

**[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

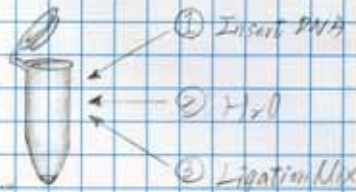
NLP 4 PBI = 7.29 ng/μL

→ 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 <sub>2</sub> O	3.5 μL
Ligation Mix	5.0 μL
Total	10.0 μL



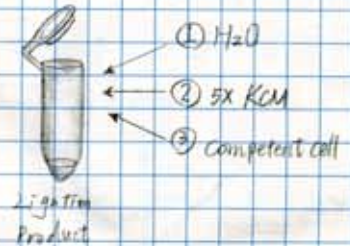
→ 將 eppendorf 置入冰箱 40 分鐘至 1 小時即完成。  
(16°C)

**[Transformation of Plasmid]**

KCM method:

5X KCM	20 μL
H <sub>2</sub> 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。

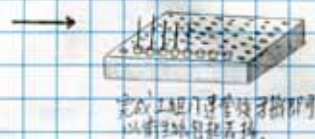


### 【Blue white screening & Colony PCR】

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

\* 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。

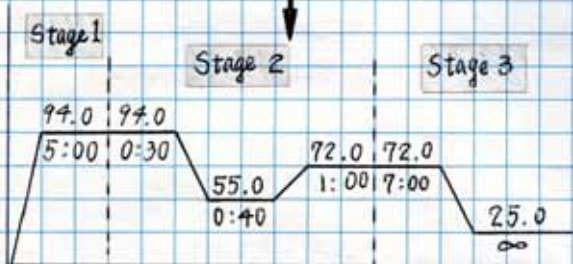


完成上述工作後牙籤即可以進行菌落挑取。

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



完成上述工作後，將分裝到入連管以進行菌落挑取。



### 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

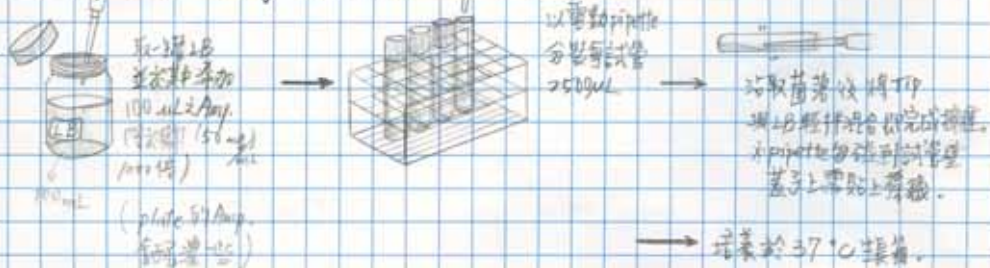
NLP4-PBI 5

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.

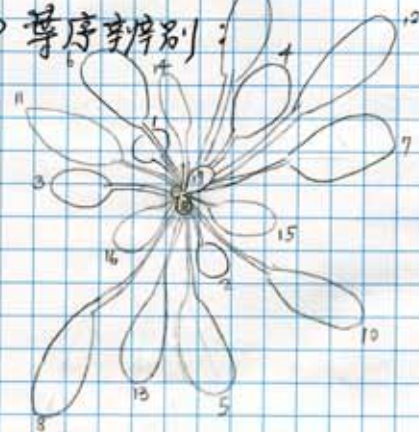


## 【Leaf nitrate content analysis】→ practice

\* 使用之 Arabidopsis:

NCI (6/20 種) &amp; 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

↓  
連加快速加入 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  
以去除殘留 ethanol↓ 換 Tube  
加入 50 μl H<sub>2</sub>O  
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  $\mu$ Lplasmid = 1  $\mu$ L + 1  $\mu$ L dye + 4  $\mu$ L H<sub>2</sub>O

## Plasmid extraction product Nano drop:

	A <sub>260/280</sub>	A <sub>260/230</sub>	Concentration (ng/ $\mu$ 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  $\mu$ L)3.115  $\mu$ g4.52  $\mu$ g6.31  $\mu$ g10.01  $\mu$ g

此 protocol 之 Max. 含量

為 40  $\mu$ 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  $\mu$ 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

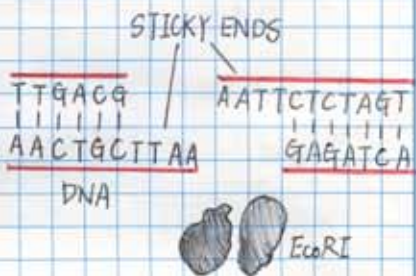
green 加 10X Buffer (fast digest)	2 μL	②
→ DNA plasmid	1 μL	③
Enzyme (EcoRI)	0.5 μL	④
H <sub>2</sub> O	16.5 μL	①
Total	20 μL	

此步為  
check  
若是要  
切下 insert 時  
則加 8 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 H<sub>2</sub>O

$0.75 = 0.0907 = 8.30$

NLP2-9 = 5 μL 原液 + 5 μL H<sub>2</sub>O

$0.75 = 0.1262 = 5.94$

NLP4-5 = 3 μL 原液 + 7 μL H<sub>2</sub>O

$0.75 = 0.2002 = 3.75$

\* 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

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



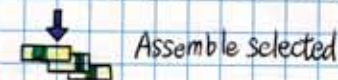
## 【Sequencing Results】

\* 將定序之 NLP2-7、NLP2-9、NLP4-5 結果與 <sup>NLP4-PB1</sup> NLP2-PB1 做 alignment

→ 點選桌面之 ContigExpress Project

→ 將定序結果之 ABI 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】

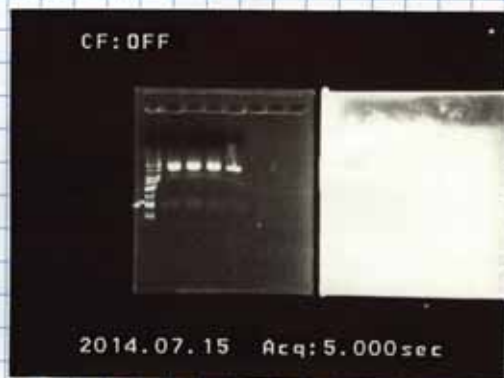
Teasy  
《Insert DNA-NLP4-PBI》

DNA	10 $\mu$ L	1	
enzyme (SfiI)	1 $\mu$ L	0.5	
Buffer 4	5 $\mu$ L	>	
BSA	5 $\mu$ L	>	
H <sub>2</sub> O	29 $\mu$ L	14.5	unit = 10000
Total	50 $\mu$ L	20	

Result =

## 《Vector-pDL2-Nx》

DNA	3 $\mu$ L
enzyme (SfiI)	1 $\mu$ L
Buffer 4	5 $\mu$ L
BSA	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	36 $\mu$ L
Total	50 $\mu$ L



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

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

## 【Gel Cutting】

\* 將 <sup>Insert-NLP4-PBI</sup> 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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 30 min

→ 加入 20  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 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