

8.21 SAM生产

Project: Example Project

Authors: 刘子琛

Created at: 2021-08-22T15:10:35.213592+00:00

SATURDAY, 21/8/2021

实验内容：

1. 配制BMGY培养基
2. 将毕赤酵母转移至液体培养基中制成种子培养物
3. 测昨天提取的酿酒酵母DNA的含量和纯度

配制BMGY培养基

注：原本的BMGY培养基组成为：牛肉膏蛋白胨 2%，酵母提取物1%，甘油1%， $10 \times$ YNB 10%，0.1 M

磷酸钾缓冲液10%，pH 6.0。但由于实验室没有磷酸钾缓冲液，于是采用磷酸一氢钠与磷酸二氢钠配制缓冲液，并添加氯化钾以补充钾离子。缓冲液的成分由pH=6.0计算而得。

Table1

	试剂	剂量	仪器	D	E
1	酵母提取物	10g	天平、称量纸		
2	peptone	20g	天平、称量纸		
3	磷酸一氢钠	0.84g	天平、称量纸		
4	磷酸二氢钠	11.29g	天平、称量纸		
5	氯化钾	7.45g	天平、称量纸		
6	YNB	0.67g	天平、称量纸		
7	甘油	10ml	量筒		
8	超纯水	适量	1L大玻璃瓶		

将毕赤酵母转移至液体培养基中制成种子培养物

材料：固体培养基上培养的毕赤酵母GS115菌株、YPD液体培养基

仪器：15ml塑料管、1微升移液枪头

步骤：将YPD液体培养基倒入塑料管，一共三管，每管倒入5ml。再用枪头挑取培养基上的菌落，分别放入三个塑料管中。最后将三个塑料管做好标记后放入摇床进行培养

测昨天提取的酿酒酵母DNA的含量和纯度

用那个小盒子的仪器啊这忘了叫什么了测了昨天提取的DNA的纯度和浓度

结果：DNA纯度足够了（1.8左右），但浓度不够，要求100以上，测出来的结果只有10~25，推测可能是水加多了。

SUNDAY, 22/8/2021

实验内容：

1. 将昨天配好的BMGY培养基进行灭菌
2. 将液体YPD培养基中的GS115菌株转移至BMGY培养基中

培养基灭菌

操作：将装有BMGY培养基的1L玻璃瓶放在灭菌锅中灭菌2小时，降温后取出，进行下面的实验。

转移菌株至BMGY培养基中

注：发现培养基中应该加入1%的甲硫氨酸作为SAM合成的前体，且文献中说的是用500ml的摇瓶培养，而实验室并没有这么大的摇瓶，于是采用将体系缩小至十分之一，用50ml塑料管培养。

步骤：

1. 称量1g甲硫氨酸，溶于50mlBMGY培养基中，制成2倍甲硫氨酸浓度的培养基
2. 用移液枪取5ml2倍浓度甲硫氨酸的培养基于50ml塑料管中，再用移液枪取5mlBMGY加入塑料管中，制成1%甲硫氨酸的BMGY培养基，重复三遍，配制三管培养基
3. 用移液枪从液体YPD培养基中分别取100微升菌液，放入配好的三管培养基中，最后将塑料管做好标记后放入摇床中培养

MONDAY, 23/8/2021

实验内容：

1. 在GS115菌株的培养液中加入甲醇
2. 从酿酒酵母DNA中通过PCR提取SAM2基因

在GS115菌株的培养液中加入甲醇

步骤：按文献中3%的要求，在培养毕赤酵母GS115菌株的10mlBMGY培养基中添加0.3ml甲醇

仪器：移液枪、超净工作台

从酿酒酵母DNA中通过PCR提取SAM2基因

20微升PCR体系：

Table2

	试剂	添加量
1	模板DNA	4微升
2	前引物	0.5微升
3	后引物	0.5微升
4	taq酶	10微升
5	超纯水	5微升

将PCR产物进行电泳检测的结果：除了marker外没有看到预期的条带，有待找到问题并再次进行实验

TUESDAY, 24/8/2021

实验内容：

1. 在GS115菌株的培养液中加入甲醇
2. 试图从酿酒酵母DNA中通过PCR提取SAM2基因

在GS115菌株的培养液中加入甲醇

同昨天

提取SAM2基因

昨天的PCR并没有成功，今天决定尝试改变不同的条件，再次进行尝试

第一次PCR的体系：

Table3

	试剂	添加量
1	模板DNA	6微升
2	前引物	0.5微升
3	后引物	0.5微升
4	taq酶	10微升
5	超纯水	3微升

结果：未显示出预期的条带

第二次决定采用菌落PCR的方法，先取菌液，100度水浴加热一段时间后放入冰箱，以使酿酒酵母破裂，之后进行PCR
第二次PCR的体系：

Table4

	试剂	添加量
1	菌液	2微升
2	前引物	1微升
3	后引物	1微升
4	taq酶	10微升
5	超纯水	6微升

结果：也没有发现预期的产物

WEDNESDAY, 25/8/2021

实验内容：

重新尝试提取SAM2基因

经过再次的实验，仍没有发现目标条带，调整各项参数，继续实验。

THURSDAY, 26/8/2021

实验内容：

1. 尝试提取SAM2基因
2. 切胶回收
3. 通过PCR检验提取出来的是目标基因

尝试提取SAM2基因

在几次尝试过后，终于在合适温度的PCR后发现了预期的条带

切胶回收

按照试剂盒的说明书进行切胶回收

结果：得到的DNA浓度很低，并且不确定回收的是不是DNA

重复切胶回收操作

结果：重复实验三次后终于得到了浓度稍高的DNA，但仍无法完全确定是预期的回收产物，因此决定对产物进行PCR扩增以验证

通过PCR检验提取出来的是目标基因

由于回收到的DNA浓度较低，所以选择了加入4微升DNA

PCR体系：

Table6

	试剂	用量
1	回收的DNA	4微升
2	前引物	0.5微升
3	后引物	0.5微升
4	超纯水	5微升
5	taq酶	10微升

结果：在1100bp—1200bp处发现了预期条带，证明切胶回收得到的产物是SAM2基因片段

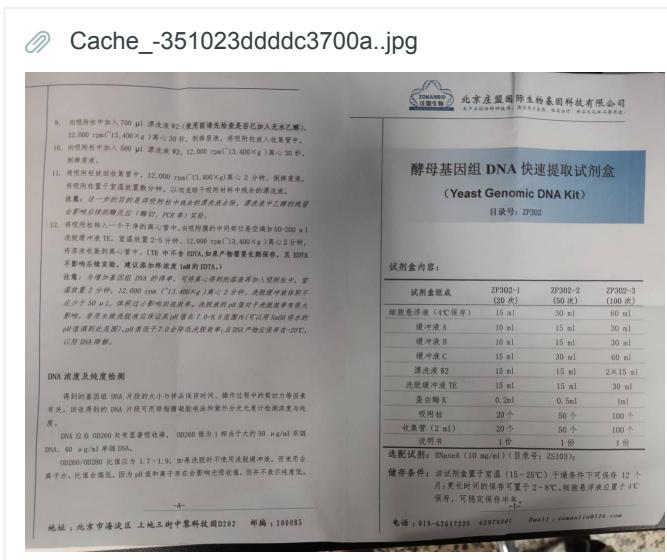
SATURDAY, 28/8/2021

实验内容：

- 提取毕赤酵母基因
- 从pGAPZα质粒中PCR出zeocin抗性基因
- 用两种限制酶处理SAM2基因，以产生粘性末端
- 从毕赤酵母DNA中PCR提取CBS基因

提取毕赤酵母基因

按照试剂盒中的说明书按步骤提取毕赤酵母中的基因DNA：



结果：没有检测到DNA，打算重新做

从pGAPZα质粒中PCR出zeocin抗性基因

总共购买了两种质粒，加入超纯水后测定质粒浓度，分别是18纳克每微升和15纳克每微升
之后进行PCR

PCR体系：

Table5

	试剂	用量
1	质粒	1微升
2	前引物	0.5微升
3	后引物	0.5微升
4	超纯水	8微升
5	taq酶	10微升

结果：发现质粒用错了...用成了pMD18T质粒，所以重新进行了PCR，观察到了条带（但是marker出问题了，暂时无法确定是预期的条带）

用双酶切SAM2基因与质粒

体系如下：

双酶切质粒

	试剂	用量
1	超纯水	11微升
2	buffer	2微升
3	DNA	6微升
4	EcoR1	0.5微升
5	BamH1	0.5微升

双酶切SAM2

	试剂	用量
1	超纯水	13微升
2	buffer	2微升
3	DNA	4微升
4	EcoR1	0.5微升
5	BamH1	0.5微升

结果：两个体系均未产生预期的条带，计划重新实验

从毕赤酵母DNA中PCR提取CBS基因

发现昨天的毕赤酵母DNA提取成功，于是开始提取CBS基因

PCR体系：

Table7

	试剂	用量
1	模板DNA	2微升
2	前引物	0.5微升
3	后引物	0.5微升
4	超纯水	7微升
5	taq酶	10微升

结果：出现了预期条带

切胶回收时，用40微升的洗脱液洗脱，测量DNA浓度，结果均为十多纳克每微升，结果正常。