

目录

BJEA_China Notebook	3
7.5 实验	3
PCR	3
7.6 实验	9
PCR	9
7.7 实验	15
PCR	16
转化.....	19
胶回收.....	19
7.10 实验	22
PCR	22
转化.....	28
7.11 实验	28
PCR	28
胶回收.....	32
转化.....	33
接菌.....	34
7.12 实验	35
保甘油菌、提质粒.....	35
转化.....	35
PCR	35
琼脂糖凝胶电泳检测.....	37
胶回收.....	37
7.13 实验	37
PCR	38
胶回收.....	38
提质粒.....	39
7.15 实验	39
PCR	39
双酶切.....	43
PCR 产物回收（非胶体系）	44
胶回收.....	44
7.16 实验	45
胶回收.....	45
双酶切.....	48
连接.....	50
PCR	51
7.18 实验	52
双酶切.....	53
胶回收.....	56
PCR	58

7.19 实验	59
质粒小提.....	59
转化.....	62
双酶切.....	63
连接.....	66
7.20 实验	69
转化.....	69
接小管.....	71
7.21 实验	71
挑取单克隆.....	72
提质粒.....	72
连接.....	72
7.22 实验	72
连接.....	72
转化.....	73
PCR 检测重组质粒	73
双酶切检测重组质粒.....	74
7.25 实验	75
连接.....	75
转化.....	75
7.26 实验	78
挑取单克隆.....	79
保甘油菌、取诱导前菌液、蛋白诱导.....	81
9.5 实验	83
BI21 转化.....	83
9.6 实验	83
挑单克隆.....	83
9.7 实验	83
IPTG 诱导表达	83
9.8 实验	84
蛋白质提取.....	84
9.12 实验	84
9.13 实验	85
9.14 实验	85
9.15 实验	85
9.16 实验	86
双水相验证.....	86

BJEA_China Notebook

7.5 实验

PCR

温度统一为 55°C

姓名：张瀚霖、王思瀚

目的基因：PETase

模板 PETase-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) PETase_F: 4ul 由 10uM 配至 1uM PETase+1000ul 纯水

下游引物 (1uM) PETase_R: 4ul 由 10uM 配至 1uM PETase+1000ul 纯水

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合 s 酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因：PETase-GSlinker

模板 PETase-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 PETase_F (1uM) : 4ul 由 10uM 配至 1uM PETase+1000ul 纯水

下游引物 (1uM) BsIA_R: 4ul 先是加了 500ul 纯水将引物稀释为 5uM 再取出 两百 ul+800ul 纯水配出 1uM 下游引物

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名：袁天一

目的基因：*EBFP-GSlinker-BsIA*

模板 EBFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) EBFP-BsIA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 上游引物

下游引物 (1uM) EBFP_R: 4ul 同上

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 纯水稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因: *EBFP-JFVlinker-BsIA*

模板 PETase-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) EBFP-BsIA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 上游引物

下游引物 (1uM) EBFP_R: 4ul 同上

10×Buffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名: 张楷若

目的基因: mPETase

模板 mPETase (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (10uM) mPETase-BsIA_F: 4ul

下游引物 (1uM) mPETase_R: 4ul 取 1u 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 下游引物

10×Buffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因: mPETase-GSlinker-BsIA

模板 mPETase (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (10uM) mPETase-BsIA_F: 4ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 4ul

10×Buffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名：王京典

目的基因：EGFP-GSlinker

模板 EGFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) EGFP-BsIA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水，得 10ul 1uM 上游引物

下游引物 (1uM) BsIA_R: 4ul 同上

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 纯水稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因：EGFP-TEVlinker

模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) EGFP-BsIA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水，得 10ul 1uM 上游引物

下游引物 (1uM) BsIA_R: 4ul 同上

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名：陈睿卿

目的基因：LL37-GSlinker-BsIA

模板 pET28a-LL37-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) LL37-BsIA_F: 4ul

下游引物 (1uM) BsIA_R: 4ul 10uM 引物+加 9ul 纯水，得 10ul 1uM 引物

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因: LL37

模板 pET28a-LL37 (50ng/ul) : 1ul

上游引物 LL37-BsIA_F (1uM) : 4ul

下游引物 (1uM) LL37_R: 4ul 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 引物

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名: 刘铠铭

目的基因: mOrange-GSlinker-BsIA

模板 pET28a-mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) mOrange-BsIA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM

下游引物 (1uM) BsIA_R: 同上

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因: mOrange-TEVlinker-BsIA

模板 pET28a-mOrange-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) mOrange-BsIA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM

下游引物 (1uM) BsIA_R: 同上

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名: 李宁静

目的基因: mHoneydew-GSlinker-BsIA

模板 pET28a- mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) mHoneydew-BsIA_F: 4ul

下游引物 (1uM) BsIA_R: 4ul

10×Buffer : 2ul
dNTP (1uM) : 4ul
pfu 聚合酶 : 0.5ul
ddH2O: 4.5ul
总体积: 20ul

目的基因: mHoneydew-TEVlinker-BsIA
模板 pET28a- mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul
上游引物 mHoneydew-BsIA_F (1uM) : 4ul
下游引物 (1uM) BsIA _R: 4ul
10×Buffer : 2ul
dNTP (1uM) : 4ul
pfu 聚合酶 : 0.5ul
ddH2O: 4.5ul
总体积: 20ul

姓名: 马晨璋

目的基因: mHoneydew
模板 pET28a- mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul
上游引物 (1uM) mHoneydew-BsIA_F: 4ul
下游引物 (1uM) mHoneydew _R: 4ul 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 引物
10×Buffer : 2ul
dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)
pfu 聚合酶 : 0.5ul
ddH2O: 4.5ul
总体积: 20ul

目的基因: mOrange
模板 pET28a- mOrange -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul
上游引物 mOrange-BsIA_F (1uM) : 4ul
下游引物 (1uM) mOrange _R: 4ul 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 引物
10×Buffer : 2ul
dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)
pfu 聚合酶 : 0.5ul
ddH2O: 4.5ul
总体积: 20ul

姓名: 姜羽柠

目的基因: EBFP

模板 EBFP-TEVlinker-BslA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) EBFP-BslA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 上游引物

下游引物 (1uM) EBFP_R: 4ul 在 100um/10uM 的引物中加入 1000ul 纯水, 得 1um/ul 的引物

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 纯水稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因: EGFP

模板 EGFP-TEVlinker-BslA_F (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) EGFP-BslA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM 上游引物

下游引物 (1uM) EGFP_R: 4ul 在 100um/10uM 的引物中加入 1000ul 纯水, 得 1um/ul 的引物

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

姓名: 王涵右

目的基因: *Bsla*

模板: LL37-GSlinker-BslA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 (1uM) BslA_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水, 得 10ul 1uM

下游引物 (1uM) Bsla_R: 4ul 同上

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 纯水稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 4.5ul

总体积: 20ul

目的基因: RGD-GSlinker-BslA

模板：mPETase-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul
上游引物 (1uM) RGD-Bs1A_F: 4ul 取 1ul 配好的 10uM 引物+加 9ul 纯水，得 10ul 1uM 上游引物
下游引物 (1uM) Bs1A_R: 4ul 同上
10xBuffer : 2ul
dNTP (1uM) : 4ul 抽取 2ul 并加入 18ul 稀释十倍 (由 10uM 稀释到 1uM)
pfu 聚合酶 : 0.5ul
ddH2O: 4.5ul
总体积: 20ul

7.6 实验

PCR

姓名：张楷若

目的基因：mPETase
模板 mPETase-linker-BsLA (50ng/ul) : 5ul
上游引物 (10uM) mPETase-Bs1A_F: 3ul
下游引物 (1uM) mPETase_R: 30ul
10xBuffer : 15ul
dNTP (1uM) : 3ul
pfu 聚合酶 : 3.5ul
ddH2O: 90.5ul
总体积: 150ul
梯度: G1,G2,G3: 55,60.5,64.1

目的基因：mPETase-GSlinker-BsIA
模板 mPETase-linker-BsLA (50ng/ul) : 5ul
上游引物 (10uM) mPETase-Bs1A_F: 3ul
下游引物 (10uM) Bs1A_R: 3ul
10xBuffer : 15ul
dNTP (1uM) : 3ul
pfu 聚合酶 : 3.5ul
ddH2O: 117.5ul
总体积: 150ul
梯度: G4,G5,G6: 55, 60.65, 63.5

实验姓名：刘铠铭

目的基因：mOrange-GSlinker-BsIA

模板 pET28a-mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) mPETase_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

标注为 mO GS 55, mO GS 实, mO GS 公。梯度为 55°C, 60°C, 62°C

目的基因：mOrange-TEVlinker-BsIA

模板 pET28a-mOrange-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

标注为 mO TEV 55, mO TEV 实, mO TEV 公。梯度为 55°C, 60°C, 62°C

姓名：王京典

目的基因：EGFP-GSlinker

模板 EGFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 31 32 33 温度梯度由小到大, 分别为 59.5°C、62.7°C、55°C

目的基因：EGFP-TEVlinker

模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul
上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 3ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul
10×Buffer : 15ul
dNTP (10uM) : 3ul
pfu 聚合酶 : 3.5ul
ddH2O: 90.5ul
总体积: 150ul
分装成三份
分别标注为 41 42 43 温度梯度由小到大, 分别为 59.5℃、62.7℃、55℃

姓名: 张瀚霖

目的基因: PETase
模板 PETase-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul
上游引物 PETase_F (1uM) : 30ul
下游引物 (1uM) PETase_R: 30ul
10×Buffer : 10ul
dNTP (10uM) : 3ul
pfu 聚合酶 : 3.5ul
ddH2O: 69ul
总体积: 150ul
分装成三份
分别标注为 P1 P2 P3 温度梯度由小到大, 分别为 55℃、61℃、62℃

姓名: 王思瀚

目的基因: PETase-linker-BsIA
模板 PETase-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul
上游引物 PETase_F (1uM) : 30ul
下游引物 (5uM) BsIA_R: 6ul
10×Buffer : 10ul
dNTP (10uM) : 3ul
pfu 聚合酶 : 3.5ul
ddH2O: 87ul
总体积: 150ul
分装成三份
分别标注为 P_L1 P_L2 P_L3 温度梯度由小到大, 分别为 55℃、60.7℃、62.1℃

实验姓名：马晨璋

目的基因：mOrange

模板 pET28a-mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) mPETase_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 O1, O2, O3, 温度梯度为 59.85°C、63.6°C、55°C

目的基因：mHoneydew

模板 pET28a-mHoneydew-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) mHoneydew_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 H1, H2, H3, 温度梯度为 59.95°C、63.6°C、55°C

姓名：李宁静

目的基因：mHoneydew-GSlinker-BsIA

模板 pET28a-mHoneydew-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积：150ul

分装成三份

分别标记为 mhGS1, mhGS2, mhGS3。温度分别为 59.8 度, 55 度, 63.7 度

目的基因：mHoneydew-TEVinkers-BsIA

模板 pET28a-mHoneydew-TEVinkers-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积：150ul

分装成三份

分别标记为 mhTEV1, mhTEV2, mhTEV3。温度分别为 59.8 度, 55 度, 63.7 度。

姓名：姜羽柠

目的基因：EGFP

模板 EGFP-TEVlinkers-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) EGFP_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积：150ul

分别标注为 11 12 13 温度梯度由小到大, 分别为 58.8°C、62.25°C、55°C

目的基因：EBFP

模板 EBFP-TEVlinkers-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) EBFP_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 21 22 23 温度梯度由小到大, 分别为 59.1°C、62.25°C、55°C

姓名: 王涵右

目的基因: *Bsla*

模板 mPETase-GSlinker-BsIA: 5ul

上游引物 (10uM) BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

分装三份: Tm 值分别为 4 (59 度), 4.1 (63.2), 4.2 (55)

目的基因: RGD-GSlinker-BsIA

模板: LL37-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (1uM) RGD-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

分装三份: Tm 值分别为 2 (60.7), 2.1 (65), 2.2 (55)

目的基因: ~~*LL37-GSlinker-BsIA*~~

模板 LL37-GSlinker-BsIA: 5ul

上游引物 (10uM) LL37-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

分装三份, Tm 值分别为: 1 (60.7), 1.1 (62), 1.2 (55)

目的基因: *LL37*

模板 LL37-GSlinker-BsIA: 5ul

上游引物 (10uM) LL37-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) LL37_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

分装三份, Tm 值分别为: 3 (57.6) , 3.1 (62.2) , 3.2 (55)

姓名: 袁天一

目的基因: EBFP-GSlinker-BsIA

模板 EBFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 30ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (1uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 63.5ul

总体积: 150ul

梯度: 管帽标 BsIA-GS-1, 2, 3 温度分别为 55.2,59.1,63.0°C

目的基因: EBFP-TEVlinker-BsIA

模板 EBFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 30ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (1uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 63.5ul

总体积: 150ul

梯度: 管帽标 BsIA-TEV-1, 2, 3 温度分别为 55.2,59.1,63.0°C

7.7 实验

PCR

姓名：张瀚霖

体系为 20ul

倍数除以 2.5

模板 PETase-GSlinker-BslA 自行补充

上游引物 PETase_F (1uM) : 12ul

下游引物 PETase_R (1UM) : 12ul

10xBuffer : 6ul

dNTP (1uM) : 12ul 配平过程

pfu 聚合酶 : 1.5ul

dd 水: 15ul

分装为三管 20ul, 分别标注为 P1、P2、P3TM 值分别为 55°C、59°C、62°C

姓名：王思瀚

体系为 20ul

倍数除以 2.5

模板 PETase-GSlinker-BslA 1ul

上游引物 PETase_F (1uM) : 4ul

下游引物 PETase_R (1UM) : 4ul

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 配平过程

pfu 聚合酶 : 0.5ul

dd 水: 5ul

以上体系做 3 管分别标注为 PL1、PL2、PL3 TM 值分别为 55°C、60.7°C、63.2°C

姓名：张楷若

体系为 20ul

倍数除以 2.5

模板 mPETase 1ul

上游引物 mPETase_F (1uM) : 4ul

下游引物 mPETase_R (1uM) : 4ul 取 1uL 配好的 10uM 引物+加 9ulddH2O

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 取 1uLdNTP+9uL ddH2O

pfu 聚合酶: 0.5ul

dd 水: 4.5ul

姓名：张楷若

体系为 20ul

倍数除以 2.5

模板 mPETase-GSlinker-BsIA 1ul

上游引物 mPETase_F (1uM) : 4ul

下游引物 BsLA_R (1uM) : 4ul

10xBuffer : 2ul

dNTP (1uM) : 4ul 取 1uL dNTP 加 9uL H2O

pfu 聚合酶 : 0.5ul

dd 水: 4.5ul

姓名：姜羽柠

目的基因：EGFP

模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) EGFP_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 11 12 13 温度梯度由小到大，分别为 58.8℃、62.25℃、55℃

目的基因：EBFP

模板 EBFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) EBFP_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 21 22 23 温度梯度由小到大，分别为 59.1℃、62.25℃、55℃

姓名：刘铠铭

目的基因：mOrange-GSlinker-BsIA

模板 mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

标注为 mO GS 55,mO GS 实, mO GS 公。梯度为 57°C,59°C,63°C

目的基因: mOrange-TEVlinker-BsIA

模板 mOrange-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 3ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 3ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 117.5ul

总体积: 150ul

标注为 mO TEV 55,mO TEV 实, mO TEV 公。梯度为 57°C,59°C,63°C

实验姓名: 马晨璋

目的基因: mOrange

模板 pET28a-mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) mPETase_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH2O: 90.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 O1, O2, O3, 温度梯度为 59.85°C、63.6°C、55°C

目的基因: mHoneydew

模板 pET28a-mHoneydew-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) mHoneydew_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH₂O: 90.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 H1, H2, H3, 温度梯度为 59.95°C、63.6°C、55°C

转化

姓名: 张瀚霖、王思瀚、张楷若

从-80°C取出 3 管感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和 LB 卡那固体培养基放 置备用

在超净台中加入分别加入 LL37-GSlinker-BsIA、PETase-GSlinker-BsIA、mPETase- GSlinker-BsIA , 并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42°C 水浴锅中热击 90s

冰浴 2 分半

每管感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37°C 摇床, 180 转 培养 1h

12000 转离心一分钟

抽取出 500ul 上清后在超净台中重悬

分别涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

胶回收

姓名: 姜羽柠、王京典

琼脂凝胶电泳后, 切下目的 DNA 条带, 放入 EP 管中

加入胶溶液至管内 1.5ml, 并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱, 进行 12000rpm, 1min 离心, 将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液, 12000rpm, 1min 离心 (进行 2 次)

12000rpm, 2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 60°C 的水 (中央悬空滴在吸附膜上), 静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心

丢弃吸附柱, 保留 EP 管内液体, 放入-20°C 冰箱保存

姓名: 刘铠铭

操作步骤:

(使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶体上的标签。)

- 1、琼脂糖凝胶电泳后，将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下尽量切除多余部分，切成小块放入干净的 PE 管中。
- 2、向胶块中加入溶胶液使得溶胶液没过提取的凝胶,55℃水浴放置 10min，期间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。得到淡黄色液体。如果溶胶液变为红色，可向含有 DNA 的胶溶液中加入 10-30ul 3M 醋酸钠将胶溶液调为淡黄色。
- 3、将上一步所得溶液加入一个吸附柱中,12000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。
- 4、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min，丢弃废液。
- 5、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 6、12000rpm 离心 2min，尽量除去漂洗液。将吸附柱敞口置于室温或 50℃温箱放置数分钟直到没有气味，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，防止漂洗液中的乙醇影响后续的实验。
- 7、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加适量经 65℃水浴预热的洗脱液，室温放置直到没有气味，12000 转离心一分钟。
- 8、DNA 产物 - 20℃保存。

姓名：马晨璋

操作步骤：

琼脂糖凝胶电泳后，将单一的目的 mOrange,mHoneydew DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下，放入干净的离心管中。

向胶块中加入 1.5ml 溶胶液,55℃水浴放置 10min，期间不断温和地上下翻转离心管，使胶块充分溶解。

将上一步所得溶液放置室温后加入一个吸附柱中,12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

向吸附柱中加入 600ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min，丢弃废液。

向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温放置 2 分钟，将吸附柱中残余的漂洗液去除。

将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加适量经 65℃水浴预热的 ddH₂O，12000rpm 离心一分钟。

将 DNA 产物于 - 20℃保存。

姓名：王涵右

操作步骤：

(使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。)

- 1、琼脂糖凝胶电泳后，将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下尽量切除多余部分，切成小块放入干净的 PE 管中。
- 2、向胶块中加入溶胶液使得溶胶液没过提取的凝胶,55℃水浴放置 10min，期间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。得到淡黄色液体。如果溶胶液变为红色，可向含有 DNA 的胶溶液中加入 10-30ul 3M 醋酸钠将胶溶液调为淡黄色。
- 3、将上一步所得溶液加入一个吸附柱中,12000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

- 4、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min , 丢弃废液。
- 5、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液, 12000rpm 离心 1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
- 6、12000rpm 离心 2min, 尽量除去漂洗液。将吸附柱敞口置于室温或 50°C温箱放置数分钟直到没有气味, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 防止漂洗液中的乙醇影响后续的实验。
- 7、将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加适量经 65°C水浴预热的洗脱液, 室温放置直到没有气味, 12000 转离心一分钟。
- 8、DNA 产物 - 20°C保存。管盖标记为 LL37-Gslinker-Bsla, RGD-Gslinker-Bsla, LL37, Bsla。管身标记 7.7 号 PCR。

姓名: 李宁静

琼脂糖凝胶电泳后, 将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下, 放入干净的离心管中。

向胶块中加入 1.5ml 溶胶液,55°C水浴放置 10min, 期间不断温和地上下翻转离心管, 使胶块充分溶解。

将上一步所得溶液放置室温后加入一个吸附柱中,12000rpm 离心 1min, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放入收集管中。

向吸附柱中加入 600ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min , 丢弃废液。

向吸附柱中加入 600ul 漂洗液, 12000rpm 离心 1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。

12000rpm 离心 2min, 将吸附柱敞口置于室温放置 2 分钟, 将吸附柱中残余的漂洗液去除。

将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加适量经 65°C水浴预热的 ddH₂O, 12000rpm 离心一分钟。

将 DNA 产物于 - 20°C保存。分别标记为 mhGS, mhTEV

姓名: 袁天一

【全过程需戴 PE 手套】

1. 配胶: 配 200ml 电泳胶, 用于配“大胶”。量取 4ml 50xTAE 缓冲液和 196ml 纯净水至量筒。注意先加水再加 TAE 缓冲液。胶配好后转移至配胶专用的烧瓶中, 置于微波炉中加热至沸腾, 停止加热略微冷却, 继续加热, 直至溶液清澈透明。将溶液导入胶槽中, 等待晾干。
2. 上样: 20ul 体系用小孔, 50ul 体系用 2 小孔或 1 大孔。首先摇晃 PCR 管, 可以吹吸一次以消除气泡。随后更换枪头, 加样时平视槽, 将枪头略微探入孔内即可。在液体基本加入后, 抬高枪头吹出剩余液体。
3. 跑胶: 合上盖子, 确认胶放置方向正确, 开始电泳。电泳完毕后, 置于紫外线仪内观察, 与 DNA ladder 比较, 以确认目的基因片段是否被成功回收。
4. 胶回收: 在紫外仪内观察, 找到目的基因片段, 用刀片快速切下该片段位置的胶。尽量去除杂胶。切下后, 将胶再切成许多小份, 如胶量较多则分装至不同 PE 管内。管内加入溶胶 buffer 至没过胶, 置于浮标上, 在水浴仪内 55°C 溶胶。

5. 将胶溶液置于离心管的内管（吸附柱）内，离心 12000RPM，1 分钟；弃废液。加 600ul 含无水乙醇的清洗剂，离心，弃废液，重复两次。随后开盖侧放吸附柱，让乙醇充分挥发
6. 取 50ul 纯水，在水浴槽中加热至 65℃，直接滴在吸附柱上。吸附柱下套 PE 管。等待 2 分钟，关上吸附柱管盖，于离心机 12000RPM*2 分钟。
7. 如胶回收时有多个吸附柱内有 DNA 片段，重复使用（6）中的洗脱液对每个吸附柱进行洗脱，以提高目的 DNA 浓度。

7.10 实验

PCR

姓名：张瀚霖

目的基因：mLCC-GSlinker-BsIA

模板 mLCC-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 ICCG_F (10uM) : 0.4ul

下游引物 BsIA_R (10uM) : 0.4ul

10×Buffer : 2ul

dNTP (10uM) : 0.4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 15ul

总体积: 20ul

标记为 BS, 温度设置为 59℃

目的基因：mLCC

模板 mLCC-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 1ul

上游引物 ICCG_F (10uM) : 0.4ul

下游引物 ICCG_R (10uM) : 0.4ul

10×Buffer : 2ul

dNTP (10uM) : 0.4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 15ul

总体积: 20ul

标记为 mLCC S, 温度设置为 57.6℃

按照剂量的大小从大到小开始加，酶最后加。

姓名：娄果多

目的基因：mLCC-GSlinker-mHFBI

模板 mLCC-GSlinker-mHFBI (50ng/ul) : 1ul

上游引物 ICCG_F (10uM) : 0.4ul

下游引物 ICCG-HF_R (10uM) : 0.4ul

10×Buffer : 2ul

dNTP (10uM) : 0.4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH2O: 15ul

总体积: 20ul

标记为 GS-HF, 温度设置为 60.8°C

目的基因: mHFBI

模板 mHFBI (50ng/ul) : 1ul

上游引物 HFBI_F (10uM) : 0.4ul

下游引物 ICCG-HF_R (10uM) : 0.4ul

10×Buffer : 2ul

dNTP (10uM) : 0.4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

ddH₂O: 15ul

总体积: 20ul

标记为 mLCC S, 温度设置为 64.1°C

按照剂量的大小从大到小开始加, 酶最后加。

姓名: 袁天一

目的基因: EBFP-GSlinker-BsIA

模板: 实验室制取的 EBFP-GSlinker-BsIA, 10ul

上游引物: EBFP-BsIA_F (10mM), 10ul (加错了, 10mM 的引物应该加 1ul)

下游引物: BsIA_R (10mM), 10ul (加错了, 10mM 的引物应该加 1ul)

10×Buffer: 5ul

dNTP: 1ul

pfu 聚合酶: 1.3ul

ddH₂O: 12.7ul

总体积: 50ul

标记为 BsIAGS, 管冒末端涂黑。

姓名: 袁天一

目的基因: EBFP-TEVlinker-BsIA

模板: 实验室制取的 EBFP-TEVlinker-BsIA, 10ul

上游引物: EBFP-BsIA_F (10mM), 10ul (加错了, 10mM 的引物应该加 1ul)

下游引物: BsIA_R (10mM), 10ul (加错了, 10mM 的引物应该加 1ul)

10×Buffer: 5ul

dNTP: 1ul

pfu 聚合酶: 1.3ul

ddH₂O: 12.7ul

总体积: 50ul

标记为 BsIATEV, 管冒末端涂黑。

姓名: 刘铠铭

目的基因: mOrange-GSlinker-BsIA

模板 mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BslA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.3ul
ddH2O: 30ul
总体积: 50ul
标注为 mO GS 梯度为 59°C

目的基因: mOrange-TEVlinker-BslA

模板 mOrange-TEVlinker-BslA (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mOrange-BslA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BslA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.3ul
ddH2O: 30ul
总体积: 50ul
标注为 mO TEV 梯度为 59°C

姓名: 马晨璋

目的基因: mOrange
模板 mOrange (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mOrange-BslA_F: 1ul
下游引物 (1uM) mOrange_R: 10ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.2ul
ddH2O: 22ul
总体积: 50ul
标注为 mO 梯度为 60.7°C

目的基因: mHoneydew

模板 mHoneydew (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mHoneydew-_BslA_F: 1ul
下游引物 (1uM) mHoneydew_R: 10ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.2ul

ddH₂O: 22ul

总体积: 50ul

标注为 mH 梯度为 60.7°C

姓名: 姜羽柠

目的基因: EGFP

模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 1ul

下游引物 (1uM) EGFP_R: 10ul

10×Buffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.75ul

ddH₂O: 21.25ul

总体积: 50ul

标注为 13 温度梯度为 55°C

目的基因: EBFP

模板 EBFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 5ul

上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 3ul

下游引物 (1uM) EBFP_R: 30ul

10×Buffer : 15ul

dNTP (10uM) : 3ul

pfu 聚合酶 : 3.5ul

ddH₂O: 117.5ul

总体积: 150ul

分别标注为 21 22 23 温度梯度由小到大, 分别为 59.1°C、62.25°C、55°C

姓名: 李宁静

目的基因: mHoneydew-GSlinker-BsIA

模板 mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

10×Buffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.3ul

ddH₂O: ul

总体积: 50ul

温度为 59.8 度

目的基因: mHoneydew-TEVinker-BsIA

模板 pET28a-mHoneydew-TEVinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

10xBuffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.3ul

ddH2O: ul

总体积: 50ul

温度为 59.8 度

姓名: 王京典

目的基因: EGFP-GSlinker

模板 EGFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

10xBuffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.25ul

ddH2O: 30.75ul

总体积: 50ul

目的基因: EGFP-TEVlinker

模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

10xBuffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.25ul

ddH2O: 30.75ul

总体积: 50ul

姓名: 王涵右

目的基因: *BsIa*

模板 BslA: 10ul
上游引物 (10uM) BslA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BslA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.25ul
ddH2O: 30.75ul
总体积: 50ul
Tm 值为 (59 度)

目的基因: RGD-GSlinker-BslA
模板: RGD-GSlinker-BslA: 10ul
上游引物 (1uM) RGD-BslA_F: 1ul
下游引物 (1uM) BslA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.25ul
ddH2O: 30.75ul
总体积: 50ul
Tm 值为 (60.7)

目的基因: *LL37-GSlinker-BslA*
模板 LL37-GSlinker-BslA: 10ul
上游引物 (10uM) LL37-BslA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BslA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.25ul
ddH2O: 30.75ul
总体积: 50ul
Tm 值为 (60.7)

目的基因: *LL37*
模板 LL37-GSlinker-BslA: 10ul
上游引物 (10uM) LL37-BslA_F: 1ul
下游引物 (10uM) LL37_R: 10ul
10xBuffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.25ul

ddH₂O: 21.75ul

总体积: 50ul

T_m 值为 (55)

转化

姓名: 张瀚霖、王思瀚、娄果多

从-80℃取出感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和 LB 卡那固体培养基放 置备用

在超净台中加入 PETase-GSlinker-BsIA 并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 110s

冰浴 2 分半

每管感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h

3500 转离心 5 分钟

抽取出 500ul 上清后在超净台中重悬

分别涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名: 张楷若

从-80℃取出 3 管感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和 LB 卡那固体培养基放 置备用

在超净台中加 mPETase-GSlinker-BsIA ， 并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 90s

冰浴 2 分半

每管感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h

3500 转离心 5 分钟

抽取出 500ul 上清后在超净台中重悬

分别涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

7.11 实验

PCR

姓名: 姜羽柠

目的基因: EGFP

模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul

上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 1ul
下游引物 (1uM) EGFP_R: 10ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.75ul
ddH2O: 21.25ul
总体积: 50ul
标注为 13 温度梯度为 55°C

姓名: 刘铠铭

目的基因: mOrange-GSlinker-BsIA
模板 mOrange-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.3ul
ddH2O: 30ul
总体积: 50ul
标注为 mO GS 梯度为 68°C

目的基因: mOrange-TEVlinker-BsIA
模板 mOrange-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.3ul
ddH2O: 30ul
总体积: 50ul
标注为 mO TEV 梯度为 68°C

姓名: 马晨璋

目的基因: mOrange
模板 mOrange (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul
下游引物 (1uM) mOrange_R: 10ul

10×Buffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.2ul
ddH2O: 22ul
总体积: 50ul
标注为 mO 梯度为 68°C

目的基因: mHoneydew

模板 mHoneydew (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul
下游引物 (1uM) mHoneydew_R: 10ul
10×Buffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.2ul
ddH2O: 22ul
总体积: 50ul
标注为 mH 梯度为 68°C

姓名: 李宁静

目的基因: mHoneydew-GSlinker-BsIA
模板 mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
10×Buffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.3ul
ddH2O: 30.8ul
总体积: 50ul
温度为 68.8 度

目的基因: mHoneydew-TEVinker-BsIA
模板 pET28a-mHoneydew-TEVinker-BsIA (50ng/ul) : 10ul
上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
10×Buffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.3ul

ddH₂O: 30.8ul

总体积: 50ul

温度为 68.8

姓名: 袁天一

目的基因: EBFP-GSlinker-BsIA

模板: 实验室制取的 EBFP-GSlinker-BsIA: 10ul

上游引物 (10uM): EBFP-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM): BsIA_R: 1ul

10xBuffer: 5ul

dNTP: 1ul

pfu 聚合酶: 1.2ul

ddH₂O: 31ul

总体积: 50.2ul

温度: 67°C

目的基因: EBFP-TEVlinker-BsIA

模板: 实验室制取的 EBFP-TEVlinker-BsIA: 10ul

上游引物 (10uM): EBFP-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM): BsIA_R: 1ul

10xBuffer: 5ul

dNTP: 1ul

pfu 聚合酶: 1.2ul

ddH₂O: 31ul

总体积: 50.2ul

温度: 67°C

姓名: 王涵右

目的基因: *BsIA*

模板 BsIA: 10ul

上游引物 (10uM) BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

10xBuffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.25ul

ddH₂O: 30.75ul

总体积: 50ul

Tm 值为 (59 度)

目的基因: RGD-GSlinker-BsIA
模板: RGD-GSlinker-BsIA: 10ul
上游引物 (1uM) RGD-BsIA_F: 1ul
下游引物 (1uM) BsIA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.25ul
ddH2O: 30.75ul
总体积: 50ul
Tm 值为 (60.7)

目的基因: ~~*LL37-GSlinker-BsIA*~~
模板 LL37-GSlinker-BsIA: 10ul
上游引物 (10uM) LL37-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.25ul
ddH2O: 30.75ul
总体积: 50ul
Tm 值为 (60.7)

目的基因: ~~*LL37*~~
模板 LL37-GSlinker-BsIA: 10ul
上游引物 (10uM) LL37-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) LL37_R: 10ul
10xBuffer : 5ul
dNTP (10uM) : 1ul
pfu 聚合酶 : 1.25ul
ddH2O: 21.75ul
总体积: 50ul
Tm 值为 (55)

胶回收

姓名：马晨璋

操作步骤：

琼脂糖凝胶电泳后，将单一的目的 mOrange DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下，放入干净的离心管中。

向胶块中加入 1.5ml 溶胶液,55℃水浴放置 10min，期间不断温和地上下翻转离心管，使胶块充分溶解。

将上一步所得溶液放置室温后加入一个吸附柱中,12000rpm 离心 1min，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

向吸附柱中加入 600ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min，丢弃废液。

向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

12000rpm 离心 2min，将吸附柱敞口置于室温放置 2 分钟，将吸附柱中残余的漂洗液去除。

将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加适量经 65℃水浴预热的 ddH₂O，12000rpm 离心一分钟。

将 DNA 产物于 -20℃保存。

姓名：姜羽柠

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的 DNA 条带，放入 EP 管中

加入胶溶液至管内 1.5ml，并 55℃水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次）

12000rpm，2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，60℃的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心

丢弃吸附柱，保留 EP 管内液体，标记为 13，管壁上标记 7.11

放入-20℃冰箱保存

转化

姓名：张瀚霖

从-80℃取出感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和含有卡那霉素的 LB 固体培养基放置备用

设置 42℃水浴锅备用

在超净台中加入 BslI 质粒并在感受态上标记后冰浴 30min

在 41.4（实验意外导致这一步没有正好 42℃的水浴锅）℃水浴锅中热击 90s
冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h

3500 转离心 5 分钟

抽取 500ul 上清后在超净台中重悬

涂布并标记日期以及 BslA 质粒后放入恒温培养箱中过夜

姓名：王思瀚

从-80℃取出感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和含有卡那霉素的 LB 固体 培养基放置备用

设置 42℃水浴锅备用

在超净台中加入 HG 质粒并在感受态上标记后冰浴 30min

在 41.4（实验意外导致这一步没有正好 42℃的水浴锅）℃水浴锅中热击 90s
冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h

3500 转离心 5 分钟

抽取 500ul 上清后在超净台中重悬

涂布并标记日期以及 HG 质粒后放入恒温培养箱中过夜

姓名：张楷若

从-80℃取出感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和含有卡那霉素的 LB 固体 培养基放置备用

设置 42℃水浴锅备用

在超净台中加入 mLCC 质粒并在感受态上标记后冰浴 30min

在 41.4（实验意外导致这一步没有正好 42℃的水浴锅）℃水浴锅中热击 90s
冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h

3500 转离心 5 分钟

抽取 500ul 上清后在超净台中重悬

涂布并标记日期以及 mLCC 质粒后放入恒温培养箱中过夜

接菌

姓名：张瀚霖

取出放置在恒温培养箱中的 PETase-GSlinker-BslA 平板，以及 LB 液体培养基和卡那霉素

在 LB 液体培养基中加入 5ul 的卡那霉素

在超净台中用枪头挑出菌落，放入到 LB 培养基。吹吸，以保证菌落确实地进入小管。（由于挑走了整个菌落，所以并没有标记对应的菌落）

标记小管为 PETase-BsLA

将 LB 液体培养基封装好后放入到 37℃ 摇床中 180 转培养（上下两处皮筋，外加封装膜。上面的皮筋要系住小管而不是管帽）

将用过的平板用封口膜封好，放到-4℃ 冰箱保存

7.12 实验

保甘油菌、提质粒

转化

姓名：张瀚霖、王思瀚、娄果多

从-80℃取出感受态 BL21 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和含有卡那霉素的 LB 固体培养基放置备用

设置 42℃ 水浴锅备用

在超净台中加入 BslA 质粒并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃ 水浴锅中热击 90s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃ 摇床，180 转 培养 1h

3500 转离心 5 分钟

抽取出 500ul 上清后在超净台中重悬

涂布并标记日期以及 BslA 质粒后放入恒温培养箱中过夜

PCR

姓名：张楷若

体系为 20ul

模板 mPETase 2ul （以自己提的质粒为模板

上游引物 mPETase_F （1uM）： 4ul

下游引物 mPETase_R （1uM）： 4ul 取 1uL 配好的 10uM 引物+加 9ul ddH2O

10xBuffer ： 2ul

dNTP （1uM）： 4ul 取 1uL dNTP+9uL ddH2O

pfu 聚合酶： 0.5ul

dd 水： 4.5ul

四个 PCR 小管分别是： 60.7℃， 62.1℃， 64.7℃， 55.2℃ （均 p 出来了

姓名：张瀚霖

体系为 20ul

目的基因: PETase-GSlinker-BsIA

模板: PETase-GSlinker-BsIA 1ul (自己提的)

上游引物 PETase_F (1uM): 4ul

下游引物 BsIA_R (10uM): 0.4ul

10xBuffer : 2ul

dNTP (10uM) : 0.4ul

pfu 聚合酶 : 0.5ul

dd 水: 12ul

分别做三管, 标注为 PET-BS1、PET-BS2、PET-BS3, TM 值分别为 55°C、60.75°C、62°C

目的基因: PETase

模板: PETase-GSlinker-BsIA 3ul (自己提的)

上游引物 PETase_F (1uM): 12ul

下游引物 PETase_R (10uM): 1.2ul

10xBuffer : 6ul

dNTP (10uM) : 1.2ul

pfu 聚合酶 : 1.5ul

dd 水: 24ul

分装到三管中, 标注为 PET1、PET2、PET3, TM 值分别为 55°C、61.5°C、62.3°C

目的基因: mLCC-GSlinker-BsIA

模板: mLCC-GSlinker-BsIA 3ul (自己提的)

上游引物 ICCG_F (10uM): 1.2ul

下游引物 BsIA_R (10uM): 1.2ul

10xBuffer : 6ul

dNTP (10uM) : 1.2ul

pfu 聚合酶 : 1.5ul

dd 水: 36ul (这里水加少了, 改数的时候没有重新全改, 应该为 45ul)

分装到三管中, 标注为 mLCC-BS1、mLCC-BS2、mLCC-BS3, TM 值分别为 55°C、58.7°C、62.8°C

目的基因: mLCC

模板: mLCC-GSlinker-BsIA 3ul (自己提的)

上游引物 ICCG_F (10uM): 1.2ul

下游引物 ICCG_R (10uM): 1.2ul

10xBuffer : 6ul

dNTP (10uM) : 1.2ul

pfu 聚合酶 : 1.5ul

dd 水: 45ul

分装到三管中, 标注为 mLCC1、mLCC2、mLCC3, TM 值分别为 55°C、57.35°C、61.2°C

琼脂糖凝胶电泳检测

姓名: 袁天一

量取~250ml 纯水, 加入 5ml 50xTAE 缓冲液。称量 3g 琼脂糖溶于缓冲液中, 置于微波炉加热至沸腾。关闭微波炉, 轻微摇晃。重复加热、摇晃, 直至全部琼脂糖溶化。

在水龙头下冲洗烧杯, 待其稍稍降温后加入 40ul 核酸染料。轻微晃动烧杯摇匀。

在配胶槽上安装 2 列梳子, 随后倒入配好的胶。今日取胶时, 胶并未完全凝固, 导致下层 加样孔出现变浅、收缩的问题。待胶凝固后, 放入电泳槽。由于 TAE 缓冲液不足, 又另配了 500mlTAE 缓冲液, 使用 150ml, 剩余 350ml 封装冷藏。

胶回收

姓名: 张楷若

操作步骤:

琼脂凝胶电泳后, 切下目的的三条 mPETase 条带, 平均放入两个 EP 管中

在每一个 EP 管中加溶胶液 (使用 750uL 量程) 直至没过胶块, 并在 55°C 水浴加热并上下翻转, 直到胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱, 进行 12000rpm, 1min 离心, 弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液, 12000rpm, 1min 离心 (进行 2 次), 弃废液

12000rpm, 2min 空离, 丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 65°C 的水 (中央悬空滴在吸附膜上), 静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心

, 保留 EP 管内液体, 标记为 13, 管壁上标记 mPETase PCR 产物 7.12

放入-20°C 冰箱保存

7.13 实验

PCR

姓名：张瀚霖

目的基因：PETase

模板 PETase-GSlinker-BslA (50ng/ul) : 9ul

上游引物 (1uM) EGFP-BslA_F: 30ul

下游引物 (1uM) EGFP_R: 30ul

10xBuffer : 15ul

dNTP (10uM) : 6ul

pfu 聚合酶 : 3.9ul

ddH2O: 60ul

总体积: 150ul

分装为三管，每管 50ul

标注为 PET1、2、3 温度梯度为 55°C

姓名：王思瀚

体系*3

目的基因：HGFI

模板 HGFI 质粒 (50ng/ul) : 3ul

上游引物 (10uM) HGFI-F: 1ul

下游引物 (10uM) ICCG-HG-R: 1ul

10xBuffer : 5ul

dNTP (10uM) : 1ul

pfu 聚合酶 : 1.3ul

ddH2O: 38ul

胶回收

姓名：张瀚霖、姜果多

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的的三条 PETase 和三条 HFDNA 条带，每一种条带分别放入两个 EP 管中（加快溶胶速度）

在每一个 PE 管中加满溶胶液，并在 55°C 水浴加热并上下翻转，直到胶完全融化
将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm, 1min 离心，弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm, 1min 离心（进行 2 次），弃废液

12000rpm, 2min 空离，丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散
加入 30ul, 65°C 的水 (中央悬空滴在吸附膜上), 静置 2min 后 12000rpm,
1min 离心
, 保留 EP 管内液体, 标记为 13, 管壁上标记 7.13
放入-20°C 冰箱保存

提质粒

500mlTAE 缓冲液, 使用 150ml, 剩余 350ml 封装冷藏。

7.15 实验

PCR

姓名: 王京典

目的基因: EGFP-GSlinker
模板 EGFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul
2xPFM mix: 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul

目的基因: EGFP-TEVlinker
模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul
2xPFM mix : 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul

姓名: 王涵右

目的基因: *BsIA*
模板 BsIA: 1.5ul
上游引物 (10uM) BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul
2*PFM mix 25ul

ddH₂O: 19.5ul
总体积: 50ul
T_m 值为 (59.5 度) 标记三角形

目的基因: RGD-GSlinker-BsIA
模板: RGD-GSlinker-BsIA: 1.5ul
上游引物 (1uM) RGD-BsIA_F: 2ul
下游引物 (1uM) BsIA_R: 2ul
2*PFM mix 25ul
ddH₂O: 19.5ul
总体积: 50ul
T_m 值为 (59.5 度) 标记正方形

目的基因: *LL37-GSlinker-BsIA*
模板 LL37-GSlinker-BsIA: 1.5ul
上游引物 (10uM) LL37-BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul
2*PFM mix 25ul
ddH₂O: 19.5ul
总体积: 50ul
T_m 值为 (59.5 度) 标记星形

目的基因: *LL37*
模板 LL37-GSlinker-BsIA: 1.5ul 上游引物 (10uM) LL37-BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) LL37_R: 20ul
2*PFM mix 25ul
ddH₂O: 1.5ul
总体积: 50ul
T_m 值为 (59.5 度) 标记 圈叉

姓名: 姜羽柠

目的基因: EGFP
模板: EGFP-TEVlinker-BsIA (ng/ul) : 3ul
上游引物: EGFP-BsIA_F (10uM) : 2ul
下游引物: EGFP_R (1uM) : 20ul
2xPFM mix: 25ul
总体积: 50ul

Tm 值为 55°C，标记为 1

pcr 样品用完务必放回冰箱

姓名：李宁静

目的基因：mHoneydew-GSlinker-BsIA

模板 mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

2*PFM Mix: 25ul

ddH2O: 18ul

总体积: 50ul

温度为 59 度

目的基因：mHoneydew-TEVinker-BsIA

模板 pET28a-mHoneydew-TEVinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul

上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul

2*PFM Mix: 25ul

ddH2O: 18ul

总体积: 50ul

温度为 59 度

回收 PCR 产物

将 PCR 产物与 50ul 凝胶液混合加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心，弃废液

12000rpm，2min 空离，丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，55°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上）

静置 2min 后 12000rpm，1min 离心，保留 EP 管内液体

分别标记为 7.15 回收 mh-GS，7.15 回收 mh-TEV

密度分别为 164.6ng/ul，203.6ng/ul

姓名：王思瀚

目的基因：mHGFI

模板 mHGFI 质粒 (50ng/ul) : 3ul

上游引物 (1uM) mHGFI-F: 2ul
下游引物 (1uM) ICCG-HG-R: 2ul
2*PFM Mix: 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul

温度设置为 64.6°C, 配六管

姓名: 张瀚霖

目的基因: PETase
模板 PETase-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (1uM) PETase_F: 10ul
下游引物 (1uM) BsIA_R: 10ul
2*PFM Mix: 25ul
ddH2O: 2ul
总体积: 50ul 温度设置为 55°C, 配六管

姓名: 刘铠铭

目的基因: mOrange-GSlinker-BsIA
模板 mOrange -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
2*PFM Mix: 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul
温度:59°C

目的基因: mOrange-TEVinker-BsIA
模板 mOrange-TEVinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 1ul
2*PFM Mix: 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul
温度:59°C

姓名: 马晨璋

目的基因: mHonydew

模板 mHoneydew -GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) mHoneydew-BsIA_F: 1ul
下游引物 (1uM) mHoneydew_R: 10ul
2*PFM Mix: 25ul
ddH2O: 11ul
总体积: 50ul
温度:55°C

目的基因: mOrange
模板 mOrange-TEVinkor-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) mOrange-BsIA_F: 1ul
下游引物 (1uM) mOrange_R: 10ul
2*PFM Mix: 25ul
ddH2O: 11ul
总体积: 50ul
温度:55°C

姓名: 袁天一

目的基因: EBFP-GSlinker-BsIA
模板 EBFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul
2*PFM mix: 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul

目的基因: EBFP-TEVlinker-BsIA
模板 EBFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 3ul
上游引物 (10uM) EBFP-BsIA_F: 2ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul
2*PFM mix : 25ul
ddH2O: 18ul
总体积: 50ul

双酶切

姓名: 张楷若

浓度检测：mPETase: 36.9 ng/uL

pET28a(第一管) : 154.85 ng/uL

pET28a(第二管) : 180.55 ng/uL

目的基因酶切:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 1uL

Xohl 1uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 23uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)

ddH2O 20uL (补足至 50uL)

载体酶切

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 16uL

ddH2O 24uL (补足至 50uL)

载体酶切

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 14uL

ddH2O 26uL (补足至 50uL)

将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C

PCR 产物回收 (非胶体系)

姓名: 袁天一

操作步骤:

将 PCR 产物小量(5ul)跑胶, 确定产物为目的基因后, 将 PCR 管内产物转移至吸附柱上, 加入 40ul 溶胶 buffer, 略微晃动摇匀, 离心 12000rpm/1 分钟, 弃废液。加入 600ul 洗涤液, 离心 12000rpm/1 分钟, 弃废液, 空转离心 12000rpm/2 分钟。随后敞口平放, 待酒精气味 消散后准备洗脱。将 ddH2O 置于 65 度金属浴上, 取 30ul 直接滴加在吸附柱滤膜上, 静置, 随后离心 12000rpm/2 分钟。所得产物标定浓度, -GSlinker 浓度约 16ng/ul, -TEVlinker 浓度约 137ng/ul.

胶回收

姓名：张楷若

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的的三条 mPETase, pET28a, pET28a 条带，分别放入两个 EP 管

在每一个 EP 管中加溶胶液（使用 750uL 量程）直至没过胶块，并在 55°C 金属浴并上下翻转，直到胶完全融化（5min 左右，融化即可

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次），弃废液

12000rpm，2min 空离，丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，60°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心

，保留 EP 管内液体，弃吸附柱，管壁盖上标记 mPETase 双酶切产物 7.15/
pET28a 双酶切产物 7.15

放入-20°C 冰箱 3 号盒子保存

姓名：张瀚霖

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的 6 条 PETase 条带（800bp），分别放入 3 个 EP 管

在每一个 EP 管中加溶胶液（使用 750uL 量程）直至没过胶块，并在 55°C 金属浴并上下翻转，直到胶完全融化（融化即可）**胶切的太大了，导致胶没有完全溶解损失了一定溶液以及胶**

将溶解后的胶溶液少量多次加入一个吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次），弃废液

12000rpm，2min 空离，丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，65°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心

，保留 EP 管内液体，弃吸附柱，管壁盖上标记 PETase PCR 产物 7.16

放入-20°C 冰箱 3 号盒子保存

7.16 实验

胶回收

姓名：张瀚霖

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的的 6 条 PETase 条带（800bp），分别放入 3 个 EP 管

在每一个 EP 管中加溶胶液（使用 750uL 量程）直至没过胶块，并在 55°C 金属浴并上下翻转，直到胶完全融化（融化即可）**胶切的太大了，导致胶没有完全溶解损失了一定溶液以及胶**

将溶解后的胶溶液少量多次加入一个吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次），弃废液

12000rpm，2min 空离，丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，65°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心

，保留 EP 管内液体，弃吸附柱，管壁盖上标记 PETase PCR 产物 7.16

放入-20°C 冰箱 3 号盒子保存

姓名：娄果多

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的的 6 条 mHF 条带（248bp），分别放入 3 个 EP 管

在每一个 EP 管中加溶胶液（使用 750uL 量程）直至没过胶块，并在 55°C 金属浴并上下翻转，直到胶完全融化（融化即可）**胶切的太大了，导致胶没有完全溶解损失了一定溶液以及胶**

将溶解后的胶溶液少量多次加入一个吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，弃废液

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次），弃废液

12000rpm，2min 空离，丢掉吸附柱

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，65°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心

，保留 EP 管内液体，弃吸附柱，管壁盖上标记 PETase PCR 产物 7.16

放入-20°C 冰箱 3 号盒子保存姓名：王京典

琼脂凝胶电泳后，切下目的 DNA 条带，放入 EP 管中

加入胶溶液至管内 1.5ml，并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次）

12000rpm, 2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 60°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心

丢弃吸附柱，保留 EP 管内液体，放入-20°C 冰箱 1 号盒子保存

姓名：刘铠铭

操作步骤：

（使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。）

1、琼脂糖凝胶电泳后，将目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下尽量切除多余部分，切成小块放入干净的 PE 管中。

2、向胶块中加入溶胶液使得溶胶液没过提取的凝胶,55°C水浴放置 10min，期间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。得到淡黄色液体。如果溶胶液变为红色，可向含有 DNA 的胶溶液中加入 10-30ul 3M 醋酸钠将胶溶液调为淡黄色。

3、将上一步所得溶液加入一个吸附柱中,12000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。

4、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液,12000rpm 离心 1min，丢弃废液。

5、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。

6、12000rpm 离心 2min，尽量除去漂洗液。将吸附柱敞口置于室温或 50°C 温箱放置数分钟直到没有气味，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，防止漂洗液中的乙醇影响后续的实验。

7、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加适量经 65°C 水浴预热的洗脱液，室温放置直到没有气味，12000 转离心一分钟。

8、DNA 产物 - 20°C 保存。

最终回收的质粒浓度为：3.25ng/ul

姓名：姜羽柠

操作步骤：

琼脂凝胶电泳后，切下目的 DNA 条带，放入 EP 管中

加入胶溶液至管内至没过胶块，并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次）

12000rpm，2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 60°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心

丢弃吸附柱，保留 EP 管内液体，标记为 13，管壁上标记 7.16

放入-20°C 冰箱保存

姓名：李宁静

操作步骤:

琼脂凝胶电泳后, 切下目的 DNA 条带, 放入 EP 管中

加入胶溶液至管内至没过胶块, 并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱, 进行 12000rpm, 1min 离心, 将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液, 12000rpm, 1min 离心 (进行 2 次)

12000rpm, 2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 65°C 的水 (中央悬空滴在吸附膜上), 静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心

丢弃吸附柱, 保留 EP 管内液体, 标记为 mhGS, mhTEV, 管壁上分别标记 7.16pcr

放入-20°C 冰箱保存

密度分别: 144.85ng/ul, 125.70ng/ul

姓名: 王涵右

操作步骤:

(使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇, 加入体积请参照瓶体上的标签。)

- 1、琼脂糖凝胶电泳后, 将目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下尽量切除多余部分, 切成小块放入干净的 PE 管中。
- 2、向胶块中加入溶胶液使得溶胶液没过提取的凝胶, 55°C 水浴放置 10min, 期间不断温和地上下翻转离心管, 以确保胶块充分溶解。得到淡黄色液体。如果溶胶液变为红色, 可向含有 DNA 的胶溶液中加入 10-30ul 3M 醋酸钠将胶溶液调为淡黄色。
- 3、将上一步所得溶液加入一个吸附柱中, 12000rpm 离心 30-60 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附柱重新放入收集管中。
- 4、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液, 12000rpm 离心 1min, 丢弃废液。
- 5、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液, 12000rpm 离心 1min, 弃废液, 将吸附柱放入收集管中。
- 6、12000rpm 离心 2min, 尽量除去漂洗液。将吸附柱敞口置于室温或 50°C 温箱放置数分钟直到没有气味, 目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除, 防止漂洗液中的乙醇影响后续的实验。
- 7、将吸附柱放入一个干净的离心管中, 向吸附膜中央悬空滴加适量经 65°C 水浴预热的洗脱液, 室温放置直到没有气味, 12000 转离心一分钟。
- 8、DNA 产物 - 20°C 保存。

双酶切

姓名: 张瀚霖、娄果多

浓度检测:

PETase: 259.50 ng/uL

mHF: 29.70 ng/uL

pET28a(第一管) + pET28a(第二管) : 192.90 ng/uL

目的基因酶切 mHF:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 1uL

Xohl 1uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 21uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
ddH2O 22uL (补足至 50uL)

载体酶切 PET28a:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 14.3uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
ddH2O 25uL (补足至 50uL)

目的基因酶切 PETase:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 10.0uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
ddH2O 30uL (补足至 50uL)

将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C

姓名: 刘铠铭

浓度检测: pET28a(汇总) : 164 ng/uL

载体酶切:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 16uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
ddH2O 24uL (补足至 50uL)

将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C

姓名: 马晨璋

浓度检测: pET28a(汇总) : 164 ng/uL

载体酶切:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

XohI 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 16uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
ddH₂O 24uL (补足至 50uL)

将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C

姓名: 李宁静

浓度检测: pET28a(汇总) : 164 ng/uL

载体酶切:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

XohI 2.5uL

目的基因 (mPETasePCR 产物) 16uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
ddH₂O 24uL (补足至 50uL)

将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C

连接

姓名: 张楷若

体系 20uL (PCR 小管)

目的片段 (mPETase) 5.5uL

载体片段 (pET8a) 11.5uL

10xT4 Buffer 2uL (固定, 需完全融化再加)

T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 直至周一取出

姓名: 张瀚霖

浓度:

PETase: 259.5ng/ul

PET28a:3.25ng/ul

体系 10uL (EP 管)

目的片段 (PETase) 0.25uL
载体片段 (pET8a) 8.3uL
10×T4 Buffer 1uL (固定, 需完全融化再加)
T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)
4°C 保存

姓名: 娄果多

浓度:

PETase: 19.4ng/ul
pET28a:3.25ng/ul
体系 10uL (EP 管)
目的片段 (PETase) 0.3uL
载体片段 (pET8a) 8uL
10×T4 Buffer 1uL (固定, 需完全融化再加)
T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)
4°C 保存

PCR

姓名: 王京典

目的基因: EGFP-GSlinker
模板 EGFP-GSlinker-BsIA (50ng/ul) : 9ul
上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 6ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 6ul
2×PFM mix: 75ul
ddH2O: 54ul
总体积: 150ul
分装成三份 温度为 56 度

目的基因: EGFP-TEVlinker
模板 EGFP-TEVlinker-BsIA (50ng/ul) : 9ul
上游引物 (10uM) EGFP-BsIA_F: 6ul
下游引物 (10uM) BsIA_R: 6ul
2×PFM mix : 75ul
ddH2O: 54ul
总体积: 150ul
分装成三份 温度为 56 度

姓名：姜羽柠

目的基因：EGFP

模板：EGFP-TEVlinker-BsIA（50ng/ul）：9ul

上游引物：EGFP-BsIA_F（10uM）：6ul

下游引物：EGFP_R（1uM）：60ul

2xPFM mix：75ul

总体积：150ul

Tm 值为 55°C，三管分别标记为 11，12，13

目的基因：EBFP

模板：EBFP-GSlinker-BsIA（未测量浓度）：12ul（加入了剩余的全部模板）

上游引物（10uM）EGFP-BsIA_F：6ul

下游引物（1uM）EBFP_R：60ul

2xPFM mix：75ul

ddH2O：0ul

总体积：153ul

分装成三份 温度分别为 59.1°C、62.25°C、55°C，标记为 21，22，23

姓名：李宁静

名称：目的基因酶切

目的基因：mhoneydew-GSlinker-BsIA(浓度为 144.85ng/ul)：17.3ul

10xGreen Buffer：5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

ddH2O：22.7ul

目的基因：mhoneydew-GSlinker-BsIA(浓度为 125.70ng/ul)：19.9ul

10xGreen Buffer：5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

ddH2O：20.1ul

37 度金属浴 1h，直接放入胶内进行跑胶

7.18 实验

双酶切

姓名：姜羽柠

浓度检测：

EGFP: 216 ng/uL——17ng/ul

EBFP: 118ng/uL——33ng/ul

pET28a(第一管) + pET28a(第二管) : 不记得了, 明天检查实验笔记进行补充

目的基因酶切 EGFP:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (EGFP PCR 产物) 11uL

ddH2O 29uL (补足至 50uL)

目的基因酶切 EBFP:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (EBFP PCR 产物) 21uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)

ddH2O 19uL (补足至 50uL)

姓名：王京典

浓度检测：

EGFP-GSlinker: 279 ng/uL——38ng/ul

EGFP-TEVlinker: 202ng/uL——18ng/ul

目的基因酶切 EGFP-GSlinker:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (GSlinker PCR 产物) 9uL

ddH2O 31uL (补足至 50uL)

目的基因酶切 EBFP:

10xGreen Buffer 5uL

BamH I 2.5uL

Xohl 2.5uL

目的基因 (TEVlinker PCR 产物) 12.4uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)

ddH2O 27.6uL (补足至 50uL)

将 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C

姓名: 刘铠铭

名称: 目的基因酶切

目的基因: mOrange-GSlinker-BsIA(浓度为 194ng/ul) : 13ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

ddH2O: 27ul

总体系: 50ul

目的基因: mOraneg-TEVlinker-BsIA(浓度为 196ng/ul) : 13ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

ddH2O: 27ul

总体系: 50ul

37°C 金属浴 1h, 上样, 跑胶(无需 85°C 15min 灭活)

目的基因双酶切

姓名: 马晨璋

目的基因: mHoneydew (浓度 26.5ng/ul)

10*Green buffer 5ul

Bam I 1ul

Xho I 1ul

目的基因 mHoneydew 30ul

ddH2O 13ul

体系 50ul

37°C 金属浴 1h 后上样琼脂糖凝胶

目的基因: mOrange (浓度 88.65ng/ul)

10*Green buffer 5ul

Bam I 2.5ul

Xho I 2.5ul

目的基因 mOrange 30ul

ddH2O 0ul

体系 50ul

37°C金属浴 1h 后上样琼脂糖凝胶

姓名：王涵右

名称：目的基因酶切

目的基因：RGD-GSlinker-BslA(浓度为 72ng/ul)：30ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2ul

Xho1: 2ul

ddH2O: 11ul

总体系：50ul

姓名：袁天一

目的基因：EBFP-TEVlinker-BslA (136ng/ul)：8ul

10x Green Buffer: 5ul

BamH1: 1ul

Xho1: 1ul

ddH2O: 35ul

总体系：50ul

在 37 度金属浴（或恒温箱）内酶切 1 小时，随后转 85 度金属浴灭活，跑胶（已溶胶，未洗 涤）

姓名：李宁静

名称：目的基因酶切

目的基因：mhoneydew-GSlinker-BslA(浓度为 144.85ng/ul)：17.3ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

ddH2O: 27ul

总体系：50ul

目的基因：mhoneydew-TEVlinker-BslA(浓度为 125.70ng/ul)：19.9ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

ddH2O:

总体系：50ul

37°C 金属浴 1h，上样，跑胶(无需 85°C 15min 灭活)

胶回收

mHGFI 胶回收

mHGFI 浓度: 23.4ng/ul

接小管*3

mHGFI 做 pcr50ul 体系*6, 放入 pcr 仪运行

姓名: 王思瀚

琼脂凝胶电泳后, 切下目的 DNA 条带, 放入 EP 管中

加入胶溶液至恰好没过胶体, 并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱, 进行 12000rpm, 1min 离心, 将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液, 12000rpm, 1min 离心 (进行 2 次)

12000rpm, 2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 60°C 的水 (中央悬空滴在吸附膜上), 静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心

丢弃吸附柱, 保留 EP 管内液体, 标记 HG 胶回收, 23.4ng/ul

姓名: 姜羽柠

操作步骤:

琼脂凝胶电泳后, 切下目的 DNA 条带, 放入 EP 管中

加入胶溶液至管内至没过胶块, 并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱, 进行 12000rpm, 1min 离心, 将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液, 12000rpm, 1min 离心 (进行 2 次)

12000rpm, 2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul, 60°C 的水 (中央悬空滴在吸附膜上), 静置 2min 后 12000rpm, 1min 离心 (忘记静置 2min)

取 EP 管管底液体, 再次中央悬空滴在吸附膜上, 12000rpm, 1min 离心

丢弃吸附柱, 保留 EP 管内液体, 分别标记为 1 EGFP 切; 2 EBFP 切, 管壁上标记 7.18

放入-20°C 冰箱保存

姓名: 王京典

琼脂凝胶电泳后，切下目的 DNA 条带，放入 EP 管中
加入胶溶液至恰好没过胶体，并 55°C 水浴加热至胶完全融化
将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，将管底废液扔进废液桶
加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次）
12000rpm，2min 离心
静置数分钟至无水乙醇味道完全消散
加入 30ul，60°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心
丢弃吸附柱，保留 EP 管内液体，放入-20°C 冰箱 1 号盒子保存

姓名：李宁静

琼脂凝胶电泳后，切下目的 DNA 条带，放入 EP 管中
加入胶溶液至恰好没过胶体，并 55°C 水浴加热至胶完全融化
将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，将管底废液扔进废液桶
加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次）
12000rpm，2min 离心
静置数分钟至无水乙醇味道完全消散
加入 30ul，60°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心
丢弃吸附柱，保留 EP 管内液体，分别标记为 mhGS 酶切 7.18，mhTEV 酶切 7.18 放入-20°C 冰箱保存

姓名：刘铠铭

操作步骤：

（使用前请先在漂洗液中加入无水乙醇，加入体积请参照瓶体上的标签。）

- 1、琼脂糖凝胶电泳后，将 mOrange-TEVlinker-BslI 目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下尽量切除多余部分，切成小块放入干净的 PE 管中。（mOrange-GSlinker-BslI 的酶切失败了）
- 2、向胶块中加入溶胶液使得溶胶液没过提取的凝胶，55°C 水浴放置 10min，期间不断温和地上下翻转离心管，以确保胶块充分溶解。得到淡黄色液体。如果溶胶液变为红色，可向含有 DNA 的胶溶液中加入 10-30ul 3M 醋酸钠将胶溶液调为淡黄色。
- 3、将上一步所得溶液加入一个吸附柱中，12000rpm 离心 30-60 秒，倒掉收集管中的废液，将吸附柱重新放入收集管中。
- 4、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，丢弃废液。
- 5、向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，12000rpm 离心 1min，弃废液，将吸附柱放入收集管中。
- 6、12000rpm 离心 2min，尽量除去漂洗液。将吸附柱敞口置于室温或 50°C 温箱放置数分钟直到没有气味，目的是将吸附柱中残余的漂洗液去除，防止漂洗液中的乙醇影响后续的实验。
- 7、将吸附柱放入一个干净的离心管中，向吸附膜中央悬空滴加适量经 65°C 水浴预热的洗脱液，室温放置直到没有气味，12000 转离心一分钟。
- 8、DNA 产物 - 20°C 保存。

mOrange-TEVlinker-BsIA 最终浓度为：20.5ng/ul

姓名：马晨璋

琼脂凝胶电泳后，切下目的 DNA 条带，放入 EP 管中

加入胶溶液至恰好没过胶体，并 55°C 水浴加热至胶完全融化

将溶解后的胶少量多次加入吸附柱，进行 12000rpm，1min 离心，将管底废液扔进废液桶

加入 600ul 含无水乙醇的漂洗液，12000rpm，1min 离心（进行 2 次）

12000rpm，2min 离心

静置数分钟至无水乙醇味道完全消散

加入 30ul，60°C 的水（中央悬空滴在吸附膜上），静置 2min 后 12000rpm，1min 离心

丢弃吸附柱，保留 EP 管内液体，分别标记为 mH 酶切 7.18 浓度 13ng/ul，mO 酶切 7.18 浓度 25.2ng/ul 放入 -20°C 冰箱保存

PCR

姓名：马晨璋

目的基因： *LL37-GSlinker-BsIA*

模板 LL37-GSlinker-BsIA: 5ul

上游引物（10uM）LL37-BsIA_F: 2ul

下游引物（10uM）BsIA_R: 2ul

2*PFM mix 25ul

ddH2O: 16ul

总体积：50ul

Tm 值为（59.5 度）标记二

目的基因： *LL37*

模板 LL37-GSlinker-BsIA: 5ul

上游引物（10uM）LL37-BsIA_F: 2ul

下游引物（10uM）LL37_R: 20ul

2*PFM mix 25ul

ddH2O: 无

总体积：52ul

Tm 值为（59.5 度）标记一

姓名：袁天一

目的基因: EBFP-GSlinker-BsIA

模板: EBFP-GSlinker-BsIA: 3ul

上游引物 (10uM) EBFP-BsIA-F: 2ul

下游引物 (10uM) BsIA_R: 2ul

2xPFM mix: 25ul

ddH₂O: 18ul

总体积: 50ul

置于 PCR 仪左数第 6 个孔内 (59.5°), 标记为 G_s (绕着 PCR 管外一圈画一个大大的 G, 在 G 的中间写一个小小的 s)

7.19 实验

质粒小提

姓名: 袁天一

1. 将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管 (15ml) 内, 离心 12000RPM 1 分钟, 尽可能地去除上清。
2. 加入悬菌缓冲液 RB 750ul, 剧烈摇晃试管 (可以吹吸), 直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。
3. 加入裂解缓冲液 LB 750ul, 略微摇晃, 直至菌液变得清澈透明。
4. 快速加入中和缓冲液 NB 1050ul, 立刻摇晃, 直至白色絮状沉淀聚集。
5. 离心 12000RPM 5 分钟, 吸上清。由于第一次离心后效果不好, 又再次离心了 5 分钟, 发现仍有少量菌体在上清液中。将上清液吸出, 分装至 3 个吸附管内。
6. 将吸附柱离心 12000RPM 1 分钟, 弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB, 离心 12000RPM 1 分钟, 弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟, 弃剩余废液。
7. 将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱, 离心 12000RPM 2 分钟。
8. 检测浓度 (仪验丁真, 鉴定为 123.25ng/ul)

姓名: 王涵右

将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管 (15ml) 内, 离心 12000RPM 1 分钟, 尽可能地去除上清。

加入悬菌缓冲液 RB 750ul, 剧烈摇晃试管 (可以吹吸), 直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。

加入裂解缓冲液 LB 750ul, 略微摇晃, 直至菌液变得清澈透明。

快速加入中和缓冲液 NB 1050ul, 立刻摇晃, 直至白色絮状沉淀聚集。

离心 12000RPM 5 分钟, 吸上清。由于第一次离心后效果不好, 又再次离心了 5 分钟, 发现仍有少量菌体在上清液中。将上清液吸出, 分装至 3 个吸附管内。

将吸附柱离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟，弃剩余废液。
每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱，将洗脱下的液体装在一个管中
测浓度浓度为 56ng/ul

姓名：李宁静

将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管（15ml）内，离心 12000rpm，1 分钟，尽可能地去掉上清。
加入悬菌缓冲液 RB 750ul，剧烈摇晃试管（可以直接吹吸），直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。
加入裂解缓冲液 LB 750ul，略微摇晃，直至菌液变得清澈透明。
快速加入中和缓冲液 NB 1050ul，立刻摇晃，直至白色絮状沉淀聚集。
离心 12000rpm，5 分钟，吸上清。将上清液吸出，分装至 3 个吸附管内。
将吸附柱离心 12000rpm，1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000rpm，1 分钟，弃废液。随后离心 12000rpm，2 分钟，弃剩余废液。
将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul，65°温水洗脱，离心 12000rpm，2 分钟。
检测浓度为 77.3ng/ul。

姓名：姜羽柠

将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管（15ml）内，离心 12000rpm，1 分钟，尽可能地去掉上清。（实验一开始分三小管转移，后面意识到可以直接用大离心管直接转移）
加入悬菌缓冲液 RB 650ul，剧烈摇晃试管（可以直接吹吸），直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。
加入蓝色裂解缓冲液 LB 650ul，略微摇晃，直至菌液变得清澈透明。
快速加入黄色中和缓冲液 NB 750ul，立刻摇晃，直至白色絮状沉淀聚集。
离心 12000rpm，5 分钟，吸上清。将上清液吸出，分装至 3 个吸附管内。
将吸附柱离心 12000rpm，1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000rpm，1 分钟，弃废液。随后离心 12000rpm，2 分钟，弃剩余废液。
将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul，65°温水洗脱，离心 12000rpm，2 分钟。
检测浓度为 39.95ng/ul
（浓度较低，可能是因为部分上清未被吸出，仅洗脱一次，或摇晃过于剧烈）

姓名：王涵右

将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管（15ml）内，离心 12000RPM 1 分钟，尽可能地去掉上清。

加入悬菌缓冲液 RB（含有无水乙醇） 750ul，剧烈摇晃试管（可以吹吸），直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。

加入裂解缓冲液 LB 750ul，略微摇晃，直至菌液变得清澈透明。

快速加入中和缓冲液 NB 1050ul，立刻摇晃，直至白色絮状沉淀聚集。

离心 12000RPM 5 分钟，吸上清。装至 1 个吸附管内。

将吸附柱重复离心 3 次 12000RPM 1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟，弃剩余废液。

每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱，

将洗脱下的液体装在一个管中，测浓度

浓度为 135ng/ul，体系约为 30ul

姓名：王京典

9. 将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管（15ml）内，离心 12000RPM 1 分钟，尽可能地去除上清。
10. 加入悬菌缓冲液 RB 750ul，剧烈摇晃试管（可以吹吸），直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。
11. 加入裂解缓冲液 LB 750ul，略微摇晃，直至菌液变得清澈透明。
12. 快速加入中和缓冲液 NB 1050ul，立刻摇晃，直至白色絮状沉淀聚集。
13. 离心 12000RPM 5 分钟，吸上清。将上清液吸出，分装至 3 个吸附管内。
14. 将吸附柱离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟，弃剩余废液。
15. 将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱，离心 12000RPM 2 分钟。
16. 检测浓度（8.65ng/ul）

姓名：马晨璋

1. 将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管（15ml）内，离心 12000RPM 1 分钟，尽可能地去除上清。
2. 加入悬菌缓冲液 RB 750ul，剧烈摇晃试管（可以吹吸），直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。
3. 加入裂解缓冲液 LB 750ul，略微摇晃，直至菌液变得清澈透明。
4. 快速加入中和缓冲液 NB 1050ul，立刻摇晃，直至白色絮状沉淀聚集。
5. 离心 12000RPM 5 分钟，吸上清。由于第一次离心后效果不好，又再次离心了 5 分钟，发现仍有少量菌体在上清液中。将上清液吸出，分装至 3 个吸附管内。
6. 将吸附柱离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟，弃剩余废液。
7. 将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱，离心 12000RPM 2 分钟。
8. 检测浓度（为 24.3ng/ul）

姓名：刘铠铭

1. 将 7.18 日实验时接到的 3 管菌液转移至一个大离心管（15ml）内，离心 12000RPM 1 分钟，尽可能地去掉上清。
2. 加入悬菌缓冲液 RB 750ul，剧烈摇晃试管（可以吹吸），直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。
3. 加入裂解缓冲液 LB 750ul，略微摇晃，直至菌液变得清澈透明。
4. 快速加入中和缓冲液 NB 1050ul，立刻摇晃，直至白色絮状沉淀聚集。
5. 离心 12000RPM 5 分钟，吸上清。由于第一次离心后效果不好，又再次离心了 5 分钟，发现仍有少量菌体在上清液中。将上清液吸出，分装至 3 个吸附管内。
6. 将吸附柱离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。加入 650ul 洗涤缓冲液 WB，离心 12000RPM 1 分钟，弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟，弃剩余废液。
7. 将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱，离心 12000RPM 2 分钟。
8. 检测浓度（为 20.5ng/ul）

转化

姓名：张楷若

从-80℃取出感受态 DH5α 放入冰盒中解冻、拿出 LB 液体培养基和 LB 卡那固体培养基放置备用

加 10uLmPETase 连接产物(没有在超净台里做)，并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 90s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h40min

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中重悬，吸 100uL 至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中

取出一一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜，将剩下的菌液在 4℃冰箱中保存

姓名：张瀚霖

从-80℃冰箱取出感受态细胞 DH5α，放在冰盒中解冻 30min，标注为 PETase 连接
将 10ul 的 PETase 连接体系加入感受态当中并且慢慢吹吸（这一步没有在超净台里做），再冰浴 30min

将 EP 管 42℃金属浴 90s

迅速将 EP 管放入冰盒中冰浴 150s

在超净台中加入无菌物抗的 LB 液体培养基，500ul 并吹吸

将 EP 管斜放在 37℃摇床 180 转摇 1 个小时 40 分钟

将 EP 管 3500 转离心 5min

在超净台中重悬菌液，吸取 100ul 加入到从 4℃ 冰箱中取出的 LB 固体培养基中，用一次性的塑料涂布棒涂布。

将涂好的平板放入到恒温培养箱中培养过夜，并且将剩下的菌液在 4℃ 冰箱中保存

双酶切

姓名：姜羽柠

浓度检测：

pET28a : 5.85ng/uL

载体酶切 PET28a:

10xGreen Buffer 10uL

BamH I 3.3uL

XohI 3.3uL

质粒 PET28a 83uL (所有加进去，酶与基因比例相对应)

ddH₂O 0uL (补足至 50uL)

将三个 EP 管金属浴 1h, 37℃

金属浴 15min, 85℃ (忘记金属浴灭活) ‘

姓名：王思瀚

pET28a 浓度 : 7.85ng/ul

mHGFI 浓度: 18.1ng/ul

目标基因酶切体系

10*Green Buffer: 30ul

BamHI: 15ul

XhoI: 15ul

mHGFI 酶切后: 240ul

载体酶切体系

10*Green Buffer: 25ul

BamHI: 7.5ul

XhoI: 7.5ul

PET28a 酶切后: 150ul

37℃ 恒温培养箱中培养 1h, 金属浴灭活 10min

姓名：王涵右

浓度检测:

pET28a :

载体酶切 PET28a:

10xGreen Buffer 10uL

BamH I 2.3uL

XohI 2.3uL

质粒 PET28a 40.4uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C 标记为 1 号

浓度检测:

pET28a :

载体酶切 PET28a:

10xGreen Buffer 10uL

BamH I 6.2uL

XohI 6.2uL

质粒 PET28a 109.6uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C 标记为 2 号

名称: 目的基因酶切

目的基因: LL37 : 40ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

总体系: 50ul

名称: 目的基因酶切

目的基因: LL37-Bsla : 40ul

10xGreen Buffer: 5ul

BamH 1: 2.5ul

Xho1: 2.5ul

总体系: 50ul

姓名: 刘铠铭

名称: 载体酶切

目的基因: pET28a: 19ul
10xGreen Buffer: 5ul
BamH 1: 2.5ul
Xho1: 2.5ul
ddH₂O: 21ul
总体系: 50ul

姓名: 王京典

浓度检测:

pET28a : 8.65ng/uL

载体酶切 PET28a:

10xGreen Buffer 10uL
BamH I 5uL
XohI 5uL
质粒 PET28a 54uL
ddH₂O 26uL

将三个 EP 管金属浴 1h, 37°C

金属浴 15min, 85°C (忘记金属浴灭活)‘

姓名: 袁天一

实验内容: 目的基因酶切

目的片段: EBFP-GS-BsIA

目的片段 PCR 产物: 160ul

BamH1: 10ul

Xho1: 10ul

10xGreen Buffer: 20ul

总体系: 200ul

置于 37°C 恒温箱酶切 1 小时, 随后置于 85°C 金属浴灭活 10 分钟, 转移至 4°C 储存, 等待纯化、连接。

姓名: 李宁静

浓度检测: pET28a : 77.25ng/ul

10xGreen Buffer 10uL

BamH I 5uL

XohI 5uL

质粒 PET28a 66.8uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)

金属浴 1h, 37°C
金属浴 15min, 85°C
两管, 但是在跑胶的时候胶漏掉了
重新和王京典的载体混合得到新浓度 98.15ng/ul
10xGreen Buffer 4uL
BamH I 3uL
Xohl 3uL
质粒 PET28a 30uL (所有加进去, 酶与基因比例相对应)
金属浴 1h, 37°C
金属浴 15min, 85°C

连接

姓名: 姜羽柠

EGFP 体系: 20uL

目的片段 (EGFP) 4.7uL
载体 (PET28a 浓度: 8.65ng/uL) 12.3uL
10xBuffer 2uL (固定, 需完全融化再加)
T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 直至明天取出

EBFP 体系: 20uL

目的片段 (EGFP) 4.5uL
载体 (PET28a 浓度: 5.85ng/uL) 12.5uL
10xBuffer 2uL (固定, 需完全融化再加)
T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 直至明天取出

姓名: 李宁静

体系: 20uL

目的片段 (mhoneydew-GSlinker-BslI 浓度: 28.4ng/ul) 9.71ul
载体 (PET28a 浓度: 36.1ng/ul) 7.28ul
10xBuffer 2uL (固定, 需完全融化再加)
T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 直至明天取出, 标记为 mhGS, 7.20 连接

体系：20uL

目的片段（mhoneydew-TEVlinker-BslA 浓度：21.0ng/ul） 10.97ul

载体（PET28a 浓度：36.1ng/ul） 6.03ul

10xBuffer 2uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出，标记为 mhTEV，7.20 连接

姓名：王涵右

RGD 体系：10uL

目的片段（RGD） 1.3uL

载体（PET28a 浓度：8.65ng/uL） 6uL

10xBuffer 1uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出

LL37 体系：10uL

目的片段（LL37） 0.42uL

载体（PET28a 浓度：5.85ng/uL） 7.6uL

10xBuffer 1uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出

LL37-Bsla 体系：10uL

目的片段（LL37-Bsla） 0.67uL

载体（PET28a 浓度：5.85ng/uL） 7.3uL

10xBuffer 1uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出

姓名：刘铠铭

mOrange-TEVlinker-BslA 体系：20uL

目的片段（mOrange-TEVlinker-BslA 浓度为 20ng/ul) 9.7uL

载体（PET28a 浓度：24ng/uL） 7.3uL

10xBuffer 2uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 链接一宿直至明天取出

姓名：王京典

体系：20uL

目的片段（EGFP-GSlinker 浓度： 38.35ng/ul）

载体（PET28a 浓度： 8.65）

10xBuffer 2uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出，标记为 GS，7.20 连接

体系：20uL

目的片段(EGFP-TEVlinker-BsIA 浓度： 18.95)

载体（PET28a 浓度： 8.65）

10xBuffer 2uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出，标记为 TEV，7.20 连接

姓名：王思瀚

体系：20ul

目的基因：2ul

PET28a：15ul

T4*Buffer: 2ul

T4 Ligase: 1ul

4°C 过夜培养

姓名：马晨璋

体系：17uL

目的片段（mhoneydew 浓度： 11.7ng/ul ） 9.44ul

载体（PET28a 浓度： 24.15ng/ul） 7.55ul

10xBuffer 2uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出，标记为 mH，7.19 连接

体系：17uL

目的片段（mOrange 浓度： 25.3ng/ul） 6.375ul

载体（PET28a 浓度： 24.15ng/ul） 10.625ul

10xBuffer 2uL（固定，需完全融化再加）

T4 ligase 1uL（固定，需完全融化再加）

16°C 直至明天取出，标记为 mO，7.19 连接

姓名：袁天一

目的片段：EBFP-TEVlinker-BslIA 浓度：（在笔记本上，待补充）

载体：pET-28a 浓度：（在笔记本上，待补充）

10×T4 ligase buffer: 2ul

T4 ligase: 1ul

16°C 过夜连接，标记为 TEV 连

7.20 实验

转化

姓名：张楷若

从 4°C 取出 mPETase 连接产物

将剩余 500uL 全部吸至昨天的平板中

用一次性涂布棒涂布

将 LB 固体培养基继续放置恒温培养箱过夜

姓名：马晨璋

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42°C 金属浴热击 90s 后冰浴 2min30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 mO 链接 DH5α 转化 7.20/mH 链接 DH5α 转化 7.20

放入 37°C 恒温培养箱过夜

姓名：李宁静

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42°C 金属浴热击 90s 后冰浴 2min30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500 离心 5min

（在超净台中操作）离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 mh-GS-BslIA 连接 DH5α 转化 7.20, mh-TEV-BslIA 连接 DH5α 转化 7.20

放入 37°C 恒温培养箱过夜

姓名：王涵右

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5 α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42 $^{\circ}$ C 金属浴热击 90s 后冰浴 2min30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 mO 链接 DH5 α 转化 7.20/mH 链接 DH5 α 转化 7.20

放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜

姓名：姜羽柠

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5 α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42 $^{\circ}$ C 金属浴热击 90s 后冰浴 2min30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 EGFP 连接 DH5 α 转化 7.20/EBFP 连接 DH5 α 转化 7.20

放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜

姓名：王京典

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5 α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42 $^{\circ}$ C 金属浴热击 90s 后冰浴 2min30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 EGFP-GSlinker 连接 DH5 α 转化 7.20/EGFP-TEVlinker 连接 DH5 α 转化 7.20

放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜

姓名：刘铠铭

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5 α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42 $^{\circ}$ C 金属浴热击 90s 后冰浴 2min30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 mOrange-TEV-BsIA 链接 DH5 α 转化 7.20/mH 链接 DH5 α 转化 7.20

放入 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱过夜

姓名：张瀚霖

从 20℃ 的冰箱中取出没有用完的 PET28a-PETase 菌液

在超净台中将剩余 500uL 全部加入至昨天的平板中

用一次性涂布棒涂布

将 LB 固体培养基继续放置恒温培养箱过夜

姓名：袁天一

取一管 DH5α 感受态细胞于冰上融化；

取 10ul 连接产物，加入到 100ulDH5α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42℃ 金属浴热击 90s 后冰浴，直到超净台空出。

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 400ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注如下：

载：pET28a（DH5α 转化）

目：EBFP-TEV-BslA

7.20

放入 37℃ 恒温培养箱过夜

姓名：王思瀚

取 10ul mHGFI，加入到 100ulDH5α 中，吹吸至混匀，冰浴 30min

42℃ 金属浴热击 90s 后冰浴 2m30s

将 500ul 无菌无抗 LB 加入到混合物中，摇床振荡 1h

3500*g 离心，离心后，吸取 500ul 上清液丢弃，吹吸剩余液体直至重悬

将剩余液体转移至平板使用一次性涂抹棒涂抹均匀

标注 mHGFI DH5α

放入 37℃ 恒温培养箱过夜

接小管

姓名：张瀚霖

将 PET28a 的甘油菌从 -80℃ 中取出，并准备 LB 液体培养基

在解冻后，在超净台内取 10ul 甘油菌并且将其加入到 LB 培养基中，做五次

做好标记并将小管放入到 37℃ 摇床中培养过夜

7.21 实验

挑取单克隆

姓名: everyone

将之前放在 37 度恒温培养箱的培养皿拿出, 放在超净台中

一种单克隆对应四管 LB

将 5ul 卡那分别加入有 LB 的试管中

用加热消毒过的镊子夹起枪头, 沾取培养皿中的单克隆, 直接扔进 LB 试管中
塞紧塞子, 放入摇床过夜培养

提质粒

姓名: 张瀚霖

将昨日实验时接到的 15 管菌液 PET28a 转移至 2 个大离心管 (37.5ml) 内, 离心 12000RPM 2 分钟, 尽可能地去上清。

加入悬菌缓冲液 RB 2050ul, 剧烈摇晃试管 (可以吹吸), 直至沉底的菌全部重新悬浮至 buffer 中。

加入裂解缓冲液 LB 2050ul, 略微摇晃, 直至菌液变得清澈透明。

快速加入中和缓冲液 NB 3450ul, 立刻摇晃, 直至白色絮状沉淀聚集。

离心 12000RPM 5 分钟, 吸上清。由于第一次离心后效果不好, 又再次离心了 5 分钟, 发现仍有少量菌体在上清液中。将上清液吸出, 分装至 3 个吸附管内。

将吸附柱离心 12000RPM 1 分钟, 弃废液。加入 2050ul 洗涤缓冲液 WB, 离心 12000RPM 1 分钟, 弃废液。随后离心 12000RPM 2 分钟, 弃剩余废液。

将吸附柱敞口放置至酒精气味消散。每个吸附柱内加 50ul 65°温水洗脱, 离心 12000RPM 2 分钟。

检测浓度 (88.8ng/ul)

连接

姓名: 张瀚霖

体系 20uL (PCR 小管)

目的片段 (mPETase) 3.86uL

载体片段 (pET8a) 13.14uL

10xT4 Buffer 2uL (固定, 需完全融化再加)

T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 2h

7.22 实验

连接

姓名：张楷若

体系 20uL (PCR 小管)

目的片段 (mPETase) 5.5uL

载体片段 (pET8a) 11.5uL

10xT4 Buffer 2uL (固定, 需完全融化再加)

T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 2h, 4°C 保存

转化

姓名：张楷若

从-80°C取出感受态两个 DH5α 和一个 BL21 放入冰盒中解冻

加 10uLmPETase 连接产物至 DH5α, 分别加入 2uLpET28a-PETase-BsLA 至 DH5α 和 BL21, 并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42°C 水浴锅中热击 90s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37°C 摇床, 180 转 培养 130min

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4°C 冰箱中取出的 LB 固体培养基中取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜(被调成 50°C 以上)

姓名：张瀚霖

从-80°C取出感受态两个 DH5α 和一个 BL21 放入冰盒中解冻

加 10uLPETase 连接产物至 DH5α, 分别加入 2uLpET28a-PETase-BsLA 至 DH5α 和 BL21, 并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42°C 水浴锅中热击 90s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37°C 摇床, 180 转 培养 130min

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4°C 冰箱中取出的 LB 固体培养基中取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜(被调成 50°C 以上)

PCR 检测重组质粒

姓名：袁天一

体系

姓名：马晨璋

质粒提取共八管：(mHoneydew) H1,H2,H3,H4; (mOrange) O1,O2,O3,O4

浓度分别为 39.25, 50.05, 107.2, 55.1; 39.95, 58.45, 106.6, 48.7 (单位均为 ng/ul)

pcr 验证:

mH 体系 20ul

上游引物 0.8ul

下游引物 8ul

Mix 10ul

mH (2.5ul/2ul/1ul/2ul)

ddH₂O 0ul

体系 3 处应加入 0.2ulddH₂O,因量过小而未添加

mO 体系 20ul

上游引物 0.8ul

下游引物 8ul

Mix 10ul

mO (2.5ul/2ul/1ul/2ul)

ddH₂O 0ul

体系 3 处应加入 0.2ulddH₂O,因量过小而未添加

温度: mH 55℃; mO 59℃

姓名: 姜羽柠

质粒提取共八管: (EGFP) G1,G2,G3,G4; (EBFP) B1,B2,B3,B4

浓度分别为 EGFP 35.3, 37.6, 43.65, 45.45 // EBFP 31.65, 36.65, 33.75, 29.5 (单位均为 ng/ul)

pcr 验证:

EGFP/EBFP 体系 20ul

【由于浓度不够】EGFP/EBFP 模板, 上游引物, 下游引物按比例取任意值相加等于 10uL

Mix 10ul

ddH₂O 0ul

双酶切检测重组质粒

姓名: 马晨璋

双酶切验证:

体系: 20ul

10xGreen buffer 2ul

BamH I 0.5ul

Xho I 0.5ul

质粒 (17ul, 17ul, 10ul, 17ul; 17ul, 17ul, 10ul, 17ul)

ddH₂O (0ul, 0ul, 6ul, 0ul; 0ul, 0ul, 6ul, 0ul)

37°C 金属浴 15min, 85°C 灭活 10min

姓名: 姜羽柠

双酶切验证:

体系: 20ul

10xGreen buffer 2ul

BamH I 0.5ul

Xho I 0.5ul

质粒 由于浓度不够均取 17uL

ddH₂O 0uL

37°C 金属浴 15min, 85°C 灭活 10min

7.25 实验

连接

姓名: 张瀚霖

体系 10uL (PCR 小管)

目的片段 (mPETase) 1.93uL

载体片段 (pET8a) 6.57uL

10xT4 Buffer 1uL (固定, 需完全融化再加)

T4 ligase 1uL (固定, 需完全融化再加)

16°C 15min

转化

姓名: 张楷若

从-80°C取出感受态一个 DH5 α 和一个 BL21 放入冰盒中解冻

加 10uLmPETase 连接产物至 DH5 α , 加入 1uLpET28a-mPETase-BsLA 至 BL21 (不够加在 DH5 α 的了), 并在感受态上标记后冰浴 20min 左右

在 42°C 水浴锅中热击 75s 左右

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37°C 摇床, 180 转 培养 2h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4°C 冰箱中取出的 LB 固体培养基中

姓名: 张瀚霖

从-80°C取出感受态两个 DH5 α 和一个 BL21 放入冰盒中解冻

分别加 10uLPETase 连接产物和 PET28a-PETase-GS-BsIA 至两管不同的 DH5α 并做好标记, 加入 10uLPET28a-PETase-BsIA 至 BL21, 并在感受态上标记后冰浴 20min 左右

在 42℃水浴锅中热击 75s 左右

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 180 转 培养 2h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中

取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名: 马晨璋

从-80℃取出感受态 BL21 (70ul/管) 放入冰盒中解冻

分别加 2uLmH 连接产物和 mO 至两管不同的 BL21 并做好标记,并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 250 转 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中

取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名: 李宁静

从-80℃取出感受态 BL21 (70ul/管) 放入冰盒中解冻

分别加 2uLmh-GS 连接产物和 mh-TEV 至两管不同的 BL21 并做好标记,并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 250 转 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中

取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名: 袁天一 (小丑 114514)

从-80℃取出感受态 BL21 (70ul/管) 放入冰盒中解冻

分别加 1ul 库存内的 EBFP-GS-BsIA 重组质粒和自己制得的 EBFP-TEV-BsIA 重组质粒至两管不同的 BL21 并做好标记,并在感受态上标记, 随后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴, 恢复

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 250rpm 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清，吹吸剩余菌体直至重悬，涂布至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中；标记为 EBFP-GSlinker (TEVlinker) -BslA 重组质粒 (BL21 转化)

姓名：王涵右

从-80℃取出感受态 BL21 (70ul/管) 放入冰盒中解冻

分别加 1ul 库存内的 LL37-BslA and Bsla 重组质粒和自己制得的 LL37, RGD-GS-Bsla 重组质粒至两管不同的 BL21 并做好标记,并在感受态上标记, 随后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴, 恢复

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 250rpm 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸剩余菌体直至重悬, 涂布至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中

取出一一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名：王思瀚

从-80℃取出两个感受态 BL21 (100ul/管) 放入冰盒中解冻

分别加 2ul mHGFI 连接产物和 mLcc 至两管 BL21 并做好标记,并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 250rpm 培养 1h

将 EP 管 3500rpm 离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并滴至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中
取出一一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名：姜羽柠

从-80℃取出感受态 BL21 (70ul/管) 放入冰盒中解冻

分别加 2uLEGFP 连接产物和 EBFP 至两管不同的 BL21 并做好标记,并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基, 放入 37℃摇床, 250 转 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清, 吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中

取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名：王京典

从-80℃取出感受态 BL21（70ul/管）放入冰盒中解冻

分别加 2ulG-GS 连接产物和 G-TEV 至两管不同的 BL21 并做好标记,并在感受态上标记后冰浴 30min

在 42℃水浴锅中热击 60s

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，250 转 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清，吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名：刘铠铭

从-80℃取出感受态两个 BL21 放入冰盒中解冻

分别加 2uL mOrange-TEV-BsIA 连接产物和 1uL mOraneg-GS-BsIA 至两管不同的 BL21 并做好标记，并在感受态上标记后冰浴 20min 左右

在 42℃水浴锅中热击 90s 左右

冰浴 2 分半

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 2h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清，吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

7.26 实验

姓名：王京典

从-80℃取出感受态一个 BL21 放入冰盒中解冻

加入 2uLpET28a-GSlinker-BsLA 至 BL21，并在感受态上标记后冰浴 30min 左右

在 42℃水浴锅中热击 60 秒

冰浴 3 分钟

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃摇床，180 转 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清，吹吸并吸至从 4℃冰箱中取出的 LB 固体培养基中取出一次性涂布棒涂布并标记后放入恒温培养箱中过夜

姓名：姜羽柠

从-80℃取出感受态一个 BL21 放入冰盒中解冻

加入 3uLpET28a-EGFP 至 BL21，加入 4uLpET28a-EBFP 至 BL21，并在感受态上标记后冰浴 30min 左右

在 42℃ 水浴锅中热击 60 秒

冰浴 3 分钟

感受态中加入 500ul 液体培养基，放入 37℃ 摇床，180 转 培养 1h

将 EP 管 3500 转离心 5 分钟

在超净台中弃 500uL 上清，吹吸并吸至从 4℃ 冰箱中取出的 LB 固体培养基中（不一定 500ul，在管内保留一定上清）

取出一一次性涂布棒涂布并标记为 EGFP BL21，EBFP BL21 放入恒温培养箱中过夜

挑取单克隆

姓名：张瀚霖

从 PET28a-PETase 的 DH5a 平板中分别挑四个不同的菌落（大小相近）加入到 LB 液体培养基后，并做好标记

从 PET28a-PETase-GS-BsIA 的 BL21 平板中挑一个菌落加入到 LB 培养基中，并做好标记

将标记好的小管十个一组绑在一起，并且放入到 37℃ 摇床中过夜

用封口膜封好不用的平板并且加入到 4℃ 冰箱中

姓名：张楷若

在六个 LB 小管里分别加入 5uL K

从 mPETase-GS-BsLA 的 BL21 平板中挑一个菌落加入到 LB 液体培养基后，并做好标记

从 PET28a-mPETase 的 DH5α 平板中挑五个不同的菌落加入到 LB 培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37℃ 摇床中过夜

用封口膜封上两个平板，放到 4℃ 冰箱中

姓名：姜羽柠

在两个 LB 小管里加入 5uL K

从 EGFP 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

从 EBFP 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37℃ 摇床

姓名：王京典

在两个 LB 小管里加入 5uL K

从 PET28a-G-GS 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

从 PET28a-G-TEV 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床 4h

姓名：李宁静

在两个 LB 小管里加入 5uL 卡那

从 PET28a-mhoneydew-GS—BslA 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

从 PET28a-mhoneydew-TEV-BslA 的 BL21 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床

姓名：王涵右

在两个 LB 小管里加入 5uL K

分别从 BslA/RGD-GS-BslA/LL37-GS-BslA/LL37 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床

姓名：袁天一

在两个 LB 小管里加入 5uL 卡那霉素

从 PET28a-EBFP-GSlinker-BslA 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

从 PET28a-EBFP-TEVlinker-BslA 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床过夜培养

姓名：马晨璋

在两个 LB 小管里加入 5uL K

从 PET28a-mhoneydew 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

从 PET28a-mOrange 的 BL21 的 BL21 平板中挑一个大小适中，形状规整的菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床

姓名：王思瀚

在两个 LB 小管里分别加入 5uL 卡那霉素

从 mHGFI 的 BL21 平板中挑一个菌落加入到 LB 液体培养基后，并做好标记

从 mLCC 的 BL21 平板中挑一个菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床中过夜
用封口膜封上两个平板，放到 4°C 冰箱中

姓名：刘铠铭

在两个 LB 小管里分别加入 5uL 卡那霉素

从 mOrange-TEV-BsIA 的 BL21 平板中挑一个菌落加入到 LB 液体培养基后，并做好标记

从 mOrange-GS-BsIA 的 BL21 平板中挑一个菌落加入到 LB 液体培养基中，并做好标记

将标记好的小管绑在一起，并且放入到 37°C 摇床中过夜
用封口膜封上两个平板，放到 4°C 冰箱中

保甘油菌、取诱导前菌液、蛋白诱导

姓名：姜羽柠

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-EGFP BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-EBFP BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

取 300uL 菌液，并标记为 pET28a-EGFP BL21 前，pET28a-EGFP BL21 前
在小管的剩余菌液中加入 8uL IPTG，并放入 16°C，220rpm 摇床过夜培养

姓名：李宁静

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-mh-GS BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-mh- BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

取 300uL 菌液，并标记为 pET28a-mh-GS 前，pET28a-mh-TEV 前
在小管的剩余菌液中加入 8uL IPTG，并放入 16°C，220rpm 摇床过夜培养

姓名：王涵右

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 PET28A BsIA/RGD-GS-BsIA/LL37-GS-BsIA/LL37 BL21-7.26

放入-80°C 冰箱保存

取 300uL 菌液，分别标记为 BslA/RGD-GS-Bsla/LL37-GS-Bsla/LL37 前

在小管的剩余菌液中加入 8uL IPTG，并放入 16°C，220rpm 摇床过夜培养

姓名：袁天一

从小管中取 600uL 菌液放入有 400ul 甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-EBFP-GS-BslA BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

从小管中取 600uL 菌液放入有 400ul 甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-EBFP-TEV-BslA BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

在两个小管内各取 300uL 菌液，并标记为 pET28a-EBFP-GS-BslA 前，pET28a-EBFP-TEV-BslA 前

在小管的剩余菌液中加入 8uL IPTG，并放入 16°C，220rpm 摇床过夜培养

姓名：马晨璋

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-mH BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-mO BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

取 300uL 菌液，并标记为 pET28a-mH 前，pET28a-mO 前

在小管的剩余菌液中加入 8uL IPTG，并放入 16°C，220rpm 摇床过夜培养

姓名：刘铠铭

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-mOrange-GS-BslA BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

从小管中取 600uL 菌液放入有甘油的 EP 管内，并标记为 pET28a-mOraneg-TEV-BslA BL21 7.26

放入-80°C 冰箱保存

取 300uL 菌液，并标记为 mO-TEV 前，mO-GS 前

在小管的剩余菌液中加入 8uL IPTG，并放入 16°C，220rpm 摇床过夜培养

9.5 实验

BL21 转化

姓名：刘铠铭，马晨璋，李宁静，王涵右

分别取融合质粒 mHoneydew, mHoneydew-GSlinker-BsIA, mOrange, mOrange-GSlinker-BsIA, EBFP, EBFP-GSlinker-BsIA, EGFP, EGFP-GSlinker-BsIA。

取-80 摄氏度保存的 BL21 (100ul/管)，冰浴融化。

取融合质粒 mHoneydew 1ul, mHoneydew-GSlinker-BsIA 1ul, mOrange 1ul, mOrange-GSlinker-BsIA 1ul, EBFP 3ul, EBFP-GSlinker-BsIA 1ul, EGFP 3ul, EGFP-GSlinker-BsIA 1ul, 分别加入至八管 100ulBL21 中, 标记为 mHoneydew, mHoneydew-GSlinker-BsIA, mOrange, mOrange-GSlinker-BsIA, EBFP, EBFP-GSlinker-BsIA, EGFP, EGFP-GSlinker-BsIA, 轻弹混匀, 冰浴 30min。

42 摄氏度金属浴热击 60s, 热击后冰浴 3min。

每管 BL21 中加入 500ul 无菌无抗 LB, 37 摄氏度摇床 250rpm 培养 1h 3500rpm 离心 5min, 去 500ul 上清液, 重悬菌液。

取 8 个含有卡那固体培养基, 标记为 mHoneydew, mHoneydew-GSlinker-BsIA, mOrange, mOrange-GSlinker-BsIA, EBFP, EBFP-GSlinker-BsIA, EGFP, EGFP-GSlinker-BsIA, 将每种菌液 100ul 分别加入平板, 涂抹均匀 37 摄氏度恒温培养箱培养过夜。

9.6 实验

挑单克隆

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

挑选转入 pET28a-mOrange-GSlinker-BsIA, pET28a-mOrange, pET28a-mHonydew-GSlinker-BsIA, pET28a-mHonydew, pET28a-EBFP-GSlinker-BsIA, pET28a-EBFP 融合质粒的 BI21 单克隆。

单个克隆接种于 LB 小管中, 小管为 5ml LB 加 5ul 卡那, 37℃, 220rpm 摇床培养过夜。

9.7 实验

IPTG 诱导表达

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

把昨天过夜培养的 pET28a-mOrange-GSlinker-BsIA, pET28a-mOrange, pET28a-mHonydew-GSlinker-BsIA, pET28a-mHonydew, pET28a-EBFP-GSlinker-BsIA, pET28a-EBFP 的 BL21 小管菌液中取出。

取 6 根小管，依次加入 5ul 卡纳，5ul IPTG。之后分别将 5 根小管中加入 100ul 菌液，做好标记，捆好。

37°C，220rpm 摇床培养过夜

9.8 实验

蛋白质提取

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

6 管菌液重悬，分别加到 6 个 EP 管中，标记好，12000 转 10min 后取出，弃上清。

分别加入 1XPBS 500ul 重悬，12000 转 10min 后取出弃上清。

分别加入 1XPBS 500ul 重悬，把 EP 管插入冰中，使用超声破碎仪 5min 每管破菌。超声破碎仪每次用完要用纸巾擦拭金属头。若在开口时发现声音很尖则正确。用时尽量闭合舱盖。

分别放入离心机，12000 转 10min 后分别取出上清加至 EP 管中，做好标记。

9.12 实验

配体积分数为 50%的甘油 50ml

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

用量筒量取 25ul 甘油，倒入锥形瓶中。

向量筒中加入 15ul 纯水，摇晃两下，目的是把挂壁的甘油弄到水中，把水加入至量筒中。

封口，121°C 灭菌 30min。

-4°C 保存。

配 LB 液体培养基,300ml

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

分别称取胰蛋白胨 3g、酵母提取物 1.5g，NaCl 3g 置于烧杯中。

加入 200mLdH₂O 于烧杯中，用玻璃棒搅拌，使粉末完全溶解。

将溶液倒入量筒中，加水至 300mL。

将培养基分装至锥形瓶（50mL/瓶）。

121°C 灭菌 30 min。

-4°C 保存

9.13 实验

挑取单克隆

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

挑选转入 pET28a-mOrange-GSlinker-BslA, pET28a-mOrange, pET28a-mHonydew-GSlinker-BslA, pET28a-mHonydew, pET28a-EBFP-GSlinker-BslA, pET28a-EBFP 融合质粒的 BL21 单克隆。

单个克隆接种于 LB 小管中，小管为 5ml LB 加 5ul 卡那，37°C，220rpm 摇床培养过夜。

9.14 实验

IPTG 诱导

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

把昨天过夜培养的 pET28a-mOrange-GSlinker-BslA, pET28a-mOrange, pET28a-mHonydew-GSlinker-BslA, pET28a-mHonydew, pET28a-EBFP-GSlinker-BslA, pET28a-EBFP 的 BL21 小管菌液中取出。

取 6 瓶培养基，依次加入 50ul 卡那，50ul IPTG。之后分别将 6 根小管中加入 1000ul 菌液，做好标记。

37°C，220rpm 摇床培养过夜。

9.15 实验

蛋白质提取

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

6 管菌液重悬，分别加到 6 个离心管中，标记好，9500 转 10min 后取出，弃上清。使用大离心机时要从 2000 转开始逐渐上调至 9500 转，目的是防止转速过高，造成安全隐患。

分别加入 1XPBS 5ml 重悬，9500 转 10min 后取出弃上清。

分别加入 1XPBS 5ml 重悬，把离心管插入冰中，使用超声破碎仪 10+30min 每管破菌。超声破碎仪每次用完要用纸巾擦拭金属头。若在开口时发现声音很尖则正确。使用时尽量闭合舱盖。

分别放入离心机，9500 转 10min 后分别取出上清加至离心管中，做好标记。

双水相验证

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

将等体积的异丁醇加入离心管中，缓慢摇晃后静放置。待分层后观察上清颜色。

9.16 实验

双水相验证

姓名：刘铠铭，王涵右，马晨璋，李宁静

使用光谱分析仪，每组取上清，280nm 经行测试并且记下示数。

改成 386nm，对 EBFP, EBFP-BsIA 组的上清测试，记下示数。

改成 487nm，对 mHoneydew, mHoneydew-BsIA 的上清测试，记下示数。

改成 504nm，对 mHoneydew, mHoneydew-BsIA 的上清测试，记下示数。

改成 548nm，对 mOrange, mOraneg-BsIA 的上清测试，记下示数。