

定向进化实验记录

Project: 定向进化

Authors: Zhang Zhijia

Entry Created On: 2021-08-20 05:52:36 AM +0000

Entry Last Modified: 2021-10-11 02:34:25 PM +0000

Export Generated On: 2021-10-19 04:16:20 PM +0000

TUESDAY, 17/8/2021

实验第1天：

实验人员：张芷嘉，张王皓明

实验地点：913

实验内容：

1. 14 : 00-16 : 00易错PCR
2. 16 : 00-16 : 30电泳检测
3. 16 : 30-18 : 10切胶回收
4. 检测DNA浓度

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day1

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (6管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (公司设计的引物)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (公司设计的引物)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (原始质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	6管, 每管20μl	PCR扩增仪	45min 95°C 150s+ (94°C 10s+64°C 15s+72°C 40s) *33+72°C 300s
8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.6g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A
9		1×TAE	配至60ml	量筒, 锥形瓶	N/A 50×稀释50倍
10	加热融化	TAE琼脂糖	60ml	微波炉	90s 高火
11	加入染色剂摇匀	Gold Viemi型核酸染色剂	5μl	移液枪	N/A COOLABOR公司SL2140-1ml
12	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*2板	凝胶板	30min
13	点样	PCR扩增后溶液	20μl*6	移液枪	N/A
14	凝胶电泳	PCR样品	2板	电泳仪	20min 60V
15	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A
16	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A 切胶前后称量离心管质量
17	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A
18	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A 测量后擦去
19		回收的DNA溶液	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day1

	离心管质量	加入凝胶后离心管质量	凝胶质量	试剂用量	DNA浓度	A260/280
1	1.01g	1.1351g	0.12g	120μl	7.55ng/μl	1.936
2	1.01g	1.127g	0.11g	110μl	6.5ng/μl	2.766
3	1.01g	1.073g	0.06g	60μl	0.15ng/μl	0.6
4	1.01g	1.084g	0.07g	70μl	2.45ng/μl	24.5
5	1.01g	1.083g	0.07g	70μl	6.75ng/μl	2.288
6	1.01g	1.076g	0.07g	70μl	4.80ng/μl	2.667

实验结果：目标条带非常浅，回收的DNA浓度和纯度低，PCR失败，怀疑是引物问题或程序问题。重新设计了引物和PCR程序，待下次重新实验。在切胶前没有称量离心管质量，取用了其他离心管质量做参考，凝胶质量的计算有误差。回收的DNA溶液已丢弃。

FRIDAY, 20/8/2021

实验第2天

实验人员：张芷嘉，张王皓明

实验地点：913

实验内容：

1. 13 : 30-16 : 30易错PCR
2. 16 : 40-17 : 00电泳检测
3. 17 : 00-19 : 00切胶回收
4. 检测DNA浓度

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day2

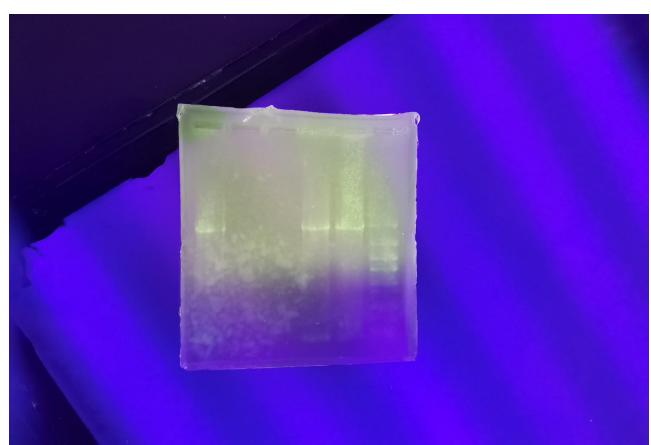
步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (6管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (原始质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	6管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C300s+ (95°C30s+62°C30s+72°C60s) + (95°C30s+61°C30s+72°C60s) + (95°C30s+60°C30s+72°C60s) + (95°C30s+59°C30s+72°C60s) + (95°C30s+58°C30s+72°C60s) + (95°C30s+57°C30s+72°C60s) + (95°C30s+56°C30s+72°C60s) + (95°C30s+55°C30s+72°C60s) *25+72°C420s 程序名称 TDpcr
8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.6g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A

9		1×TAE	配至60ml	量筒，锥形瓶	N/A	50×稀释50倍
10	加热融化	TAE琼脂糖	60ml	微波炉	90s	高火
11	加入染色剂摇匀	Gold Viemi型核酸染色剂	5μl	移液枪	N/A	COOLABOR公司SL2140-1ml
12	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*2板	凝胶板	30min	
13	点样	PCR扩增后溶液	20μl*6	移液枪	N/A	
14	凝胶电泳	PCR样品	2板	电泳仪	20min	60V
15	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
16	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台，刀片，电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
17	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
18	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
19		回收的DNA溶液	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day2

	离心管质量	加入凝胶后离心管质量	凝胶质量	试剂用量	DNA浓度	A260/280
1	0.9864g	1.0730g	0.0866g	87μl	16.95ng/μl	17.84
2	0.9905g	1.1252g	0.1347g	135μl	17.3ng/μl	7.689
3	0.9841g	1.1398g	0.1557g	156μl	15.95ng/μl	5.230
4	0.9926g	1.0814g	0.0888g	89μl	15.1ng/μl	8.389
5	0.9942g	1.1643g	0.1701g	170μl	17.9ng/μl	7.783
6	0.9921g	1.1769g	0.1848g	185μl	18.45ng/μl	7.688

实验结果：1-3号没有marker条带，4-6号条带如图。提纯的DNA浓度比上一次高了很多，但纯度依然不理想。回收的DNA溶液已丢弃。



📎 day2 (4-6) .jpg

SATURDAY, 21/8/2021

实验第3天

实验人员：张芷嘉，张王皓明，徐凯骏，柳志远

实验地点：913

实验内容：

1. 易错PCR
2. 电泳检测
3. 切胶回收
4. 检测DNA浓度
5. 单克隆培养含cdh质粒的DH5α菌

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day3

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (12管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (第一次提取的质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl; 7号到12号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl; 7号到12号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	12管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C300s+ (95°C30s+62°C30s+72°C60s) + (95°C30s+61°C30s+72°C60s) + (95°C30s+60°C30s+72°C60s) + (95°C30s+59°C30s+72°C60s) + (95°C30s+58°C30s+72°C60s) + (95°C30s+57°C30s+72°C60s) + (95°C30s+56°C30s+72°C60s) + (95°C30s+55°C30s+72°C60s) *25+72°C420s
8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.6g*2	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A

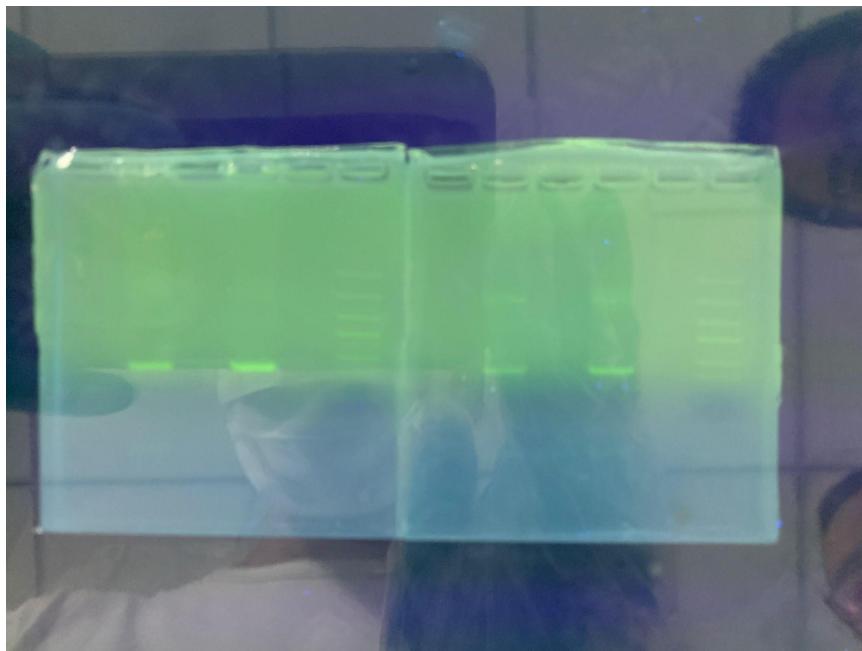
9		1×TAE	配至60ml*2	量筒 , 锥形瓶	N/A	50×稀释50倍
10	加热融化	TAE琼脂糖	60ml*2	微波炉	90s	高火
11	加入染色剂摇匀	Gold Viem型核酸染色剂	5μl*2	移液枪	N/A	COOLABOR公司SL2140-1ml
12	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*4板	凝胶板	30min	
13	点样	PCR扩增后溶液	20μl*12	移液枪	N/A	
14	凝胶电泳	PCR样品	4板	电泳仪	20min	60V
15	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
16	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
17	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
18	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
19		回收的DNA溶液	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day3

	离心管质量	加入凝胶后离心管质量	凝胶质量	试剂用量	DNA浓度	A260/280
1	0.9829g	1.1763g	0.1934g	193μl	17.450ng/μl	11.26
2	0.9812g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
3	0.9833g	1.1214g	0.1381g	138μl	17.800ng/μl	8.279
4	0.9824g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
5	0.9851g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
6	0.9883g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
7	0.9895g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
8	0.9890g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
9	1.0513g	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
10	0.9907g	1.1560g	0.1653g	200μl	15.850	5.981
11	0.9994g	1.2687g	0.2693g	300μl	15.850	6.216
12	0.9932g	1.3636g	0.3704g	400μl	16.150	6.592

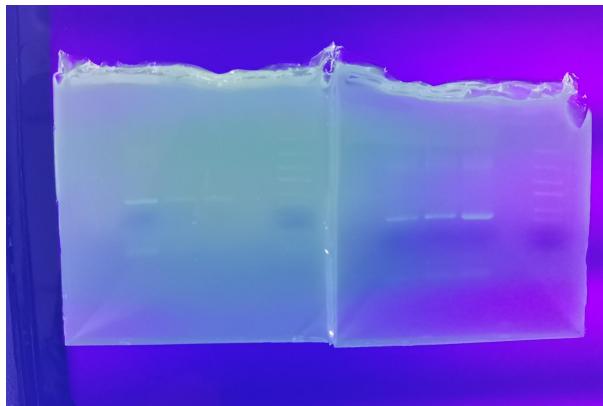
实验结果：1号，3号，10号，11号，12号有目标条带，但都很浅。提纯的DNA浓度纯度都不理想。回收的DNA溶液已丢弃。

3AB018F514F984AE3A38CA48ED2753C9.png



左侧胶由左到右分别是6号，5号（无条带），4号；右侧胶从左到右分别是3号，2号（无条带），1号。

[7_5MF\$4`QGYB6)Q1BH\$B(8.jpg



左侧胶由左到右分别是9号，8号，7号；右侧胶由左到右分别是12号，11号，10号。

单克隆培养-day3

	A	B	C	D	E	F
1	含氨苄青霉素的培养基	液态LB培养基	6ml*2管	移液枪, EP管	N/A	
2		氨苄青霉素	6μl*2管	移液枪, EP管	N/A	
3	挑单克隆	8月5日转化的含cdh质粒的DH5α菌落	2个	移液枪头	N/A	
4	摇床培养	单克隆培养基	2管	摇床	15:00-次日10:00	37°C, 195rpm, 微松管口

SUNDAY, 22/8/2021

实验第4天

实验人员：张芷嘉，张王皓明

实验地点：913

实验内容：

1. 从前一天单克隆培养的DH5α中提取质粒
2. 检测质粒浓度和纯度
3. 易错PCR
4. 电泳检测
5. 切胶回收
6. 检测DNA浓度和纯度

提取质粒，检测浓度-day4

	步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	提取质粒	高纯度质粒小提中量试剂盒	N/A	离心管, 离心机, 移液枪	N/A	
2	检测质粒浓度和纯度	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	
3		提取的质粒溶液	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	

实验结果：质粒浓度和纯度都在预期范围，置于-20°C冰箱保存。

质粒浓度及纯度-day4

	浓度	A260/280
1	140.5ng/μl	1.912
2	140.15ng/μl	1.920

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day4-1

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (12管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8月22日第二次提取的质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A 1号-6号加入1号质粒 (浓度140.5ng/μl) ; 7号-12号加入2号质粒 (浓度140.15ng/μl)
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl ; 7号到12号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl ; 7号到12号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	12管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C 300s+ (95°C 30s+62°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+61°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+60°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+59°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+58°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+57°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+56°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+55°C 30s+72°C 60s) *25+72°C 420s 程序名称 TDpcr

8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	1.2g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A	
9		1×TAE	配至 120ml	量筒, 锥形瓶	N/A	50×稀释 50倍
10	加热融化	TAE琼脂糖	120ml	微波炉	90s	高火
11	加入染色剂摇匀	Gold Viem型核酸染色剂	10μl	移液枪	N/A	COOLABOR公司SL2140-1ml
12	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*4板	凝胶板	30min	
13	点样	PCR扩增后溶液	20μl*12	移液枪	N/A	
14	凝胶电泳	PCR样品	4板	电泳仪	20min	80V
15	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
16	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
17	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
18	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
19		回收的DNA溶液	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	

调整了质粒用量的第二组实验

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day4-2

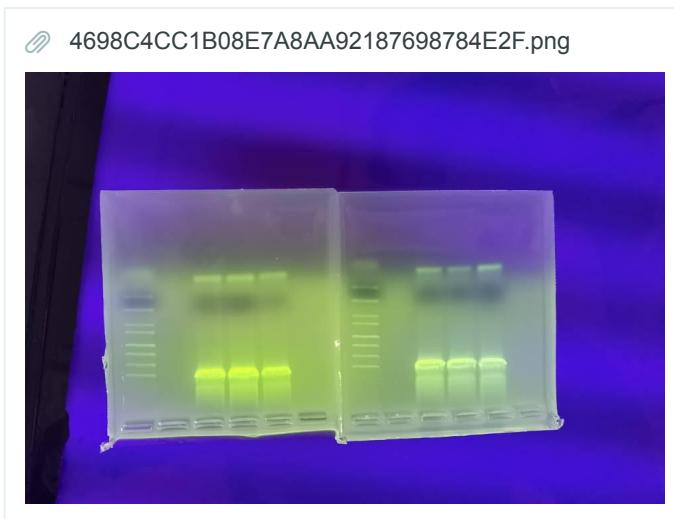
步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (12管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8月22日第二次提取的质粒)	2μl	移液枪, PCR管	N/A 13号-18号加入1号质粒 (浓度140.5ng/μl) ; 19号-24号加入2号质粒 (浓度140.15ng/μl)
5		MnCl2 (2mmol/L)	13号到18号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl ; 19号到24号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 13号到18号分别为7μl, 6.6μl, 6.2μl, 5.8μl, 5.4μl, 5μl ; 19号到24号分别为7μl, 6.6μl, 6.2μl, 5.8μl, 5.4μl, 5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	12管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C 300s+ (95°C 30s+62°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+61°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+60°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+59°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+58°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+57°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+56°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+55°C 30s+72°C 60s) *25+72°C 420s 程序名称 TDpcr

8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	1.2g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A	
9		1×TAE	配至 120ml	量筒, 锥形瓶	N/A	50×稀释50倍
10	加热融化	TAE琼脂糖	120ml	微波炉	90s	高火
11	加入染色剂摇匀	Gold Viem型核酸染色剂	10μl	移液枪	N/A	COOLABOR公司SL2140-1ml
12	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*4板	凝胶板	30min	
13	点样	PCR扩增后溶液	20μl*12	移液枪	N/A	
14	凝胶电泳	PCR样品	4板	电泳仪	20min	
15	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
16	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
17	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
18	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
19		回收的DNA溶液	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day4

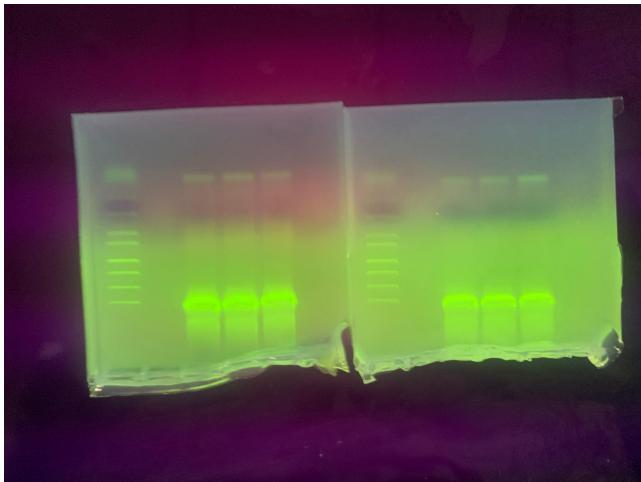
	离心管质量 (g)	加入凝胶后离心管质量 (g)	凝胶质量 (g)	试剂用量 (μl)	DNA浓度 (ng/μl)	A260/280	A260/230	A260 (10mm 光程)
1	0.9801	1.1529	0.1728	173	43.950	2.462	0.133	0.901
2	0.9947	1.1623	0.1676	168	52.950	2.374	0.133	1.083
3	0.9768	1.1615	0.1847	185	34.350	2.816	0.092	0.709
4	0.9798	1.1376	0.1578	158	37.950	2.547	0.091	0.787
5	0.9824	1.1054	0.1230	123	33.450	2.753	0.102	0.698
6	1.0370	1.1935	0.1565	157	35.900	2.783	0.070	0.738
7	1.0520	1.1800	0.128	128	43.100	2.456	0.092	0.884
8	0.9936	1.1111	0.1175	118	38.350	2.618	0.121	0.779
9	1.0021	1.1029	0.1008	101	37.300	2.590	0.112	0.759
10	0.9767	1.0999	0.1232	124	30.450	2.928	0.082	0.627
11	1.0054	1.1452	0.1398	140	33.150	2.845	0.083	0.682
12	1.0518	1.1993	0.1475	148	28.450	3.092	0.080	0.586
13	0.9847	1.1601	0.1754	180	33.8	2.864	0.098	0.686
14	1.0048	1.1422	0.1374	140	21.1	3.907	0.063	0.444
15	0.9906	1.0736	0.0830	90	25.25	3.237	0.065	0.514
16	0.9843	1.1383	0.1540	160	30.450	2.985	0.074	0.631
17	0.9815	1.1286	0.1471	150	30.3	3.030	0.072	0.620
18	0.9881	1.1326	0.1445	150	25.4	3.256	0.069	0.513
19	0.9839	1.0918	0.1079	110	34.85	2.591	0.083	0.721
20	0.9797	1.1002	0.1205	130	28.55	3.086	0.085	0.588
21	0.9889	1.0868	0.979	100	28.55	3.086	0.086	0.587
22	0.9927	1.1148	0.1221	130	26.95	3.189	0.082	0.550
23	0.9863	1.1395	0.1532	160	27.25	3.263	0.084	0.551
24	0.9844	1.1261	0.1417	150	23.9	3.252	0.073	

实验结果：1-24号均有目标条带，且条带清晰亮度高。可以证明提出的质粒中含有目的基因cdh。回收的DNA浓度和纯度与前三天实验相比有明显改善，但仍不在理想范围内。回收的DNA溶液在-20℃冰箱中保存。



左侧胶由左到右分别是1-3号，右侧胶由左到右分别是4-6号

📎 D8E5D10C94E69DB0CF1C5C34A11836C3.png



左侧胶从左到右分别是7-9号，右侧胶从左到右分别是10-12号

📎 8F75D954428B4EC8FAB0240F0D855466.jpg



左侧胶从左到右分别是15-17号，右侧胶从左到右分别是18-19号

📎 EA8996C674598FE1B71C6D25150CB115.jpg



左侧胶从左到右分别是21-23号，右侧胶从左到右分别是24-25号

WEDNESDAY, 25/8/2021

实验第5天

实验人员：张王皓明

实验地点：913

实验内容：

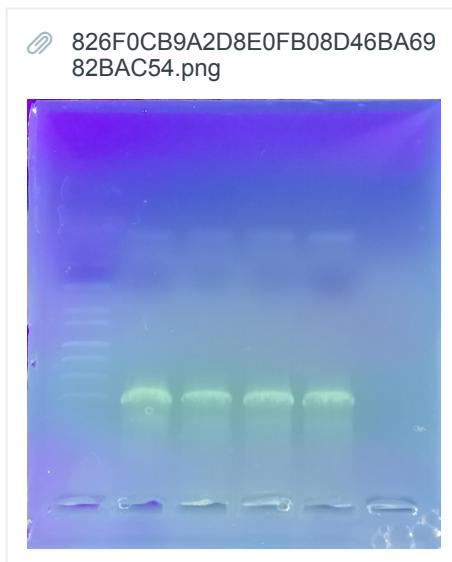
1. 易错PCR
2. 电泳检测
3. 切胶回收
4. 检测DNA浓度和纯度

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day5

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (12管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8月22日第二次提取的质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A 1号-6号加入1号质粒 (浓度140.5ng/μl) ; 7号-12号加入2号质粒 (浓度140.15ng/μl)
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl ; 7号到12号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl ; 7号到12号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	12管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C 300s+ (95°C 30s+62°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+61°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+60°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+59°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+58°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+57°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+56°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+55°C 30s+72°C 60s) *25+72°C 420s 程序名称 TDpcr

8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.9g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A	
9		1×TAE	配至90ml	量筒, 锥形瓶	N/A	50×稀释50倍
10	加热融化	TAE琼脂糖	90ml	微波炉	90s	高火
11	加入染色剂摇匀	Gold Viem型核酸染色剂	10μl*3	移液枪	N/A	COOLABOR公司SL2140-1ml
12	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*3板	凝胶板	30min	
13	点样	PCR扩增后溶液	20μl*12	移液枪	N/A	
14	凝胶电泳	PCR样品	3板	电泳仪	20min	80V
15	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
16	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
17	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
18	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
19		回收的DNA溶液	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A	

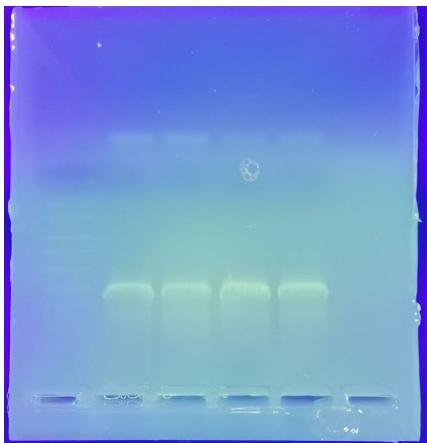
实验结果：DNA纯度不佳，数据和提纯样本均未保留。



从左到右分别是1-4号



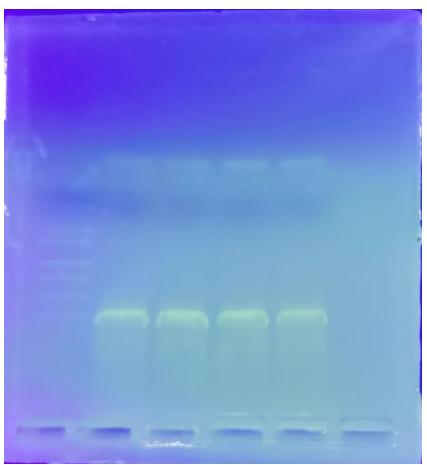
D832EF4F92C15202742D2B90AD
322325.png



从左到右分别是5-8号



31E7F9727E0A27FEAD6465547B
B18A38.png



从左到右分别是9-12号

FRIDAY, 27/8/2021

实验第6天：

实验人员：张芷嘉，张王皓明

实验地点：913

实验内容：

1. 易错PCR
2. 电泳检测
3. 切胶回收
4. 检测DNA浓度

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day6

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (6管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (公司设计的引物)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (公司设计的引物)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8.22第二次提取的质粒1号)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A 0.1M稀释50倍
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	6管, 每管20μl	PCR扩增仪	45min 95°C300s+ (95°C30s+62°C30s+72°C60s) + (95°C30s+61°C30s+72°C60s) + (95°C30s+60°C30s+72°C60s) + (95°C30s+59°C30s+72°C60s) + (95°C30s+58°C30s+72°C60s) + (95°C30s+57°C30s+72°C60s) + (95°C30s+56°C30s+72°C60s) + (95°C30s+55°C30s+72°C60s) *25+72°C420s 程序名称 TDpcr

实验结果：发现了Gold View型染料不适合用于胶回收，找到了前几日实验胶回收失败的原因，订购了SYBR Green染料，待到货后继续实验。PCR产物保存在-20℃冰箱。

SUNDAY, 12/9/2021

实验第7天：

实验人员：张芷嘉

实验地点：913

实验内容：

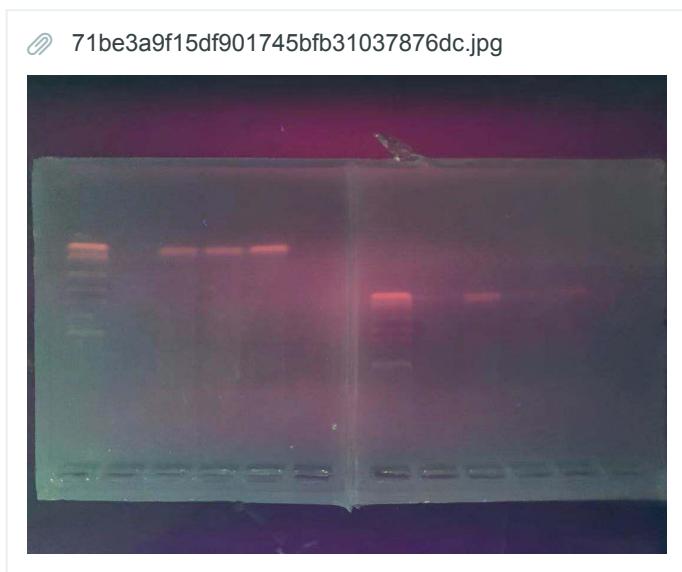
1. 易错PCR
2. 电泳检测
3. 切胶回收
4. 检测DNA浓度

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day7-1

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (6管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8月22日第二次提取的质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	6管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C 300s+ (95°C 30s+62°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+61°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+60°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+59°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+58°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+57°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+56°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+55°C 30s+72°C 60s) *25+72°C 420s 程序名称 TDpcr
8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.6g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A
9		1×TAE	配至60ml	量筒, 锥形瓶	N/A
10	加热融化	TAE琼脂糖	60ml	微波炉	90s
11	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*2板	凝胶板	30min
12	SYBR Green工作液配置	SYBR Green原液	1μl	离心管, 移液枪	N/A
13		ddH2O	1ml	离心管, 移液枪	N/A

14		6× DNA Loading Buffer	1ml	离心管 , 移液枪	N/A	
15	染色	PCR样品	6管*20μl	离心管	5min	
16		SYBR Green工作液	6管*3μl	离心管 , 移液枪		用量计算错误
17	点样	PCR扩增后溶液	23μl*6	移液枪	N/A	
18		5K DNA Marker	23μl*2	移液枪	N/A	
19	凝胶电泳	PCR样品	2板	电泳仪	20min	80V
20	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	

实验结果：没有目标条带，怀疑配置扩增体系时出现了问题



从左到右分别是1-6号

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day7-2

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (6管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8月22日第二次提取的质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	6管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C 300s+ (95°C 30s+62°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+61°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+60°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+59°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+58°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+57°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+56°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+55°C 30s+72°C 60s) *25+72°C 420s 程序名称 TDpcr
8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.6g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A
9		1×TAE	配至60ml	量筒, 锥形瓶	N/A
10	加热融化	TAE琼脂糖	60ml	微波炉	90s
11	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*3板	凝胶板	30min
12	染色	PCR样品	6管*20μl	离心管	5min
13		SYBR Green工作液	6管*6μl	离心管, 移液枪	

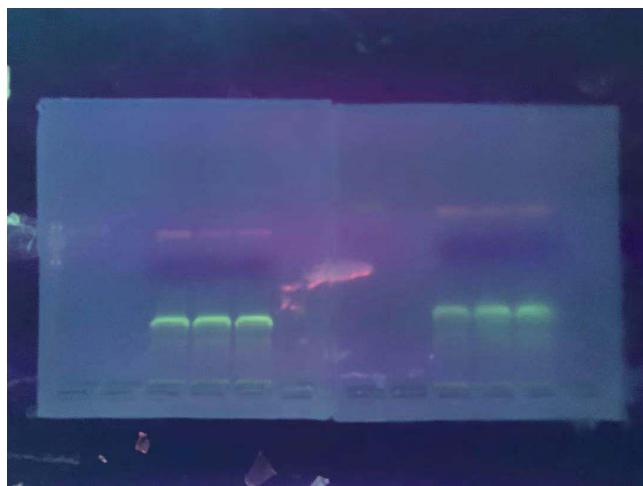
14	点样	PCR扩增后溶液	26μl*6	移液枪	N/A	
15		5K DNA Marker	5μl*2	移液枪	N/A	放太少了
16	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
17	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台，刀片，电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
18	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
19	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
20		回收的DNA溶液	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day7

	离心管质量	加入凝胶后离心管质量	凝胶质量	试剂用量	DNA浓度	A260/280
1	1.0098g	1.2544g	0.2446g	245μl	56.250ng/μl	1.917
2	1.0034g	1.2559g	0.2525g	253μl	49.050ng/μl	1.946
3	0.9996g	1.2938g	0.2942g	295μl	64.150ng/μl	1.935
4	0.9982g	1.2259g	0.2277g	228μl	47.350ng/μl	1.961
5	0.9856g	1.1754g	0.1898g	190μl	39.350ng/μl	2.013
6	0.9905g	1.1946g	0.2041g	205μl	45.000ng/μl	1.982

实验结果：点样时Marker太少看不清，但根据经验可以判断有明显目标条带。回收的DNA溶液浓度和纯度都达到了预期。回收的DNA溶液保存在-20°C

56acb645ef4264e7d4a96c522d005a6.jpg



从左到右分别是1-6号

SATURDAY, 18/9/2021

实验第8天

实验人员：张芷嘉

实验地点：913

实验内容：

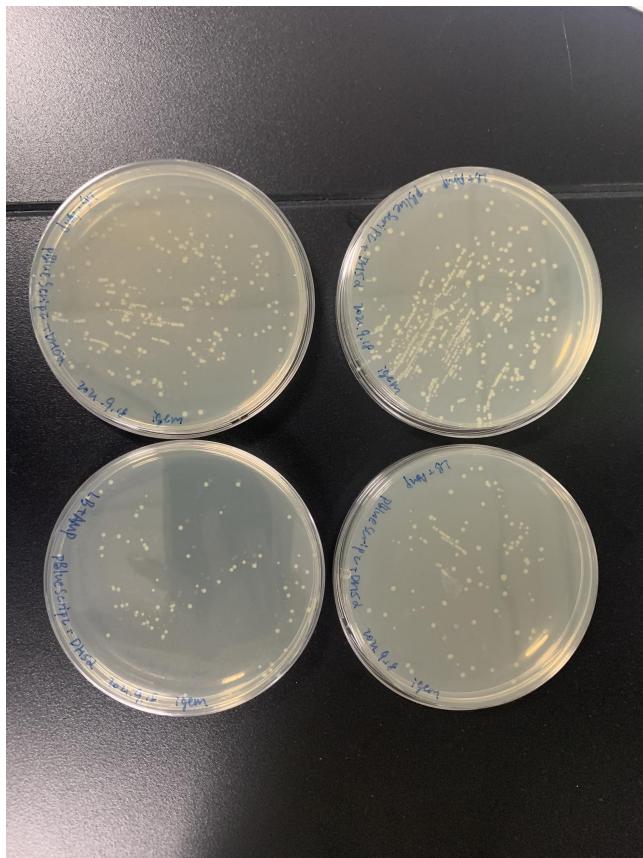
1. 感受态细胞DH5α转化pBlueScript质粒，涂平板培养

感受态转化质粒-day8

	步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	培养基配置	LB培养基 (固)	50ml*2	N/A	N/A	
2		氨苄青霉素 AMP	60μl*2	N/A	N/A	在体系温度降到50-60°C时加入
3	倒平板	混合了氨苄青霉素的LB培养基 (固)	4板	培养皿，超净工作台	N/A	
4	离心	pBlueScript液体质粒 (100ng/μl)	10μl	离心机	1min	5000rpm
5	混合转化体系	pBlueScript液体质粒 (100ng/μl)	1.5μl*2	N/A	N/A	
6		DH5α感受态大肠杆菌	50μl*2	N/A	N/A	
7	冰浴	转化体系	51.5μl*2	冰盒	30min	
8	热激	转化体系	两管	水浴锅	90s	40°C
9	再次冰浴	转化体系	两管	冰盒	150s	
10	摇床培养	转化体系	两管	摇床	45min	
11	涂平板		4板	培养皿，超净工作台	N/A	
12	过夜培养	培养基	4板	37°C恒温培养箱	12-16h	

实验结果：9.19日早观察细菌生长情况

eff4588f51f30af15792fded1b9350c.jpg



SUNDAY, 19/9/2021

实验第9天

实验人员：张芷嘉

实验地点：913

实验内容：

1. 单克隆培养

单克隆培养-day9

	步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	含氨苄青霉素的培养基	液态LB培养基	6ml*4管	移液枪，EP管	N/A	
2		氨苄青霉素	6μl*4管	移液枪，EP管	N/A	
3	挑单克隆	8月5日转化的含cdh质粒的DH5α菌落	4个	移液枪头	N/A	
4	摇床培养	单克隆培养基	4管	摇床	20210919 16 : 55- 20210921 12 : 30	37°C， 195rpm，微松 管口

TUESDAY, 21/9/2021

实验第10天

实验人员：张芷嘉

实验地点：913

实验内容：

1. 提取质粒，检测浓度
2. 酶切连接

提取质粒，检测浓度-day10

	步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	提取质粒	高纯度质粒小提中量试剂盒	N/A	离心管，离心机，移液枪	N/A	
2	检测质粒浓度和纯度	ddH2O	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	
3		提取的质粒溶液	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	

质粒浓度及纯度-day10

	浓度 (ng/μl)	A260/280
1	204.70	1.904
2	240.30	1.903
3	215.30	1.903
4	221.20	1.902

用量计算-day10

	试剂	序号	浓度 (ng/μl)	用量 (μl)	ddH2O用量 (μl)
1	易错pcr产物	1	56.250ng/μl	18μl	25μl
2		2	49.050ng/μl	21μl	22μl
3		3	64.150ng/μl	16μl	27μl
4		4	47.350ng/μl	22μl	21μl
5		5	39.350ng/μl	26μl	17μl
6		6	45.000ng/μl	23μl	20μl
7	pBlueScript质粒	1 (两个体系都用1号质粒)	204.70ng/μl	5μl	38μl

酶切连接-day10

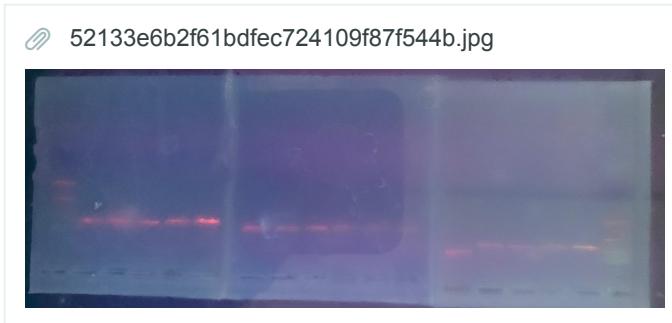
步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	酶切体系 (DNA)	DNA (9.12易错pcr产物*6)	离心管	N/A	
2		10×NEB Buffer			1×
3		Apa I (冰上)			10units
4		Sac II (冰上)			10units
5		ddH2O			
6	酶切体系 (质粒载体)	pBlueScript质粒	离心管	N/A	
7		10×NEB Buffer			1×
8		Apa I (冰上)			10units
9		Sac II (冰上)			10units
10		ddH2O			
11	混合	酶切体系	N/A	小离心机	N/A
12	孵育	酶切体系*8	N/A	pcr仪	5-15min 37°C
13					20min 65°C
14	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.9g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A
15		1×TAE	配至90ml	量筒, 锥形瓶	N/A 50×稀释50倍
16	加热融化	TAE琼脂糖	90ml	微波炉	90s 高火
17	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*3板	凝胶板	30min
18	染色	酶切体系	8管*50μl	离心管	5min
19		SYBR Green 工作液	8管*15μl	离心管, 移液枪	
20	点样	PCR扩增后溶液	30μl*16 (一个管点两个孔)	移液枪	N/A
21		1Kb DNA Marker	30μl*2 (少点一个marker吧)	移液枪	N/A
22	电泳	平板	3板	电泳仪	16 : 44-17 : 09 80V
23	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A
24	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A 切胶前后称量离心管质量
25	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A
26	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A 测量后擦去

27		回收的DNA溶液	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	
28	连接体系 (回收时用30μl缓冲液)	T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10×)	5μl	移液枪	N/A	
29		Vector DNA (酶切回收后的质粒)	10μl	移液枪	N/A	
30		Insert DNA (酶切回收后的DNA片段)	30μl*6	移液枪	N/A	
31		ddH2O	补全到 50μl (2.5μl)	移液枪	N/A	
32		T4 DNA连接酶	2.5μl	移液枪	N/A	
33	混合	连接体系	50μl*6	小离心机		
34	孵育	连接体系	50μl*6	pcr仪or恒温箱	12h	16°C

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day10

	离心管质量	加入凝胶后离心管质量	凝胶质量	试剂用量	DNA浓度	A260/280
1	0.9851g	1.3370g	0.3519g	352μl	12.100ng/μl	2.123
2	0.9824g	1.3454g	0.3630g	363μl	10.150ng/μl	2.160
3	0.9845g	1.3907g	0.4062g	407μl	12.700ng/μl	2.082
4	0.9741g	1.2667g	0.2926g	293μl	15.650ng/μl	2.285
5	1.0371g	1.3292g	0.2921g	293μl	12.600ng/μl	2.100
6	0.9891g	1.2334g	0.2443g	245μl	11.050ng/μl	2.402
7	0.9843g	1.1747g	0.1904g	191μl	14.100ng/μl	2.496
8	0.9997g	1.1912g	0.1915g	192μl	14.250ng/μl	2.500

实验结果：酶切反应后回收产物浓度和纯度不高，用了1Kb Marker，电泳应该时间更长。



序号由左至右递增

FRIDAY, 24/9/2021

实验第11天

实验人员：张王皓明

实验地点：913

实验内容：

1. 感受态转化质粒，涂平板培养

感受态转化质粒-day10						
	A	B	C	D	E	F
1	热激	连接体系	50μl*6	pcr仪or金属浴	10min	65°C
2	培养基配置	LB培养基 (固)	50ml*3	N/A	N/A	
3		氨苄青霉素 AMP	60μl*3	N/A	N/A	在体系温度降到50-60°C时加入
4	倒平板	混合了氨苄青霉素的LB培养基 (固)	6板	培养皿，超净工作台	N/A	
5	混合转化体系	连接产物	5μl*6	N/A	N/A	
6		BL21感受态大肠杆菌	25μl*6 (3管)	N/A	N/A	
7	冰浴	转化体系	30μl*6	冰盒	30min	
8	热激	转化体系	六管	水浴锅	90s	40°C
9	再次冰浴	转化体系	六管	冰盒	150s	
10	摇床培养	转化体系	六管	摇床	45min	
11	重悬		六管			
12	涂平板		6板	培养皿，超净工作台	N/A	
13	过夜培养	培养基	6板	37°C恒温培养箱	12-16h	

实验结果：只有，两个平板有白色菌斑，且有污染。

FRIDAY, 1/10/2021

实验第12天

实验人员：张王皓明

实验地点：913

实验内容：

1. 易错PCR
2. 电泳检测
3. 切胶回收
4. 检测DNA浓度

易错PCR，电泳检测，切胶回收，检测浓度-day11

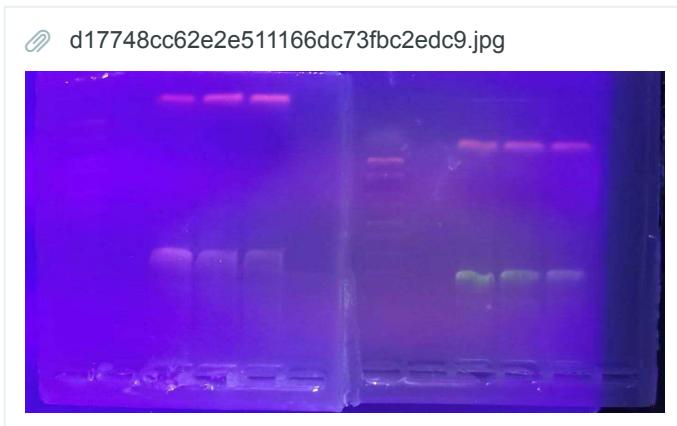
步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	PCR扩增溶液 (6管, 每管20μl)	2×Mix	10μl	移液枪, PCR管	N/A
2		首引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-forward)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
3		尾引物 (第二次设计的引物, cktcs/cdh-reverse)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
4		模板 (含Cdh基因的pBlueScript II SK+质粒) (8月22日第二次提取的质粒)	0.5μl	移液枪, PCR管	N/A
5		MnCl2 (2mmol/L)	1号到6号分别为0μl, 0.4μl, 0.8μl, 1.2μl, 1.6μl, 2.0μl	移液枪, PCR管	N/A
6		ddH2O	补全至20μl, 1号到6号分别为8.5μl, 8.1μl, 7.7μl, 7.3μl, 6.9μl, 6.5μl	移液枪, PCR管	N/A
7	PCR扩增	PCR扩增溶液	6管, 每管20μl	PCR扩增仪	1h45min 95°C 300s+ (95°C 30s+62°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+61°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+60°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+59°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+58°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+57°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+56°C 30s+72°C 60s) + (95°C 30s+55°C 30s+72°C 60s) *25+72°C 420s 程序名称 TDpcr
8	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.6g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A
9		1×TAE	配至60ml	量筒, 锥形瓶	N/A
10	加热融化	TAE琼脂糖	60ml	微波炉	90s
11	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*3板	凝胶板	30min
12	染色	PCR样品	6管*20μl	离心管	5min
13		SYBR Green工作液	6管*6μl	离心管, 移液枪	

14	点样	PCR扩增后溶液	26μl*6	移液枪	N/A	
15		5K DNA Marker	5μl*2	移液枪	N/A	放太少了
16	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A	
17	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台，刀片，电子天平	N/A	切胶前后称量离心管质量
18	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A	
19	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	测量后擦去
20		回收的DNA溶液	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day11

	离心管质量	加入凝胶后离心管质量	凝胶质量	试剂用量	DNA浓度	A260/280
1	1.0054g	1.1754g	0.17g	170μl	12.850ng/μl	1.917
2	1.0162g	1.1413g	0.1251g	130μl	20.000ng/μl	1.946
3	1.0083g	1.0999g	0.0916g	100μl	21.400ng/μl	1.935
4	1.0208g	1.2225g	0.2017g	200μl	15.750ng/μl	1.961
5	1.0170g	1.2757g	0.2587g	260μl	15.950ng/μl	2.013
6	1.0214g	1.3675g	0.3481g	350μl	15.700ng/μl	1.982

实验结果：



MONDAY, 11/10/2021

实验第13天

实验人员：张芷嘉

实验地点 : 913

实验内容 :

1. 酶切反应
2. 电泳检测
3. 切胶回收
4. 连接反应

酶切连接-day13

步骤	试剂	剂量	仪器	时间	备注
1	酶切体系 (DNA)	DNA (9.12易错pcr产物*6)	离心管	N/A	
2		10×NEB Buffer			1×
3		Apa I (冰上)			10units
4		Sac II (冰上)			10units
5		ddH2O			
6	酶切体系 (质粒载体)	pBlueScript质粒	离心管	N/A	
7		10×NEB Buffer			1×
8		Apa I (冰上)			10units
9		Sac II (冰上)			10units
10		ddH2O			
11	混合	酶切体系	N/A	小离心机	N/A
12	孵育	酶切体系*8	N/A	pcr仪	5-15min 37°C
13					20min 65°C
14	琼脂糖凝胶配置	琼脂糖	0.9g	电子天平, 称量纸, 药匙	N/A
15		1×TAE	配至90ml	量筒, 锥形瓶	N/A 50×稀释50倍
16	加热融化	TAE琼脂糖	90ml	微波炉	90s 高火
17	倒板凝固	TAE琼脂糖	30ml*3板	凝胶板	30min
18	染色	酶切体系	8管*50μl	离心管	5min
19		SYBR Green 工作液	8管*15μl	离心管, 移液枪	
20	点样	PCR扩增后溶液	30μl*16 (一个管点两个孔)	移液枪	N/A
21		1Kb DNA Marker	30μl*2 (少点一个marker吧)	移液枪	N/A
22	电泳	平板	3板	电泳仪	16 : 44-17 : 09 80V
23	观察	凝胶	N/A	紫外投射切胶台	N/A
24	切胶	凝胶	N/A	紫外投射切胶台, 刀片, 电子天平	N/A 切胶前后称量离心管质量
25	回收	凝胶	N/A	琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒	N/A
26	DNA浓度测定	ddH2O	1μl	移液枪, 超微量分光光度计	N/A 测量后擦去

27		回收的DNA溶液	1μl	移液枪，超微量分光光度计	N/A	
28	连接体系 (回收时用30μl缓冲液)	T4 DNA Ligase Reaction Buffer (10×)	5μl	移液枪	N/A	
29		Vector DNA (酶切回收后的质粒)	10μl	移液枪	N/A	
30		Insert DNA (酶切回收后的DNA片段)	30μl*6	移液枪	N/A	
31		ddH2O	补全到 50μl (2.5μl)	移液枪	N/A	
32		T4 DNA连接酶	2.5μl	移液枪	N/A	
33	混合	连接体系	50μl*6	小离心机		
34	孵育	连接体系	50μl*6	pcr仪or恒温箱	12h	16°C

琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒试剂用量及DNA浓度-day13

	离心管质量(g)	加入凝胶后离心管质量(g)	凝胶质量(g)	试剂用量(μl)	DNA浓度(ng/μl)	A260/280
1	0.9942	1.4912	0.4970	650	2.8000	-1.057
2	0.9841	1.6583	0.6742	650	9.0500	181.0
3	1.0095	1.6635	0.6540	650	15.450	1.287
4	1.0366	1.3393	0.3027	650	2.4500	-1.690
5	0.9989	1.3596	0.3607	650	9.4000	2.474
6	0.9949	1.5929	0.5980	650	15.650	1.527
7	0.9859	1.4174	0.4315	650	33.450	1.911
8	0.9951	1.4303	0.4352	650	25.900	1.992

实验结果：目的基因片段回收浓度和纯度非常差，但酶切后质粒浓度纯度很好，推测是易错pcr部分出现了问题



3793eced10fe6a5fd828bbf320f7488.jpg

