlpA36 2 8.17】

管壁标注浓度

每种质粒的管 1 都放旧馆 110 进门右手边的家用冰箱下层第一层里的 RDFZ plasmid 盒中

管 2 交给王宣，快递给 genscript

换 pTac-LuxR 的抗性

场地：新馆 103

材料：

刚提完的质粒 pTac-LuxR 和 TlpA36

引物 RDFZ46 47 48 49【在旧馆 110

Q5 聚合酶【找王宣学长拿】

测完浓度配 PCR Mix

25ul 的 Q5 Mix

1ul 的 RDFZ**46** 引物

1ul 的 RDFZ**47** 引物

TlpA36 为模板

25ul 的 Q5 Mix

1ul 的 RDFZ**48** 引物

1ul 的 RDFZ**49** 引物

pTac-LuxR 为模板

模板取 30ng

各配两管

标注 PCR 管【pTac-LuxR 标 B　　TlpA36 标 A】

TlpA36 程序

1 98 5min

2 98 30s

3 56.8 ℃ 30s

4 72°C 30s【用另外一管做 72°C 10s】

Go to 2 35 cycle

5 72℃ 5 min

6 16 ∞

pTac-LuxR 程序 u

1 98 5min

2 98 30s

3 60.4 ℃ 30s

4 72°C 3min【用另外一管做 72°C 70s】

Go to 2 35 cycle

5 72℃ 5 min

6 16 ∞

反应结束后 每管加入 1ul 的 Dpn1 酶

37°C 反应 1 小时

80°C 反应 20 分钟

跑 DNP1 到还剩四十分钟时

回生物旧馆 110 制备一块回收用的 6 孔胶

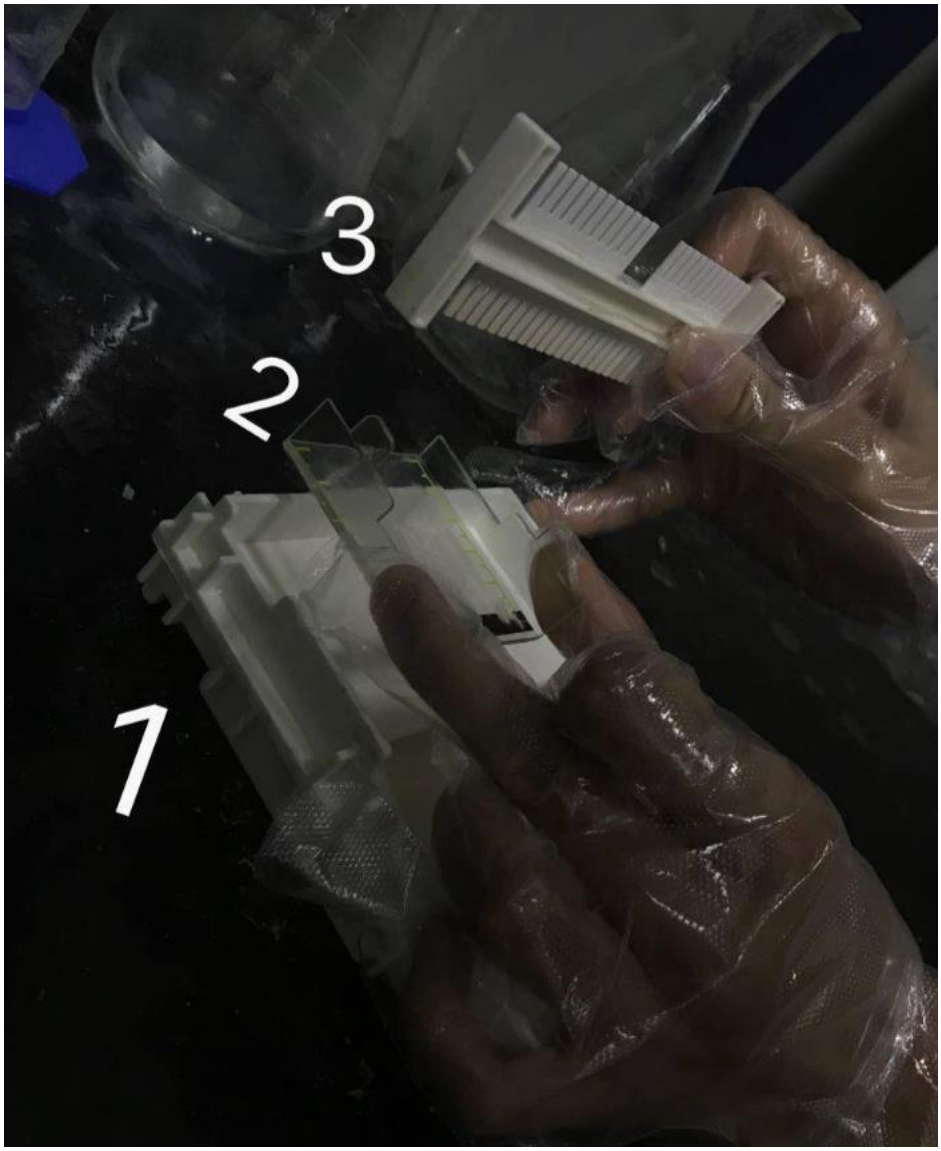
【电泳胶配置】6 孔回收胶。

配制质量体积分数为1%的凝胶，称取0.3g的Agarose粉末【生物旧馆110最里面的bench的架子上 称量纸在天平旁边的盒子里】，量取30mL的TAE缓冲液中于100mL锥形瓶中，用微波炉加热融化至肉眼看不到琼脂糖颗粒（约2min）。

注意：融化琼脂糖时，第一次需完全沸腾30s，之后，用纸巾夹取出锥形瓶，摇晃数秒，之后继续加热。反复沸腾3次，一次5s，直至看不到琼脂糖颗粒。

待冷却2min至戴手套的手背感受不到烫，加入3ul的安全染料（sybrsafe）。混匀，再倒入胶板***（6孔胶到30mL）。静置30min制胶。

***胶板放置顺序见下一页，先确认放好，再倒液体。



1. 【电泳及胶回收】

准备胶：轻轻拔掉梳子，将琼脂糖浸泡在 TAE 缓冲液里，注意样品孔朝负极放置。

准备样品和 marker：

找到 Trans8K DNA ladder 和 6X loading buffer（蓝紫色，进门第一或第二个 4 度冰箱，从上至下第三层），取出备用。【旧馆没有 8k 的话，就把胶拿到新馆】

取 10X loading buffer 4uL 至 PCR 管中上，

然后用 100ul 移液枪，量程调至 20uL，吸取样品，加入 DNA 胶中（孔的排序见下），注意要把枪头插入胶孔中，但是不要戳破。

按照下图的排列加样。从左到右分别是：1 号孔: 8K DNA Ladder （取 5uL）

2 A (较长 PCR 时间) 3 A（较短 PCR 时间） 4 B（较长 PCR 时间） 5 B（较短 PCR 时间）

----------DNA 电泳槽----------

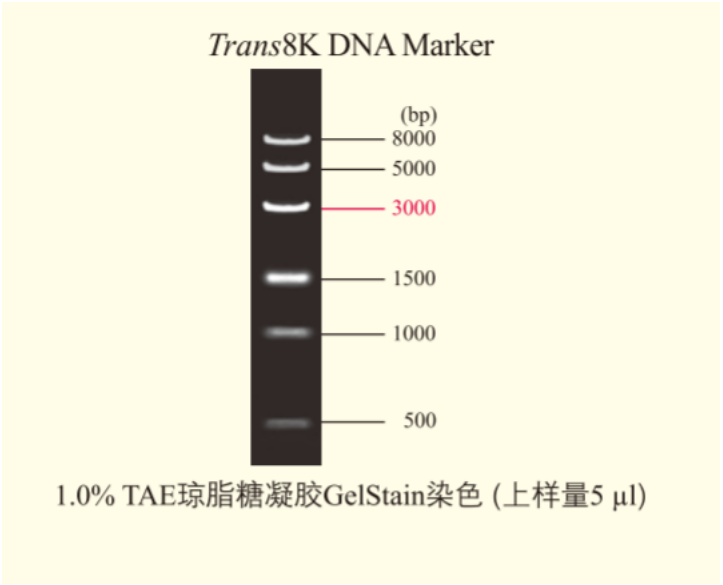
-极

1	2	3	4	5

+极

----------DNA 电泳槽----------

【一定注意安全】打开电泳仪，开始跑胶（正负极会有气泡出现），**10min 按停止。确定电泳液中没有气泡后**，带上橡胶手套和 PE 手套，取出胶，放到蓝光照胶仪中，打开仪器，用手机照相。如果不够亮，轻轻把胶从底板上推出，再观察拍照。



如果条带单一

则使用 PCR 产物回收试剂盒 进行产物回收

材料:

EP 管

PCR 回收试剂盒

Nuclease free water

离心机【13000rpm】

步骤

PB buffer 5:1 PCR 产物【50μl 的 PCR 产物加入 250μl 的 PB】

在吸附柱上做标记

吸附柱【QIAquick column 放入 2ml 收集管】

将 PB buffer+产物放入吸附柱

离心 60 秒【注意配平】

丢弃废液

加入 750μl buffer PE

离心 60 秒【注意配平】

丢弃废液

空转离心 60 秒【注意配平】

丢弃废液

晾 15 分钟

吸附柱放入 EP 管中

加 50μl 水

离心 60 秒【注意配平】

Nanodrop 测浓度:

如果条带不单一 对胶进行切胶回收

材料:

EP 管【切胶之前称重量】

刀片【在 110 电泳区正上方的架子上】

胶回收试剂盒【108 我们的 bench 的架子上】

步骤:

去分析天平秤称 EP 管的重量

切胶仪 隔着挡板切取正确的条带【A 管应为 991bp B 管应为 6444bp】

将相应的胶放入 EP 管中

再称重量 得出胶的重量 100mg 约等于 100ul

向管中加入 3 倍胶的体积的 Buffer QG

金属浴锅【108 最后一条 bench 上】调至 50°C

每 2-3 分钟 vortex 一下【108 第二条 bench 靠黑板那侧】

当胶完全溶解时

加入 1 倍胶的体积的异丙醇【108 我们的 bench 上锡纸包着的 50ml 离心管】

拿出吸附柱【粉色的 小的带盖子的】上面标注里面将要装什么产物

放入收集管【没盖子的】

将 EP 管里融完的东西加入吸附柱中

13000rpm 离心 1 分钟【注意配平】

去掉废液

向吸附柱中加入 750ul Buffer PE【注意有没有加酒精】

去掉废液

找到灭过菌的饭盒 拿出 EP 管

做相应的标记

将吸附柱放入 EP 管中

向吸附柱中加入 50ml 的水【Nuclease Free Water 从桌上的小瓶子里取 1ml 进灭过菌的 EP 管 用 EP 管的水】

13000 离心 1 分钟

注意配平

Nanodrop【旧馆 103 测浓度】

Gibson 连接：

Protocol 在这写

连接时开始做 Bxb1 转化

Bxb1 转化：

材料：

Top10 感受态【新馆 108 -80°C 冰箱内】

LB 培养基无抗【新馆 103 架子上】

LB 固体培养基 K 抗【新馆 103 跑胶区】

Bxb1 质粒【新馆 108 -20°C 冰箱 WXiGEM 中】

涂布棒

冰盒

步骤 u

取生物旧馆 110 的-20 度中的冰盒 or 生物新馆 103 的泡沫盒+生物新馆 112 借冰（其他实验室，客气一点）

从新馆 108 的—80 度冰箱王宣层取的 Top10 感受态细胞 1 管，擦干离心管上的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 bxb1。取 1uLbxb1 的质粒放入感受态细胞中。

注意 1uL 体积小，保证确实有液体吸入枪头中。手握枪用枪头轻轻搅拌 10 下，然后盖上盖子。

超净台外，放回冰上，冰浴 30min。

擦干平板底部的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 bxb1 RDFZ 8.18。

冰浴 30min 后，插入浮漂 在 42 度（103 的金属浴锅）热激 45s。放回冰上冰浴 2min。

此时把金属浴锅调回 65°C

放回超净台，取干净无抗的 LB 液体培养基 150uL 打入每一管中（此时共 251uL），插入浮漂，放入 108 的 37 度摇床放平板的地方复苏 1h。然后取 150uL 菌液，打到培养基表面（注意不要戳培养基），然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）将菌液涂布至表面干燥为止（中途可以将涂布棒置于平板中，盖上盖，然后先涂下一个）。

在 108 摇床身后，取 1 个 PE 塑料手套，套上拧一下口，放入 108 的 37 度培养箱上层（不用摇)。

Bxb1 复苏时，取旧馆 110 超净台旁冰箱上层第三层中的 Amp 平板带到新馆

新馆 108 的—80 度冰箱王宣层取的 Top10 感受态细胞 1 管，擦干离心管上的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记‘AmpR’。取 10ul 的连接产物放入感受态细胞中。

手握枪用枪头轻轻搅拌 10 下，然后盖上盖子。

超净台外，放回冰上，冰浴 30min。

擦干平板底部的水，用 F 型号（细）马克笔在盖子上标记 AmpR RDFZ 8.18。

冰浴 30min 后，插入浮漂 在 42 度（103 的金属浴锅）热激 45s。放回冰上冰浴 2min。

此时把金属浴锅调回 65℃

取全部菌液，打到培养基表面（注意不要戳培养基），然后用涂布棒（像摊煎饼果子一样）将菌液涂布至表面干燥为止（中途可以将涂布棒置于平板中，盖上盖，然后先涂下一个）。

在 108 摇床身后，取 1 个 PE 塑料手套，套上拧一下口，放入 108 的 37 度培养箱上层（不用摇)。

时间协调好

剩余的 phiC31 和 bxb1 质粒送测序

材料:
深孔板【新馆 103 进门右手边顶上】
封口膜【新馆 103 进门左手边超净台右侧】
M9 培养基两管【50ml
IPTG 诱导剂【新馆 103 进门左手边公用冰箱左下角的盒子里 黄色管子】
氯霉素【IPTG 旁边 绿色板子】
-80°C 冻存菌
sfGFP mNeonGreen mWasabi【标注可能是个 M】
新馆 108 -80°C 冰箱 王宣 iGEM 盒子中

步骤:
向一管 M9 里加入 50ul 氯霉素和 50ul IPTG
向一管 M9 里加入 50ul 氯霉素

	mWasabi	mWasabi	mWasabi		sfGFP	sfGFP	sfGFP		mNeonGreen	mNeonGreen	mNeonGreen
	mWasabi	mWasabi	mWasabi		sfGFP	sfGFP	sfGFP		mNeonGreen	mNeonGreen	mNeonGreen

在超净台中
深孔板标注【RDFZ 8.18 GFP】
橙色框内加入 M9+IPTG+Cm 1ml
在灰色框内加入 M9+Cm 1ml

挑相应菌/取 3ul 菌液去相应的孔里
贴上封口膜

放入 37°C 的深孔振荡器【新馆 108】

连接：
材料：
PCR 管【第一条 bench 的离心机左侧】
Amp 平板【生物旧馆 110 超净台旁边的冰箱上层第三层】
PCR 黄色盒子【桌上】
PCR 仪
水【胶回用的那个就行】
片段【之前胶回完的 TlpA36
骨架【刚刚胶回完的 pTac-LuxR
Vazyme 在酶盒中

步骤：
打开 PCR 仪的开关【身后的 bench】
算 130ng 质粒骨架需要多少微升
算 36ng 片段需要多少微升
总体积需要 10μl,里面包括酶，所以算一算 10μl 减去 5μl 酶和骨架和片段后还剩多少体积，配液时用水补齐。
PCR 管标注
向 PCR 管中加入对应体积片段和骨架，加入相应体积的水
PCR 管补水至 10μl
去 110 冰箱内找到酶，放入旁边的冰盒中后拿回 108
向每个管中加入 5μl 的酶
放入 PCR 仪中
选取 RDFZ Infusion
50°C 的时间改为 60 分钟
开始反应
收拾东西　酶放回原位
冰盒转化用

背景：
换抗性的产物已经转化上了
长出来就挑菌培养
没长出来就放弃吧，配 M9 培养基

挑菌：
材料：
摇菌管【旧馆 108 我们的 bench 抽屉里】
记号笔
A 抗【旧馆 110 进门右手边第一个家用冰箱下层第一层 antibiotic 盒子里】
转化完的平板【新馆 108 摇床第一层手套包着 标注“RDFZ 8.20 pTac-LuxR-TlpA”】
LB 液体培养基【旧馆 108 我们的 bench 上或旧馆 110 超净台中分装过的 如果分装过的用完了就拿外面的在超净台中开紫外照 20 分钟后 分装进 50ml 离心管】
步骤：
超净台中
向摇菌管中倒入 5ml 的培养基
每管加入 5ul 的抗生素
换抗性产物是 A 抗
挑取菌落进相应的摇菌管中
枪头可直接打进摇菌管中
做好标记
盖盖子
放入摇床中培养

配培养基
地点：生物旧馆
先取 2 个 300mL 锥形瓶，2 个 50mL 离心管（量液体用）
在**超净台中**（每 1 个瓶）用 50mL 离心管量取 M9 液体培养基 150mL。
盖好 M9 液体培养基，将 2 个锥形瓶拿出超净台，称取琼脂 Agar 12g/L=1.8g 分别加入锥形瓶中。扎封口膜，瓶身标记 RDFZ，121°C 高压蒸汽灭菌 20 min。
教学中
放入超净台，待冷却至 50-60 度，戴手套可以摸液体。
一个瓶加入 Amp 抗生素和 Cm 抗生素各 150uL（1000X），摇晃混匀。
另一个瓶中加入 Amp 抗生素，Cm 抗生素和 IPTG 各 150uL（1000X），摇晃混匀。
在平板侧面用红色（Amp），绿色（Cm）和黑色（IPTG）马克笔标记竖线
或者用记号笔在板子上标注【用细头】
每个培养皿倒入约 15mL 培养基，待冷却后收走。

材料:
深孔板【新馆 103 进门右手边顶上】
封口膜【新馆 103 进门左手边超净台右侧】
M9 培养基两管【50ml
IPTG 诱导剂【新馆 103 进门左手边公用冰箱左下角的盒子里 黄色管子】
C 抗【IPTG 旁边 绿色板子】
A 抗【旧馆 110 -20°C plasmid 盒子】
sfGFP mNeonGreen mWasabi 的板子
sRNA 的板子
pTac-LuxR LuxI-LuxR 的板子
新馆 108 -80°C 冰箱 王宣 iGEM 盒子中

步骤:
先把板子拿到切胶仪上照一下，看看是不是都亮了
向一管 M9 里加入 50ul 氯霉素和 50ul IPTG
向一管 M9 里加入 50ul 氯霉素

	mWasabi	mWasabi	mWasabi		sfGFP	sfGFP	sfGFP		mNeonGreen	mNeonGreen	mNeonGreen
	mWasabi	mWasabi	mWasabi		sfGFP	sfGFP	sfGFP		mNeonGreen	mNeonGreen	mNeonGreen

在超净台中
深孔板标注【RDFZ 8.18 GFP】
橙色框内加入 M9+IPTG+Cm 1ml
在灰色框内加入 M9+Cm 1ml

挑相应菌/取 3ul 菌液去相应的孔里
贴上封口膜

放入 37°C 的深孔振荡器【新馆 108】

背景
抱歉我前天实验计划写反了
得重新划线准备后期表征

划线
材料:
C 抗板子 2 块【新馆 103】
A+C 抗板子 1 块【新馆 104 王宣 4 度】
记号笔
尺子/PCR 盒
冻存菌【pTac-LuxR LuxI-LuxR sRNA134679　mWasabi mNeonGreen sfGFP】

步骤:

C 抗平板用记号笔分成两瓣

C 抗平板用记号笔分成三瓣

A+C 抗平板用记号笔分成六瓣

板子边缘有颜色标记的 qwp

用枪头蘸取冻存菌液/冰渣
在培养基相应的位置上轻轻的划线
丢掉枪头

六瓣的分别划入 sRNA134679
标注好哪个是哪个
一定要记号笔哦
两瓣的分别划入 pTac-LuxR 和 LuxI-LuxR
三瓣的划入 mWasabi mNeonGreen sfGFP
放入包上手套，放入培养箱

背景：
CcdB 已经划线，需要挑菌送测序
sRNA 已经划线，板子先留着，下次再做
三种 GFP 已经划线，需要挑菌进深空板摇起来
pTac-LuxR 和 LuxI-LuxR 已经划线，需要挑菌进深空板摇起来
AHL 清华已经帮忙配了一些，我们需要拿来验证模型

ccdB 挑菌
材料：
摇菌管【我们的抽屉里】
LB 培养基【旧馆 110 超净台中】
C 抗【旧馆 110 冰箱-20°C plasmid 盒中】

步骤：
在摇菌管中加入 5ml 的 LB 培养基
加入 5ul 的氯霉素
要两管
标注要挑的单克隆
先挑起来在一管中涮一涮
再到另一管中把枪头打入
标记为 RDFZ ccdB
没有枪头的管放在旧馆 110 的摇床培养
有枪头的管用 parafilm 封好 和深孔板一起拿去新馆

摇菌
材料：
深孔板【103 进门右手边的冰箱顶上】
M9 培养基【旧馆的】
C 抗【旧馆 110 我们的 plasmid 盒中】
IPTG 诱导剂【找清华 iGEM 的学长拿】
AHL 诱导剂【找清华 iGEM 的学长拿】
封口膜【新馆 103 进门左手边超净台旁】
GFP 和 Lux 的板子【新馆 108 培养箱内】

步骤：
找个框，在新馆取划过线的板子和深空板、封口膜
出门摘掉手套，回到旧馆
切胶仪上看荧光
GFP 应该都亮
LuxI-LuxR 应该亮
找到 IPTG 和抗生素和 M9
在超净台中，向两管 M9 中各加 50ul 的 C 抗
向其中一管加入 50ul 的 IPTG

标注为 M9 Cm IPTG-3 和 M9 Cm IPTG

深空板的排布如下

mWasabi	mWasabi	mWasabi		sfGFP	sfGFP	sfGFP		Neon	Neon	Neon	
Wasabi	Wasabi	Wasabi		sfGFP	sfGFP	sfGFP		Neon	Neon	Neon	
pTacLuxR	pTacLuxR	pTacLuxR		LuxI	LuxI	LuxI					
-5	-5	-5									
-7	-7	-7									

橙色的格子里加入 M9+C 抗+IPTG
蓝色的格子里加入 M9+C 抗
pTac-LuxR 下面的-5 和-7 意味着加入-5 次方摩尔的 AHL 和-7 次方摩尔的 AHL 加 1ul 进 1ml 的培养基

挑取相应菌落进深空板相应位置
一定一定要换枪头

贴上封口膜
收拾超净台
一只手的手套摘掉 用于开门关门
另一只手拿着深孔板
拿到新馆 108 37°C 深孔振荡器中培养

摇菌
材料:
深孔板【103 进门右手边的冰箱顶上】
M9 培养基【旧馆的】
C 抗【旧馆 110 我们的 plasmid 盒中】
IPTG 诱导剂【找清华 iGEM 的学长拿】
AHL 诱导剂【找清华 iGEM 的学长拿 找刘若宸确认】
封口膜【新馆 103 进门左手边超净台旁】
GFP 和 Lux 的板子【新馆 108 培养箱内】

步骤:
找个框，在新馆取划过线的板子和深空板、封口膜
出门摘掉手套，回到旧馆
切胶仪上看荧光
GFP 应该都亮
LuxI-LuxR 应该亮
找到 IPTG 和抗生素和 M9
在超净台中，向两管 M9 中各加 50ul 的 C 抗
向其中一管加入 50ul 的 IPTG
标注为 M9 Cm IPTG-3 和 M9 Cm IPTG

深孔板的排布如下
橙色的格子里加入 M9+C 抗 1ml
蓝色的格子里加入 M9+C 抗+IPTG 1ml
绿色的格子里加入 M9+C 抗+IPTG 1ml 和 1ul 的 AHL

挑取相应菌落进深空板相应位置
一定一定要换枪头

贴上封口膜
收拾超净台
一只手的手套摘掉 用于开门关门
另一只手拿着深孔板
拿到新馆 108 37°C 深孔振荡器中培养

背景：
pTac-LuxR 已重新用 AHL 诱导，今天看荧光
GFP 似乎没亮，需要重新划线

荧光：
材料：
EP 管【3 管】
记号笔

步骤：
在新馆 108 的深孔振荡器中取出深孔板
超净台中打开
取左上角每一行各一管菌液
标注行数
离心 2 分钟
到切胶仪上看荧光

划线
材料：
王宣 4 度里找到任何标有 sfGFP mWasabi mNeonGreen 的培养皿
C 抗板子 1 块
记号笔

步骤
将 C 抗板一分为三
检查找到的板子亮不亮
取亮的相应的菌落划线
注意不要划破培养基
标注好套上 PE 手套放进培养箱

20180909

实验内容：

1. pSEVA-121 PCR 加 PhlF.
2. AHL 最低诱导浓度曲线摇菌

AHL Protocol:

Preparing Series of AHL Concentrations

1. Add 100ul IPTG (1M) and 100ul Amp into 100ml M9 media.
2. Split M9 media into 10 separate 15ml tube, 8ml each tube.
3. Add 8ul AHL solution (10^-11M) into a tube with 8ml M9 media to get AHL solution with concentration of 10^-14M.
4. And so forth, obtain AHL solution of 10^-13M, 10^-12M…., and 10^-6M. One of the tube is not added AHL.
5. Add 500ul M9 respectively with 10^-6M AHL into 1A, 1B, and 1C of a 96-well plate; add 500ul M9 with 10^-7M AHL into 2A, 2B, and 2C; and forth on, add 500ul M9 with 10^-14M AHL into 9A, 9B, and 9C.
6. Add 500ul M9 without AHL into 10A, 10B, and 10C respectively.
7. Add 500 ul M9 media without IPTG and AHL into well 11A, 11B, 11C, 12A, 12B, 12C, and 12D.

Preparing bacteria culture

1. Add 100ul M9 without AHL and IPTG into three 200ul pcr tubes, respectively.
2. Pick a colony (pTac-LuxR-pLux-GFP) from plate and mix the colony thoroughly with M9 media respectively. Label each bacteria culture as 1, 2,
3. and 3.
4. Add 5ul bacteria culture 1 into A1, A2, A3… and A11, respectively. Similarly, add 5ul bacteria culture 2 into row B and culture 3 in row C.
5. Add 5ul negative control strain into A12, B12, and C12.
6. D12 is blank for M9 media with Amp.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-6	-7	-8	-9	-10	-11	-12	-13	-14	0	M9	NC
B												
C												
D												Blank
E												
F												
G												
H												

Column 1-9: M9 + Amp + IPTG + AHL (10^{-6}M to 10^{-14}M) + GFP (pTac-LuxR-pLux-GFP)

Column 10: M9 + Amp + IPTG + GFP

Column 11: M9 + Amp + GFP

Column 12: M9 + Amp + Negative Control

Row 1: Replicate 1

Row 2: Replicate 2

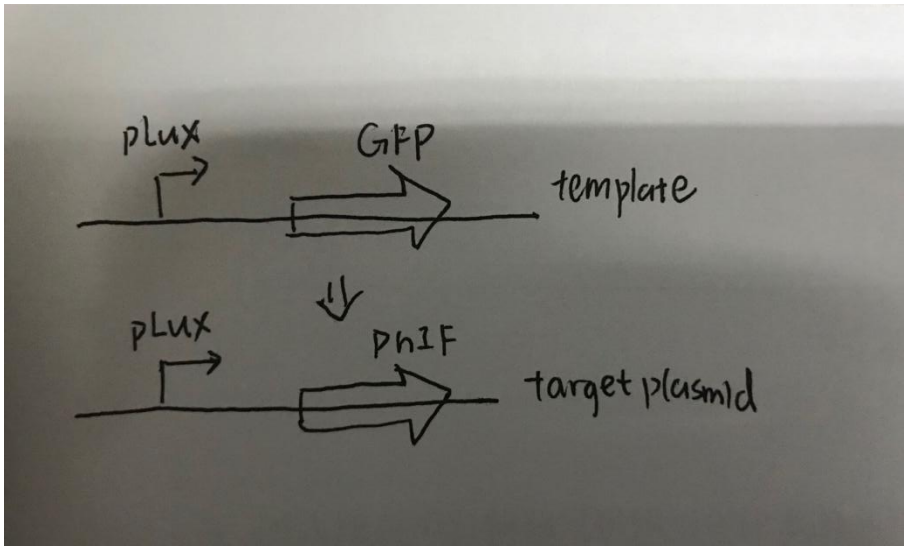
Row 3: Replicate 3

D12: M9 + Amp Blank

9.15 Experiment Aim:

In the morning, PCR is performed to determine whether the Gibson Assembly in 9.14 is successful.

In the afternoon, PCR is performed for gene sequencing to determine whether the functional genes (including lacI, luxR, and PhIF), in the plasmid are correct.



The PCR performed in the morning, provided that Gibson Assembly was successful, should result in a target template about 970 bp long containing the entire PhIF gene sequence.

1. Morning Experiment Protocol:

PCR system:

Primer RDFZ-30	1ul
Primer P367	1ul
Template colony[1]	0
Taq 2X mix	25ul
ddH2O	22ul
Total	50ul

[1] : eight systems with different colonies as templates respectively

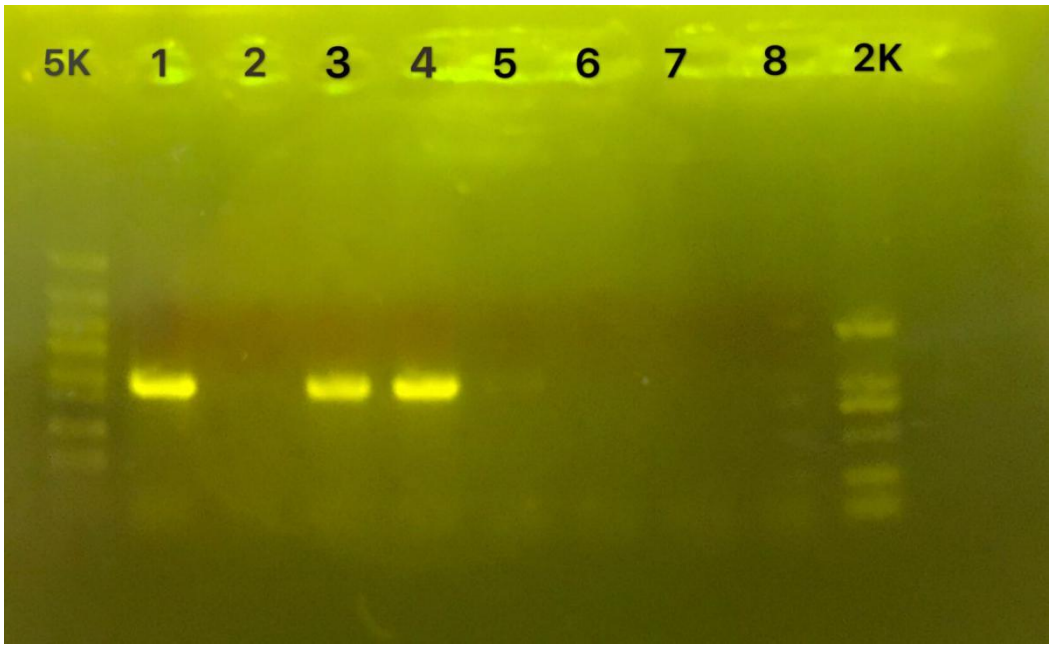
1) Taq 2X mix 100ul+ddH2O 80ul+primer RDFZ-30 10ul+primer P367 10ul
Mix evenly and divide into 10 unit of solutions in PCR tubes with 20ul each
2) Pick 8 colonies and use pipette tips to dip colonies into each solution respectively. Mark the eight tubes as R1, 2, 3, 4, 5, 6,7, and 8 respectively

PCR protocol:

1. 95℃	10min
2. 95℃	30s
3. 58℃	30s
4. 72℃	1min

2-4: x35 cycles
5. 72℃ 2min
6. 16℃ ∞
The target PCR sequence in the afternoon is 3700 bp long.

2. Gel electrophoresis:
Result:



(P.S.: 1 to 8 stand for pSEVA121-LuxR-pLux-PhIF-1(R1) to pSEVA121-LuxR-pLux-PhIF-8(R8) respectively.)
It can be seen from the photograph that PCR products of R1, R3, and R4 are between 800 to 1000 bp long, indicating that their Gibson Assemblies were successful.

3. Afternoon PCR protocol:

PCR system:
Primer RDFZ-26 1ul
Primer VR 1ul
Template[2] 1ul
Taq 2X mix 25ul
ddH2O 22ul
Total 50ul
[2] : three systems with template as R1, R3, and R4 respectively

PCR protocol:
1. 95℃ 10min
2. 95℃ 30s
3. 58℃ 30s
4. 72℃ 3min 45s

2-4: x35 cycles

5. 72℃ 4min

6. 16℃ ∞

(P. S.:The target PCR sequence in the afternoon is 3700 bp long.)

4. Primers for tomorrow's sequencing :

RDFZ-26 & RDFZ-27

RDFZ-28 & RDFZ-29

RDFZ-30 & VR