

构建正交温敏回路

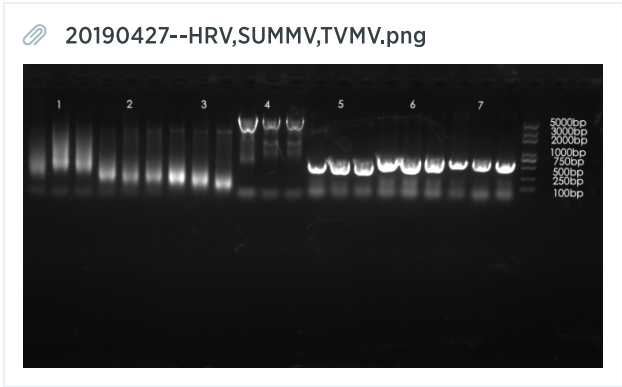
2019年4月26日星期五

目的：在cI434中插入HRV, SuMMV和TVMV酶切位点；构建HRV, SuMMV和TVMV的表达质粒

- 1. 提质粒（RGP-pTac-Syn4855-TEV-Amp和pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV）
- 2. PCR

PCR模板及引物						
	模板	引物	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-HRV-VF/VR	6000bp		环P自连	a1
2	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-SuMMV-VF/VR	6000bp		环P自连	a2
3	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-TVMV-VF/VR	6000bp		环P自连	a3
4	RGP-pTac-Syn4855-TEV-Amp	0426-RGP-VF/VR	4832bp		载体	b1
5	R3C	0426-R3C-F/R	600bp		片段	b2
6	SUMMV	0426-SuMMV-F/R	777bp		片段	b3
7	TVMV	0426-TVMV-F/R	700bp		片段	b4

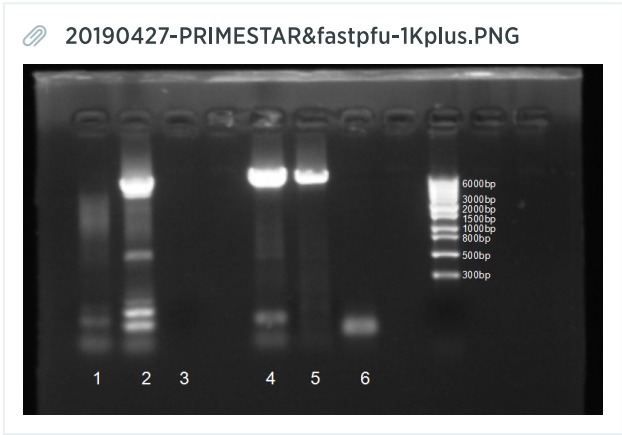
胶图如下：



1, 2, 3条带异常，重新使用fastpfu和primSTAR进行PCR

换酶PCR			
	所用酶	模板	引物
1	fastpfu	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-HRV-VF/VR
2	fastpfu	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-SuMMV-VF/VR
3	fastpfu	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-TVMV-VF/VR
4	primSTAR	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-HRV-VF/VR
5	primSTAR	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-SuMMV-VF/VR
6	primSTAR	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-TVMV-VF/VR

胶图如下：



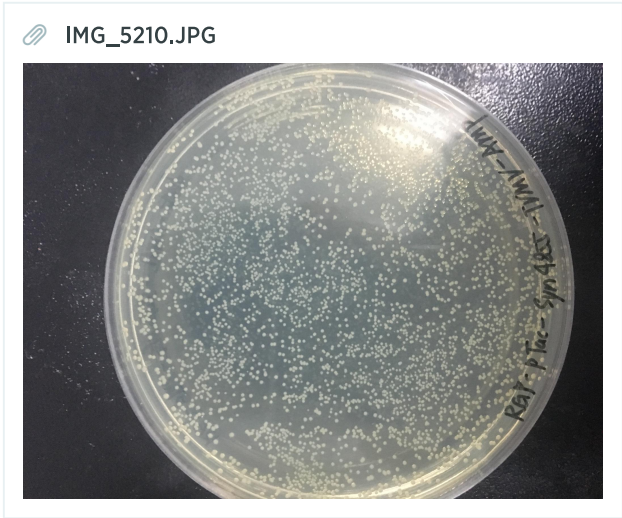
1，3，6条带异常，保留2，4，5做dpn1消化。

3. dpnI 消化，gibson连接及转化

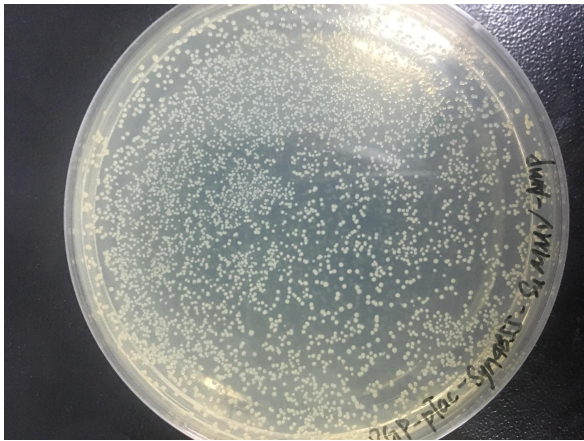
gibson连接组合

	片段1	浓度	片段2	浓度	命名	转化结果
1	a1				pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HRV3C	
2	a2				pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-SuMMVS	
3	a3				pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS	
4	b1	65.9	b2	79.6	RGP-pTac-Syn4855-HR3C-Amp	
5	b1	65.9	b3	127	RGP-pTac-Syn4855-SuMMV-Amp	
6	b1	65.9	b4	59.9	RGP-pTac-Syn4855-TVMV-Amp	

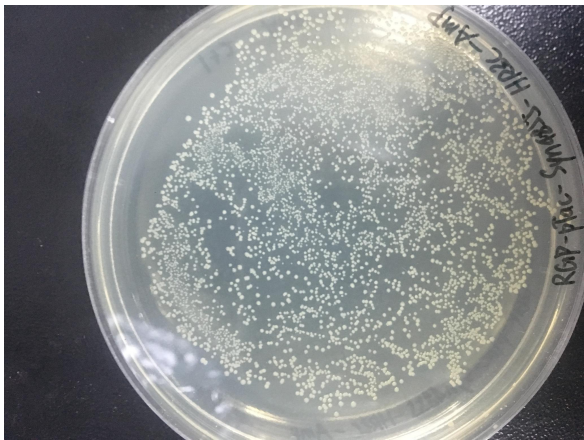
转化结果：



IMG_5211.JPG



IMG_5212.JPG



2019年4月28日星期日

目的：1. 做RGP-pTac-Syn4855-HR3C-Amp，RGP-pTac-Syn4855-SuMMV-Amp，RGP-pTac-Syn4855-TVMV-Amp的菌p验证以及保菌

2. 改变退火温度重p a3，同时做a1-a3的消化、连接、克隆

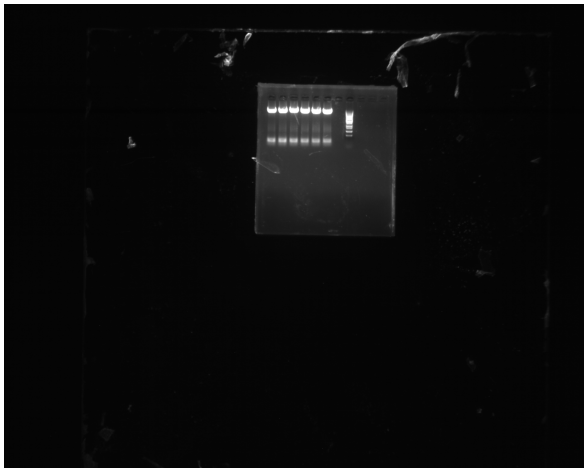
实验步骤：

1. 设置温度梯度（52-60℃）对a1进行环P

环P							
	模板	引物	长度	时间	属性	编号	
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-HRV-VF/VR	6000bp		环P自连	a1	primSTA

结果：环P结果有条带，因此做了a1-a3的连接和转化。

20190429 TVMV环p.Tif



2. 对RGP-pTac-Syn4855-HR3C-Amp, RGP-pTac-Syn4855-SuMMV-Amp, RGP-pTac-Syn4855-TVMV-Amp进行菌p验证

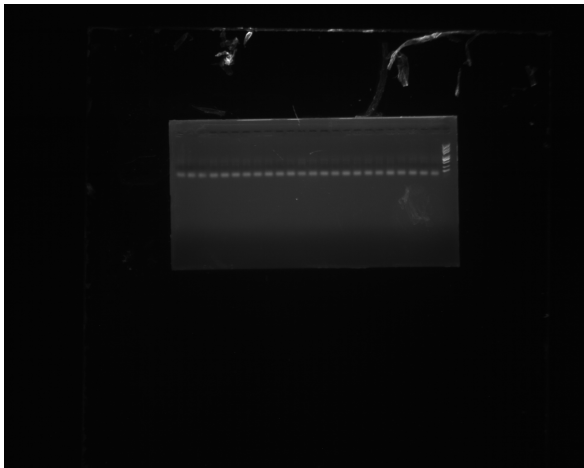
2.1 三个平板各挑取8个单菌落于96孔板中, 振荡2h

2.2 菌落PCR验证

PCR验证					
	模板	引物	长度	时间	酶
1	RGP-pTac-Syn4855-HR3C-Amp	0426-RGP-JC-F/R	1034	0: 16	fastTaq
2	RGP-pTac-Syn4855-SuMMV-Amp	0426-RGP-JC-F/R	1216	0: 18	fastTaq
3	RGP-pTac-Syn4855-TVMV-Amp	0426-RGP-JC-F/R	1138	0: 17	fastTaq

结果： 菌p验证结果无条带，阳性对照条带异常，推测可能是引物的问题，重新设计引物，明天测

20790429 验证.Tif



2019年4月29日星期一

- 实验目的：
- 1. 构建PSC101和RGP的空质粒
 - 2. 对RGP-pTac-Syn4855-HR3C/SUMMV/TVMV-Amp做验证
 - 3. 对pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV/TVMV做验证
- 实验步骤：
- 1. 做克隆

环P体系							
	模板	引物	长度	时间	属性	编号	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0429-pSC101-Empty-F/R	5227bp	1:45	环P自连	C1	primSTA
2	RGP-pTac-Syn4855-TEV-Amp	0429-RGP-Empty-F/R	3368bp	1:08	环P自连	C2	primSTA

PrimSTAR 50μl 体系: 25μl PrimSTAR Max; 20μl ddH2O; 2μl Primer1; 2μl Primer2; 1μl template

注意：加完后先轻微离心（去除气泡，使壁上的液体进入底部），再放入PCR仪里进行PCR

DpnI消化：5μ Cutsmart, 1μ DpnI

纯化：加水补齐至100微升，加100μ Buffer GDP,转移到柱子中离心

加600μ buffer DW2,离心

空离2min

换管，加50μ水，静置1min，离心

Gibson连接：10μ gibson buffer，片段，加水补齐到20μ

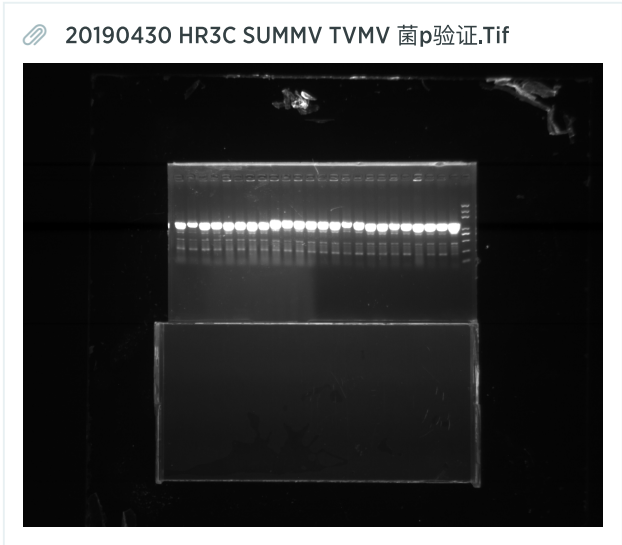
结果： pcr成功，但转化没长，重做



2. 做验证

PCR 验证体系							
	模板	引物	长度	时间	属性	编号	酶
1	RGP-pTac-Syn4855-HR3C-Amp	0429-RGP-JC-F/R	1125bp	0:17	菌p验证	D	fastTaq
2	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV-Amp	0429-RGP-JC-F/R	1302bp	0:33	菌p验证	E	fastTaq
3	RGP-pTac-Syn4855-TVMV-Amp	0429-RGP-JC-F/R	1230bp	0:19	菌p验证	F	fastTaq
4	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C	0426-PTP-JC-F/R	668bp	0:10	菌p验证	G	fastTaq
5	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-SUMMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp	0:10	菌p验证	H	fastTaq
6	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp	0:10	菌p验证	I	fastTaq

结果：对RGP-pTac-Syn4855-HR3C (1-8) /SUMMV (9-16) /TVMV (17-24) -Amp进行了验证，已送去测序
pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV/TVMV转化的培养皿内细菌生长缓慢，未进行验证

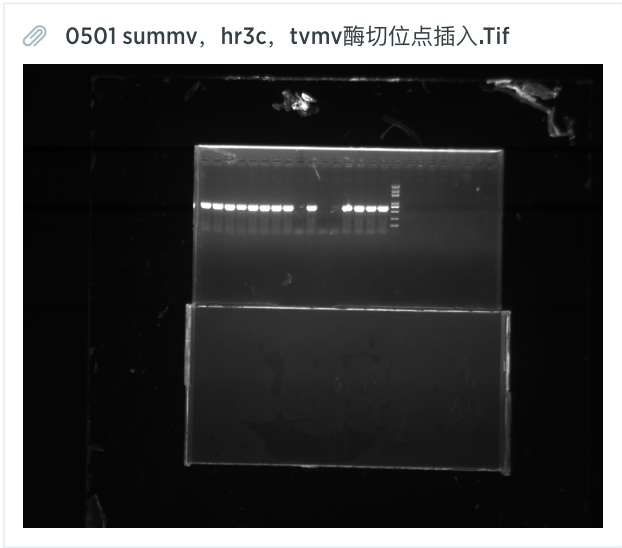


2019年4月30日星期二

- 实验目的：
- 看RGP-pTac-Syn4855-HR3C/SUMMV/TVMV-Amp测序结果，保菌，提质粒
 - 重新构建PSC101和RGP的空质粒
 - 对pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV/TVMV进行验证

- 实验结果：
- RGP-pTac-Syn4855-HR3C/SUMMV/TVMV-Amp测序成功，均已保菌，提质粒

- 2. 对04.30纯化过的PSC101和RGP重新进行连接，已转化
 - 3. pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV/TVMV验证图（1-8:HR3C; 9-12:SUMMV; 13-16:TVMV）
- HR3C全部正确，取1-4进行测序；SUMMV只有2正确，对2测序；TVMV全部正确，均进行测序
- 测序结果为：HR3C正确，SUMMV正确，保菌。TVMV测序出现问题，需重新进行构建



2019年5月12日星期日

- 实验目的：
- 1. 将三种酶（RGP-pTac-Syn4855-HR3C/SUMMV/TVMV）与插入两种酶切位点的CI434(pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV)做双转，共六种组合
 - 2. 对空质粒PSC101-Empty和RGP-Empty进行PCR验证，送测序
 - 3. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMV

- 实验步骤：
- 1. 双转
 - 1) 将插入两种酶切位点的CI434表达质粒(pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV)摇菌液
 - 2) 第二天提质粒，做双转
 - 2. 验证PSC101-Empty和RGP-Empty（挑单克隆，摇菌，菌p验证）

Table1				
	模板	引物	长度	体系
1	PSC101-Empty	0512-PSC101-Empty-JC-F/R	1205bp	FastTaq
2	RGP-Empty	0512-RGP-Empty-JC-R/F	825bp	FastTaq

FastTaq菌p验证 25μl 体系：

2x FastTaq Mix： 12.5μl

Primer F： 1μl

Primer R： 1μl

Template： 0.5-1μl（一般取0.5μl）

ddH₂O： 10μl

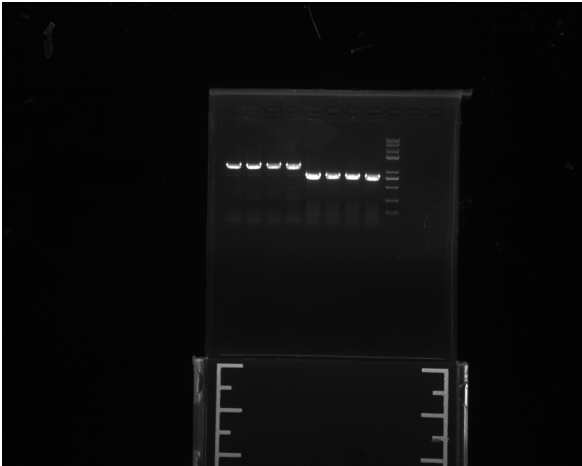
- 3. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMV

Table2					
	模板	引物	长度	时间	属性
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-TVMV-VF/VR	6000bp		环P自连

实验结果：

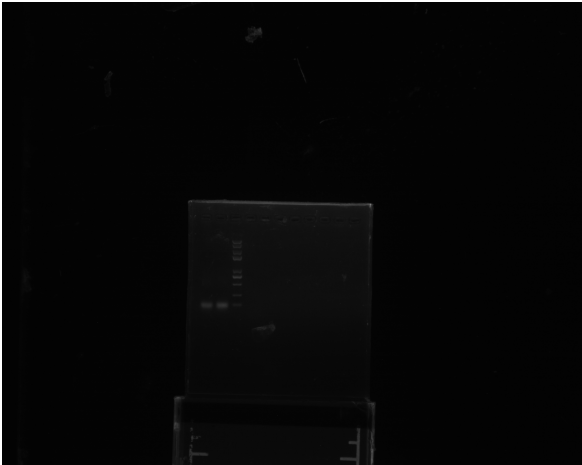
- 1. 菌液已摇，第二天提质粒
- 2. 菌p验证成功，第二天送测序，摇菌

20190513-PSC101 RGP-EMPTY 菌p验证.Tif



3. 重新构建失败（没有p出东西），重新设计了引物，明天将质粒分成两部分3kbp的片段重新p再连接

20190513-CI434-TVMV环P 失败.Tif



2019年5月13日星期一

实验目的：

- 1. 送测序，摇菌(空质粒PSC101-Empty和RGP-Empty，编号分别为a1-4, b1-4)
- 2. 使用新设计引物，重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMV（3kbp+3kbp分别p，再连接）

3. 提质粒（pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV）
4. 对三种酶+两种插入不同酶切位点的TF组合分别进行双转，周五挑单克隆，摇菌液，后稀释，加诱导剂，再次摇，周六测流式

实验步骤：

1. 送测序，摇菌（空质粒PSC101-Empty和RGP-Empty, 编号分别为a1-4, b1-4）
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMV（3kbp+3kbp分别p，再连接）

新设计引物：0513-pSC101-CI434-TVMVS-F/R

重新合成之前引物：0426-PTP-TVMV-VF/YR

1) PCR，p出CI434-TVMV两个片段

CI434-TVMV构建PCR体系							
	模板	引物	长度	时间	属性	酶	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-TVMV-VF + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-R	2873bp	58s	片段	PrimSTAR(3000 bp/min)	TVMV A1
2	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TEV	0426-PTP-TVMV-VR + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-F	3212bp	65s	片段	PrimSTAR	TVMV A2

PrimSTAR 50μl 体系: 25μl PrimSTAR Max； 20μl ddH2O； 2μl Primer1； 2μl Primer2； 1μl template

注意：加完后先轻微离心（去除气泡，使壁上的液体进入底部），再放入PCR仪里进行PCR

2) 跑胶验证

Table4		
	片段名称	跑胶结果
1	TVMV A1	
2	TVMV A2	

3) 消化，纯化

DpnI消化：5μ Cutsmart，1μ DpnI

纯化：加水补齐至100微升，加100μ Buffer GDP,转移到柱子中离心

加600μ buffer DW2,离心

空离2min

换管，加50μ水，静置1min，离心

4) TVMV两个片段进行Gibson连接

CI434-TVMV构建Gibson连接体系							
	片段1	浓度	体积	片段2	浓度	体积	命名
1	TVMV A1			TVMV A2			pSC101-PIsfGFP-J231119-CI434-TVM

Gibson连接：10μ gibson buffer， 片段，加水补齐到20μ

- 5) 转化
- 6) 涂板 （抗性：Amp，50微升/50ml LB)

3. 提质粒（pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C/SUMMV)

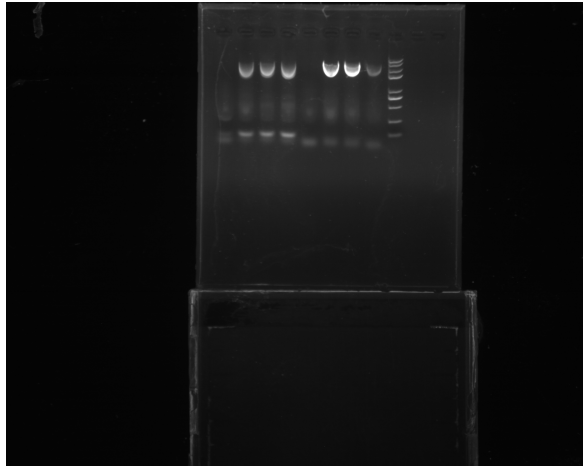
- 1) 取900微升菌液进行保菌
- 2) 对剩下4ml提质粒（依据试剂盒说明书操作)

4. 对三种酶+两种插入不同酶切位点的TF组合分别进行双转，并涂板

酶+插入酶切位点的TF 实验组 双转组合			^
	酶	酶切位点	
1	RGP-pTac-Syn4855-HR3C	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C	
2	RGP-pTac-Syn4855-HR3C	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-SUMMV	
3	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C	
4	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-SUMMV	
5	RGP-pTac-Syn4855-TVMV	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-HR3C	
6	RGP-pTac-Syn4855-TVMV	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-SUMMV	

- 实验结果：
2. 跑胶验证成功，已连接，第二天转化涂板

📎 20190514 CI434 TVMV 3K A1 A2.Tif



2019年5月15日星期三

实验目的：

1. 提质粒（空质粒PSC101-Empty和RGP-Empty）
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：取连接产物进行转化，涂板
3. 对照组双转
4. 对pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C/SUMMV重新进行转化保菌（之前提了质粒但忘保菌了 T_T）

实验步骤：

1. 提质粒（空质粒PSC101-Empty和RGP-Empty）
 - 1) 取900微升菌液进行保菌
 - 2) 对剩下4ml提质粒（依据试剂盒说明书操作）
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：取连接产物（放在4°C冰箱里）进行转化，涂板
3. 对照组双转（5组）（可以跟第4步一起转化）

酶质粒：5μ

插入酶切位点质粒：5μ

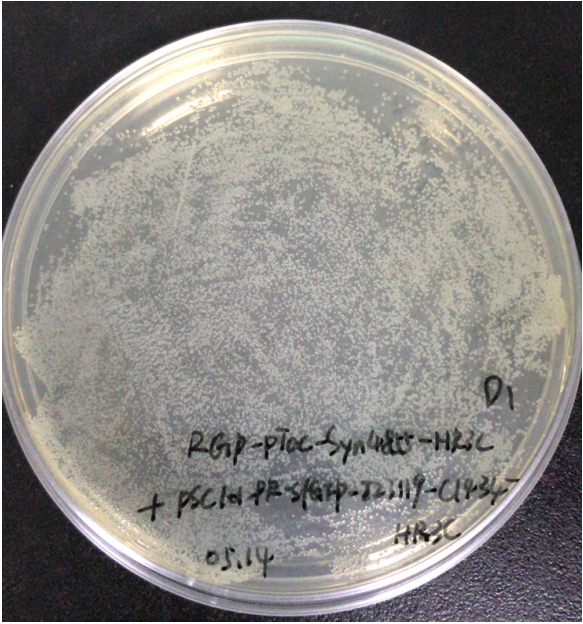
共10μ，在实验台上混合好后，在超净台内进行转化

4. 对pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C/SUMMV重新进行转化保菌

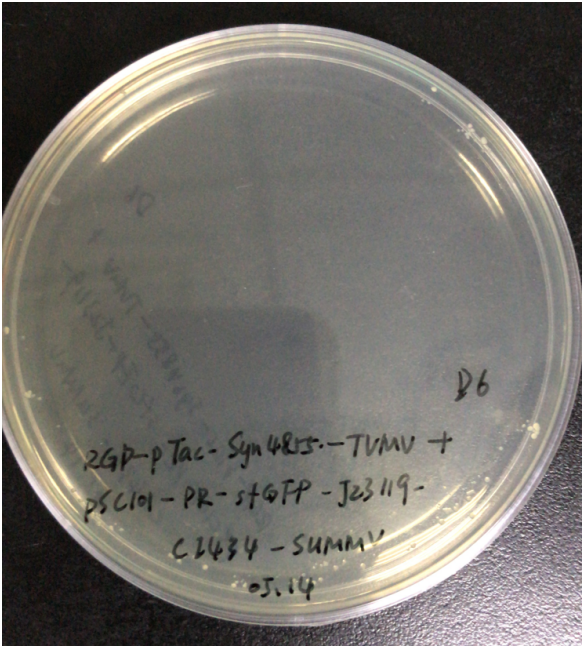
实验结果：

1. PSC101-Empty与RGP-Empty各提质粒两管（DNA浓度略低），余两管菌暂存4°C冷室
2. pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV已转化*2（使用菌株BL21）（置于37°C培养箱最上层靠内侧）
3. 未完成双转——无DH-5α感受态细胞——购买
4. pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C/SUMMV已转化
5. Check 三种酶+两种插入不同酶切位点的TF组合转化结果：

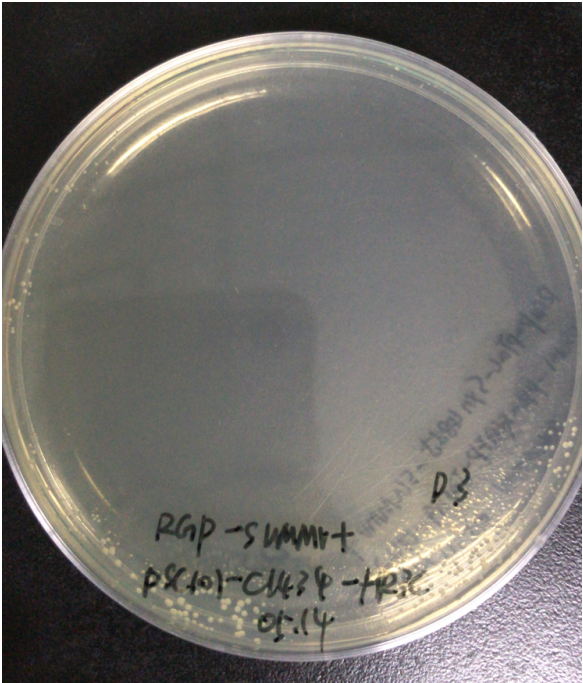
RGP-pTac-Syn4855-HR3C+pSc101-PR-sfGFP-J2311
9-CI434



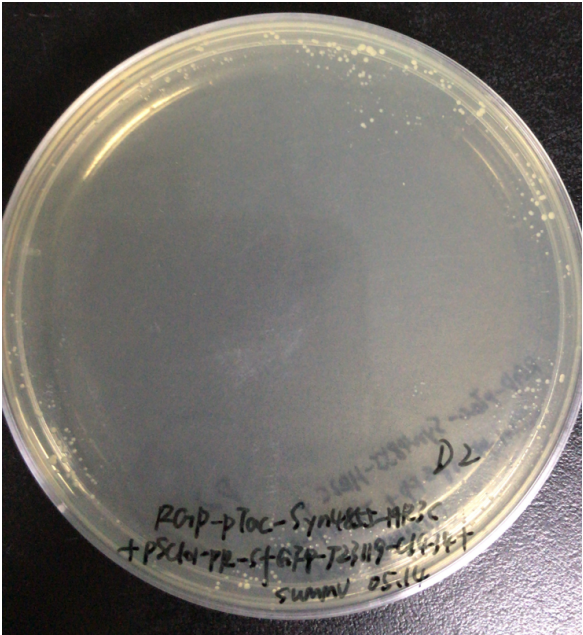
RGP-pTac-Syn4855-TVMV+pSc101-PR-sfGFP-J2311
9-CI434-SuMMV



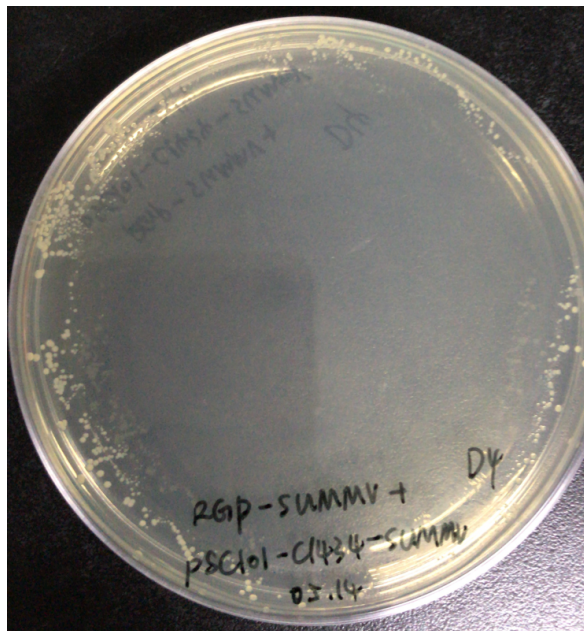
RGP-SuMMV+pSC101-CI434-HR3C



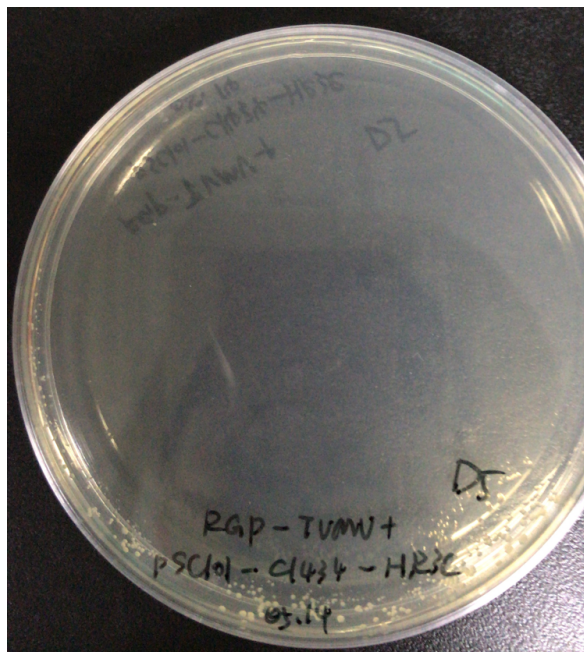
RGP-pTac-Syn4855-HR3C+pSc101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV



RGP-SuMMV+pSC101-CI434-SuMMV



RGP-TVMV+pSC101-CI434-HR3C



2019年5月16日星期四

实验目的：

1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J2319-CI434-TVMV：Check转化结果，菌P验证，送测序
2. 重新转化的pSC101-PR-sfGFP-J2319-CI434-HR3C/SuMMV挑单克隆、摇菌、保菌

实验步骤：

1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J2319-CI434-TVMV：Check转化结果（置于37°C培养箱最上层靠内侧），菌P验证，送测序

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV验证体系

	模板	引物	长度	时间	属性	编号	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp		菌P验证		

2. 重新转化的pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C/SUMMV挑单克隆、摇菌、保菌

实验结果：

1. 菌p失败，无条带。怀疑是PCR的问题，明天应该重做，并且添加阳性的质粒对照，转化的板子和摇的菌都放在4℃冷室了
2. 菌已保，标记为pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C/SUMMV

2019年5月17日星期五

实验目的：

1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：先重新做菌P验证；菌p验证失败的话再重新构建
2. 对照组双转，涂板
3. 构建质粒pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI-TEV

构建思路：

1. 设计引物从师兄的质粒上PCR获得CI、TetR、LacI（准备Gibson带同源片段），测序看是否符合目标序列
2. 以pSC101质粒为载体PCR获得带同源片段的Vector片段
3. Gibson连接获得pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI（留待后续做阴性对照）
4. 环P自连插入酶切位点，获得pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI-TEV

实验步骤：

1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：重做菌P（摇的菌+重挑单菌落摇），添加阳性质粒对照：

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV重新验证体系

	模板	引物	长度	时间	属性	编号	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp	10s	菌P验证	1、2、3、4	fastTaq
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp	10s	阳性对照	5、6	fastTaq

2. 对照组双转（5组）

酶质粒：5μ

插入酶切位点质粒：5μ

共10μ，在实验台上混合好后，在超净台内进行转化

对照组双转			
	酶	酶切位点	编号 (Control-Double)
1	RGP-Empty	pSC101-PR-sfGFP-J23111-CI434-HR3C	CD1
2	RGP-Empty	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	CD2
3	RGP-pTac-Syn4855-HR3C	PSC101-Empty	CD3
4	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV	PSC101-Empty	CD4
5	RGP-pTac-Syn4855-TVMV	PSC101-Empty	CD5

3. 构建质粒pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI-TEV：设计获得CI、TetR、LacI的引物

实验结果：

1. pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV菌P验证完成，送测序

跑胶结果：



2. 对照组双转，涂板，置于37°C培养箱最上层靠里——流式测试后延，待TVMV双转系统也完成后一起做

3. 未完成，需要取得带CI、TetR、LacI的质粒

- 1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：提质粒、保菌
- 2. 对照组双转：Check转化情况，摇菌、保菌

实验步骤：

- 1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：提质粒，菌已摇4管（侧标CI434-TVMV-1/2/3/4）
- 2. 对照组双转

实验结果：

- 1. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：测序失败，重新构建
- 2. 对照组双转：明日保菌，一组重新转化

2019年5月19日星期日

实验目的：

- 1. 对照组双转：重新转化的一组挑单克隆、摇菌、保菌；其他4组保菌
- 2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：换模板重新构建

实验步骤：

- 1. 对照组双转：重新转化的一组挑单克隆、摇菌、保菌；其他4组保菌
- 2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：以HRV3C、SuMMV为模板
 - 1) 片段PCR

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV构建片段PCR							
	模板	引物	长度	时间	属性	酶	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0426-PTP-TVMV-VF + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-R	2873bp	58s	片段	PrimSTAR(3000 bp/min)	TVMV1
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0426-PTP-TVMV-VR + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-F	3212bp	65s	片段	PrimSTAR	TVMV2
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV	0426-PTP-TVMV-VF + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-R	2873bp	58s	片段	PrimSTAR	TVMV3
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV	0426-PTP-TVMV-VR + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-F	3212bp	65s	片段	PrimSTAR	TVMV4

- 2) DpnI消化、纯化
- 3) Gibson连接

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV构建1+1Gibson...

^

	命名	片段1	片段2
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV-1	TVMV1	TVMV2
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV-2	TVMV3	TVMV4

4) 转化、涂板（抗性Cm）

实验结果：

1.

2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：以HRV3C、SuMMV为模板：
PCR完成，已重新连接（产物置于4℃冰箱最上层），待转化验证

2019年5月23日星期四

实验目的：

1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI：片段PCR、Gibson连接、转化

2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化、验证

3. 对照组双转：已长出单克隆的4组保菌、一组重新转化

4. 培养基作画：准备菌

实验步骤：

1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI：片段PCR、Gibson连接、转

1) 片段PCR（O519-pSC101-TetR-VF2周三晚送合成）

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI片段PCR							
	模板	引物	长度	时间	属性	酶	编号
1	师兄给的CI质粒	0519-ECF11-CI-F/R	1 17bp		片段		A1
2	师兄给的CI质粒	0519-CI-F/R	734bp		片段		A2
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-CI-VF2/VR2	3300bp		片段		A3
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-CI-VF1/VR1	2080bp		片段		A4
5	师兄给的TetR质粒	0519-tetA-TetR-F/R	75bp		片段		B1
6	师兄给的TetR质粒	0519-TetR-F/R	644bp		片段		B2
7	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-TetR-VF2/VR2	3300bp		片段		B3
8	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-TetR-VF1/VR1	2080bp		片段		B4
9	师兄给的LacI质粒	0519-tac-LacI-F/R	74bp		片段		C1
10	师兄给的LacI质粒	0519-LacI-F/R	1103bp		片段		C2
11	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-LacI-VF2/VR2	3300bp		片段		C3
12	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-LacI-VF1/VR1	2080bp		片段		C4

- 2) DpnI消化、纯化
- 3) Gibson连接

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI构建1+3Gibson连接

	命名	片段1	片段2	片段3	片段4
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	A1	A2	A3	A4
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	B1	B2	B3	B4
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	C1	C2	C3	C4

- 4) 转化、涂板（抗性Cm）
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化（连接产物在4℃冰箱最上层）
3. 对照组双转

1) 已长出单克隆的4组保菌

2) 失败的一组重新转化（1+2+3的转化可一起做）
4. 培养基作画：Check实验室表达颜色的菌，摇菌、保菌，带回玉泉路

实验结果：

2019年5月24日星期五

- 实验目的：
1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI：Check转化情况、菌P验证

- 实验步骤：
1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI：Check转化情况、菌P验证

1) 挑单克隆、96孔板摇

2) 菌P验证

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI构建验证PCR							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0519-pSC101-CI-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	723bp		菌P验证	
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-CI-JC-R2	647bp		菌P验证	
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	0519-pSc101-TetR-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	656bp		菌P验证	
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-TetR-JC-R2	649bp		菌P验证	
5	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	0519-pSC101-LacI-JC-F2	0519-PTP-JC-R1	690bp		菌P验证	
6	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-LacI-JC-R1	967bp		菌P验证	

3) 送测序

2019年5月30日星期四

- 实验目的:
- 1. 准备流式：摇菌，提质粒，做双转
 - 2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化（连接产物在4℃冰箱）
 - 3. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI：消化、纯化、连接、转化
 - 4. 培养基作画：配培养基、摇菌

- 实验步骤:
- 1. 准备流式
 - 1) 摇菌 5-6h

需要提的质粒		
	TF	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C	RGP-pTac-Syn4855-HR3C
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	RGP-pTac-Syn4855-TVMV
4	PSC101-Empty	RGP-pTac-Syn4855-TEV
5		RGP-Empty

- 2) 提质粒
- 3) 做双转,准备流式

双转组		
	TF	酶
1	PSC101-Empty	RGP-pTac-Syn4855-HR3C
2	PSC101-Empty	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV
3	PSC101-Empty	RGP-pTac-Syn4855-TVMV
4	PSC101-Empty	RGP-pTac-Syn4855-TEV
5	PSC101-Empty	RGP-Empty
6	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	RGP-pTac-Syn4855-HR3C
7	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV
8	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	RGP-pTac-Syn4855-TVMV
9	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	RGP-pTac-Syn4855-TEV
10	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	RGP-Empty
11	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	RGP-pTac-Syn4855-HR3C
12	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV
13	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	RGP-pTac-Syn4855-TVMV
14	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	RGP-pTac-Syn4855-TEV
15	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SUMMV	RGP-Empty
16	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C	RGP-pTac-Syn4855-HR3C
17	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C	RGP-pTac-Syn4855-SUMMV
18	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C	RGP-pTac-Syn4855-TVMV

19	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C	RGP-pTac-Syn4855-TEV
20	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C	RGP-Empty

2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化 与1、3一并转化
3. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI：消化、纯化、连接、转化
- 1) 消化、纯化
- 2) Gibson连接

pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI 构建片段连接					
	命名	片段1	片段2	片段3	片段4
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	Vector1	Vector2	promoter+operator	LacI

3) 转化

实验结果：

1. 准备流式：转化结果：
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化结果：
3. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI：纯化完成，准备连接

2019年5月31日星期五

实验目的：

1. 准备流式：摇菌、诱导、稀释
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：菌P验证、送测序
3. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI：Gibson连接，转化
4. 培养基作画

实验步骤：

1. 准备流式
- 1) 挑3个单菌落/组，150μL/孔置于96孔板内摇8-12h
- 2) 梯度诱导：0-1M/L每孔10倍浓度梯度+菌液100倍稀释
- i. 配制 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)
- ii. 在1-7孔加入148.5μL LB (Cm+Amp)，8孔加入165μL 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)
- iii. 从8孔中取16.5μL加到7孔，从7孔中取16.5μL加到6孔.....从1孔中取16.5μL弃去
- iv. 在每孔中加入1.5μL菌液
- 以上20组类似，共需5个96孔板
- 3) 震荡培养过夜
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV
- 1) 摇菌 菌P验证

TVMV菌p验证体系							
	模板	引物	长度	时间	属性	编号	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp	10s	菌P验证	1、2、3、4、5、6、7、8	GreenMix

2) 送测序

3. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：Gibson连接，转化

4. 作画前将培养基置于超净台内打开紫外30min，将5mL菌液分装到3个1.5mL离心管内，用棉签蘸取作画

实验结果：

1. 准备流式：转化中TF+酶：SuMMV+Empty/HR3C/TEV及Empty+Empty/HR3C/SuMMV长起来了，其余重转
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化未长起来，不要使用去年的感受态

2019年6月1日星期六

实验目的：

1. 准备流式：摇菌、诱导、稀释
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：转化
3. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI：Gibson连接，转化

实验步骤：

1. 准备流式

1) 挑3个单菌落/组，150μL/孔置于96孔板内摇8-12h

2) 梯度诱导：0-1M/L每孔10倍浓度梯度+菌液100倍稀释

i. 配制 1mol/L IPTG-LB（Cm+Amp）

ii. 在1-7孔加入148.5μL LB（Cm+Amp），8孔加入165μL 1mol/L IPTG-LB（Cm+Amp）

iii. 从8孔中取16.5μL加到7孔，从7孔中取16.5μL加到6孔.....从1孔中取16.5μL弃去

iv. 在每孔中加入1.5μL菌液

以上20组类似，共需5个96孔板

3) 震荡培养过夜
2. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV

1) 转化
3. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV：Gibson连接，转化

2019年6月2日星期日

实验目的：

1. 将学校双转成功的板带到所里，准备流式：摇种子液、诱导、稀释
2. 双转未长的需重新转化
3. 对昨天转化的4组进行菌p验证，送测序
4. 热诱导相关质粒：保菌，提质粒，送测序
5. 对一直未pcr成功的CI,TetR重新构建

实验步骤：

1. 学校双转成功的有9组，带到所里一起准备流式

准备流式：

1) 挑3个单菌落/组，150μL/孔置于96孔板内摇8-12h

种子液-96-well-1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-Empty +pSC101-Empty	RGP-Empty +pSC101-Empty	RGP-Empty+ pSC101-Empty		RGP-Empty +CI434-TEV	RGP-Empty +CI434-TEV	RGP-Empty +CI434-TEV		RGP-Empty +CI434- HR3C	RGP-Empty +CI434- HR3C	RGP-Empty +CI434- HR3C	
B												
C	RGP-Empty +CI434-SUMM V	RGP-Empty +CI434-SUMM V	RGP-Empty+ CI434-SUMM V		RGP-TEV+p SC101-Empty	RGP-TEV+p SC101-Empty	RGP-TEV+p SC101-Empty		RGP-TEV+ CI434-TEV	RGP-TEV+ CI434-TEV	RGP-TEV+ CI434-TEV	
D												
E	RGP-TEV+C I434-HR3C	RGP-TEV+C I434-HR3C	RGP-TEV+CI 434-HR3C		RGP-TEV+C I434-SUMM V	RGP-TEV+C I434-SUMM V	RGP-TEV+C I434-SUMM V		RGP-HR3C+ pSC101-Empty	RGP-HR3C+ pSC101-Empty	RGP-HR3C+ pSC101-Empty	
F												
G	RGP-HR3C+ CI434-TEV	RGP-HR3C+ CI434-TEV	RGP-HR3C+ CI434-TEV		RGP-HR3C+ CI434-HR3C	RGP-HR3C+ CI434-HR3C	RGP-HR3C+ CI434-HR3C		RGP-HR3C+ CI434-SUMM V	RGP-HR3C+ CI434-SUMM V	RGP-HR3C+ CI434-SUMM V	
H												

种子液-96well-2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-SUMM V+pSC 101- Empty	RGP-SUMM V+pSC 101- Empty	RGP-SUMM V+pSC 101- Empty		RGP-SUMM V+CI4 34- TEV	RGP-SUMM V+CI4 34- TEV	RGP-SUMM V+CI4 34- TEV		RGP-SUMM V+CI4 34- HR3C	RGP-SUMM V+CI4 34- HR3C	RGP-SUMM V+CI4 34- HR3C	
B												
C	RGP-SUMM V+CI4 34- SUMM V	RGP-SUMM V+CI4 34- SUMM V	RGP-SUMM V+CI4 34- SUMM V		RGP-TVMV +pSC1 01- Empty	RGP-TVMV +pSC1 01- Empty	RGP-TVMV +pSC1 01- Empty		RGP-TVMV +CI43 4-TEV	RGP-TVMV +CI43 4-TEV	RGP-TVMV +CI43 4-TEV	
D												
E	RGP-TVMV +CI43 4- HR3C	RGP-TVMV +CI43 4- HR3C	RGP-TVMV +CI43 4- HR3C		RGP-TVMV +CI43 4- SUMM V	RGP-TVMV +CI43 4- SUMM V	RGP-TVMV +CI43 4- SUMM V					
F												
G												
H												

- 2) 梯度诱导: 0-1M/L每孔10倍浓度梯度+菌液100倍稀释
- i. 配制 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)

ii. 在1-7孔加入148.5μL LB (Cm+Amp) , 8孔加入165μL 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp) 8: 10mM

iii. 从8孔中取16.5μL加到7孔, 从7孔中取16.5μL加到6孔.....从1孔中取16.5μL弃去


iv. 在每孔中加入1.5μL菌液
- 以上20组类似, 共需5个96孔板
- 3) 震荡培养过夜

Well1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-Empty +pSC101-Empty	RGP-Empty+pSC101-Empty	RGP-Empty +pSC101-Empty	RGP-Empty +CI434-TEV	RGP-Empty +CI434-TEV	RGP-Empty +CI434-TEV	RGP-Empty +CI434-SUMM V	RGP-Empty +CI434-SUMM V	RGP-Empty +CI434-SUMM V	RGP-TEV+pSC101-Empty	RGP-TEV+pSC101-Empty	RGP-TEV+pSC101-Empty
B	10 ⁻⁶	135μ										
C	10 ⁻⁵	135μ										
D	10 ⁻⁴	135μ										
E	10 ⁻³	135μ										
F	10 ⁻²	135μ										
G	10 ⁻¹	135μ										
H	IPTG 10mM (150 μ in 15ml)	165μ										

Well2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-TEV+C I434-HR3C	RGP-TEV+C I434-HR3C	RGP-TEV+C I434-HR3C	RGP-TEV+C I434-SUMM V	RGP-TEV+CI434-SUMM V	RGP-TEV+C I434-SUMM V	RGP-HR3C+pSC101-Empty	RGP-HR3C+pSC101-Empty	RGP-HR3C+pSC101-Empty	RGP-HR3C+CI434-HR3C	RGP-HR3C+CI434-HR3C	RGP-HR3C+CI434-HR3C
B	10 ⁻⁶	135μ										
C	10 ⁻⁵	135μ										
D	10 ⁻⁴	135μ										
E	10 ⁻³	135μ										
F	10 ⁻²	135μ										
G	10 ⁻¹	135μ										
H	IPTG 10mM	165μ										

Well3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-HR3C+ CI434-SUMM V	RGP-HR3C+ CI434-SUMM V	RGP-HR3C+ CI434-SUMM V	RGP-SUMM V+pSC 101-Empty	RGP-SUMM V+pSC 101-Empty	RGP-SUMM V+pSC 101-Empty	RGP-TVMV +pSC1 01-Empty	RGP-TVMV +pSC 101-Empty	RGP-TVMV +pSC1 01-Empty			
B	10^-6	135μ										
C	10^-5	135μ										
D	10^-4	135μ										
E	10^-3	135μ										
F	10^-2	135μ										
G	10^-1	135μ										
H	IPTG 10mM	165μ										

数据：

 0604流式数据.xlsx

所以目前缺的数据有

Table8						
	PSC101-Empty	CI434-TEV	CI434-TVMV	CI434-SUMMV	CI434-HR3C	F
1						RGP-Empty
2						RGP-TEV
3						RGP-SUMMV
4						RGP-HR3C
5						RGP-TVMV

红色代表需要双转的，绿色代表已经有板子但是没有测流式的，黄色代表这次测流式的

 0604流式.pzfx

2. 双转未长的有5组，需重新转化（如果所里的板长了，就不需要再转化了吧）

Table3		
	酶	TF
1	RGP-pTac-Syn4855-Empty	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV
2	RGP-pTac-Syn4855-SuMMV	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV
3	RGP-pTac-Syn4855-TEV	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV
4	RGP-pTac-Syn4855-Empty	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C
5	RGP-pTac-Syn4855-TVMV	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C

3. 昨天连接转化的4组进行菌P验证，送测序
两组：pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI
另两组：pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV（分别使用pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HR3C和pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV做模板，应该没有什么差别）

Table7							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0519-pSC101-CI-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	723bp		菌P验证	
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-CI-JC-R2	647bp		菌P验证	
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	0519-pSc101-TetR-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	656bp		菌P验证	
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-TetR-JC-R2	649bp		菌P验证	

4. 热诱导相关质粒：保菌，提质粒，送测序
5. 对一直未pcr成功的CI,TetR重新构建：

1) PCR

Table5							
	模板	引物	长度	时间	属性	酶	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0531-pSC101-CI-VF2/VR2	3300bp		片段		A3
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0531-pSC101-TetR-VF2/VR2	3300bp		片段		B3
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp		菌P验证		
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV	0426-PTP-JC-F/R	665bp		阳性对照		

- 2) 消化，纯化
- 3) 连接： (/后面的是之前p成功时的编号)

Table6					
	命名	片段1	片段2	片段3	片段4
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	A1/1	A2/2	A3	A4/4
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	B1/5	B2/6	B3	B4/8

- 结果：
1. 流式培养基染菌，21：00重做，第二天9：00接菌诱导，下午五点测流式

2. tetR CI 连接完成并做转化

3. 热诱导菌已保并提质粒

2019年6月5日星期三

- 实验目的：
1. 热诱导质粒的验证，需要设计引物

2. tetR CI的菌p验证

3. 红色双转

4. CI434-TVMV的构建

5. 找郑洋师姐要冷诱导质粒，并把doc换到gfp上

2019年6月6日星期四

实验目的：

- 1. tetR CI的菌p验证
- 2. LacI重新进行连接

实验步骤：

- 1. tetR CI的菌p验证

Table9							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0519-pSC101-CI-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	723bp		菌P验证	
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-CI-JC-R2	647bp		菌P验证	
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	0519-pSc101-TetR-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	656bp		菌P验证	
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-TetR-JC-R2	649bp		菌P验证	

实验结果：

- 1. TetR菌p验证条带正确，明天进行测序；CI菌落过小，经过96孔板摇床培养后没有生长起来，96孔板放在试验台上，CI转化的板子放在37°C培养箱内
- 2. LacI已重新进行连接（涂了两个板），放在37°C培养箱内

2019年6月7日星期五

实验目的：

- 1. CI与重新连接转化的LacI的菌p验证

实验步骤：

- 1. CI与LacI的菌p验证（引物均在实验台上）

Table10							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0519-pSC101-CI-JC-F1	0519-PTP-JC-R1	723bp		菌P验证	
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-CI-JC-R2	647bp		菌P验证	
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	0519-pSC101-LacI-JC-F2	0519-PTP-JC-R1	690bp		菌P验证	
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	0426-PTP-JC-F	0519-pSC101-LacI-JC-R1	967bp		菌P验证	

2019年6月8日星期六

实验目的：

- 1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI：片段PCR、Gibson连接、转化
- 2. 热诱导质粒验证：片段PCR、测序
- 3. 冷诱导系统提质粒
- 4. T/A系统构建：构建pSC101-PR-doc-J23119-CI434-TEV

实验步骤：

- 1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI
 - 1) 片段PCR

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI构建片段PCR							
	模板	引物	长度	时间	属性	酶	编号
1	师兄给的CI质粒	0519-ECF11-CI-F/R	1 17bp		片段		A1
2	师兄给的CI质粒	0519-CI-F/R	734bp		片段		A2
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0531-pSC101-CI-VF2/VR2	3300bp		片段		A3
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-CI-VF1/VR1	2080bp		片段		A4
5	师兄给的TetR质粒	0519-tetA-TetR-F/R	75bp		片段		B1
6	师兄给的TetR质粒	0519-TetR-F/R	644bp		片段		B2
7	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0531-pSC101-TetR-VF2/VR2	3300bp		片段		B3
8	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-TetR-VF1/VR1	2080bp		片段		B4
9	师兄给的LacI质粒	0519-tac-LacI-F/R	74bp		片段		C1
10	师兄给的LacI质粒	0519-LacI-F/R	1103bp		片段		C2
11	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-LacI-VF2/VR2	3300bp		片段		C3
12	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV	0519-pSC101-LacI-VF1/VR1	2080bp		片段		C4

- 2) DpnI消化、纯化
- 3) Gibson连接

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI/TetR/LacI构建Gibson连接					
	命名	片段1	片段2	片段3	片段4
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI	A1	A2	A3	A4
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-TetR	B1	B2	B3	B4
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-LacI	C1	C2	C3	C4

4) 转化，抗性Cm

2.热诱导质粒验证：片段PCR、测序

热诱导系统质粒PCR验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-J23119-Tcl38-pR(3)-pL(3)-sfGFP	190607-JC-F	190607-JC-pL-R	1146bp		片段PCR	
2	pSC101-J23119-Tcl42-pR(3)-pL(3)-sfGFP	190607-JC-F	190607-JC-pL-R	1146bp		片段PCR	
3	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	190607-JC-F	190607-JC-pL-R	1146bp		片段PCR	
4	pSC101-J23119-TlpA(Right)-pTlpA-sfGFP	190607-JC-F	190607-JC-pTlpA-R	1529bp		片段PCR	
5	pSC101-J23119-TlpA36(Right)-pTlpA-sfGFP	190607-JC-F	190607-JC-pTlpA-R	1529bp		片段PCR	
6	pSC101-J23119-TlpA39(Right)-pTlpA-sfGFP	190607-JC-F	190607-JC-pTlpA-R	1529bp		片段PCR	

跑胶验证+送测序

3. 冷诱导系统提质粒

共计8管，4mL提质粒+900μL保菌

4. 构建pSC101-PR-doc-J23119-CI434-TEV

1) 片段PCR

pSC101-PR-doc-J23119-CI434-TEV构建片段PCR							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pTN-CI2Try aaRS-pBAD- doc	0607-doc-F	0607-doc-R	404bp		片段PCR	doc
2	pSC101-PR- sfGFP- J231119- CI434-TEV	0607-pSC101- doc-VR	0607-pSC101- doc-VF	5363bp		片段PCR	Vdoc

- 2) DpnI消化、纯化
- 3) Gibson连接

pSC101-PR-doc-J23119-CI434-TEV构建Gibson连接				^
	命名	片段1	片段2	
1	pSC101-PR- doc-J23119- CI434-TEV	doc	Vdoc	

- 4) 转化，抗性Cm

实验结果：

2019年6月10日星期一

- 实验目的：
1. 扩增pTac、pTet质粒：转化

2. 验证热诱导体系：质粒PCR、测序

3. 验证冷诱导体系：质粒PCR、测序

4. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒：PCR、消化、纯化、连接、转化

5. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒：PCR、消化、纯化、连接、转化

6. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS：PCR、消化、纯化、连接、转化

实验步骤：

如果引物还没送到：

1. 扩增pTac、pTet质粒：转化 抗性Cm (both)

6. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMVS
- **合成好之前最后再试一下，师兄那边也会同步做，之前测序不对的原因可能是模板消化不完全
- 1) 片段PCR

重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS

	模板	引物	长度	时间	属性	酶	编号
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0426-PTP-TVMV-VF + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-R	2873bp	58s	片段	PrimSTAR(3000 bp/min)	TVMV1
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0426-PTP-TVMV-VR + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-F	3212bp	65s	片段	PrimSTAR	TVMV2
3	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV	0426-PTP-TVMV-VF + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-R	2873bp	58s	片段	PrimSTAR	TVMV3
4	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-SuMMV	0426-PTP-TVMV-VR + 0513-pSC101-CI434-TVMVS-F	3212bp	65s	片段	PrimSTAR	TVMV4

- 2) DpnI消化、纯化
- 3) Gibson连接

重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS Gib...



	命名	片段1	片段2
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV-1	TVMV1	TVMV2
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMV-2	TVMV3	TVMV4

- 4) 转化、涂板（抗性Cm）

如果引物送达：

- 2. 验证热诱导体系：质粒PCR、测序

热诱导体系验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	酶
1	pSC101-J23119-Tcl38-pR(3)-pL(3)-sfGFP	VF2	190607-JC-pL-R	1215bp		片段	
2	pSC101-J23119-Tcl42-pR(3)-pL(3)-sfGFP	VF2	190607-JC-pL-R	1215bp		片段	
3	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	VF2	190607-JC-pL-R	1215bp		片段	
4	pSC101-J23119-TlpA(Right)-pTlpA-sfGFP	VF2	190607-JC-pTlpA-R	1598bp		片段	
5	pSC101-J23119-TlpA36(Right)-pTlpA-sfGFP	VF2	190607-JC-pTlpA-R	1598bp		片段	
6	pSC101-J23119-TlpA39(Right)-pTlpA-sfGFP	VF2	190607-JC-pTlpA-R	1598bp		片段	

3. 验证冷诱导体系：质粒PCR、测序8

冷诱导体系验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	
1	cl434-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-Cm	0610-JC-F	0519-PTP-JC-R1	753bp		片段	
2	cl434-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp		片段	
3	pcl434-TEVts-6#-Amp	0610-TEVts-JC-F	0610-TEVts-JC-R	1061bp	✓	片段	
4	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-JC-F	0519-PTP-JC-R1	753bp		片段	
5	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp		片段	
6	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-TEVts-JC-F	0610-TEVts6#-JC1-R	812bp	✓	片段	
7	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-TEVts6#-JC2-F	0610-TEVts-mfLon-JC-R	931bp	✓	片段	
8	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-mfLon-JC-F1	0610-mfLon-JC-R1	889bp		片段	
9	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-mfLon-JC-F2	0610-mfLon-JC-R2	952bp	✓	片段	
10	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-mfLon-JC-F3	0610-mfLon-JC-R3	1089bp	✓	片段	

4. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒：PCR、消化、纯化、连接、转化
- 1) 片段PCR

pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV

	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	酶
1	pTN-CI2Try aaRS-pBAD- doc	0610-doc-F	0610-doc-R	424bp		片段	
2	cl434ts(R2 #2)- TEVsite- pcl434(O2)- sfGFP-pdt#4- Cm	0610-pSC101- doc-VF	0610-pSC101- doc-VR	4509bp		片段	

2) DpnI消化、纯化

3) Gibson连接

pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒构...

	命名	片段1	片段2
1	pSC101- pCI434(O2)- doc-J231119- CI434ts-TEV	doc	Vdoc

4) 转化、涂板（抗性Cm）

5. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒：PCR、消化、纯化、连接、转化

1) 片段PCR

pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒PCR

	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	酶
1	pSC101- J23119-Tcl- pR(3)-pL(3)- sfGFP	0610-T-C-F	0610-CI-repA-R	3046bp		片段	
2	pSC101- J23119-Tcl- pR(3)-pL(3)- sfGFP	0610-CI-repA-F	0610-T-C-R	2402bp		片段	

2) DpnI消化、纯化

3) Gibson连接

pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒构建Gibson

	命名	片段1	片段2
1	pSC101-pR(3)- pL(3)-sfGFP- J23119-CI	CI1	CI2

4) 转化、涂板（抗性Cm）

实验结果：

- 1. 扩增pTac、pTet质粒：转化——长出单克隆
- 2. 验证热诱导体系：质粒PCR、测序——均P出条带
- 3. 验证冷诱导体系：质粒PCR、测序——1组未P出条带，重P
- 4. /5./6. 均无，重P

2019年6月11日星期二

实验目的：

- 1. 扩增pTac、pTet质粒：挑单克隆，摇菌，提质粒
- 2. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒：PCR、消化、纯化、连接、转化
- 3. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒：PCR、消化、纯化、连接、转化
- 4. 验证冷诱导体系：质粒PCR、测序——1组未P出条带

实验步骤：

- 1. 扩增pTac、pTet质粒：挑单克隆，摇菌
- 2. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒
- 3. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒
- 4. 验证冷诱导体系

Table11							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	
1	cl434-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-Cm	0610-JC-F	0519-PTP-JC-R1	753bp		片段	
2	cl434-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp		片段	
3	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-JC-F	0519-PTP-JC-R1	753bp		片段	
4	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp		片段	
5	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-mfLon-JC-F1	0610-mfLon-JC-R1	889bp	no	片段	

实验结果：

1. 扩增pTac、pTet质粒：挑单克隆，摇菌
2. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒：doc片段用GreenMix得到

2019年6月15日星期六

实验目的：

1. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒
2. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒
3. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS
4. 验证冷诱导体系
5. 准备测流式

实验步骤：

1. /2. /3. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒、pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒、pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS

1) 片段PCR

构建							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	酶
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	0610-T-C-F	0610-CI-repA-R	3046bp		片段	
2	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	0610-CI-repA-F	0610-T-C-R	2402bp		片段	
3	pTN-CI2TryaaRS-pBAD-doc	0610-doc-F	0610-doc-R	424bp		片段	
4	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-pSC101-doc-VF	0610-pSC101-doc-VR	4509bp		片段	
5	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0426-PTP-TVMV-VF	0513-pSC101-CI434-TVMVS-R	2873bp		片段	
6	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0513-pSC101-CI434-TVMVS-F	0426-PTP-TVMV-VR	3212bp		片段	

- 2) 消化纯化
- 3) Gibson连接

Gibson连接			
	命名	片段1	片段2
1	pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI	CI1	CI2
2	pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV	doc	Vdoc
3	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS	TVMV1	TVMV2

4) 转化

4. 验证冷诱导体系

冷诱导验证补充							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	重P原因
1	pcl434-TEVts-6#-Amp	0610-TEVts-JC-F	0610-TEVts-JC-R	1061bp	16s	TEV6-1/2	结合问题
2	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp			无信号
3	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-mfLon-JC-F1	0610-mfLon-JC-R1	889bp	14s		重P
4	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	mfLon-JC-F1	mfLon-JC-R2	1799bp	28s		重P
5	p15A-TEVts#6-tetR-pTetO(wt)-3000-mfLon	0610-TEVts6#-JC2-F	0610-mfLon-JC-R1	1840bp	28s		重P

5. 准备测流式

流式						
	PSC101-Empty	CI434-TEV	CI434-TVMV	CI434-SUMMV	CI434-HR3C	F
1					✓	RGP-Empty
2		✓				RGP-TEV
3		✓		✓	✓	RGP-SUMMV
4		✓				RGP-HR3C
5		✓		✓	✓	RGP-TVMV

- 1) 挑3个单菌落/组，150μL/孔置于96孔板内摇8-12h
- 2) 梯度诱导：0-1M/L每孔10倍浓度梯度+菌液100倍稀释

i. 配制 1mol/L IPTG-LB（Cm+Amp）

ii. 在1-7孔加入148.5μL LB（Cm+Amp），8孔加入165μL 1mol/L IPTG-LB（Cm+Amp）

iii. 从8孔中取16.5μL加到7孔，从7孔中取16.5μL加到6孔.....从1孔中取16.5μL弃去

iv. 在每孔中加入1.5μL菌液

以上20组类似，共需5个96孔板
- 3) 震荡培养过夜

2019年6月21日星期五

实验目的：

1. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒
2. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒
3. 重新构建pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMV
4. 准备测流式

实验步骤：

实验步骤：

1. /2. /3. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒、pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒、pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS

1) 片段PCR

片段PCR							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	编号
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	0610-T-C-F	0610-CI-repA-R	3046bp		片段	CI1
2	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	0610-CI-repA-F	0610-T-C-R	2402bp		片段	CI2
3	pTN-CI2TryaaRS-pBAD-doc	0610-doc-F	0610-doc-R	424bp		片段	doc
4	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-pSC101-doc-VF	0610-pSC101-doc-VR1	2205bp		片段	Vdoc1
5	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-pSC101-doc-VF1	0610-pSC101-doc-VR	2323bp		片段	Vdoc2
6	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0426-PTP-TVMV-VF	0620-CI434-TVMV-VR	2991bp		片段	TVMV1
7	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-HRV3C	0620-CI434-TVMV-VF	0426-PTP-TVMV-VR	3114bp		片段	TVMV2

- 2) 消化纯化
- 3) Gibson连接

Gibson				
	命名	片段1	片段2	片段3
1	pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI	CI1	CI2	
2	pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV	doc	Vdoc1	Vdoc2
3	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS	TVMV1	TVMV2	

- 4) 转化
5. 准备测流式

双转组别						
	PSC101-Empty	CI434-TEV	CI434-TVMV	CI434-SUMMV	CI434-HR3C	F
1						RGP-Empty
2						RGP-TEV
3						RGP-SUMMV
4						RGP-HR3C
5						RGP-TVMV

- 1) 挑3个单菌落/组，150μL/孔置于96孔板内摇8-12h
- 2) 梯度诱导：0-1M/L每孔10倍浓度梯度+菌液100倍稀释

i. 配制 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)

ii. 在1-7孔加入148.5μL LB (Cm+Amp) ， 8孔加入165μL 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)

iii. 从8孔中取16.5μL加到7孔，从7孔中取16.5μL加到6孔.....从2孔中取16.5μL弃去

iv. 在每孔中加入1.5μL菌液

以上20组类似，共需5个96孔板
- 3) 震荡培养过夜

准备材料：5个96孔板，黄枪头，白枪头，排枪（2个20-200μL，1个20μL，1个100μL）

使用排枪注意事项：

1. 插枪头时在第一排或最后一排左右轻微压排枪，使枪头插紧
2. 吸取液体时不要碰到底部或板壁，使枪头处于液体中间，同时防止将枪头碰松掉落
3. 吸上液体后，确认是否每个枪头内液体量都相等，打出液体时，同样要确定是否均全部打出；枪头使用几次后，可能由于每次的液体残留使得枪头内液体量不等，可重新插新的枪头

具体步骤：

1. 配制2管50ml 双抗（Amp+Cm），加进每个96孔板的1-7排，每孔加148.5μL
2. 配制10ml 10mM IPTG：9.9ml 双抗LB+100μL 1mM IPTG，加到每个96孔板的第8排，每孔加165μL
3. 从8孔中取16.5μL加到7孔，从7孔中取16.5μL加到6孔.....从2孔中取16.5μL弃去，1孔不进行操作
4. 在96孔板上标注清楚

1												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-Empty+ pSC101-Empty			RGP-Empty+ CI434-TEV			RGP-Empty+ CI434-SUMMV			RGP-Empty+ CI434-HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

2												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP- TEV+pSC10 1-Empty			RGP- TEV+CI434 -TEV			RGP- TEV+CI434- SUMMV			RGP- TEV+CI43 4-HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP- SUMMV+pS C101-Empty			RGP- SUMMV+CI 434-TEV			RGP- SUMMV+CI 434- SUMMV			RGP- SUMMV+C I434- HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-HR3C+pSC101-Empty			RGP-HR3C+CI434-TEV			RGP-HR3C+CI434-SUMMV			RGP-HR3C+CI434-HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	RGP-TVMV+pSC101-Empty			RGP-TVMV+CI434-TEV			RGP-TVMV+CI434-SUMMV			RGP-TVMV+CI434-HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

5. 在每孔中加入1.5μL菌液（96孔板每列加相同的种子液）
6. 贴膜封口，震荡培养12h

- 实验结果：
1. 构建：均已连接上，等待转化

2. 明日测流式

2019年6月22日星期六

- 实验目的：
1. 构建相关转化

2. 测流式

3. 验证
- 实验步骤：
2. i) 取5个96孔板，在每个板上做好对应的标记，每孔加146μL的PBS-Kan

ii) 每孔加入种子液4μL

3. 验证

验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	重P原因
1	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp			无信号

2019年7月15日星期一

实验目的：1. 构建pSC101-pCI434(O2)-doc-J231119-CI434ts-TEV质粒

实验步骤：

doc质粒PCR							
	A	B	C	D	E	F	G
1	pTN-CI2TryaaRS-pBAD-doc	0610-doc-F	0610-doc-R	424bp		片段	doc
2	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-pSC101-doc-VF	0610-pSC101-doc-VR1	2205bp		片段	Vdoc1
3	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0610-pSC101-doc-VF1	0610-pSC101-doc-VR	2323bp		片段	Vdoc2

2019年7月17日星期三

实验目的：

1. 重P Vdoc/doc 连接
2. 消化纯化TVMV
3. 划线挑单克隆、摇菌、保菌
4. 寄三管质粒

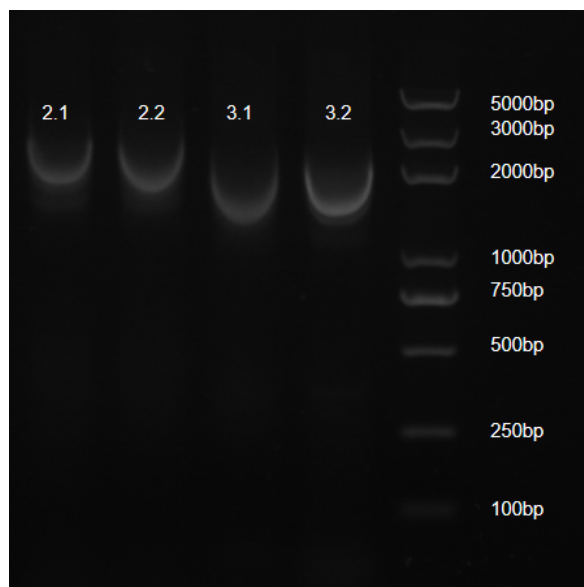
实验步骤：

1. 重P Vdoc/doc 连接
2. 消化纯化TVMV
3. 划线挑单克隆、摇菌、保菌

0718.1.PNG



0718.2.PNG



2019年8月13日星期二

测流式-正交性检验剩余组别

- 1) 挑3个单菌落/组，150 μ L/孔置于96孔板内摇8-12h
- 2) 梯度诱导：0-1M/L每孔10倍浓度梯度+菌液100倍稀释
 - i. 配制 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)
 - ii. 在1-7孔加入148.5 μ L LB (Cm+Amp)，8孔加入165 μ L 1mol/L IPTG-LB (Cm+Amp)
 - iii. 从8孔中取16.5 μ L加到7孔，从7孔中取16.5 μ L加到6孔.....从2孔中取16.5 μ L弃去
 - iv. 在每孔中加入1.5 μ L菌液

以上20组类似，共需5个96孔板
- 3) 震荡培养过夜

准备材料：5个96孔板，黄枪头，白枪头，排枪（2个20-200μL，1个20μL，1个100μL）

使用排枪注意事项：

- 1. 插枪头时在第一排或最后一排左右轻微压排枪，使枪头插紧
- 2. 吸取液体时不要碰到底部或板壁，使枪头处于液体中间，同时防止将枪头碰松掉落
- 3. 吸上液体后，确认是否每个枪头内液体量都相等，打出液体时，同样要确定是否均全部打出；枪头使用几次后，可能由于每次的液体残留使得枪头内液体量不等，可重新插新的枪头

具体步骤：

- 1. 配制2管50ml 双抗（Amp+Cm），加进每个96孔板的1-7排，每孔加148.5μL
- 2. 配制10ml 10mM IPTG：9.9ml 双抗LB+100μL 1000mM IPTG，加到每个96孔板的第8排，每孔加165μL
- 3. 从8孔中取16.5μL加到7孔，从7孔中取16.5μL加到6孔.....从2孔中取16.5μL弃去，1孔不进行操作
- 4. 在96孔板上标注清楚

板1

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CI434-TVMV+RGP-TVMV			CI434-TVMV+RGP-TEV			CI434-TVMV+RGP-SUMMV			CI434-TVMV+RGP-HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

板2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CI434-TVMV+RGP-Empty			CI434-TEV+RGP-TEV			CI434-SUMMV+RGP-SUMMV			CI434-HR3C+RGP-HR3C		
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

板3

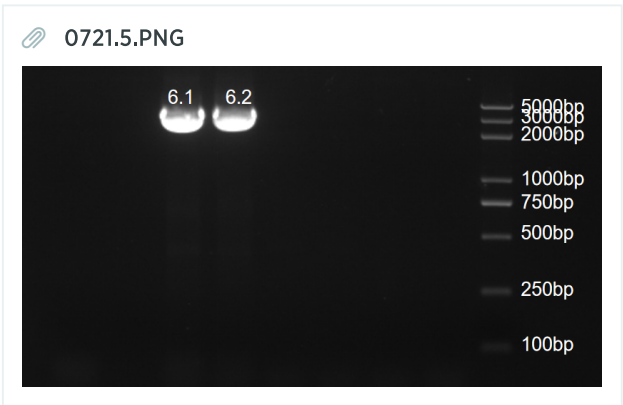
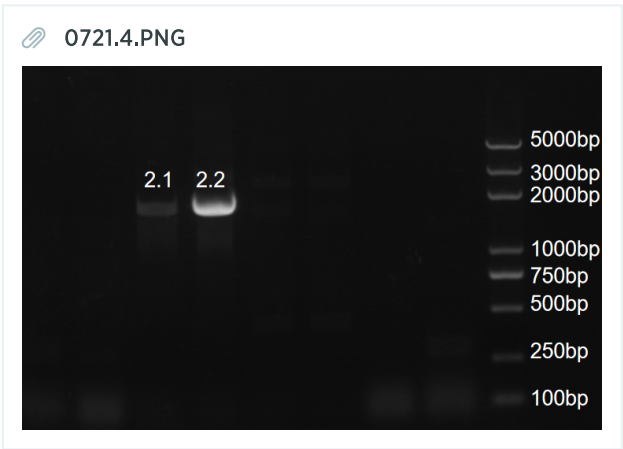
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CI434-HR3C+RGP-SUMMV											
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

构建双平台质粒

2019年7月20日星期六

1. 构建双平台质粒：pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm, pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm
1)PCR, 消化, 纯化, 测浓度

pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm 及 pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm PCR					
	模板	引物F	引物R	长度	命名
1	pJFR4	0719-mRFP-F	0719-mRFP-R	678bp	mRFP
2	TCl	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	1762bp	TCl-mRFP-1
3	TCl	0719-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	2981bp	TCl-mRFP-2
4	pJFR4	0719-mRFP-F	0719-TlpA36-mRFP-R	718bp	mRFP-1
5	TlpA36	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	2156bp	TlpA36-mRFP-1
6	TlpA36	0719-TlpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	2989bp	TlpA36-mRFP-2



- 2) 连接、转化

pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm 及 pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-...

^

	连接产物名称	片段1	片段2	片段3
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	mRFP	TCI-mRFP-1	TCI-mRFP-2
2	pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	mRFP-1	TlpA36-mRFP-1	TlpA36-mRFP-2

只有2和6成功P出来，并且已经做了消化纯化，其它均未P出。

菌P验证

pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm, pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-p...

^

	模板	引物F	引物R	长度
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	0719-TCI-mRFP-JC-F	0719-TCI-mRFP-JC-R	636bp
2	pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	0719-TlpA36-mRFP-JC-F	0719-TCI-mRFP-JC-R	646bp

2019年7月24日星期三

1. 重新构 建双平台质粒： pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm, pSC101-J23119-TlpA36-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm

Table3

	模板	引物F	引物R	长度	命名	备注	G
1	pJFR4	0724-TCI-mRFP-F	0724-TCI-mRFP-R	702bp	mRFP		
2	TCI	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	1762bp	TCI-mRFP-1	已有	
3	TCI	0719-TIpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	3017bp	TCI-mRFP-2	已有	
4	pJFR4	0724-TCI-mRFP-F	0724-TCI-mRFP-R	702bp	mRFP	已有, TIpA36-mRFP已连接转化	
5	TIpA36	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	2156bp	TIpA36-mRFP-1	已有	
6	TIpA36	0719-TIpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	2989bp	TIpA36-mRFP-2	已有	

2019年7月30日星期二

1. 双平台质粒构建
片段PCR:

构建PCR					
	模板	引物1	引物2	长度	命名
1	TIpA-mRFP	0729-TEVts#6-TIpA36-mRFP-F	0729-TEV#6-TIpA36-mRFP-R	2960bp	RGP-TIpA36-mRFP-1
2	TEVts6#	0729-TEV#6-TIpA36-mRFP-VF	0729-TEVts#6-p15A-R	2244bp	RGP-TIpA36-mRFP-2
3	TEVts6#	0729-TEVts#6-p15A-F	0729-TEVts#6-TIpA36-mRFP-VR	2195bp	RGP-TIpA36-mRFP-3
4					
5	TCI-mRFP	0729-TEVts#6-TIpA36-mRFP-F	0729-TEV#6-TIpA36-mRFP-R	2594bp	RGP-TCI-mRFP-1
6	TEVts6#	0729-TEV#6-TIpA36-mRFP-VF	0729-TEVts#6-p15A-R	2244bp	RGP-TCI-mRFP-2
7	TEVts6#	0729-TEVts#6-p15A-F	0729-TEVts#6-TIpA36-mRFP-VR	2195bp	RGP-TCI-mRFP-3
8					

消化+纯化+连接

Gibson Assembly				
	质粒名称	片段1	片段2	片段3
1	RGP-pCI434-TEVts6#-TlpA36-mRFP-Amp	RGP-TlpA36-mRFP-1	RGP-TlpA36-mRFP-2	RGP-TlpA36-mRFP-3
2	RGP-pCI434-TEVts6#-TCI-mRFP-Amp	RGP-TCI-mRFP-1	RGP-TCI-mRFP-2	RGP-TCI-mRFP-3

转化+验证

2019年8月2日星期五

菌p验证：

Table6				
	验证质粒	引物F	引物R	长度
1	RGP-pCI434-TEVts6#-TlpA36-mRFP-Amp	0729-TEVts#6-JC-F	0729-TlpA36-JC-R	813bp
2		0719-TlpA36-mRFP-VF	0729-TEVts#6-Amp-JC-R	1164bp
3				
4	RGP-pCI434-TEVts6#-TCI-mRFP-Amp	0729-TEVts#6-JC-F	0729-TEVts#6-TCI-JC-R	863bp
5		0719-TlpA36-mRFP-VF	0729-TEVts#6-Amp-JC-R	1164bp

2019年8月17日星期六

- 1. 另两组双平台质粒构建：

1+1 体系

	模板	引物F	引物R	长度	命名	F
1	pSC101-J23119-TlpA(Right)-pTlpA-sfGFP-Cm	0719-TlpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-VR	5080bp	TlpA-mRFP-1	
2	pSC101-J23119-Tcl38-pR(3)-pL(3)-sfGFP-Cm	0719-TlpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-VR	4686bp	TCI38-mRFP-1	
3	pJFR4	0724-TCI-mRFP-F	0724-TCI-mRFP-R	702bp	mRFP	

Table10

	模板	引物F	引物R	长度	命名	备注	G
1	pJFR4	0724-TCI-mRFP-F	0724-TCI-mRFP-R	702bp	mRFP		
2	TCI42	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	1762bp	TCI-mRFP-1		
3	TCI42	0719-TlpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	3017bp	TCI-mRFP-2		
4	pJFR4	0724-TCI-mRFP-F	0724-TCI-mRFP-R	702bp	mRFP		
5	TlpA	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	2156bp	TlpA36-mRFP-1		
6	TlpA	0719-TlpA36-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	2989bp	TlpA36-mRFP-2		

连接：

Table8

	片段1	片段2	命名	D
1	TlpA-mRFP-1	mRFP	pSC101-TlpA-mRFP	
2	TCI38-mRFP-1	mRFP	pSC101-TCI38-mRFP	

菌p检验：

Table7

	模板	引物F	引物R	长度
1	pSC101-J23119-Tcl42-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	0719-TCI-mRFP-JC-F	0719-TCI-mRFP-JC-R	630bp
2	pSC101-J23119-TlpA-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	0719-TlpA36-mRFP-JC-F	0719-TCI-mRFP-JC-R	640bp

验证完之后一方面送测序，验证成功的就直接往下构

双平台质粒-TEV+热诱导 构建：

Table9

	模板	引物F	引物R	长度	命名	F
1	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0818-TEVts-TlpA-mRFP-VF	0818-TEVts-TlpA-mRFP-VR	4405bp	VTEVts	
2	pSC101-J23119-TlpA-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	0818-TEVts-TlpA-mRFP-F	0818-TEVts-TlpA-mRFP-R	2430bp	TEVts-TlpA-mRFP	
3	pSC101-J23119-Tcl42-pR(3)-pL(3)-RFP-Cm	0818-TEVts-TlpA-mRFP-F	0818-TEVts-TlpA-mRFP-R	2066bp	TEVts-Tcl42-mRFP	

连接：1+2， 1+3
转化：均为Amp抗性

构建温敏part与建模part

2019年7月18日星期四

实验目的：

2019年7月20日星期六

1. 冷诱导质粒补充验证

2. 构建pSC101-pR（3）-pL（3）-sfGFP-J23119-CI质粒

3. TVMV菌p验证

4. 做双转准备测流式

实验步骤：

1. 冷诱导质粒补充验证

冷诱导质粒验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	cl434ts(R2 #2)-TEVsite-pcl434(O2)-sfGFP-pdt#4-Cm	0426-PTP-JC-F	0610-CI434ts-JC-R	783bp	12s	pdt#4 1/2	Fastaq

2. 构建pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI质粒

1) 片段PCR

片段PCR							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	属性	命名
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	0610-T-C-F	0610-CI-repA-R	3046bp	91s	片段	CI1
2	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP	0610-CI-repA-F	0610-T-C-R	2402bp	84s	片段	CI2

2) 消化纯化

3) Gibson连接

Gibson连接				
	命名	片段1	片段2	D
1	pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI	CI1	CI2	

4) 转化

5) 准备测流式

3. TVMV菌p验证

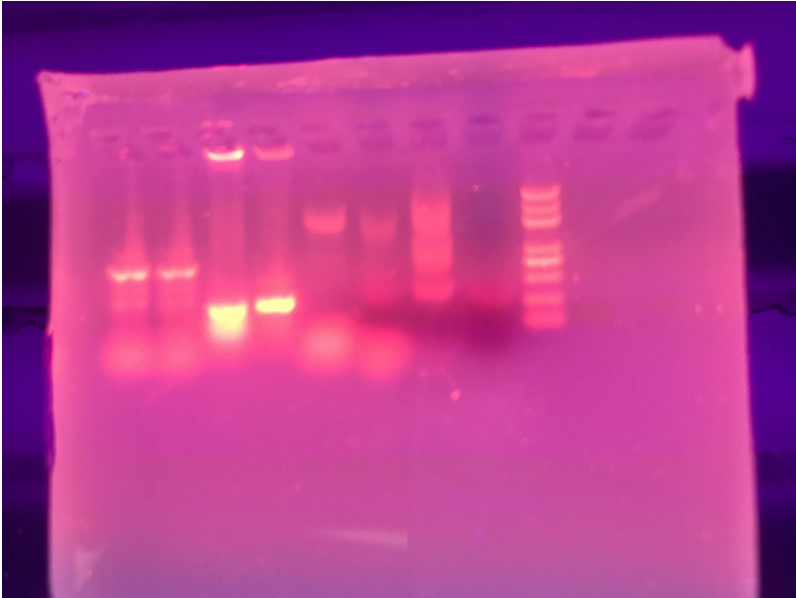
TVMV菌p验证						
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS-Cm	0426-PTP-JC-F	0426-PTP-HRV-VR	286bp	5s	TVMV

4. 双转

双转					
	CI434-TEV	CI434-TVMV	CI434-SuMMV	CI434-HR3C	E
1					RGP-TEV
2					RGP-TVMV
3					RGP-SuMMV
4					RGP-HR3C

实验结果：

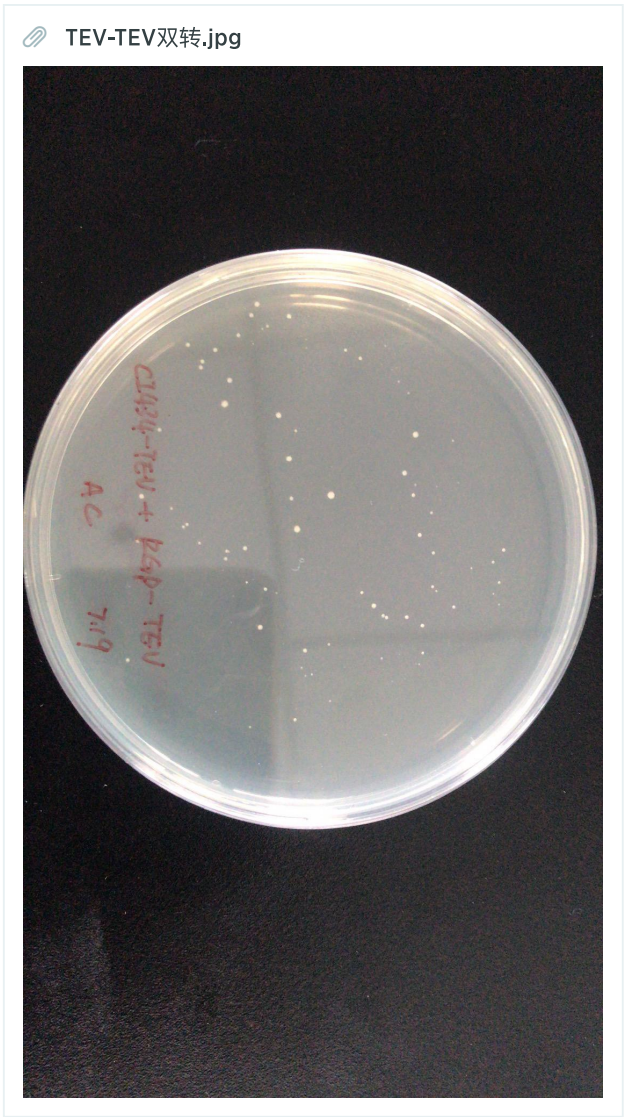
跑胶结果



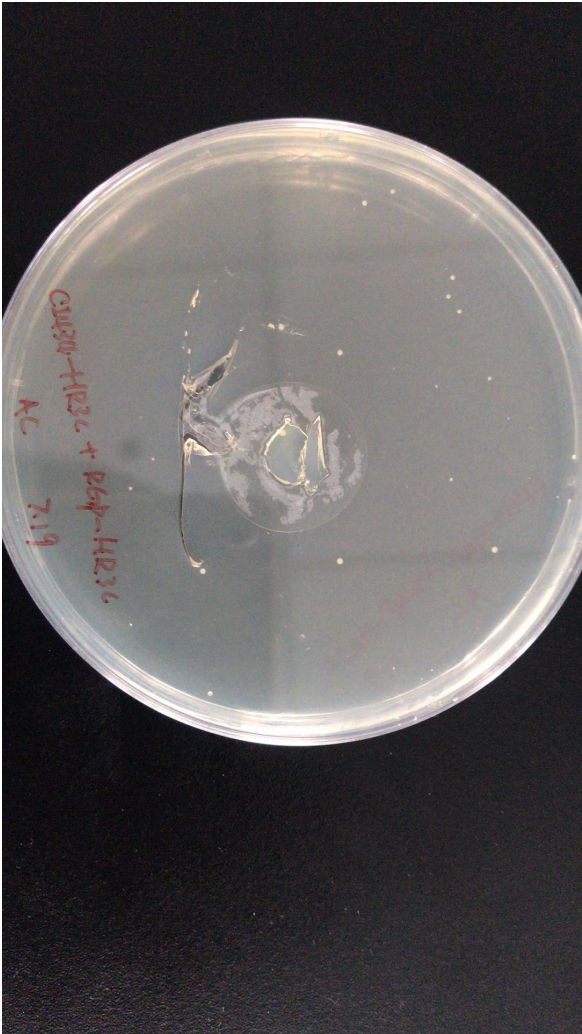
从左到右依次为：pdt#4 1 //pdt#4 2//TVMV 1//TVMV 2//CI1 1//CI1 2//CI2 1//CI2 2//MARKER

CI构建失败，推测为引物问题，0610-CI-repA-R//0610-CI-repA-F 引物量过少，稀释后使用，推测引物浓度过低，考虑重新合引物

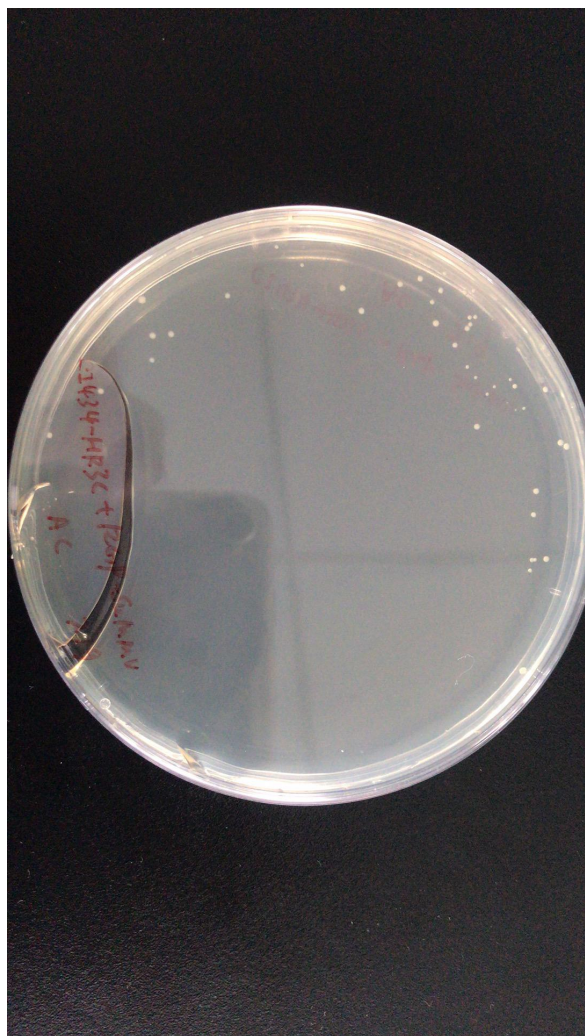
双转结果:



HR3C双转.jpg



SuMMV--CI434-HR3C双转.jpg



CI434-SuMMV--SuMMV双转没长起来，且CI434-HR3C--SuMMV双转菌落位置在边缘处

实验目的：

1. 重新做CI434-SUMMV--SUMMV//CI434-HR3C--SUMMV//CI434-TEV--TEV//CI434-HR3C--HR3C的双转
2. 重新构建pSC101-PR3-PL3-J23119-CI质粒
3. （如果下午回学校早）开始构建pSC101-J23119-TF-Cm

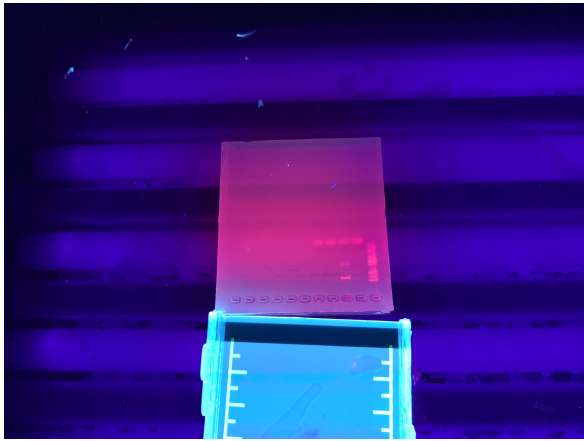
实验步骤：

1. 双转CI434-SUMMV--SUMMV//CI434-HR3C--SUMMV//CI434-TEV--TEV//CI434-HR3C--HR3C
2. 重新构建pSC101-PR3-PL3-J23119-CI质粒
3. 构建pSC101-J23119-TF-Cm

1) 片段PCR

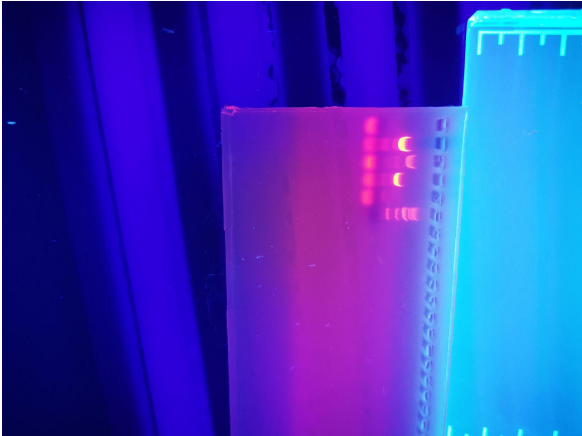
pSC101-J23119-CI434-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-434F1	0719-sfGFP-remove-R1	3263bp	98s	CI434 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-434R2	1895bp	57s	CI434 2	PrimeStar

laclI和CI434 1片段的PCR,有条带的是CI434 1.jpg

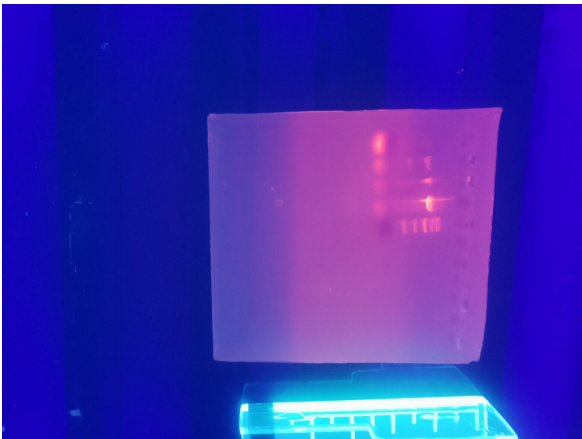


pSC101-J23119-CI-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-CF1	0719sfGFP-remove-R1	3263bp	98s	CI 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-CR2	1262bp	38s	CI 2	PrimeStar
3	pSC101-pR(3)-pL(3)-sfGFP-J23119-CI-Cm	0719-CI-F	0719-CI-R	734bp	22s	CI 3	PrimeStar

0720pSC101-J23119-CI-Cm质粒构建-CI434 2 CI 1 CI 2.jpg



0720-pSC101-PR3-PL3-J23119-CI质粒构建片段PCR.jpg

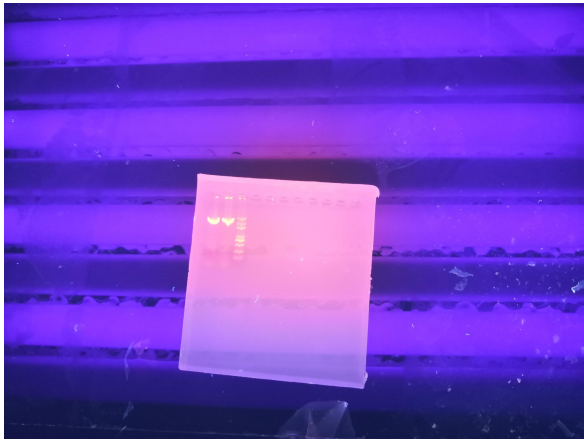


pSC101-J23119-TetR-Cm

	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-TetF1	0719sfGFP-remove-R1	3263bp	98s	TetR 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-TetR2	1262bp	38s	TetR 2	PrimeStar
3	pTet	0719-TetR-F	0719-TetR-R	646bp	20s	TetR 3	PrimeStar

pSC101-J23119-LacI-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-LF1	0719sfGFP-remove-R1	3263bp	98s	LacI 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-LR2	1262bp	38s	LacI 2	PrimeStar
3	pTac	0719-LacI-F	0719-LacI-R	1103bp	33s	LacI 3	PrimeStar

📎 lacI片段PCR.jpg

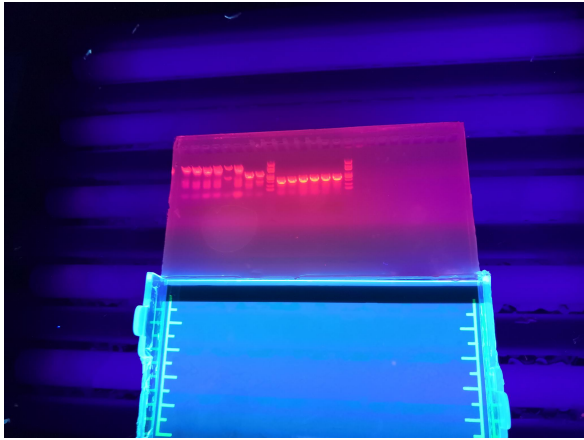


pSC101-J23119-HKCI-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-HF1	0719sfGFP-remove-R1	3263bp	98s	HKCI 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-R2	1262bp	38s	HKCI 2	PrimeStar
3	RGP-HKCI-RBS16	0719-HKCI-F	0719-HKCI-R	752bp	23s	HKCI 3	PrimeStar

pSC101-J23119-TP901CI-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-TF1	0719sfGFP-remove-R1	3258bp	98s	TP901CI 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-R2	1267bp	38s	TP901CI 2	PrimeStar
3	RGP-TP901CI-RBS19	0719-TP901CI-F	0719-TP901CI-R	588bp	18s	T901CI 3	PrimeStar

pSC101-J23119-P22C2-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-PF1	0719sfGFP-remove-R1	3258bp	98s	P22C2 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-R2	1267bp	38s	P22C2 2	PrimeStar
3	RGP-P22C2-RBS6	0719-P22C2-F	0719-P22C2-R	694bp	21s	P22C2 3	PrimeStar

CI家族构建.jpg



- 2) 消化纯化
- 3) 测浓度
- 4) Gibson连接
- 5) 转化
- 6) 菌p验证

pSC101-J23119-TF-Cm菌p验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-J23119-CI434-Cm	0721-CI434-JC-F	0721-JC-R	775bp	12s	CI434 JC	Fastaq
2	pSC101-J23119-CI-Cm	0610-T-C-F	0721-JC-R	791bp	12s	CI JC	Fastaq
3	pSC101-J23119-TetR-Cm	0721-TetR-JC-F	0721-JC-R	798bp	12s	TetR JC	Fastaq
4	pSC101-J23119-LacI-Cm	0721-LacI-JC-F	0721-JC-R	796bp	12s	LacI JC	Fastaq
5	pSC101-J23119-HKCI-Cm	0721-HKCI-JC-F	0721-JC-R	784bp	12s	HKCI JC	Fastaq
6	pSC101-J23119-TP901CI-TP901CI-Cm	0721-TP901CI-JC-F	0721-JC-R	789bp	12s	TP901CI JC	Fastaq
7	pSC101-J23119-P22C2-P22C2-Cm	0721-P22C2-JC-F	0721-JC-R	793bp	12s	P22C2 JC	Fastaq

- 7) 送测序
- 8) 挑单克隆，摇菌，保菌，提质粒

2019年7月24日星期三

- 实验目的：
- 1. 测冷诱导质粒生长曲线
 - 2. 重新转化pSC101-J23119-CI-Cm
 - 3. 提质粒 0
- 测生长曲线值班表：

0725生长曲线测量		
	时间	人员
1	16: 07	杨傲
2	17: 07	杨焯雅
3	18: 07	陈晨
4	19: 07	张志远
5	20: 07	杨傲
6	21: 07	杨焯雅
7	22: 07	陈晨
8	23: 07	张志远
9	24: 07	卓良辰
10		

2019年7月26日星期五

实验目的:

- 1. 测生长曲线 菌9: 00摇上, 每隔一小时测一次, 若生长速度明显加快, 则半小时测一次 (杨傲)
- 2. pSC101-PR3-PL3-sfGFP-J23119-CI-Cm重新构建 (前一天的转化还没长起来) 见7.19日实验步骤
- 3. 如果引物到了, 开始构建pSC101-J23119-CI家族-Cm (见7.20日实验步骤) 以及建模组需要的质粒
- 4. 菌p验证
- 5. HP组调研

实验步骤:

- 1. 将菌液150微升转移到九十六孔板上, 用酶标仪测OD值
- 2. 见7.19日实验步骤
- 3. 构建pSC101-J23119-CI家族-Cm (见7.20日实验步骤)
建模组需要的质粒构建 (杨焯雅) 张志远: 提质粒+转化

pTac-DOC-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pTac	0725-sfGFP-remove-R1	0725-sfGFP-remove-F1	3586bp	72s	DOC1	PrimeStar
2	doc	0725-doc-add-R1	0725-sfGFP-remove-F1	403bp	12s	DOC2	PrimeStar

- 4. 菌p验证见7.20日实验步骤 (卓良辰)
- 5. HP调研 (张志远)

2019年7月28日星期日

实验目的:

- 1. 继续构建之前没构建完成的转录因子质粒
- 2. 构建启动子+荧光蛋白质粒
- 3. 构建建模需要的质粒

实验步骤:

- 1. 自己心里清楚

2. 构建启动子+荧光蛋白质粒

RGP-pCI434-sfGFP-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-434R	0727-RGP-F	3564bp		pCI434 1	greenmix
2	pTac	0727-sfGFP-add-434F	0727-sfGFP-add-R	849bp		pCI434 2	greenmix

RGP-pCI-sfGFP-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1		0728-CI-R	0728-CI-F	4234bp		pCI	

RGP-pHKCI-sfGFP-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1		0727-HKCI-R	0727-HKCI-F	4235bp		pHKCI	

RGP-pP22C2-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1		0727-P22C2-R	0727-P22C2-F	4235bp		pP22C2	

RGP-pTP901-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1		0727-TP901-R	0727-TP901-F	4236bp		pTP901	

RGP-pTac-sfGFP-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pTac	0727-sfGFP-add-R	0727-sfGFP-add-lacF	900bp		pTac 1	greenmix
2	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-lacR	0727-RGP-F	3391bp		pTac 2	greenmix

RGP-pTet-sfGFP-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pTet	0727-sfGFP-add-tetR	0727-sfGFP-add-tetF	939bp		pTet 1	greenmix
2	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-tetR	0727-RGP-tetF	3391bp		pTet 2	greenmix

3. 建模组质粒

pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-pTac-CI434ts(R2#2)-TEVsite-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	Ptac-sfGFP-LacI-TEV-2-Cm	0728-pTac-add-F1	0728-pTac-add-R1	128bp		JM-pdt1	
2	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-pTac-CI434ts(R2#2)-TEVsite-Cm	0728-J23119-remove-F1	0728-J23119-remove-R1	2532bp		JM-pdt2	
3	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-pTac-CI434ts(R2#2)-TEVsite-Cm	0728-J23119-remove-F2	0728-J23119-remove-R2	2770bp		JM-pdt3	

RGP-J23119-mflon-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-J23119-CI434ts(R2 #2)-TEVsite-Cm	0728-J23119-add-F	0728-J23119-add-R	94bp		JM-mf1	
2	RGP-pCI434-TEVts6#-tetR-pTetO(wt)-mflon-Amp	0728-Tevts-TetR-remove-F1	0728-Tevts-TetR-remove-R1	2667bp		JM-mf2	
3	RGP-pCI434-TEVts6#-tetR-pTetO(wt)-mflon-Amp	0728-Tevts-TetR-remove-F2	0728-Tevts-TetR-remove-R2	3106bp		JM-mf3	

RGP-J23119-TEVts6#-Amp							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-J23119-CI434ts(R2 #2)-TEVsite-Cm	0728-add-J23119-F1	0728-add-J23119-R1	94bp		JM-TEVts1	
2	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0728-add-J23119-F2	0728-add-J23119-R2	4200bp		JM-TEVts2	



read me.txt

任务分配：杨傲：构启动子+荧光蛋白质粒
杨焯雅：建模的三个质粒
张志远：CI质粒 doc质粒

2019年7月31日星期三

菌p验证

启动子+转录因子//建模组质粒 菌p验证							
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	RGP-pCI434-sfGFP-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R	760bp	12s	pCI434 JC	FastTaq
2	RGP-pCI-sfGFP-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R			pCI JC	FastTaq
3	RGP-pHKCI-sfGFP-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R			pHKCI JC	FastTaq
4	RGP-pP22C2-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R			pP22C2 JC	FastTaq
5	RGP-pTP901-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R			pTP901 JC	FastTaq
6	RGP-pTac-sfGFP-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R			pTac JC	FastTaq
7	RGP-pTet-sfGFP-Amp	0731-JC-F	0731-JC-R			pTet JC	FastTaq
8	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-pTac-CI434ts(R2#2)-TEVsite-Cm	0728-pTac-add-F1	0728-pTac-add-R1	128bp		JM PDT JC	FastTaq
9	RGP-J23119-mflon-Amp	0728-J23119-add-F	0728-J23119-add-R			JM MF JC	FastTaq
10	RGP-J23119-TEVts6#-Amp	0728-add-J23119-F1	0728-add-J23119-R1			JM TEVts JC	FastTaq
11	pTac-DOC-Cm	0801-doc-JC-F	0801-doc-JC-R			JM DOC JC	FastTaq

2019年8月1日星期四

准备测生长曲线：doc单转；nissle，双转

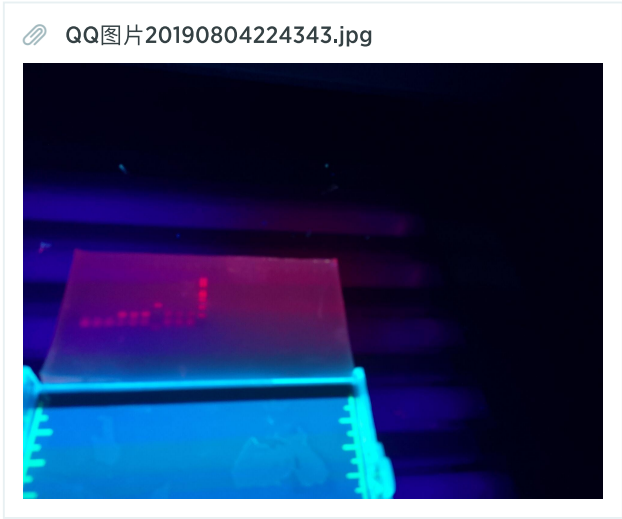
2019年8月3日星期六

实验目的：

- 1. 温敏TEV及温敏转录因子摇菌提质粒，测序
- 2. PHD (antitoxin) 转化
- 3. 菌p验证
- 4. 测生长曲线 30°C 34°C 37°C 40°C 42°C 注：nissle菌株生长速度可能较缓慢，需要测量15h左右

实验结果：

- 1. 提质粒的菌已摇上
- 2. 由于没有感受态转化未能完成
- 3. 菌p验证由于建模组验证引物p出来长度太短，考虑设计引物重新菌p，其中doc质粒验证长度不对



1. 40°C doc生长曲线已测量，注：nissle菌株无抗性

2019年8月4日星期日

实验目的：

- 1. 温敏TEV及温敏转录因子保菌提质粒，送测序
- 2. 建模组质粒重新菌p验证
- 3. 42°C生长曲线测量
- 4. 转化未长的质粒重p
- 5. 插点枪头和配的固体培养基一起高压灭菌

实验步骤：

- 1. 保菌提质粒的菌已经放在摇床上摇了（22：30）盖子上均画有三角符号

记得保菌：900微升菌液+900微升甘油

质粒提完之后做质粒pcr验证（酶用FastTaq 速度4k/min）

TEVts组（-6、7、11、17、18）检测引物：0610-TEVts-JC-F//0610-TEVts-JC-R 长度1061bp

TCI TCI38 TCI42：引物VF2//190607-JC-pL-R 长度：1215bp

TlpA A36 A39：引物VF2//190607-JC-pTlpA-R 长度：1598bp

- 2. 建模组重新菌p验证

建模组菌p验证						
	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名
1	RGP-J23119-mflon-Amp	0807-JC-F	0610-mfLon-JC-R1	883bp		
2	RGP-J23119-TEVts6#-Amp	0807-JC-F	0804-TEVts-JC-R	715bp		
3	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-pTac-CI434ts(R2#2)-TEVsite-Cm	0804-JMpdt-F	0804-JMpdt-R	760bp		

注：FastTaq酶速度为4k/min

引物送到前菌p mflon 菌在4度冰箱最上层泡沫板上 8.4日菌p显示mflon12345 均有条带（其12345为盖子上的数字）

- 3.生长曲线42°C

96孔板

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

4. 转化未长的质粒重p
建模组doc
转录因子P22C2、CI434
启动子+荧光蛋白pCI434、pTet、pTac

1.png

pSC101-J23119-P22C2-Cm							
№	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-FF1	0719-sfGFP-remove-R1	3258bp	98s	P22C2 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-R2	1267bp	38s	P22C2 2	PrimeStar
3	RGP-P22C2-RBS6	0719-P22C2-F	0719-P22C2-R	694bp	21s	P22C2 3	PrimeStar

2.png

pSC101-J23119-CI434-Cm							
№	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-434F1	0719-sfGFP-remove-R1	3263bp	98s	CI434 1	PrimeStar
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-434R2	18950p	57s	CI434 2	PrimeStar

3.png

pTec-DOC-Cm							
№	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pTac	0725-sfGFP-remove-R1	0725-sfGFP-remove-F1	3586bp	72s	DOC1	PrimeStar
2	doc	0725-doc-add-R1	0725-sfGFP-remove-F1	403bp	12s	DOC2	PrimeStar

4.png

	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	RGp-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-434R	0727-RGP-F	3564bp		pCI434 1	greenmix
2	pTac	0727-sfGFP-add-434F	0727-sfGFP-add-R	849bp		pCI434 2	greenmix

5.png

	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pTac	0727-sfGFP-add-R	0727-sfGFP-add-lacF	900bp		pTac 1	greenmix
2	RGp-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-lacR	0727-RGP-F	339bp		pTac 2	greenmix

	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	pTet	0727-sfGFP-add-tetR	0727-sfGFP-add-tetF	939bp		pTet 1	greenmix
2	RGp-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-tetR	0727-RGP-tetF	339bp		pTet 2	greenmix

注：酶用fastpfu 速度2k/min

2019年8月6日星期二

实验目的：

- 1. 昨天提的浓度较好的质粒进行质粒验证pcr
- 2. 昨天提质粒浓度较低的TCI-Cm重新提质粒（8.6 22：45 菌已摇上）
- 3. 测37°C冷诱导质粒//nissle1917//doc 的生长曲线（8.6 22：45菌已摇上） 同时nissle//doc 保菌
- 4. 前天未p出来的

实验步骤：

- 1. 质粒验证pcr

	模板	引物1	引物2	长度	时间	命名	酶
1	TEVts -6, 7, 11, 17, 18	0610-TEVts-JC-F	0610-TEVts-JC-R	1061bp			FastTaq
2	TCI 38, 42	VF2	190607-JC-pL-R	1215bp			FastTaq
3	TlpA//A36//A39	VF2	190607-JC-pTlpA-R	1598bp			FastTaq

190607-JC-pTlpA-R引物可能不好找，晚上整引物的时候没有看见，但应该是有的，没有找到的话跟我联系

- 2. TCI-Cm重新提质粒，可以多摇一段时间 提出来如果浓度 ;可以，继续1中的验证pcr p出来之后送测序
- 3. Nissle//doc 保菌 900微升甘油+900微升菌液
- 4. 未p出来的片段重p

pSC101-J23119-CI434

	模板	引物1	引物2	长度	备注	F	G
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-434F1	0719-sfGFP-remove-R1	3263bp	模板不能换		
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-434R2	1895bp	模板不能换		

这个模板如果质粒找不到就找菌摇上提质粒，找不到菌问我

pSC101-J23119-P22C2

	模板	引物1	引物2	长度	备注	F	G
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-PF1	0719sfGFP-remove-R1	3258bp	模板可以换成CI434插酶切位点的 比如 CI434-HR3C		
2	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm	0719-sfGFP-remove-F2	0719-sfGFP-remove-R2	1267bp	同上		
3	RGP-P22C2-RBS6	0719-P22C2-F	0719-P22C2-R	694bp			

RGP-pCI434-sfGFP-AMP

	A	B	C	D	E	F	G
1	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-434R	0727-RGP-F	3546bp			
2	pTac	0727-sfGFP-add-434F	0727-sfGFP-add-R	849bp			

RGP-pTac-sfGFP-AMP

	A	B	C	D	E	F	G
1	pTac	0727-sfGFP-add-lacF	0727-sfGFP-add-R	900bp			
2	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-F	0727-RGP-lacR	3391bp			

RGP-pTet-sfGFP-AMP							
	A	B	C	D	E	F	G
1	pTet	0727-sfGFP-add-tetR	0727-sfGFP-add-tetF	939bp			
2	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	0727-RGP-tetR	0727-RGP-tetF	3391bp			

建模组质粒请自行上翻 注：建模组的doc质粒可以不用构了

2019年8月7日星期三

等8.9引物送到之后，pSC101-J23119-CI434质粒就可以开始构建了

pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-Cm							
	模板	引物1	引物2	长度	备注	F	G
1	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV (TVMV/S UMMV/HR3C)	0808-CI434-F	0808-CI434-R	6039bp	环p自连		

环p自连之后消化纯化，转化，菌p
菌p引物：0426-PTP-JC-F//0426-PTP-JC-R 长度：644bp
之后送测序，测序结果正确之后摇菌提质粒，即可作为pSC101-J23119-CI434质粒构建的模板

以及pSC101-pR (3) -pL (3) -sfGFP-J23119-CI质粒构建时使用梯度PCR

注：菌p验证时所有用0731-JC-F的引物都换成刚送的0807-JC-F引物

环p自连改两段：
0810-CmR-R+0808-CI434-F 3068bp
0810-CmR-F+0808-CI434-R 3011bp

检测Toxin系统逃逸率

2019年7月23日 星期二

需要准备的材料：

1. 菌


菌					
	组别	底盘菌株	质粒	目的	预期
1	实验组	Nissle 1917	pSC101-pCI434(O2)-doc-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm + RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	测试接在冷诱导开关下游的doc对于温度的响应（显示为逃逸率）	随温度升高逃逸率增高
2	对照组	Nissle 1917	pSC101-pCI434(O2)-Empty-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm + RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	作阳性对照。证明在开关开启的情况下逃逸率降低不是由于系统burden造成的	逃逸率始终很高且不随温度变化

2. 设定为25°C、37°C的96孔震荡培养箱
3. AC抗普通LB平板： **购买方形培养皿——每一组相同温度的点在同一个板子上**
- // 如有必要后续可以在Rich Defined、Blood、Soil等其他培养基上测试

实验流程：

前期准备：

1. 构建pSC101-pCI434(O2)-Empty-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm及pSC101-pCI434(O2)-doc-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm质粒
- IMPORTANT——测序完成后挑单菌落在37°C摇床中培养5-6h，同一管菌于甘油中冻存3份**

 pSC101-pCI434(O2)-Empty-J23119-CI434-TEVsite-Cm.dna

 pSC101-pCI434(O2)-doc-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm.dna

2. 双转得到实验组及对照组菌株 **双转组置于40°C环境下培养**
3. 准备实验中所使用的材料：
- a. 灭菌的24孔深孔板
- b. 配制**1xPBS**并灭菌
- c. 购置较大的**方形培养皿**（尺寸略小于11.5cm×7.5cm×7.5cm） **//共计3天**

液体——

1. 挑双转组单克隆于37°C的96孔板内摇至OD为0.2左右（1h测一次，约2h就可），将三组平行调至OD相同（均调成最小的那个）
2. 吸10μL菌液至加了4mL AC抗液体LB的24孔深孔板内，分别25°C、37°C震荡培养箱内连续培养12h
3. 吸到96孔板内测OD和荧光，记得每次加**空LB**，1h、1h、1h、1h、0.5h、0.5h、0.5h、0.5h、0.5h、0.5h、1h、1h、1h、1h、1h（当OD出现突增时每半小时测一次，最后小幅波动再延长一些就可）

固体——

每一组需要做3个平行

1. 挑取单菌落/吸取保存的菌液，在24孔深孔板内每孔加入**4mL**的**AC抗培养基**，置于**振荡培养箱内37°C**下培养至**对数生长期后期**（**培养时间~12h**，**OD600~1.0-1.2**）（40°C下生长情况不好）

24孔深孔板						
	实验组1	实验组2	实验组3	D	对照组	F
1	1	1	1		1	
2	2	2	2		2	
3	3	3	3		3	
4	备用	备用	备用		备用	

2. 在超净台里将深孔板内液体分两次吸至同一个**2mL**离心管内，拿到超净台外离心沉淀菌体，在超净台内弃去上清液，用**1×PBS**洗**2次**（加入**1×PBS**吹打+重悬，再离心弃去上清液），用**200μL**的**1×PBS**重悬
3. 利用**96孔板**进行**10 倍**连续稀释，直到**10⁻⁸**次方甚至更多
从第一个孔吸16.7μL到第二个孔内，依次向后.....最后一个吸出弃去

稀释步骤											
	稀释浓度	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
1	实验组1	167μL 菌液	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	150μL AC抗LB	
2	实验组2										
3	实验组3										
4											
5	对照组1										
6	对照组2										
7	对照组3										
8											

4. 每次取不同稀释的样品**10uL**点在平板（**Amp+Cm抗性**）上，排列整齐，设置好间距（事先量好并在培养皿背面做好标记位置/打印在白纸上）
5. 将平板置于**25°C、37°C**（作为**permissive组**）下培养**12、24 小时**
——计算逃逸率时将37°C组作为permissive组，25°C组作为non-permissve组
6. 培养相应时间后拍摄照片，计数不同稀释样品内长出的菌落数目，计算逃逸率：

Escape Frequency

= Average Escape Frequency ± standard deviation
per Escape Frequency

=(Colonies on non-permissive plate X dilution)/(Colonies on permissive plate X dilution)

——先对每一组内的每个平板计算Escape Frequency，再计算平均逃逸率和标准差

Standard deviation = 方差的算术平方根

=sqrt[(Escape Frequency1 - Average Escape Frequency)^2+(Escape Frequency2 - Average Escape Frequency)^2+(Escape Frequency3 - Average Escape Frequency)^2]

doc同一管摇5-6h 保菌*3
测序测全 尤其是启动子区等关键部分

做双转

2019年7月30日星期二

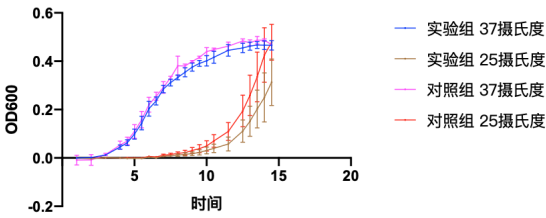
摇菌至0.2 40°C; ~3h 7:00-10:00
测12h生长曲线 (l) + 12h连续培养 (s) (24深孔板) 25°C + 37°C 10:00-22:00
s点10μL, 放到生物物理所闲置培养箱里培养24h 22:00-24:00

实验结果:

📎 0804液体逃逸率检测.pzfx

📎 0804液体逃逸.emf

📎 液体逃逸率.png



结果分析:

- 37°C情况下实验组与对照组生长情况基本相近, 对数增长期斜率基本一致 (理想)
- 由于前期取样次数过多, 导致后续25°C实验组与对照组中摇的菌液不足, 生长异常, 但对数期初期显示出的效果较好 (标准差非常大)

2019年8月6日星期二

鉴于上次的25°C组数据不够理想, 本次调整取样间隔重新测试
实验结果:

2019年9月12日星期四

DOC/PHD 逃逸率				
	编号	37°C	25°C	escape frequency
1	TEVts6#-1			
2	TEVts6#-2			
3	TEVts6#-3			
4	TEVts6#-4			
5	TEVts6#-5			
6	TEVts6#-6			
7	TEVts6#-8			
8	TEVts6#-9			
9	TEVts6#-10			
10	TEVts6#-11			
11	TEVts6#-12			
12	TEVts6#-13			
13	TEVts6#-14			
14	TEVts6#-15			

Multipair Toxin Escape Sequence Test:

测试以下几组Toxin： doc、Zeta、Kis
构建诱导型质粒质粒：

 pTN-pBAD-doc-Cm.dna

 pTN-pBAD-Kis-Cm.dna

 pTN-pBAD-Zeta-Cm.dna

- 1. 挑取单菌落/吸取保存的菌液，在24孔深孔板内每孔加入**4mL**的**AC**抗培养基，置于振荡培养箱内**37°C**下培养至对数生长期后期（培养时间~12h，OD600~1.0-1.2）（40°C下生长情况不好）
- 2. 在超净台里将深孔板内液体分两次吸至同一个**2mL**离心管内，拿到超净台外离心沉淀菌体，在超净台内弃去上清液，用**1×PBS**洗**2**次（加入**1×PBS**吹打+重悬，再离心弃去上清液），用**200μL**的**1×PBS**重悬
- 3. 利用**96**孔板进行**10** 倍连续稀释，直到**10⁻⁸**次方甚至更多
- 4. 每次取不同稀释的样品**10uL**点在平板（**Cm**抗性）上，排列整齐，设置好间距（事先量好并在培养皿背面做好标记位置/打印在白纸上）
- 5. 将平板置于普通平板（作为**permissive**组）、诱导平板（固定**50mMAra**，作为**non-permissive**组）下培养**12、24** 小时
- 6. 培养相应时间后拍摄照片，计数不同稀释样品内长出的菌落数目，计算逃逸率

重新测定温度响应曲线

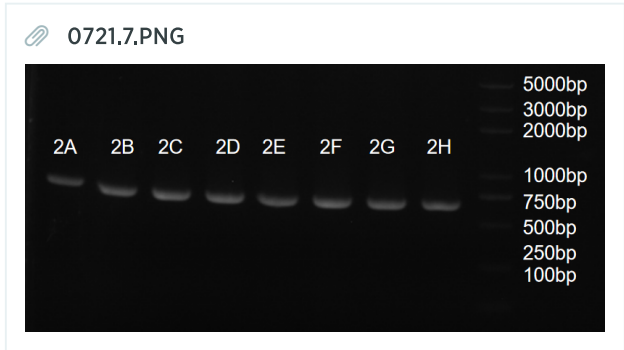
2019年7月18日星期四

--实验:

1. 构建pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TVMVS-Cm质粒

- 1) 0718连接产物进行转化
- 2) 板子培养8-12h (看一下生长出大量菌落就可以了) 后, 挑取单克隆 (每个板子挑4个就可以), 在96孔板内培养 (具体步骤: 在96孔板内加入150微升LB, 记得加对应的抗生素, 将挑取的单菌落放到对应的孔内, 之后将96孔板放到恒温振荡培养箱内进行培养1-2h)
- 3) 培养1-2h后, 进行菌落PCR验证 (与普通PCR步骤一样, 将模板换成等量的菌液就可以), PCR完之后, 将96孔板放到冷室

TVMV菌落PCR验证				
	模板	引物F	引物R	长度
1	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS-Cm	0718-TVMVsyn-JC-F	0718-TVMVsyn-JC-R	331bp
2	pSC101-PR-sfGFP-J231119-CI434-TVMVS-Cm	0426-PTP-JC-F	0426-PTP-JC-R	665bp



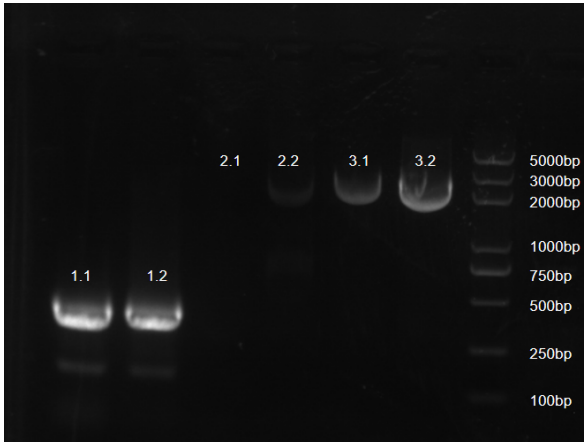
- 4) 验证成功后, 送测序, 第二天测序结果出来之后, 如果测序成功, 就把对应的96孔板内的菌液摇起来 (10微升菌液+5ml LB), 保菌, 提质粒
- 已验证成功, 7.22送测序, 还在等待结果。

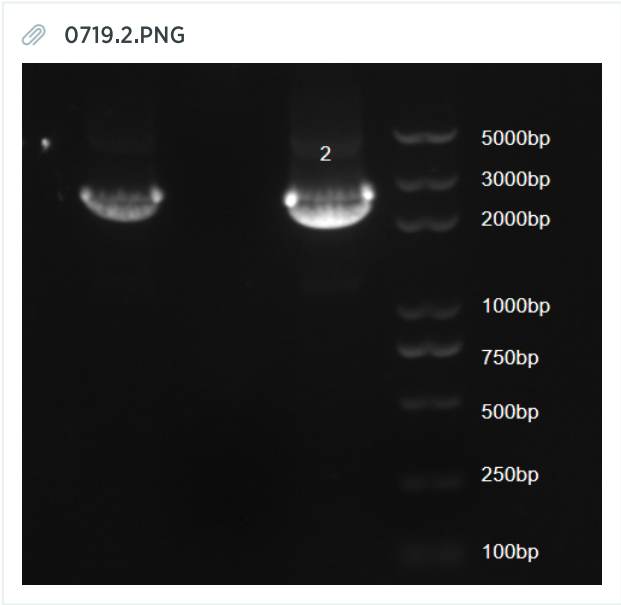
2. 构建Doc质粒 (pSC101-pCI434(O2)-doc-J23119-CI434-TEVsite-Cm)

1) 07.19 PCR，将没p出来的两个片段用新到的引物重p一遍，之后，消化，纯化

构建doc质粒					
	模板	引物1	引物2	长度	备注
1	pTN-CI2Try aaRS-pBAD- doc	0610-doc-F	0716-doc-R	424bp	doc质粒命名： pSC101- pCI434(O2)- doc-J23119- CI434-TEVsite- Cm
2	pSC101- pCI434(O2)- sfGFP-pdt#4- J23119- CI434ts(R2 #2)- TEVsite-Cm	0716-pSC101- doc-VF	0617- pSC101-doc- VR1	2236bp	
3	pSC101- pCI434(O2)- sfGFP-pdt#4- J23119- CI434ts(R2 #2)- TEVsite-Cm	0617-pSC101- doc-VF1	0610- pSC101-doc- VR	2323bp	这个已经p出来 了的话可以用之 前的

0719.1.PNG





2) 连接

Table1				
	连接后质粒命名	片段1	片段2	片段3
1	pSC101- pCI434(O2)-doc- J23119-CI434- TEVsite-Cm	上面的1	上面的2	上面的3

3) 转化

4) 07.20 菌p验证，验证成功送测序

Table2					
	模板	引物F	引物R	长度	E
1	pSC101- pCI434(O2)- doc-J23119- CI434-TEVsite- Cm	0610-pSC101- doc-JC-F		773bp	

5) 07.21 如果菌落PCR产物测序也成功，将对应的96孔板内的菌液摇起来（10微升菌液+5ml LB），保菌提质粒

6) 07.22 进行逃逸率检测

缺菌P验证的引物，摇好的菌在4°C储存。

3. 转化：插入四种TAG的GFP（问高元力）

4. 温控诱导系统对温度的响应曲线：（在nissle感受态里做）

先让师兄或高元力带着做一波nissle的感受态，之后再行后续实验

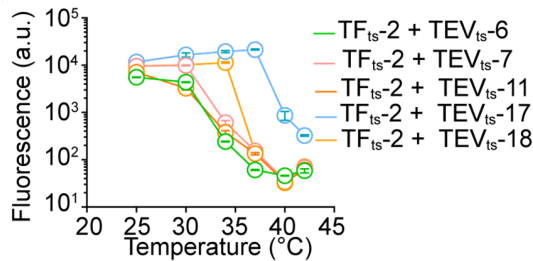
热诱导系统：测试tCI, tIpA对温度的响应曲线

1) 07.19 使用保的菌（在-80°C），摇起来，提质粒，（先做到这里，后面的我们会跟师兄约时间，师兄带着我们做）

晚上：转化到nissle感受态中（具体转化时间我们跟师兄约好后面的带我们操作的时间再告诉你们）

2) 07.20 挑单克隆摇起来（5ml 带抗性的LB），晚上：1ml 保菌（900微升菌液+900微升甘油），剩余的转移到96孔板中，在不同的温度下培养过夜

温度响应曲线温度设置参考图



3) 07.21 用酶标仪测荧光

冷诱导系统：1) 双转（转化到nissle感受态中，可以和热诱导系统的转化一起做）：RGP-TEV+pSC101-CI434-TEV

（看一下师姐给的质粒有没有其他的TEV的突变体，有的话每一对pair都要双转测曲线）

2) 07.20 挑单克隆摇菌，晚上在不同温度培养（记得保下菌）

3) 07.21 酶标仪测荧光

调研：

1. DOPA调研：Phe→Tyr, Tyr→DOPA

调研内容：酶与底物反应体系的配制；Tyr与DOPA液相检测条件；人体中是否会自发产生DOPA（非天然氨基酸方面）

2. CD47拮抗蛋白调研：

蛋白序列；做PPT给我们进行讲解

3. 抗癌药物肽

陈钰宁负责

2019年7月25日星期四

1. 将pET22b-TyrOH质粒直接送测序，使用T7/T7 Ter通用引物，重新提质粒 —— 测序结果unknown。选择直接使用pEVOL+PTPK尝试
2. TIpA36-RBS端vector、pET22b-TyrOH vector使用梯度PCR的方法重新做一次（TIpA36偏低、TyrOH偏高） —— 成功，纯化连接转化以构建双平台质粒
3. doc质粒构建菌P验证送测序，准备测定doc生长曲线和逃逸率（protocol整理） —— 3C测序结果正确，设计质粒准备完整测序
4. check双转 —— 结果不理想，先做TVMV感受态，再单转
5. check Nissle转化情况，挑单克隆保菌 —— 良好，已保菌
6. 重新构建上述的空质粒和双平台质粒（重PmRFP片段+vector尝试梯度PCR） —— 已转化，但纯化产物浓度太低，连接效果不好

2019年7月26日星期五

1. doc质粒构建：

1) 摇菌5-6h 保菌*3+提质粒

2) 完整菌P验证

2. 对照所需空质粒构建
- 1) 重新PCR，将两个样品一起纯化以提高浓度

2) doc质粒提出后即PCR构建空质粒
3. 正交性检测所需双转：TVMV菌划线，明日挑单克隆做感受态，再做单转（+RGP-Empty/HR3C/SuMMV/TEV/TVMV）
4. 非天然氨基酸插入效率检验所需双转：DH5α-pEVOL菌划线，明日挑单克隆做感受态，再做单转
5. 构建双平台质粒：重新使用连接产物做转化

2019年7月28日星期日

1. 构建pSC101-pCI434(O2)-Empty-J23119-CI434-TEVsite-Cm质粒以备用于对照

CI434ts空质粒						
	模板	引物F	引物R	长度	命名	F
1	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-J23119-CI434ts(R2 #2)-TEVsite-Cm	0728-CI434ts-nosfGFP-F	0724-CI434-repA-R	2335bp	CI434ts-Empty-V1	
2		0724-CI434-repA-F	0728-CI434ts-nosfGFP-R	2280bp	CI434ts-Empty-V2	

2. pEVOL质粒检验（测序） 用FastTaq酶

pEVOL质粒检验						
	模板	引物F	引物R	长度	命名	备注
1	pEVOL-CHX	0728-pEVOL-JC-F1	0728-pEVOL-JC-R1	1095bp	pEVOL-JC-1	
2		0728-pEVOL-JC-F2	0719-mRFP-Cm-VF	951bp	pEVOL-JC-2	应该是质粒方向不同导致的引物命名问题。序列没问题
3		0728-pEVOL-JC-F3	0728-pEVOL-JC-R3	1291bp	pEVOL-JC-3	
4		0728-pEVOL-JC-F4	0728-pEVOL-JC-R4	1173bp	pEVOL-JC-4	

3. check双转情况 + 菌P验证

Empty验证					
	菌	引物1	引物2	长度	命名
1	TCI	0723-TIpA36-JC-F1	VR	777bp	
2	TCI38	0723-TIpA36-JC-F2	VR	777bp	
3	TCI42	0723-TIpA36-JC-F3	VR	777bp	
4	TIpA	0723-TIpA36-JC-F4	VR	769bp	
5	A36	0723-TIpA36-JC-F5	VR	769bp	
6	A39	0723-TIpA36-JC-F6	VR	769bp	
7	CI434-TEV	0723-TIpA36-JC-F1	0716-TVMVsyn-VR	1521bp	
8	TCI-mRFP	0719-TCI-mRFP-JC-F	0719-TCI-mRFP-JC-R	636bp	
9	TIpA36--mRFP	0719-TIpA36-mRFP-JC-F	0719-TCI-mRFP-JC-R	646bp	

4. 双转doc逃逸率准备

菌					
	组别	底盘菌株	质粒	目的	预期
1	实验组	Nissle 1917	pSC101-pCI434(O2)-doc-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm + RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	测试接在冷诱导开关下游的doc对于温度的响应（显示为逃逸率）	随温度升高逃逸率增高
2	对照组	Nissle 1917	pSC101-pCI434(O2)-Empty-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm + RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	作阳性对照。证明在开关开启的情况下逃逸率降低不是由于系统burden造成的	逃逸率始终很高且不随温度变化

5. 做pEVOL菌的感受态 并且做一个转化试试
6. doc verification (repeat)

doc verification

	菌	引物1	引物2	长度	命名
1	pSC101-pCI434(O2)-doc-J23119-CI434ts-TEVsite-Cm	0719-mRFP-Cm-VF	0726-doc-JC-R	933bp	docJC1
2		0610-pSC101-doc-JC-F	0610-pSC101-doc-JC-R	857bp	docJC2
3		0726-doc-JC-mid-F	0610-pSC101-doc-JC-R	696bp	docJC3
4		0610-JC-F	0716-doc-R	607bp	docJC4

2019年7月31日星期三

1. pEVOL-CHX测序

pEVOL

	模板	引物1	引物2	长度
1	pEVOL-CHX	0731-pEVOL-JC-F3	0719-mRFP-Cm-VF	1013bp

2019年8月3日星期六

1. 构建pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm质粒

1) 片段PCR

PCR

	模板	引物1	引物2	长度	命名
1	pET-22b(+)-TyrOH-Amp	0803-TyrOH-F	0803-TyrOH-R	1087bp	TyrOH
2	TCl	0719-mRFP-Cm-VF	0719-mRFP-VR	1762bp	VTCI短
3	TCl	0719-mRFP-VF	0719-mRFP-Cm-VR	2981bp	VTCI长
4					
5					

2) 消化、纯化、连接

Gibson连接				
	质粒名称	片段1	片段2	片段3
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm	TyrOH	VTCl长	VTCl短
2				

3) 转化、验证

菌P验证					
	模板	引物1	引物2	长度	命名
1	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm	0723-pET22b-YZ-R1	VR	760bp	
2		0723-pET22b-YZ-F2	VF2	1424bp	

- 2. 做doc（抗性Cm）和phd质粒（抗性Cm）的转化、保菌+提质粒（含doc的质粒摇5-6h，每管保菌*3）
- 3. 准备做DH5α-phd感受态，做完转化长出单克隆后立即摇种子液
- 4. 挑doc+TEVts6#和Empty+TEVts6#摇种子液 准备再测一次固体逃逸率

PheOH/TyrOH表征及DOPA发酵

2019年6月8日星期六

2019年6月9日星期日

1. 诱导Phe/Tyr羟化酶表达：转化

实验步骤：

1. 将pET22b-PheOH与pET22b-TyrOH转入感受态BL21菌株内表达

实验结果：

已转化

2019年6月10日星期一

实验目的：

1. 诱导Phe/Tyr羟化酶表达：挑单克隆摇菌，转接摇菌，诱导表达

实验步骤：

1. 挑单克隆摇菌~5h

2. 转接至小三角瓶内继续摇菌4-5h

- 1) 每个小三角瓶内含100ml LB，将上一步摇的菌液每个取2-3ml 加入瓶内，继续放入37°C摇床内震荡培养
- 2) 使用分光光度计测量菌液浓度，在A600处达到0.8以上即可进行诱导表达

3. 诱导表达过夜

向每个小三角瓶内加入1mol/L的IPTG 100微升（使IPTG终浓度为1毫mol/L），放入25°C摇床诱导表达过夜

实验结果：

1. 生长良好，每个板挑取4个单克隆摇菌

2/3. 已进行诱导表达

2019年6月11日星期二

实验目的：

1. 分离提纯蛋白：苯丙氨酸羟化酶（PheOH）、酪氨酸羟化酶（TyrOH）
2. 验证蛋白活性

实验步骤：

※50ml 管离心前均需要严格配平

1. 分离提纯蛋白：苯丙氨酸羟化酶（PheOH）、酪氨酸羟化酶（TyrOH）

破碎菌体

- 1) 将锥形瓶中的菌液分装至50ml EP管中配平，离心，3000r/30min，4°C
- 2) 使用lysis buffer重悬所有50ml 管中沉淀，使最后为总体积4ml，并转移到小烧杯中
- 3) 取1ml lysis buffer洗涤上述50ml 管，将洗涤液也收集至小烧杯中，置于冰上
- 4) 超声裂解20min
- 5) 分装裂解液至1.5ml 管中，离心，12000r/35min，4°C

过柱子

- 1) 使用elution buffer洗涤柱子，后用水洗柱子
- 2) 取裂解液上清加入柱子中，将柱子上下两端盖上盖子，放在冰上摇床孵育1h
- 3) 孵育完成后，打开上下盖子，使柱子中液体流干，可以使用洗耳球压液面
- 4) 洗去杂蛋白：用lysis buffer（20mM咪唑）洗涤两次，后用含有50mM咪唑的溶液洗涤5-6次（使用20mM咪唑与500mM咪唑按15: 1的比例混合获得），使用15ml EP管收集最后一次洗涤液5-6ml，并使用1.5ml 管收集1ml用于跑蛋白胶（若有目标蛋白的条带，则说明已经洗干净）；之后使用500mM咪唑洗涤一次，收集至超滤管中，（用于后续跑蛋白胶，看目标蛋白中是否还含有杂蛋白）
- 5) 离心浓缩：将超滤管先配平，再离心进行浓缩，3700r/1h，4°C，离心1h后倒掉超滤管下层液体，重新加水，配平，再次离心，3700r/1h，4°C（时间越长越好）

制蛋白胶：

- 1) 将双层玻璃放入制胶槽中

非天然氨基酸插入效率检测

2019年8月3日星期六

质粒图谱：

 pEVOL-CHX.dna	——aaRS及tRNA所在质粒
 PTPK J23119-sfGFP-Kan.dna	——未插入TAG的阳性对照
 PTPK J23119-Tyr151-Kan.dna	——在Tyr151处插入1个TAG
 PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Kan.dna	——在Tyr151、Asn39处插入2个TAG
 PTPK J23119-Asn39-Tyre151-Tyr182-Kan.dna	——在Tyr151、Asn39、Tyr182处插入3个TAG
 pET22b(+)-sfGFP-OTAG-Amp (酶切酶联) .dna	——pET22b载体+未插入TAG的阳性对照
 pET22b(+)-sfGFP-1TAG-Amp (酶切酶联) .dna	——pET22b载体+在Tyr151处插入1个TAG
 pET22b(+)-sfGFP-2TAG-Amp (酶切酶联) .dna	——pET22b载体+在Tyr151、Asn39处插入2个TAG
 pET22b(+)-sfGFP-3TAG-Amp (酶切酶联) .dna	——pET22b载体+在Tyr151、Asn39、Tyr182处插入3个TAG

实验组别：

实验组别				
	菌株	质粒	目的	备注
1	DH5α	pEVOL-CHX + PTPK-sfGFP-0TAG	阳性对照	add dopa
2				No
3	DH5α	pEVOL-CHX + PTPK-sfGFP-1TAG	测试插入效率	add dopa
4				No
5	DH5α	pEVOL-CHX + PTPK-sfGFP-2TAG		add dopa
6				No
7	Niisle	pEVOL-CHX + PTPK-sfGFP-3TAG		DH5α未转出来 add dopa
8				No
9	空M9			
10	DH5α	pEVOL-CHX	阴性对照	

实验流程：

- 1) 挑3个单菌落/组，150μL/孔置于96孔板内摇8-12h
- 2) 培养条件： **M9培养基 + 不同浓度的dopa + 50mM Ara + 100μM DTT + 菌液100倍稀释**

i. 配制 不同浓度的培养基

ii. 每孔加入148.5 对应的培养基

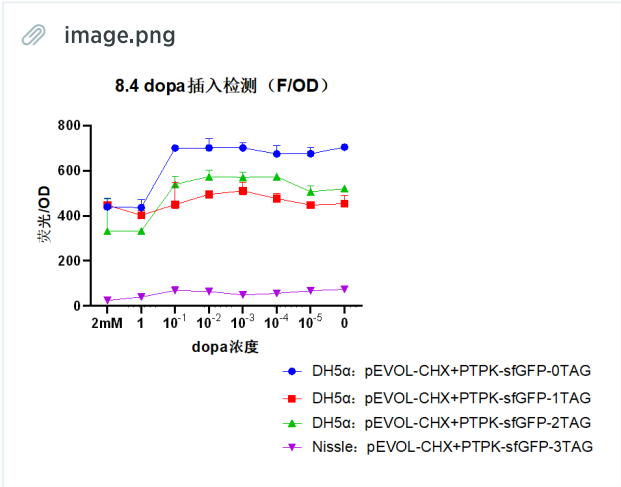
iv. 在每孔中加入1.5μL菌液

96孔板分布				
	DH5α: pEVOL+PTPK-sfGFP-0TAG	DH5α: pEVOL+PTPK-sfGFP-1TAG	DH5α: pEVOL+PTPK-sfGFP-2TAG	Niisle: pEVOL+PTPK-sfGFP-3TAG
1	2mM dopa			
2	1mM dopa			
3	0.1mM dopa			
4	10 ⁻² mM dopa			
5	10 ⁻³ mM dopa			
6	10 ⁻⁴ mM dopa			
7	10 ⁻⁵ mM dopa			
8	0			

- 3) 96孔板封口 震荡培养过夜 (~10h)
- 4) 培养结束后测OD及荧光

实验结果：

 0808 dopa incorporated.pzfx



结果分析:

① 0TAG和3TAG组10⁻¹组-0显示出符合预期的荧光值，但1TAG与2TAG组并不符合预期。

② 在2mM及1mM浓度处可能由于dopa浓度过高导致100μM的DTT不能完全防止dopa的氧化，影响了吸光度的测定。

3. 在dopa浓度为0的时候，1TAG/2TAG组并未显示出明显的荧光降低，不符合预期。猜测可能是由于插入dopa特异性不高导致的。

2019年8月10日星期六

重新测一遍插入效率

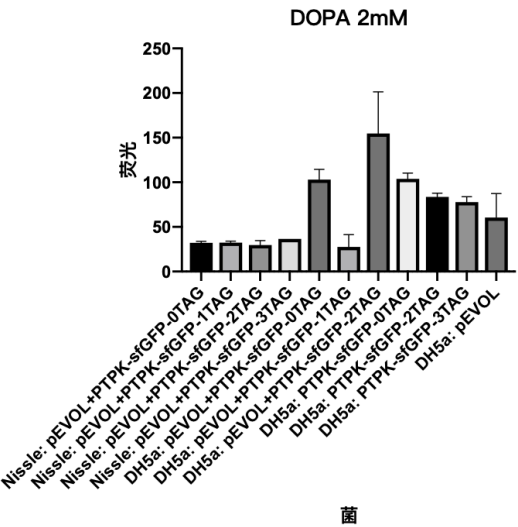
14: 30转接, 24: 30测荧光值和OD

96孔板分布:

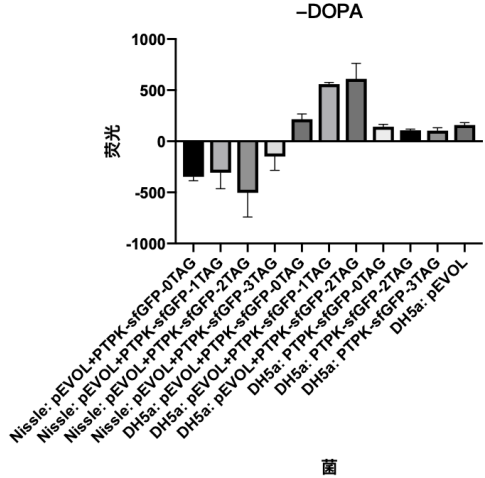
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Nissle: pEVOL+PTPK-sfGFP-0TAG						Nissle: pEVOL+PTPK-sfGFP-1TAG					
B	Nissle: pEVOL+PTPK-sfGFP-2TAG						Nissle: pEVOL+PTPK-sfGFP-3TAG					
C	DH5α: pEVOL+PTPK-sfGFP-0TAG						DH5α: pEVOL+PTPK-sfGFP-1TAG					
D	DH5α: pEVOL+PTPK-sfGFP-2TAG											
E	DH5α: PTPK-sfGFP-0TAG											
F	DH5α: PTPK-sfGFP-2TAG											
G	DH5α: PTPK-sfGFP-3TAG											
H	DH5α: pEVOL											

插入效率 0812.pzfx

屏幕快照 2019-08-12 15.18.34.png



屏幕快照 2019-08-12 15.18.43.png



2019年8月15日星期四

1. 摇种子液 (BL21) : 13:00-23: 00
2. 诱导表达:

CK抗LB培养基 + 2mM dopa + 50mM Ara + 1mM IPTG + 10mM 抗坏血酸 + 100μM硫酸亚铁铵 + 菌液100倍稀释 + 25°C过夜

2019年8月16日星期五


准备应用pEt22b载体与pEVOL相对应

pET22b(+)-sfGFP-0TAG-Amp (酶切酶联) .dna


——pET22b载体+未插入TAG的阳性对照

pET22b(+)-sfGFP-1TAG-Amp (酶切酶联) .dna

——pET22b载体+在Tyr151处插入1个TAG

 pET22b(+)-sfGFP-2TAG-Amp (酶切酶联) .dna

--pET22b载体+在Tyr151、Asn39处插入2个TAG

 pET22b(+)-sfGFP-3TAG-Amp (酶切酶联) .dna

--pET22b载体+在Tyr151、Asn39、Tyr182处插入3个TAG

2019年8月31日星期六

质粒构建（酶切酶联方法）：

1. 片段PCR

sfGFP-nTAG片段PCR					
	模板	引物1	引物2	长度	命名
1	PTPK J23119-sfGFP-Kan	0816-sfGFP-nTAG-F	0816-sfGFP-nTAG-R	757bp	sfGFP-0TAG
2	PTPK J23119-Tyr151-Kan				sfGFP-1TAG
3	PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Kan				sfGFP-2TAG
4	PTPK J23119-Asn39-Tyre151-Tyr182-Kan				sfGFP-3TAG

TCI、TCI38 热敏开关vector片段					
	模板	引物1	引物2	长度	命名
1	pSC101-J23119-Tcl38-pR(3)-pL(3)-sfGFP-Cm	0831-TCI-VF	0831-TCI-VR	4743bp	TCI38 vector
2	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-sfGFP-Cm	0831-TCI-VF	0831-TCI-VR	4743bp	TCI vector

2. 使用XhoI及NdeI处理pET22b质粒得到vector片段和TyrOH片段

 XhoI1094S.pdf

 NdeI 1161A.pdf

步骤：

1. 混合反应体系，37°C下反应1.5h

反应体系		
	反应物	量
1	XhoI	1μL
2	NdeI	1μL
3	10× H buffer	2μL
4	pET22b-TyrOH-Amp	10-12μL ≤ 1μg
5	ddH2O	补齐20μL

2. 跑胶，得片段：pET22b Vector 5363bp 及 TyrOH 1048bp 对正确长度的DNA片段切胶回收
3. Gibson连接、转化

Gibson连接			
	片段1	片段2	命名
1	pET22b Vector	sfGFP-0TAG	pET22b(+)-sfGFP-0TAG-Amp
2		sfGFP-1TAG	pET22b(+)-sfGFP-1TAG-Amp
3		sfGFP-2TAG	pET22b(+)-sfGFP-2TAG-Amp
4		sfGFP-3TAG	pET22b(+)-sfGFP-3TAG-Amp
5	TCI38 vector	TyrOH	pSC101-J23119-Tcl38-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm
6	TCI vector		pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm

4. 菌P验证

菌P验证				
	模板	引物1	引物2	长度
1	pET22b(+)-sfGFP-0TAG-Amp	0719-pET22b-sfGFP-JC-F	0719-pET22b-sfGFP-JC-R	740bp
2	pET22b(+)-sfGFP-1TAG-Amp			
3	pET22b(+)-sfGFP-2TAG-Amp			
4	pET22b(+)-sfGFP-3TAG-Amp			
5	pSC101-J23119-Tcl38-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm	0831-TCI-TyrOH-JC-F	0831-TCI-TyrOH-JC-R	875bp
6	pSC101-J23119-Tcl-pR(3)-pL(3)-TyrOH-Cm			

- 2) 配制SDS-PAGE下层液体并加入双层玻璃槽内，加入3.3ml左右即可（不能加满）（*这一步操作要迅速，否则会容易凝）
- 3) 配置浓缩液并加入双层玻璃槽内，加入1.5ml左右即可（加到下层液体上方，加满到双层玻璃边缘）
- *AP（过硫酸铵，一般使用10%，可以现用现配）和 是酶促剂，一定要在最后加进去
- 4) 插入梳子

📎 Y and Dopa.pptx

2. 验证蛋白活性

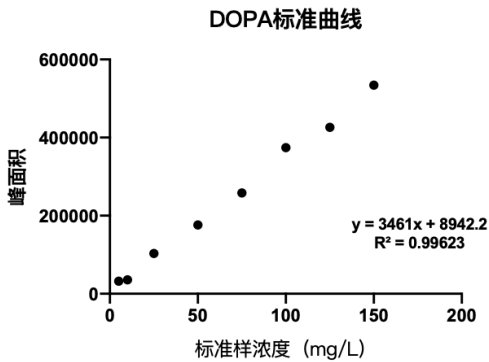
用比色法分析酪氨酸羟化生成DOPA的情况，确定DOPA的生成量。

2019年7月24日星期三

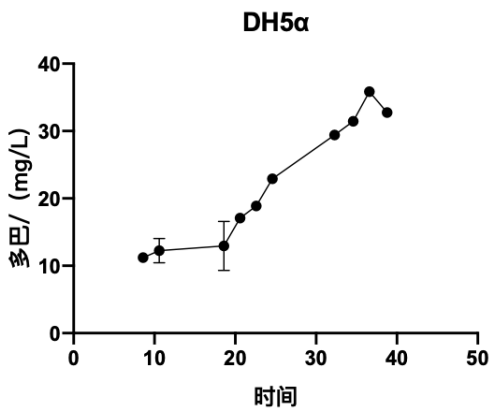
做了大肠杆菌DH5α和BL21的发酵实验，结果如下：

📎 0725 BL21,DH5α发酵液相结果.xlsx

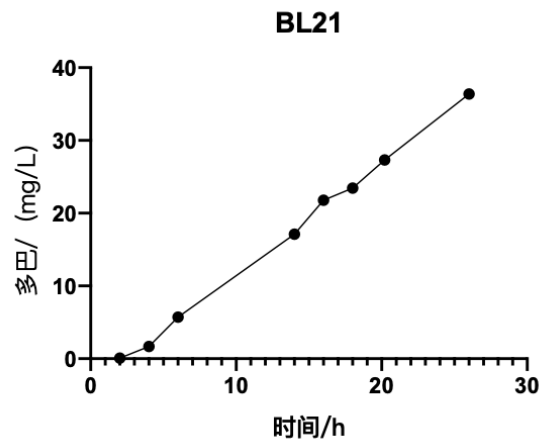
📎 屏幕快照 2019-07-27 13.51.59.png



📎 屏幕快照 2019-07-27 13.52.16.png



屏幕快照 2019-07-27 13.52.24.png



液相.pzfx

2019年7月26日星期五

实验目的：

1. 做Nissle的发酵实验，观察其在有无诱导剂、有无底物的情况下的表现
2. 做Nissle的梯度快速发酵实验，观察其在诱导剂梯度、底物浓度梯度下的表现

实验过程

1. 摇瓶发酵：
12：30开始，1%菌液加入50ml M9培养基中，四个锥形瓶分别为
IPTG(+/-), 底物200mg/L (+/-)
从12：30开始每隔4h取一次样，取48h
2. 15ml管发酵：
14:00 挑单克隆摇种子液
16:00 左右转接1：100至5ml M9培养基中
22:00 加入底物和诱导剂
次日6:00 收菌

样品分布

	IPTG(0mM)	IPTG(0.001mM)	IPTG(0.01mM)	IPTG(0.1mM)	IPTG(1mM)	底物浓度	G
1						0 mg/ml	
2						5 mg/ml	
3						25 mg/ml	
4						50 mg/ml	
5						100 mg/ml	
6						200 mg/ml	
7							

3. 多巴的快速检测法：

3.1 试剂： 0.5mol/L HCl： 5mL浓盐酸定容于12mLddH2O

亚硝酸钠-钼酸钠溶液： 10g亚硝酸钠， 10g钼酸钠， 定容于100ml ddH2O

1 mol/L NaOH: 4g NaOH,定容于100mL ddH2O。变溶解边轻轻晃动， 溶解释放大量热

3.2 颜色反应：

10ml离心管， 分别加入1ml ddH2O, 1ml 0.5mol/L HCl, 1mL 亚硝酸钠-钼酸钠溶液， 1mL样品溶液， 最后加入1mL 1mol/L NaOH,样品液换做1mL ddH2O反应液做对照， 510nm检测吸光度

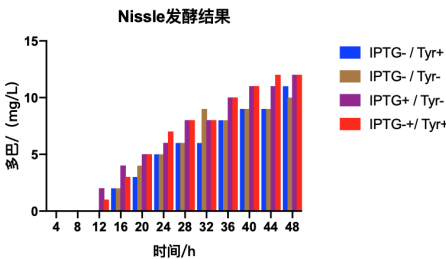
显色反应.pzfx

2019年7月31日星期三

1. 液相结果：

0730Nissle发酵结果.pzfx

屏幕快照 2019-07-31 15.41.06.png



结论:

1. 有无Tyr结果差别不大，说明在目前的表达水平下细菌自身产生的/M9培养基中的酪氨酸足量
2. 加不加IPTG有较明显差别，说明酶是少量的，但本底表达过高
3. 总体产量很低，可能不足以用于后面控制非天然氨基酸系统，需要进一步优化

2. 提Tyr-OH， Phe-OH蛋白，跑胶并测浓度

IMG_20190801_094905.jpg

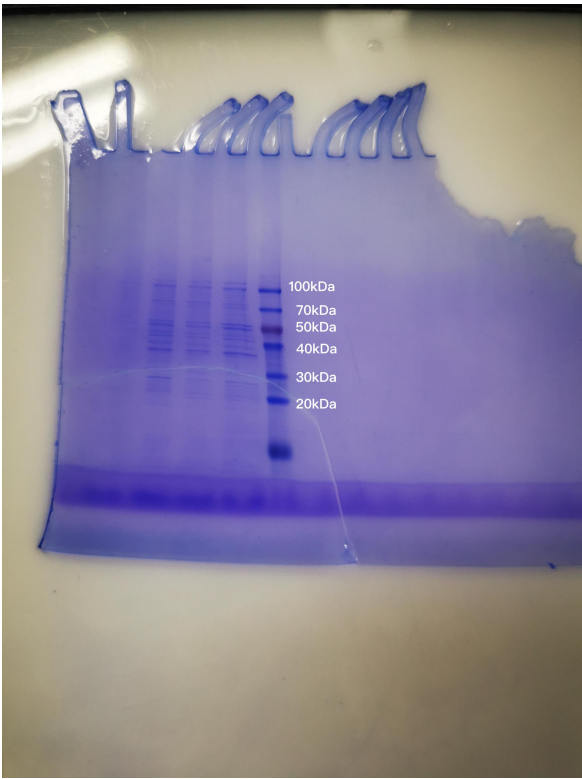


Table1

	280nm吸收	375nm吸收	稀释倍数	酶	相对分子质量	浓度 (280nm)	浓度 (375nm)
1	0.12181	0.079196	30	Phe-OH	34kDa	5.402 mg/ml	3.512mg/r
2	0.23214	0.070415	20	Tyr-OH	40kDa	8.074 mg/ml	2.449mg/r

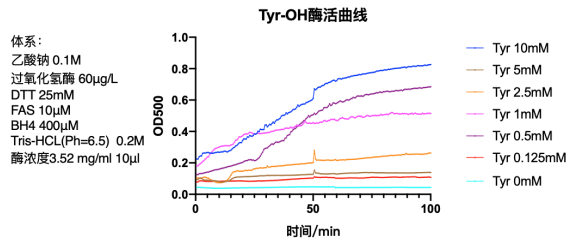
计算公式 浓度=AbsX稀释倍数/0.023(μM)X相对分子质量 (X kD x0.001)

2019年8月1日星期四

0801酶活曲线测定结果：

0801 Tyr-OH酶活测定.pzfx

屏幕快照 2019-08-02 14.23.44.png



今天重新测酶活曲线

结果：

1. 蛋白浓度：

Table2

	280nm吸收	375nm吸收	稀释倍数	酶	相对分子质量	浓度 (280nm)	浓度 (375nm)
1	2.09010	0.095289	5	Phe-OH	36kDa	18.174 mg/ml	0.8286 mg
2	0.27145	0.039998	5	Tyr-OH	40kDa	2.124 mg/ml	0.313 mg/r

2. 酶活数据：

0802 酶活测定数据处理.pzfx

2019年8月3日星期六

实验结果：

1. 蛋白浓度：

Table3

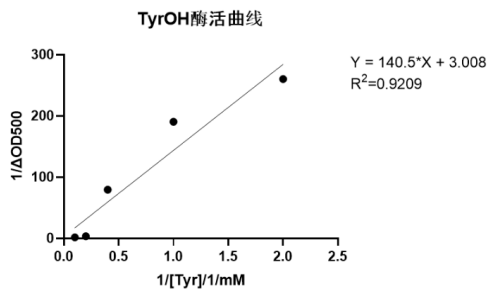
	280nm吸收	375nm吸收	稀释倍数	酶	相对分子质量	浓度 (280nm)	浓度 (375nm)
1	0.177765	0.0470874	20	Phe-OH	36kDa	6.1831 mg/ml	1.6377 mg
2	0.1898407	0.0589025	20	Tyr-OH	40kDa	6.6032 mg/ml	2.0488 mg

2. 酶活数据：

0803 酶活测定数据处理.pzfx

TyrOH 显色反应 OD500 2min 10mM-0.xls

image.png



1. 上面的数据所作的酶活曲线，还需要再高浓度和低浓度处分别多设置几个组别，进行酶活测定 2. 除此之外，直接做1/[Tyr]-1/OD曲线，发现也近似为一条直线，可能是由于2min淬灭反应之前已经完全反应，考虑将淬灭时间变到开始反应1min以后

得到此图的protocol:

测TyrOH酶活体系:

反应体系: 50微升, 其中, 过氧化氢酶-75μg/ml-1.5μl, 乙酸钠-20μM-5μl, DTT-100mM-12.5μl, FAS-20μM-1μl, BH4-100mM-2μl, TyrOH酶-10μl (可调整), 酪氨酸与Tris-HCl缓冲液 (PH=6.5) 共18μl

反应步骤: 30℃混合反应体系进行反应, 开始反应2min后, 加入15%HCl淬灭反应, 并加入20μl 12.5%亚硝酸钠-12.5%钼酸钠混合液, 10-15min后, 加入7μl 3M NaOH, 10s后测500nm处的吸光度

TyrOH 显色反应 OD500 2min 20mM-0.xls

2019年8月6日星期二

08.05酶活数据:

1. 蛋白浓度

Table4

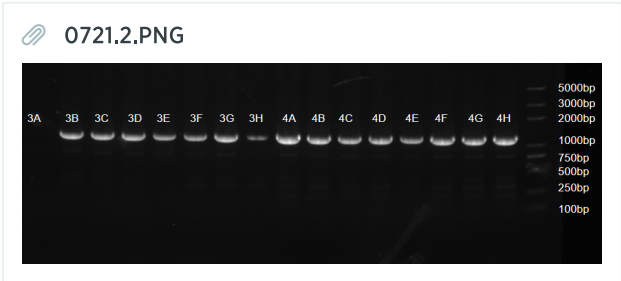
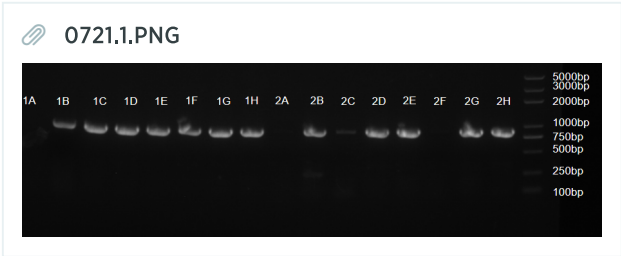
	280nm吸收	375nm吸收	稀释倍数	酶	相对分子质量	浓度 (280nm)	浓度 (375nm)
1	0.32105	0.084038	20	Phe-OH	36kDa	6.1831 mg/ml	2.639 mg/r
2	0.16462	0.033118	20	Tyr-OH	40kDa	6.6032 mg/ml	1.037 mg/r
3				DHFR			

验证GFP不同位点插入TAG的终止效率

2019年7月19日 星期五

1. 对插入四种TAG的GFP挑单克隆，摇菌，提质粒，保菌，并对质粒进行验证，验证完送测序

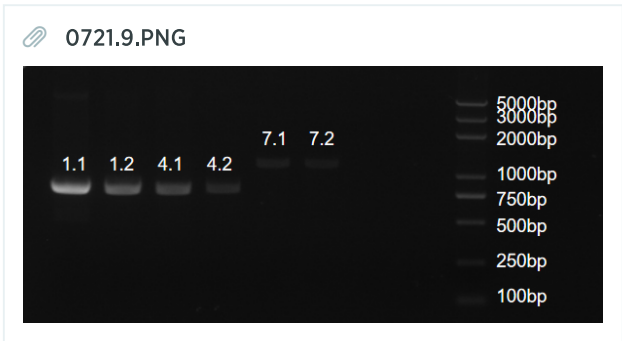
sfGFP-nTAG验证				
	模板	引物F	引物R	长度
1	PTPK J23119-sfGFP-Kan	0719-sfGFP-TAG-JC-F	VR	814bp
2	PTPK J23119-Tyr151-Kan	0719-sfGFP-TAG-JC-F	VR	814bp
3	PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Kan	0719-sfGFP-TAG-JC-F	VR	814bp
4	PTPK J23119-Asn39-Tyre151-Tyr182-Kan	0719-sfGFP-TAG-JC-F	VR	814bp

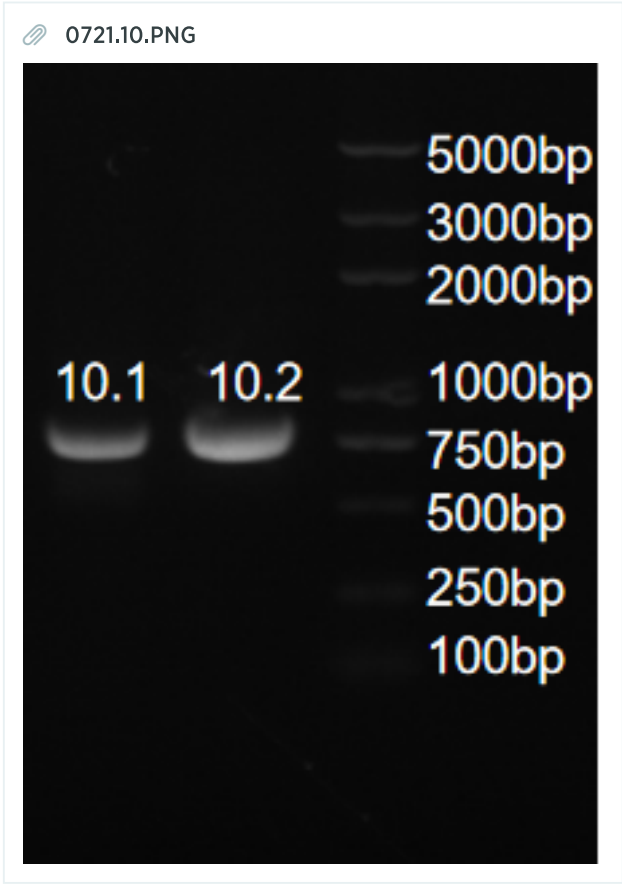


菌P验证完成，7.22送测序，还在等待结果。
结果：0/1 TAG完全与图谱符合，2/3 TAG仅在terminator处与图谱不符，经NCBI BLAST后，推测可能是换了Terminator

3. 构建质粒（放在表达载体上的）：PET22b-GFP-nTAG（插入0/1/2/3个TAG的sfGFP）
1)PCR，消化，纯化，测浓度

pET22b-sfGFP-nTAG PCR						
	模板	引物F	引物R	长度	命名	F
1	PTPK J23119-sfGFP-Kan	0719-sfGFP-TAG-F	0710-sfGFP-TAG-R	749bp	sfGFP	
2	pET22b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF1	0719-pET22b-sfGFP-VR1	2955bp	sfGFP-V1	
3	pET22b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF2	0719-pET22b-sfGFP-VR2	2496bp	sfGFP-V2	
4	PTPK J23119-Tyr151-Kan	0719-sfGFP-TAG-F	0710-sfGFP-TAG-R	749bp	sfGFP-1TAG	
5	pET22b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF1	0719-pET22b-sfGFP-VR1	2955bp	sfGFP-V1	
6	pET23b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF2	0719-pET22b-sfGFP-VR2	2496bp	sfGFP-V2	
7	PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Kan	0719-sfGFP-TAG-F	0710-sfGFP-TAG-R	749bp	sfGFP-2TAG	
8	pET22b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF1	0719-pET22b-sfGFP-VR1	2955bp	sfGFP-V1	
9	pET23b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF2	0719-pET22b-sfGFP-VR2	2496bp	sfGFP-V2	
10	PTPK J23119-Asn39-Tyre151-Tyr182-Kan	0719-sfGFP-TAG-F	0710-sfGFP-TAG-R	749bp	sfGFP-3TAG	
11	pET22b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF1	0719-pET22b-sfGFP-VR1	2955bp	sfGFP-V1	
12	pET23b-TyrOH-Amp	0719-pET22b-sfGFP-VF2	0719-pET22b-sfGFP-VR2	2496bp	sfGFP-V2	





1, 4, 10成功P出，并完成消化纯化，7的长度和纯化后浓度有问题，7.22重新P了一次，条带正常，其余还未P出。

2) 连接、转化

pET22b-sfGFP-nTAG 连接				
	连接产物名称	片段1	片段2	片段3
1	pET22b-PTPK J23119-sfGFP-Amp	sfGFP	sfGFP-V1	sfGFP-V2
2	pET22b-PTPK J23119-Tyr151-Amp	sfGFP-1TAG	sfGFP-V1	sfGFP-V2
3	pET22b-PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Amp	sfGFP-2TAG	sfGFP-V1	sfGFP-V2
4	pET22b-PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Tyr182-Amp	sfGFP-3TAG	sfGFP-V1	sfGFP-V2

菌P验证

PET22b-GFP-nTAG 菌P验证					
	模板	引物F	引物R	长度	E
1	pET22b-PTPK J23119-sfGFP-Amp	0719-pET22b-sfGFP-JC-F	0719-pET22b-sfGFP-JC-R	736bp	
2	pET22b-PTPK J23119-Tyr151-Amp	0719-pET22b-sfGFP-JC-F	0719-pET22b-sfGFP-JC-R	736bp	
3	pET22b-PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Amp	0719-pET22b-sfGFP-JC-F	0719-pET22b-sfGFP-JC-R	736bp	
4	pET22b-PTPK J23119-Asn39-Tyr151-Tyr182-Amp	0719-pET22b-sfGFP-JC-F	0719-pET22b-sfGFP-JC-R	736bp	

4. 提质粒：TCI、TCI38、TCI42、TlpA、TlpA36、TlpA39
5. 等良辰他们带来质粒之后做双转：

测温度变化用双转组			
	质粒1	质粒2	备注
1	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-J23119-CI434ts(R2 #2)-TEVsite-Cm	RGP-pCI434-TEVts6#-Amp	如果有RGP-pCI434-TEVts6#-Amp系列的质粒（如RGP-pCI434-TEVts11#-Amp）也一并转上
2	pSC101-pCI434(O2)-sfGFP-pdt#4-J23119-CI434ts(R2 #2)-TEVsite-Cm	RGP-pCI434-TEVts6#-tetR-pTetO(wt)-mflon-Amp	
3	RGP-pTac-Syn4855-TEV-Amp	pSC101-PR-sfGFP-J23119-CI434-TEV-Cm	

2019年7月22日星期一

1. 检验pET22b（看看构建ncAA插GFP质粒的时候，P不下来vector是不是因为vector与目的基因接头处的序列不正确）

检验pET22b载体					
	模板	引物1	引物2	长度	命名
1	pET22b-TyrOH-Amp	0723-pET22b-YZ-F1	0723-pET22b-YZ-R1	512bp	His端
2	pET22b-TyrOH-Amp	0723-pET22b-YZ-F2	0723-pET22b-YZ-R2	579bp	RBS端
3	pET22b-TyrOH-Amp	0723-pET22b-YZ-F1	0723-pET22b-YZ-R2	1727bp	涵盖

——送测序
———结果：仅在约1500bp处有微弱条带，送测序。重新看一下引物和模板——用上表中第三组P一下

3. 构建pET22b-sfGFP插0/1/2/3个TAG的质粒

1) 片段PCR

片段PCR for pET-sfGFP-nTAG						
	模板	引物1	引物2	长度	命名	片段性质
1	sfGFP-0TAG	0723-pET22b-sfGFP-F	0710-sfGFP-TAG-R	743bp	sfGFP-0	从师兄给的质粒上得到sfGFP-0TAG的片段
2	sfGFP-1TAG	0723-pET22b-sfGFP-F	0710-sfGFP-TAG-R	743bp	sfGFP-1	从师兄给的质粒上得到sfGFP-1TAG的片段
3	sfGFP-2TAG	0723-pET22b-sfGFP-F	0710-sfGFP-TAG-R	743bp	sfGFP-2	从师兄给的质粒上得到sfGFP-2TAG的片段
4	sfGFP-3TAG	0723-pET22b-sfGFP-F	0710-sfGFP-TAG-R	743bp	sfGFP-3	从师兄给的质粒上得到sfGFP-3TAG的片段
5	pET22b-TyrOH	0719-pET22b-sfGFP-VF2	0723-pET22b-R2	2508bp	pET22b-V2	得到另一段pET22b 载体片段

——先P vector那一段，如果一次就顺利P下来了就继续把sfGFP片段也P了，继续消化纯化连接；如果一次没有顺利P下来vector片段，就等上面的载体测序结果出来以后再重新设计引物做片段PCR

———结果：vector有条带，但长度偏小，送测序。重新看一下模板和引物

【2) 消化、纯化/切胶回收

3) Gibson连接】———搁置

连接			
	片段1	片段2	片段3
1	sfGFP-0	pET22b-V2	原本消化纯化得到的VF1
2	sfGFP-1	pET22b-V2	原本消化纯化得到的VF1
3	sfGFP-2	pET22b-V2	原本消化纯化得到的VF1
4	sfGFP-3	pET22b-V2	原本消化纯化得到的VF1

