

实验组实验记录8.30~9.3

2021年8月30日星期一

- 实验内容：
- 1.大肠杆菌DH5α菌株转化
 - 2.转化完成的菌液涂平板培养

大肠杆菌DH5α菌株转化						
	步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	准备	-80℃储存的DH5α感受态细胞	100微升	-80℃冰箱	N/A	N/A
2		连接好的pPIC3.5k-Sam2质粒	10微升	PCR扩增仪	N/A	N/A
3		LB培养基	900微升	4℃冰箱	N/A	N/A
4	热激转化	细胞、连接产物、液体培养基	1ml	冰盒、金属浴、超净台	N/A	N/A
5	培养复苏	转化产物	1ml	37℃摇床	1h	N/A
6						

转化子涂平板培养						
	A	B	C	D	E	F
1	准备	转化产物	1ml	37℃摇床	N/A	
2	倒平板、涂平板	转化产物	3个平板	超净工作台	N/A	
3	过夜培养	培养基	3个平板	37℃恒温培养箱	12~16h	
4						
5						
6						

2021年8月31日星期二

- 30日实验结果：三个平板上均无菌落产生
- 实验内容：
- 1.重复昨日实验，设计对照组观察是否是菌种储藏时间过长导致转化失败
 - 2.重新连接目的基因片段与载体，探究是否是连接产物导致转化失败

T4DNA连接酶连接实验						
	A	B	C	D	E	F
1	准备	T4 DNA Ligase	2微升	-20℃冰箱	N/A	
2		10X T4DNA Ligase buffer	2微升	-20℃冰箱	N/A	
3		pPIC3.5k	4微升	4℃冰箱	N/A	
4		Sam2	12微升	4℃冰箱	N/A	
5	连接	上述所有物质	20微升	pcr仪16度保温	16~24h	
6						

2021年9月1日星期三

31日试验结果：30日涂的三个板上均有菌落长出

实验内容：

1.挑取单菌落并接种在LB液体培养基中

挑取单菌落并接种						
	A	B	C	D	E	F
1	准备	20微升无菌枪头	一盒	超净台	N/A	
2		长出菌落的三个平板	3个平板	37℃恒温培养箱	N/A	
3		LB液体培养基	30ml	4℃冰箱	N/A	
4		移液枪、10ml离心管、50ml离心管、枪头若干	若干	常温存放	N/A	
5	挑取	移液枪、枪头	若干	超净台	N/A	
6	转移培养	挑取了单菌落的枪头，装有LB液体培养基的10ml离心管	3枚、3支	37℃恒温摇床	12~16h	

2021年9月2日星期四

9月1日实验结果：摇瓶培养的菌液OD600达到0.6左右，可以进一步提取质粒。

实验内容：

1.使用天根质粒小提试剂盒提取菌液中的质粒

2.使用PCR、双酶切及电泳直接检测的方法检测是否为所需大小的质粒。

PCR检测						
	A	B	C	D	E	F
1	PCR扩增溶液 配制	ddH2O	8微升	移液枪, PCR管	N/A	
2		2xMix	10微升	移液枪, PCR管	N/A	
3		首引物	0.5微升	移液枪, PCR管	N/A	
4		尾引物	0.5微升	移液枪, PCR管	N/A	
5		质粒提取产物溶液	1微升	移液枪, PCR管	N/A	
6	PCR扩增	PCR扩增溶液	20微升	PCR扩增仪	约40min	
7	琼脂糖凝胶配制	琼脂糖	0.5g	电子天平	N/A	
8		1xTAE	配至50ml	锥形瓶	N/A	
9	加热融化	TAE琼脂糖	50ml	微波炉	90s	
10	加入染色剂摇匀	Gold View型核酸染色剂	5微升	移液枪	N/A	
11	凝胶电泳	PCR样品	6微升	电泳仪	40min	
12	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	

电泳工作量巨大：检测PCR产物（应为正常长度的Sam2）、检测双酶切产物（应为正常长度的Sam2+pPIC3.5k）、检测质粒提取产物的大小（产物和pPIC3.5k放一起跑，溴酚蓝到底时应该能在负极附近看到两个条带）。至少不用胶回收。

电泳结果：

3号和6号泳道有条带，在1000bp和2000bp之间，说明3号和6号摇管中为所需菌种。