

## 7/28

Optimize the condition of folding DNA origami – the mole ratio between scaffold and staple.

Mole ratio(scaffold:staple)	scaffold only	staple only	1:5	1:7	1:10
scafold(100nM)	52	0	2	2	2
staple(250nM)	0	8	4	5.6	8
10X TE	2	2	2	2	2
MgCl <sub>2</sub> (200mM)	2	2	2	2	2
ddH <sub>2</sub> O	14	8	10	8.4	6
total	20	820	20	20	20

## 7/29

- Run the gel electrophoresis
  - Run two gels for each of the three structure. Six gels in total.
    - Box: 1-264(**A**)
    - bottom:265-348(**B**)
    - Top : 349-434(**C**)
  - 7 wells on one gel with the first one and the last one being the ladder.  
Load 20 micro l in each well.
  - Choose the best ratio based on the gel result and conduct the PCR under different Mg+2 ion concentration accordingly.

Side notes:

1. PCR notation: f for scaffold, p for staple, Box: 1-264 are noted as **A**, bottom:265-348 are noted as (**B**)
2. scaffold, staple (note 1, 256, 349 respectively), 200mM MgCl<sub>2</sub>, are all put in the -20 degree celcius fridge.

## 7/29

### 第一次跑電泳

配置agarose：到B1細胞培養實驗室，進入到第三個門內。

1. 關冷氣
2. 取1.5g agarose(三片膠份量)，以輕拍方式精準取出
3. 加入150ml (應該是吧？) 1X TAE buffer
4. 微波爐加熱至聽見「滋滋聲」即可取出(戴手套)

炷膠：

1. 選擇適宜的齒梳插入炷膠盤(本次使用三片大片，可以注入20 mu l 體積)，放置U型橫線壓克力板，倒入agarose至標線處。
2. 靜置約50分(以擦手紙遮蔽灰塵)

load 膠：

1. 加入1X TAE buffer 至標線處
2. 放置凝固的agar(含U型橫線壓克力板)
3. 將pcr摺疊後之各種比例DNA加入2.2mu l 之DNA loading dye
4. 取出20mu l 之混合液，垂直load入各well
5. 前後well分別加入6 mu l 之1 kb DNA marker
6. 加入3 mu l EtBr，蓋起電泳槽，以half voltage通電，約等55min。(以鋁箔紙蓋住避免EtBR分解)

得到結果：

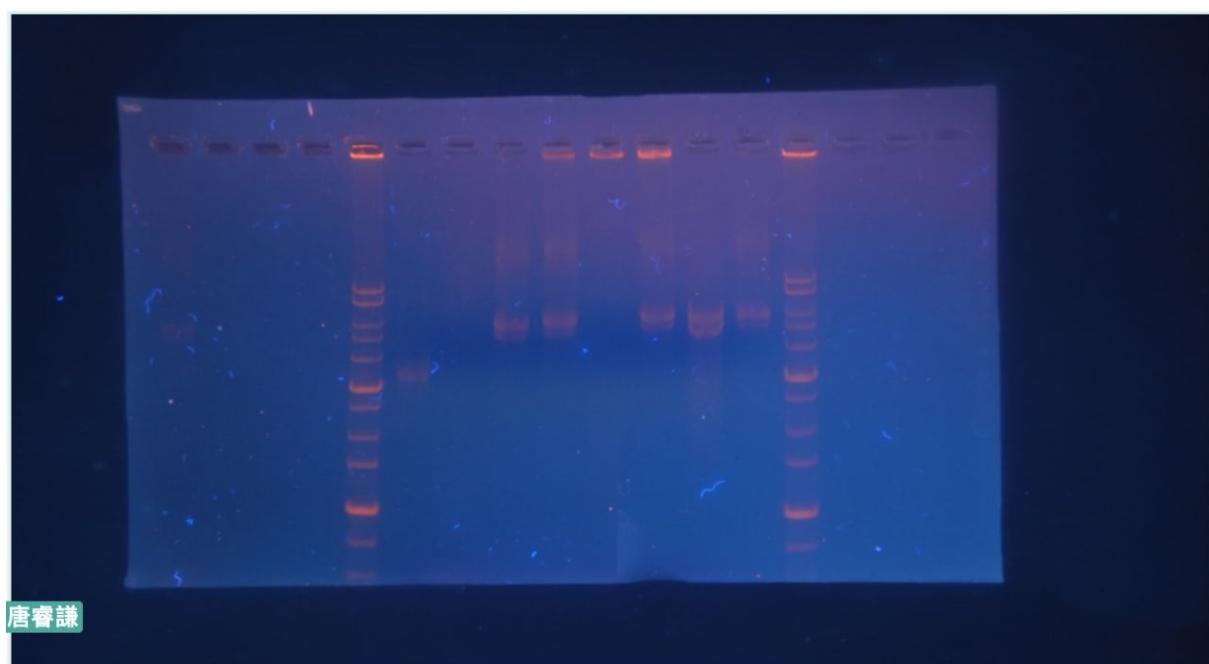
1. 取出agar，放置在右側UV照射台

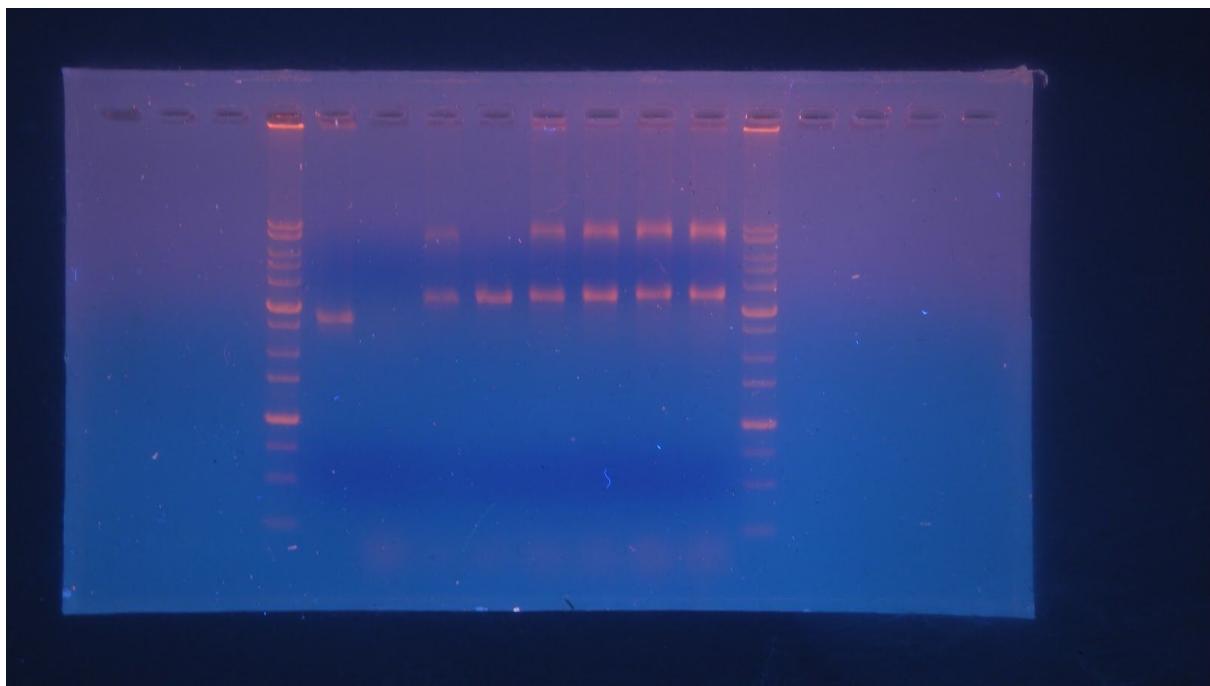
2. 關燈
3. 該起右下角uv燈，以地上黑箱蓋住之
4. 單眼拍照

determining scaffold/staple ratio

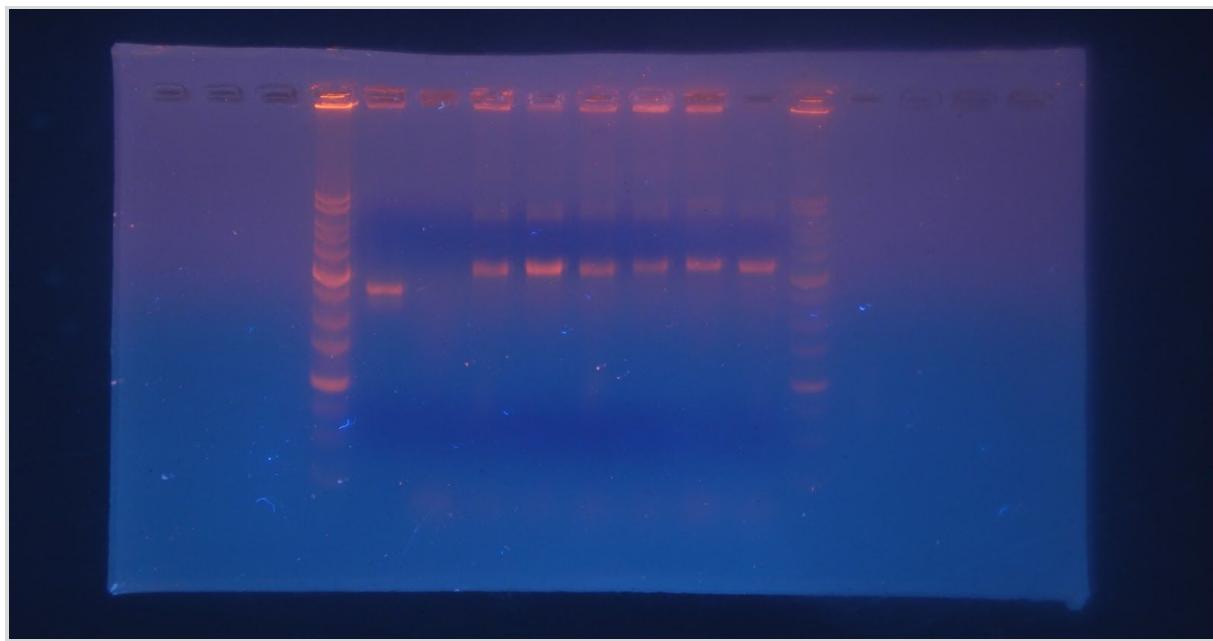
box result (marker/scaffold/staple/1:5/1:5/1:7/1:7/1:10/1:10/marker)

可看出皆有摺出東西，但不確定是哪個部分，似乎是1:5跟1:10效率較高





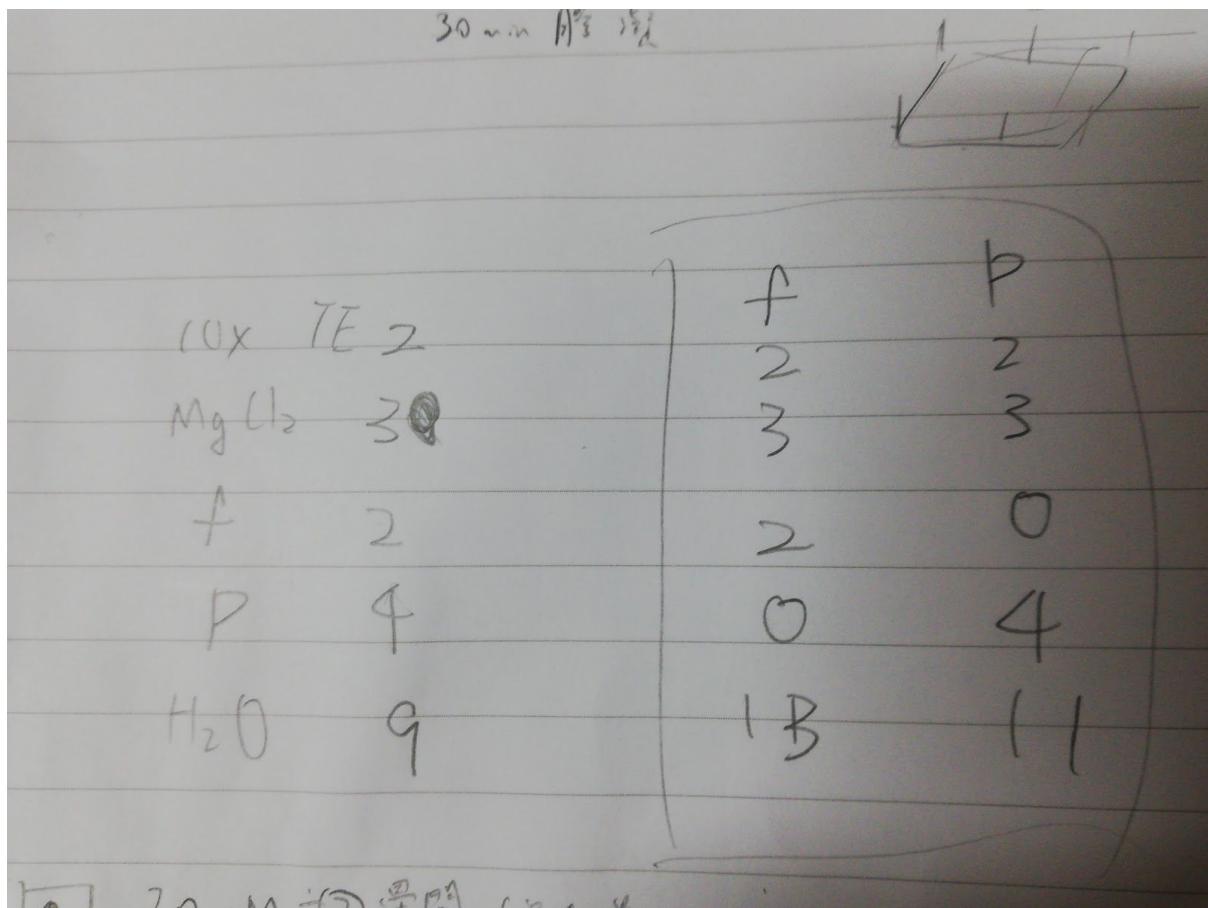
bottom lid result (marker/scaffold/staple/1:5/1:5/1:7/1:7/1:10/1:10/marker)  
摺出兩種band，可能選用1:5做？



top lid result (marker/scaffold/staple/1:5/1:5/1:7/1:7/1:10/1:10/marker)  
摺出很多道band，可能選用1:5 or 1:10做？

7/31下午 佳儀、采蘩

測Mg的五種濃度 (10,15,20,25,30 microM) , 共 $5 \times 2 + 1 + 1 + 2 = 14$ 個well, 三片膠  
因電泳放熱會讓結構解開, 故先將電泳的的TAE buffer冰 4°C 30分鐘。



(f&p配方，總體積各自為20 μl)

f & p記得要跟著跑PCR!!

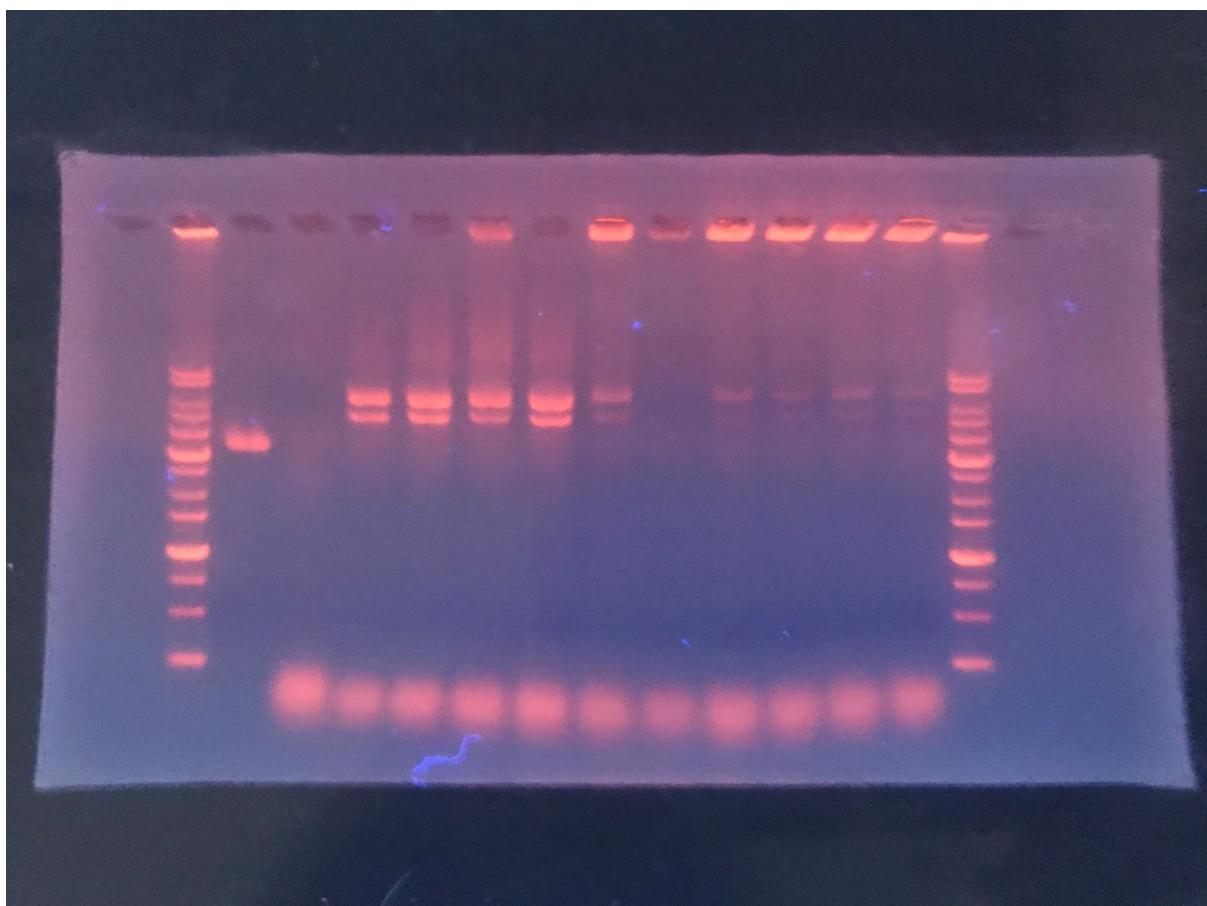
註：staple點紅點的是用過的，先把用過的用完，再用新的

在Load膠時，Box的第2支20microM量開了，top lid的scaffold 和第一支30microM量開了，可能會污染或量不足。

Marker放在-20度冰箱由上而下的第三層，標示DNA marker的盒子。

跑膠約跑30分鐘（深藍色染劑到倒數第三條線）

結果：



Box - 選用10mM

(marker/scaffold/staple/10mM/10mM/15mM/15mM/20mM/20mM/25mM/25mM/30mM  
/30mM/marker)

助教說這個跟先前有一點不吻合，因為之前是用20mM配，但在這裡卻沒有很明顯的明帶

(苡寧，泉浩)

收第二片跟第三片十一開始看不見結果，因染劑太濃，後將跑出來的膠置於紙上，指吸收了部分染劑，得以看到部分結果，但在取出時有碎裂情形，之後會補做，以便作為網站的資料

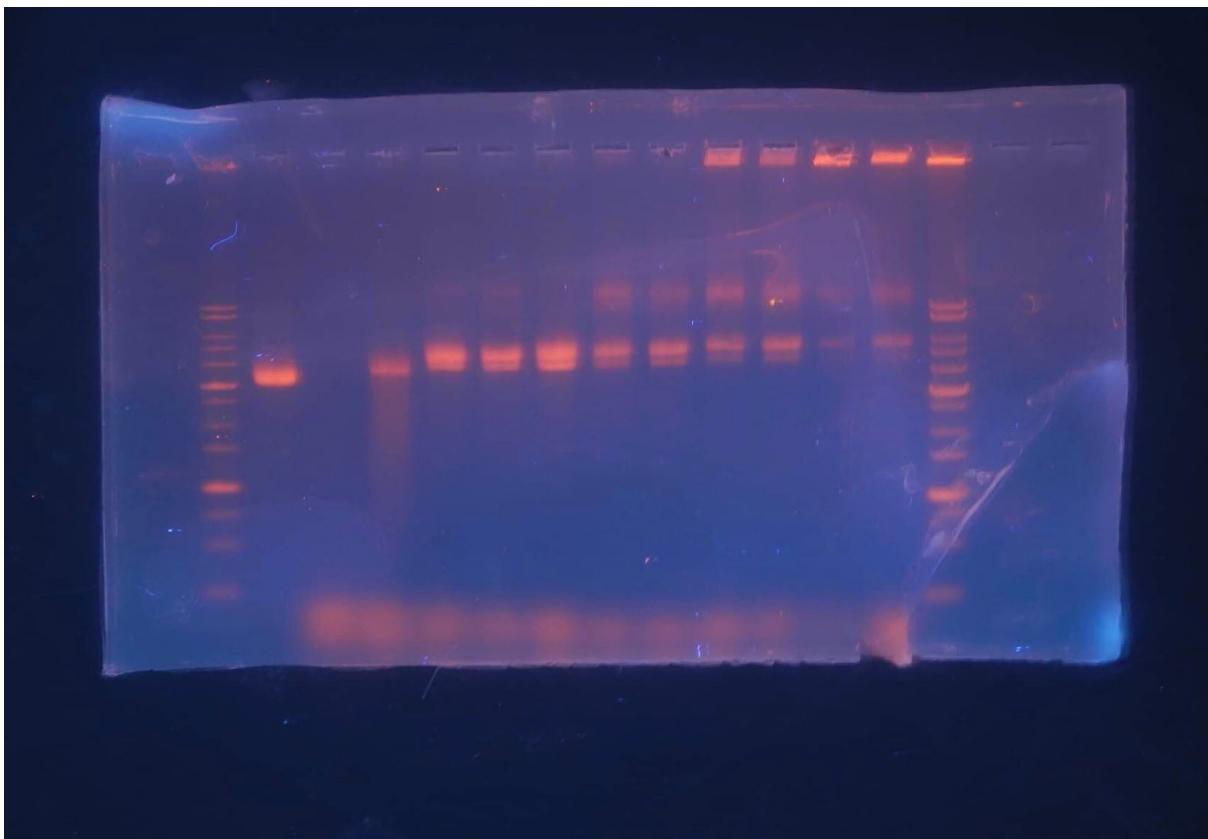
後續添加染劑時以新的六倍染劑為主(4μl)，如要加十倍染劑加2.2μl

重下了一次PCR以再確認一次結果

8/1

下午（佳儀、采蘩）

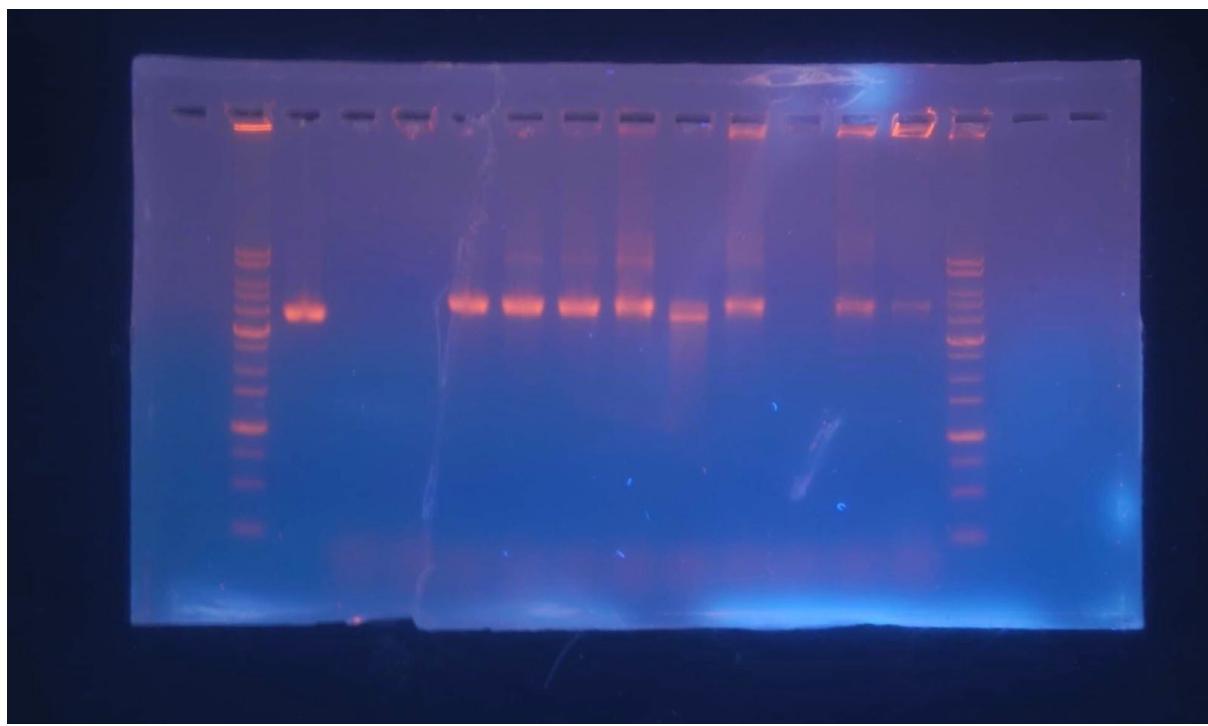
補做昨日失敗的電泳



bottom lid - 選用15mM

(marker/scaffold/staple/10mM/10mM/15mM/15mM/20mM/20mM/25mM/25mM/30mM  
/30mM/marker)

Ok



top lid - 選用15mM  
(marker/scaffold/staple/10mM/10mM/15mM/15mM/20mM/20mM/25mM/25mM/30mM  
/30mM/marker)

**8/1 (泉浩, 翟謙)**

分別以box(10mM MgCl<sub>2</sub>) bottom top(15mM MgCl<sub>2</sub>) 配製50 μl 共10管, 進行  
NanoMuscle protocol的PCR

## 8/2(清臺，鉢璇)

### DNA origami Purification

#### ※純化sample前先潤洗

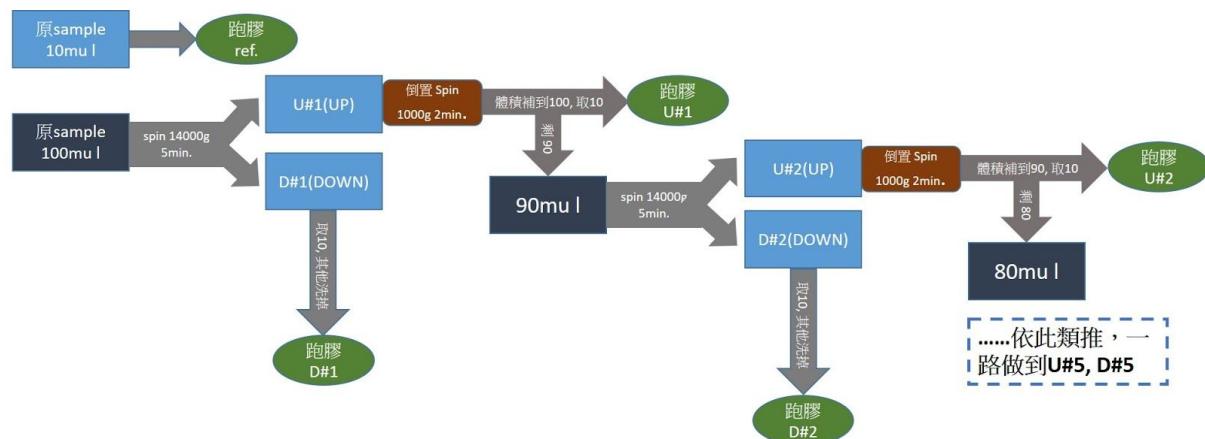
1,assemble the filter and centrifuge tube, load 200 $\mu$ l 1xTEbuffer with 10mMMg2+(box),

200 $\mu$ l 1xTEbuffer with 15mMMg2+(lid)

2,spin down at 14000g for 3 min 建議改為7000g 避免因為些微不平衡而機器故障。

3,Upide down the filter (doesn't have to cap it).Spin the device at 1000 g for 2 min.

#### ※Purification



這是原計畫。(一樣的步驟同時處理box, bottom, top lid 的材料。原材料各共有500 mu l .也就是說處理一次如此純化要用兩管迷你eppendorf, 共計100mu l .)

註1: BOX 的 TOP 記做 X T; BOTTOM 的 DOWN 記做 B D. 另外, 所有要跑膠的現在都在迷你eppendorf中(ref, U#1, D#1...)，標記皆在蓋子上。

註2:之所以要補體積是為了要讓跑膠的每個well濃度皆相同，因為純化的目的就是要讓底部的渣渣逐漸消失，當濃度相當時，亮度相同，這樣比較較有說服力。

※之所以上面叫做"原計畫"是因為我們不小心將體積補到90補成100，所以從U#2開始所有的濃度皆變成原先預計的9/10倍。助教說沒關係，反正因為後面濃度相同，所以跑膠結果依舊可以觀察出此純化方式的效果。

#### ※清洗filter

1,wash with ddH2O\*2, 正轉7000 3min./倒轉100 2min.

2,sonication in ddH2O for30~60min

3,keep in 20%EtOH

預計8/4

※跑三片膠，6倍loading dye加2 $\mu$ l,一個well load 10 $\mu$ l

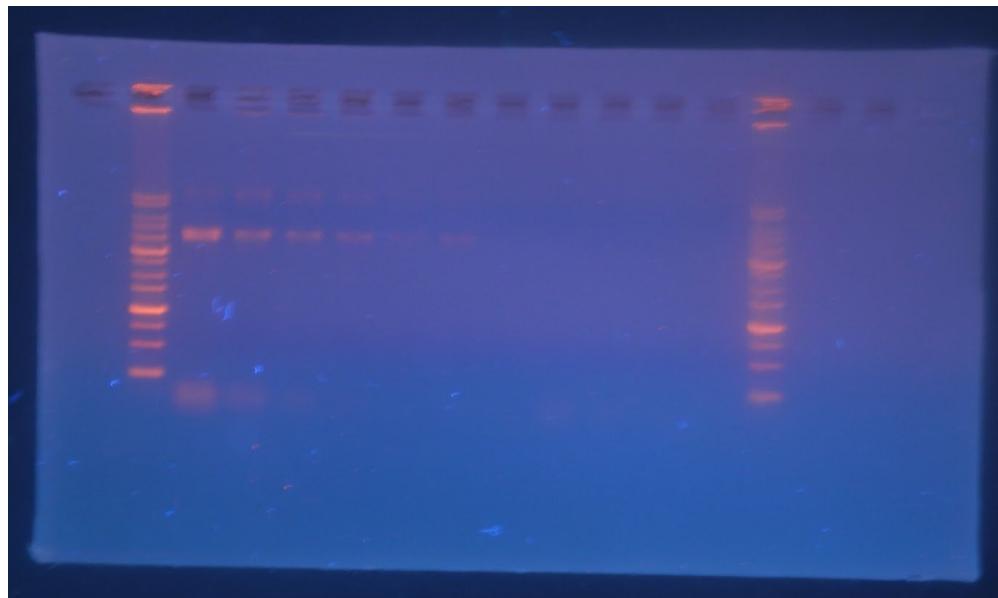
※原sample/U1/D1/U2/D2/U3/D3/U4/D4/U5/D5(x和t長得有點像，麻煩注意一下)

理想結果D都沒有我們的產物，U中staple的band隨著純化次數增加，應越來越淺，幾乎看不到staple的band代表已幾乎去除多餘staples，若staple的band還很明顯，就要再繼續純化。

## 8/4 采藥

## 純化後跑膠

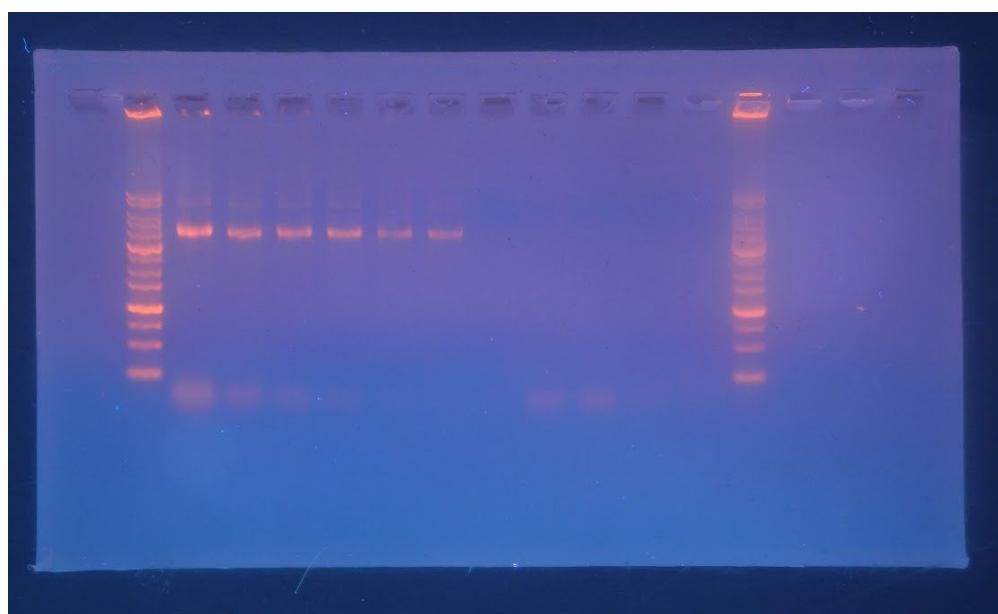
bottom lid (B) 由左至右依序為 : ladder/ref./U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/ladder



D有點怪怪的，因為完全沒東西。

純化效果不錯 (U自第三次就較少staple) , 可能採純化第三次為最佳次數。

top lid (t) 由左至右依序為 : ladder/ref./U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/ladder



純化效果不錯，第四次為可接受的純度。

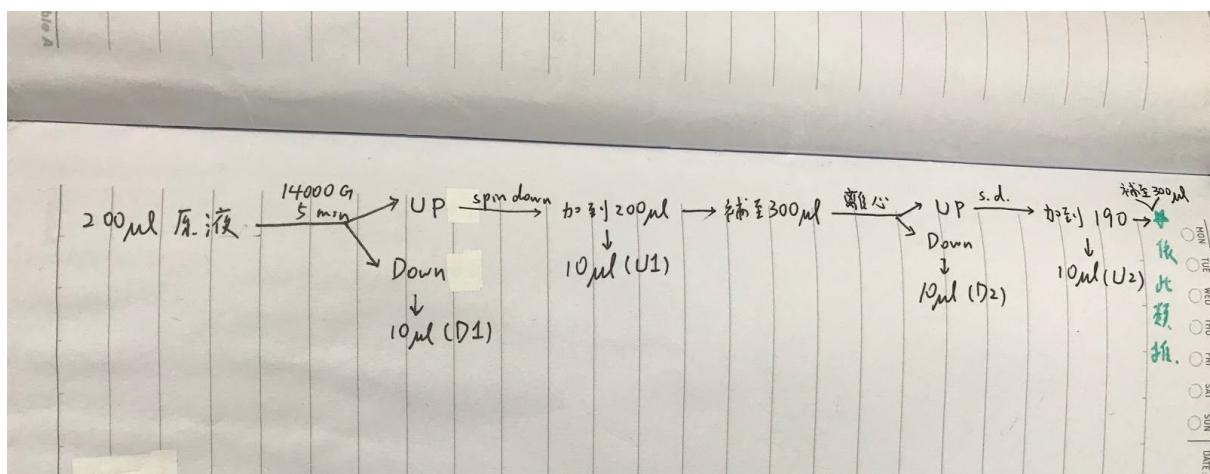
box (X) 由左至右依序為 : ladder/ref./U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/ladder

純化效果不佳，U仍持續有staple，可能要再多純化幾次或擴大純化時的體積。（如100microl->300microl）

U的上面（較近的亮帶，為摺疊產物）應該要維持一樣亮度，但這三張圖都顯示越來越淡，代表我們的摺疊產物在純化的過程中有所流失。而U和D的下方（遠端）是Staple等小分子，隨著純化進行應越來越淡。

## 8/5 下午 佳儀、采棻

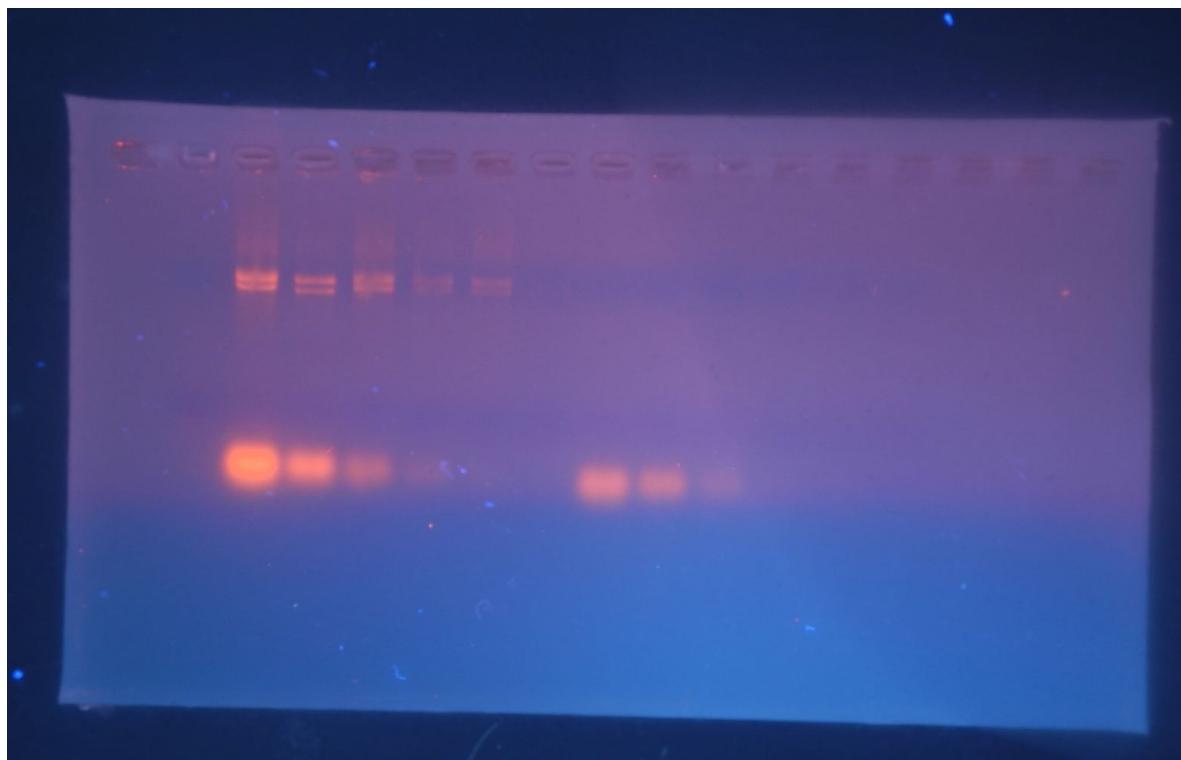
重新純化Box（共純化5次），流程圖如下：



Top/Bottom lid完成TEM要用的純化，top純化5次，bottom純化3次，皆按照之前8/2的流程

註1：第一次補體積補成水而非buffer，之後都有修正回buffer  
註2：Top lid 在第二次補體積時不小心補成100μl了（應為90μl）

8/5 晚上 采葉



新的Box 純化，由左至右依序為：

ladder/ref./U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/ladder

討論決定採用第四次純化？

## 8/6

### 早上 采樣、佳儀

按照昨天流程完成Box純化，共純化4次

### 下午 采樣、佳儀、苡寧、泉浩 @生科大樓4樓 [生物影像平台]

TEM樣本前處理（未wash）。

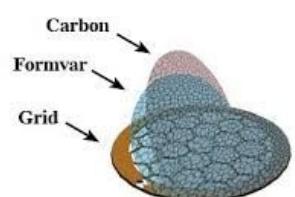
生科院方提到如果產物都糾結在一起，可以用超音波震盪先處裡樣本。（據說上一屆花了很多時間2小時在震）

補充說明TEM銅網：把樣品load 7microl(形成完美包覆的液滴的最小需求體積)至有膜的那面 (grid外圍的顏色較深的那面)，用反夾鑷子夾取邊緣使用，不要碰到銅網。

負染UA用針筒裝，放在冰箱裡。由於是重金屬且用針釋液，故使用時要特別小心不要戳到手。

因樣品殘留MgCl<sub>2</sub>，故潤洗load好樣品的銅網有助於去除鹽類，讓TEM的影像更美。

加完sample和UA的銅網存放在裝有濾紙的plate上，放入烘箱20分鐘。  
關於TEM影像拍攝操作，可參考之前貼在群組的補充資料。



本次的protocol遵循上上屆：

1. Pick up a TEM copper grid (small) with negative tweezer.<sup>+</sup>
2. Transfer 7 uL sample solution onto the TEM copper grid.<sup>+</sup>
3. Wait for 35 seconds.<sup>+</sup>
4. Remove sample solution from the side of the droplet with the edge of the filter paper.<sup>+</sup>
5. Transfer a droplet of 2% UA (negative stain solution) onto the TEM copper grid.<sup>+</sup>
6. Wait for 30 seconds.<sup>+</sup>
7. Remove negative stain solution from the side of the droplet with the edge of the filter paper.<sup>+</sup>
8. Place TEM copper grid under a lamp for 20 minutes.<sup>+</sup>
9. Put TEM copper grid into TEM. (assisted by technician)<sup>+</sup>
10. Observe with TEM and save the coordinates you intend to take photo of.<sup>+</sup>
11. Take pictures and save files. (assisted by technician)<sup>+</sup>

## **8/7 上午 苑寧、鈺璇、清璽、采蓁、重旬、睿謙**

### **TEM操作**

銅片的載入、卸載及照片拍攝都由老師操作，我們僅負責操作控制板，尋找欲留存的影像。

今天拍照的結果，有許多糊糊黑黑的團塊，且影像解析度不太好，看不到想要的結果。（尤以Box嚴重）

預期成果是透明，周圍有黑黑的UA染劑。

因此考慮將樣品稀釋／超音波震盪／加MgCl<sub>2</sub>(學姊建議?)，但一次只操作一個變因，目前以重跑新的PCR (Nano Trap——加長annealing的時間) 改變摺疊方式為目的，以期看到較為清晰的Box。

8/7 (重旬睿謙)



	A	B	C	D	E	F	
7	ddH2O		14	8	10	8.4	6
8	total		20	20	20	20	20
9							
10							
11	MgCl <sub>2</sub> conc.(mM)	scaffold only	staple only		10	15	20
12	10X TE		2	2	2	2	2
13	MgCl <sub>2</sub> (200mM)		1	1	1	1.5	2
14	scafold(100nM)		2	0	2	2	2
15	staple(250nM)		0	4	4	4	4
16	ddH2O		15	13	11	10.5	10
17	total		20	20	20	20	20
18							
19	10X TE composition(for 1 liter stock solution)可以依比例減少。				volume(ml)	final conc.(mM)	
20							

工作表1 ▾

工作表2

X 配 MgCl<sub>2</sub> 10mM / B, T 配 MgCl<sub>2</sub> 15mM 50 up 各六管

PCR protocol 改新的

	A	B
1		trap
2	denature	65oC for 15 min
3		to 45 @ 0.1oC / 7 min
4		Hold at 20oC



8/8

(A)睿謙 重旬 鈺璇 茲寧：

討論TEM無法找到產物的原因。歸咎2點：1.產物離心後沒有震盪，導致可能吸上的產物過少 2.沈降(settle)時間太少，僅有30秒，導致產物尚未附著於銅網，就被WASH掉

解套：將產物settle時間提升至5分鐘，染劑時間可能可以調整？

(B)睿謙 重旬 鈺璇 泉浩：

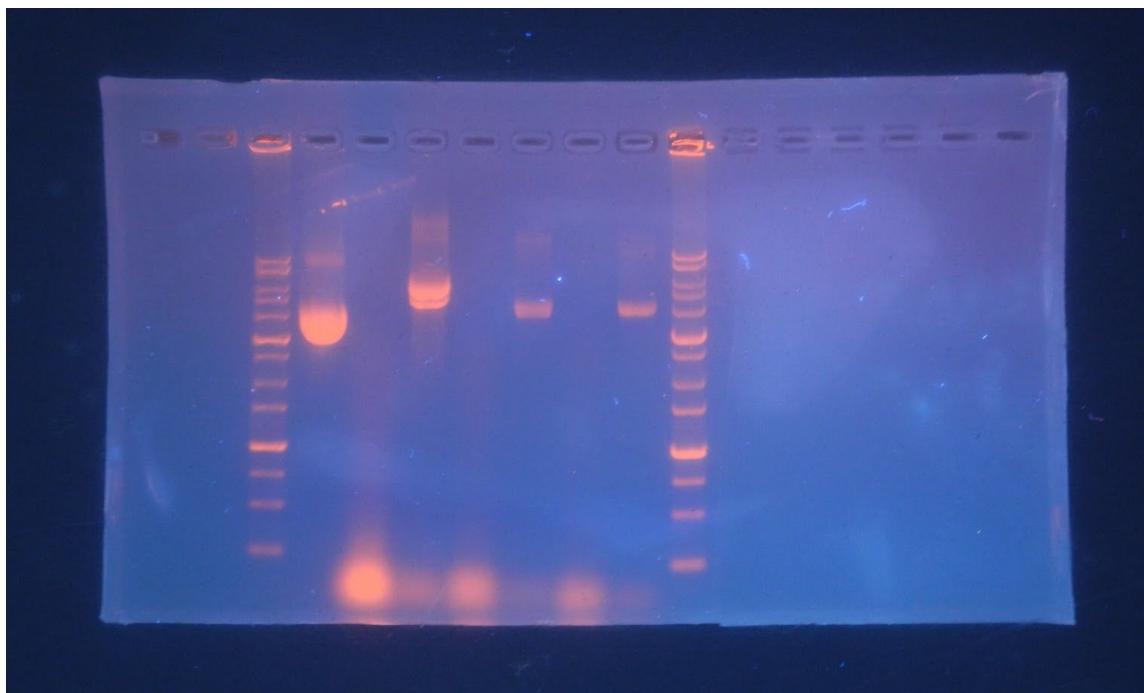
進行上步 pcr 後產物的電泳，炷膠時沒有放置tray，故使用罐子切割下來

跑電泳時，儀器短路導致DNA沒有分離，呈現隨機擴散狀態。

## **8/10 睿謙 重甸 泉浩**

重新跑電泳(新的protocol, pcr跑24小時之成果，未純化)，以下是結果呈現。

各well分別是：marker/ scaffold / X staple / X / B p / B / T p / T / marker



解析：

BOX部分：於3、4處各有一條band，與第一次未純化結果大致相符。然而，3處的band和第一次的照片有所差異(第一次是在2~3處，此次是在3~4處)。另外，無法和純化後結果做比較。

BOTTOM的部分：於4~5有一條band，與第一次未純化結果相比，少了5~6的band；與純化後結果比較，相符，都是4~5。

TOP部分：結果與BOTTOM類似，於4~5處有band。少了第一次未純化的2處band，與純化後相符，只有一條4~5的band。

小結：

- 1.仍無法推測BOX的產物是哪一個亮帶，但應該是4處最有可能
- 2.bottom and top 的產物帶應該位於4~5處，因為和純化後結果相符，也同時代表我們新的protocol折疊效果更佳。

## 8/11 采葉、睿謙、泉浩

### 新PCR之純化+電泳

Tips: 擴大純化體積會延長純化所需時間，進而增加staple被濾出的機率。

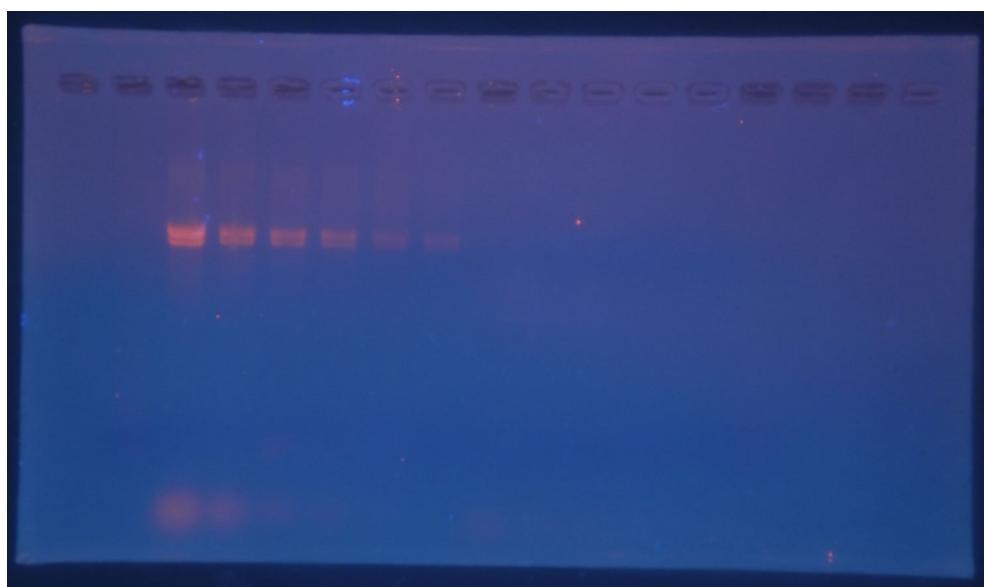
box—由左至右依序為（左二始）：

RNA ladder (加錯了所以看不到ladder) /未純化

/U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/RNA ladder (加錯了所以看不到ladder)

由Up, 可以看到staple大約在純化第3次後大量減少, 因此**新protocol的box應純化3次**

至於down都沒有東西, 推測因為這次的純化將體積擴大到300microl, 導致Down (濾出液) 太稀而看不到東西。



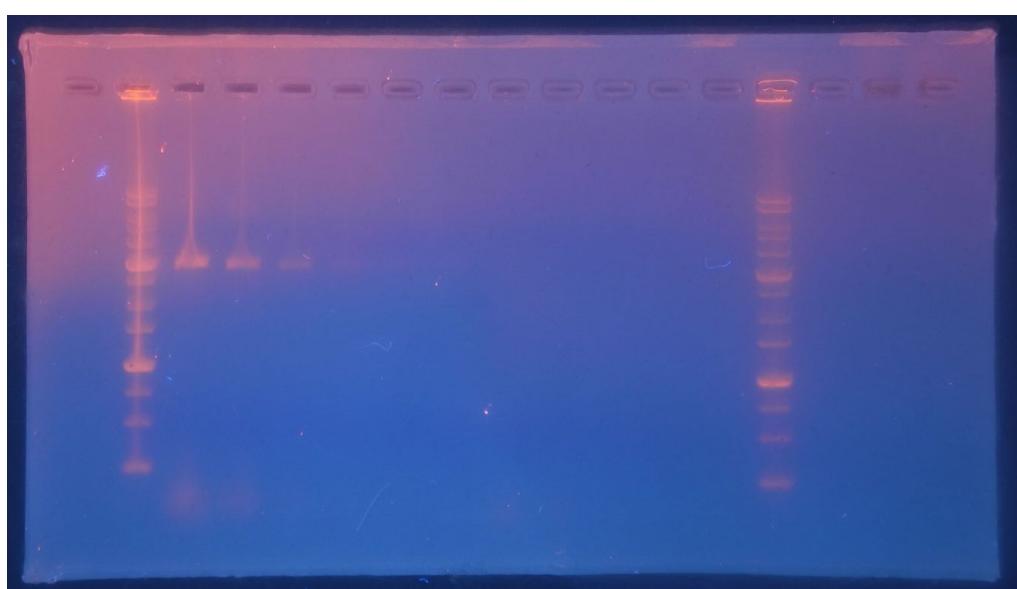
top lid—由左至右依序為：

DNA ladder/未純化/U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/DNA ladder

down都沒有東西, 推測因為這次的純化將體積擴大到300microl, 導致Down (濾出液) 太稀而看不到東西。正常而言toplaid & bottom lid的純化只需要把體積補回100microl即可。

前三排各有一條奇怪的垂直線, 原因未知, 可能是炷膠的問題。

和舊protocol的top lid (5~6)相比, 新protocol的產物在第7行。



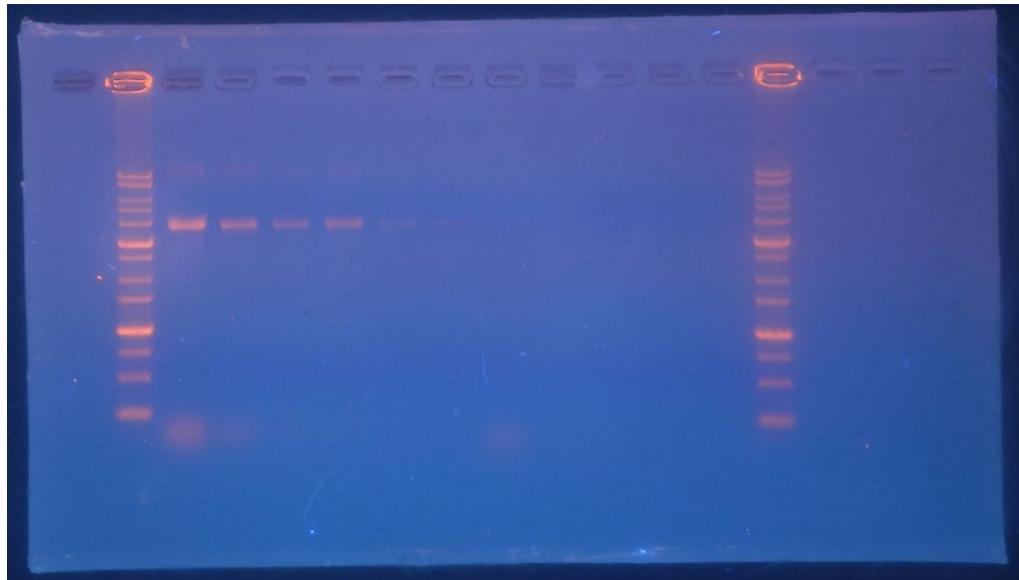
bottom lid—由左至右依序為：

DNA ladder/未純化/U1/U2/U3/U4/U5/D1/D2/D3/D4/D5/DNA ladder

down都沒有東西，推測因為這次的純化將體積擴大到300microl，導致Down（濾出液）太稀而看不到東西。正常而言toplid & bottom lid的純化只需要把體積補回100microl即可。

純化第三次似乎比第二次亮，推測是濃度／不均的原因。

和舊protocol的bottom lid相同，在第6行。



結論：box純化3次（要把體積補到300microl），top lid 3or4 次，bottom lid 3次。

注意：使用離心機務必注意轉速是\*100G而非\*100rpm，轉速過高會讓eppendorf斷頭很可怕！

## 8/12

**早上：采葉、清靈**

**已純化5次的產物取30microl（還剩110microl）作超音波震盪2小時十下新protocol的pcr 各300microl**

最後一管體積有點偏差，放在右二的位置。

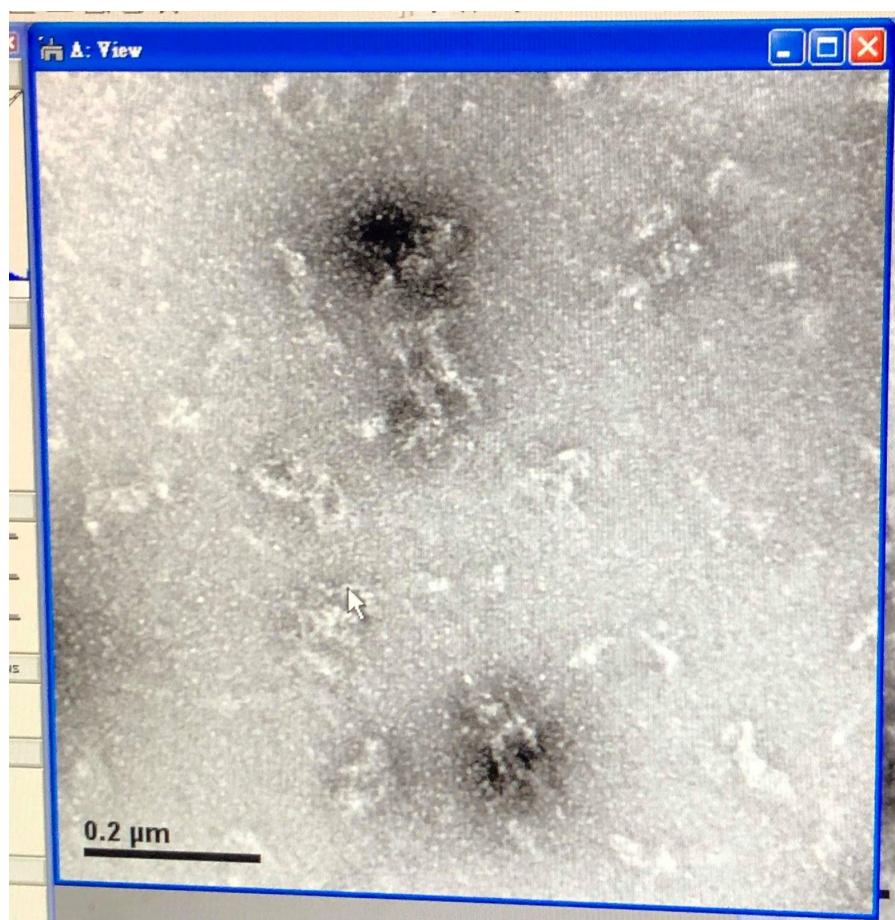
右一有點紅點，是額外配的50microl，因為當初配完250 microl才發現忘了預留保險空間。

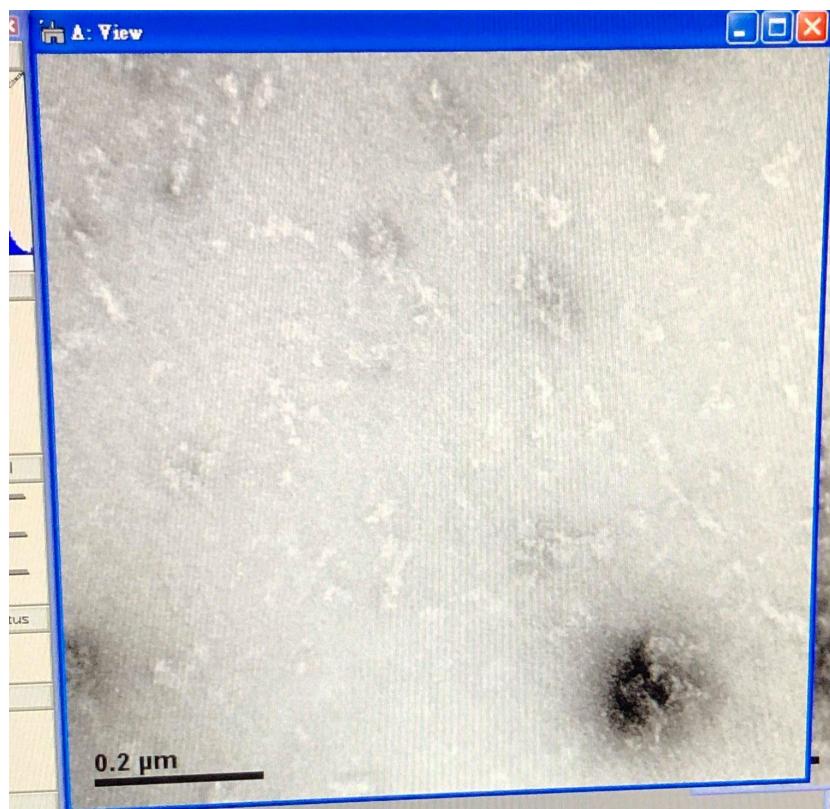
B和X的標示有塗改，敬請留意。

**下午：重旬、泉浩、睿謙、采葉**

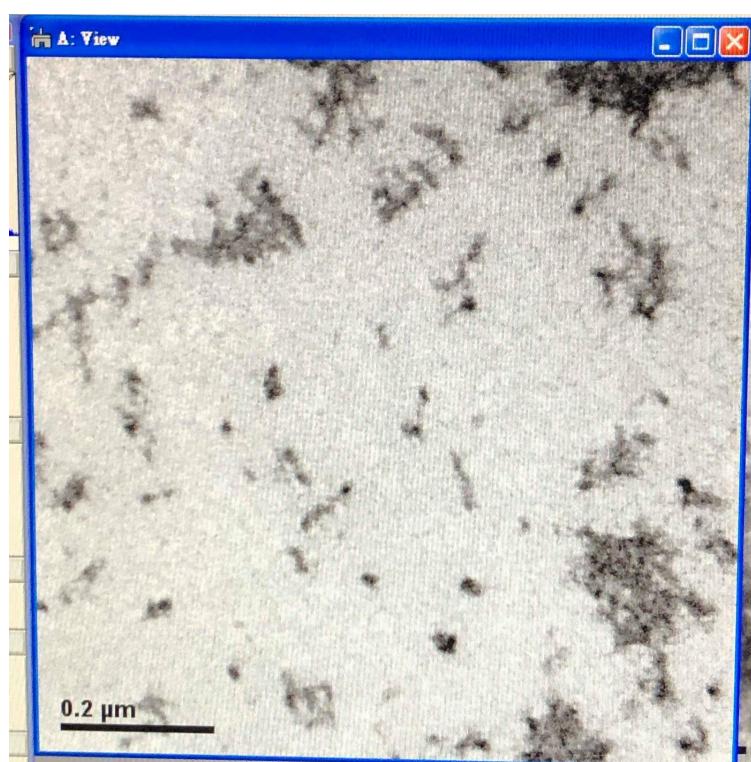
**照Box（有&無超音波震盪）的TEM**

已震盪2小時的box (settle 5 min, UA 35 sec.) 一可以看到重複性的條狀白色物，也許因為超音波震碎的關係，些許呈現破碎貌，也有一些糾纏在一起。





未震盪的box (settle 5 min, UA 35 sec.) —什麼東西都看不到的平原／黑黑的擠成一坨



結論：樣品要超音波震盪2小時以下（以防太碎）

**8/13**

**早上：佳儀、清璽**

box,top,bottom各取200mu l原液純化三次，box有將體積補到300mu l

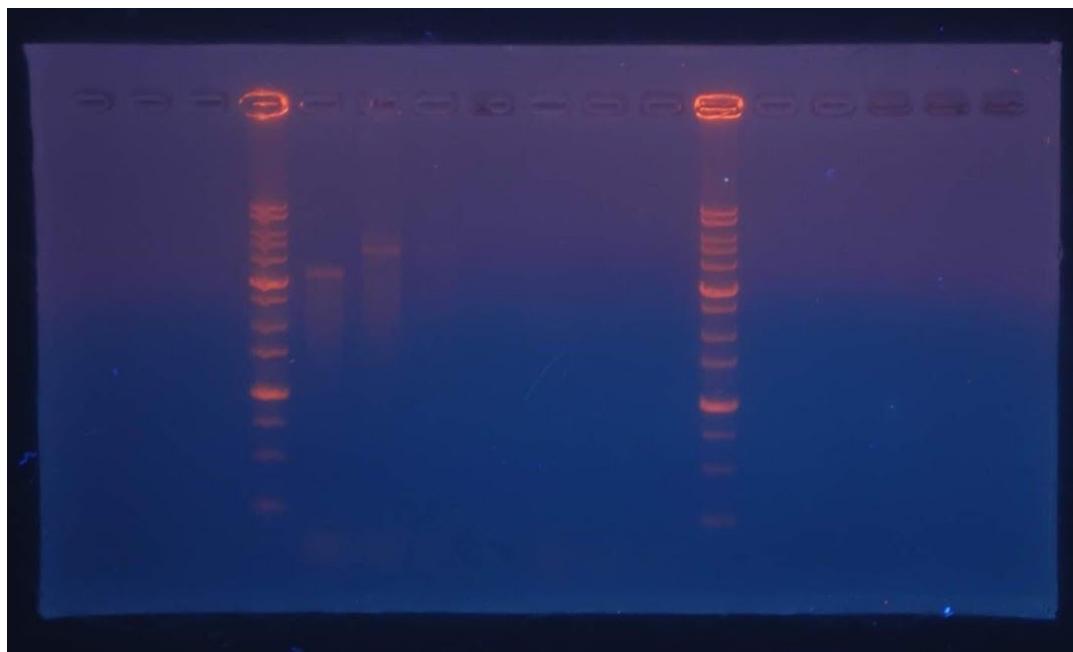
**下午：佳儀、采蘋**

將上午的結果跑膠

box

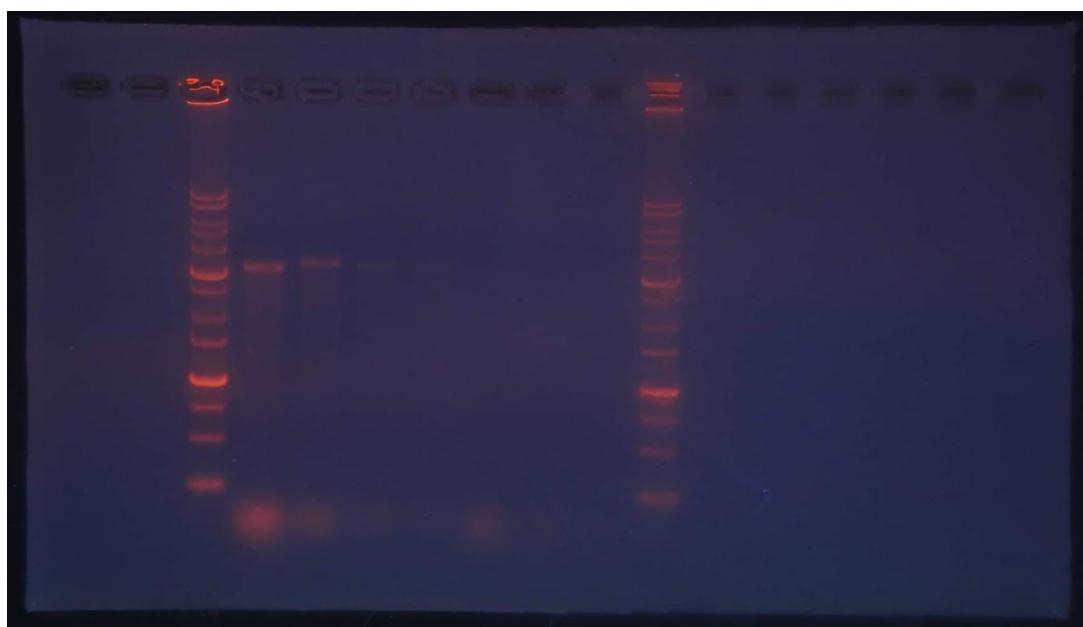
DNA ladder/未純化/U1/U2/U3/D1/D2/D3/DNA ladder

未純化和純化跑出的band不一樣，有些詭異，原因不明



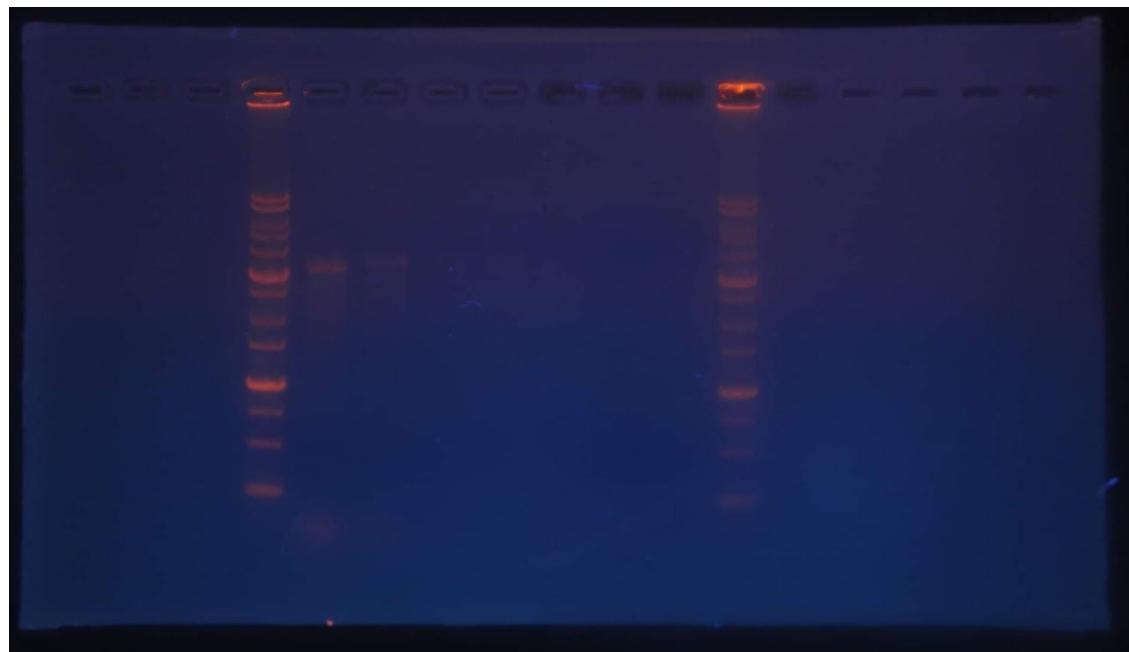
bottom lid

DNA ladder/未純化/U1/U2/U3/D1/D2/D3/DNA ladder



top lid

DNA ladder/未純化/U1/U2/U3/D1/D2/D3/DNA ladder



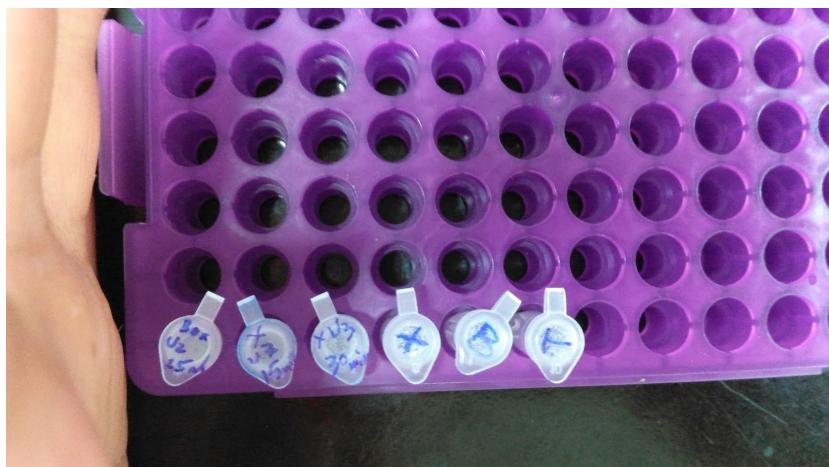
## 8/15 賈謙 重甸 鈺璇

- Box,lid純化三次(Box補到300mu l,lid補到100mu l)
- BoxU3--震15min ; BoxU3--震30min(有discharge)已處理好(settle5min,染50sec), 放在照電顯一進去, 左手邊櫃子從下面數來第二個, 有個圓形培養皿, 明早看TEM
- BoxU3--震15min ; BoxU3--震30min(不用discharge)還沒放在銅片處理, 可明早處理
- 震盪方式:15min是(連續震5min→停止震盪1min)\*3  
30min是(連續震5min→停止震盪1min)\*6

注意震盪一段時間要換水, 避免水過熱(水會越來越熱, 要注意)



右上三管是Box和lid的U3, 體積剩55mu l



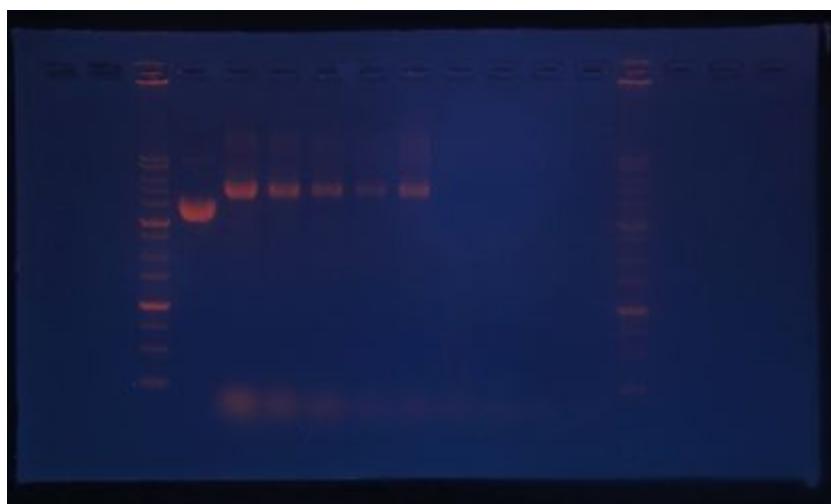
由左至右為BoxU2/BoxU3--震15min/BoxU3--震30min/XBT用24hour protocol合成的原液(8/14下的)

BoxU3--震15min/BoxU3--震30min明天可拿去照TEM, 做為沒有discharge的對照組

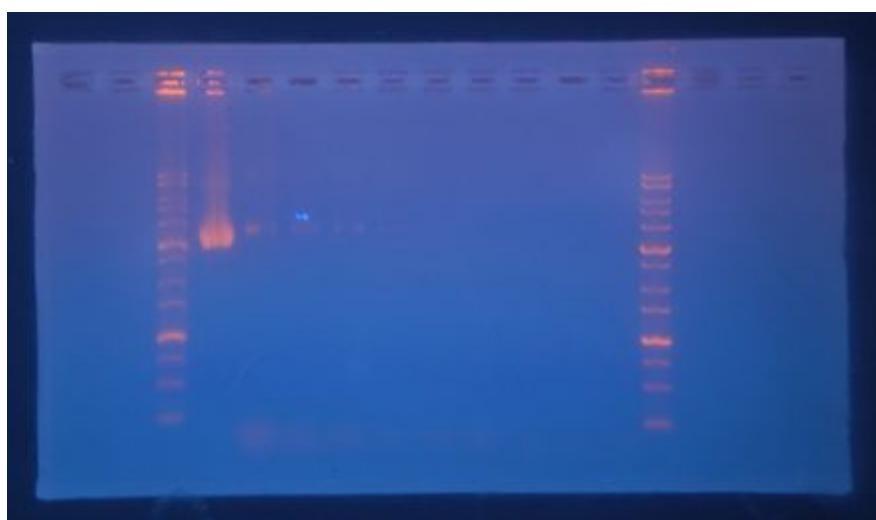
scaffold/原液/U1/U2/U3/U3(震15min)/U3(30min)/D1/D2/D3

Box:取200mu l純化, 體積捕到300mu l

震15min較30min好



Bottom:取100mu l純化，體積捕到100mu l



top:取100mu l純化，體積捕到100mu l



lid震盪後都沒band，可考慮震更短

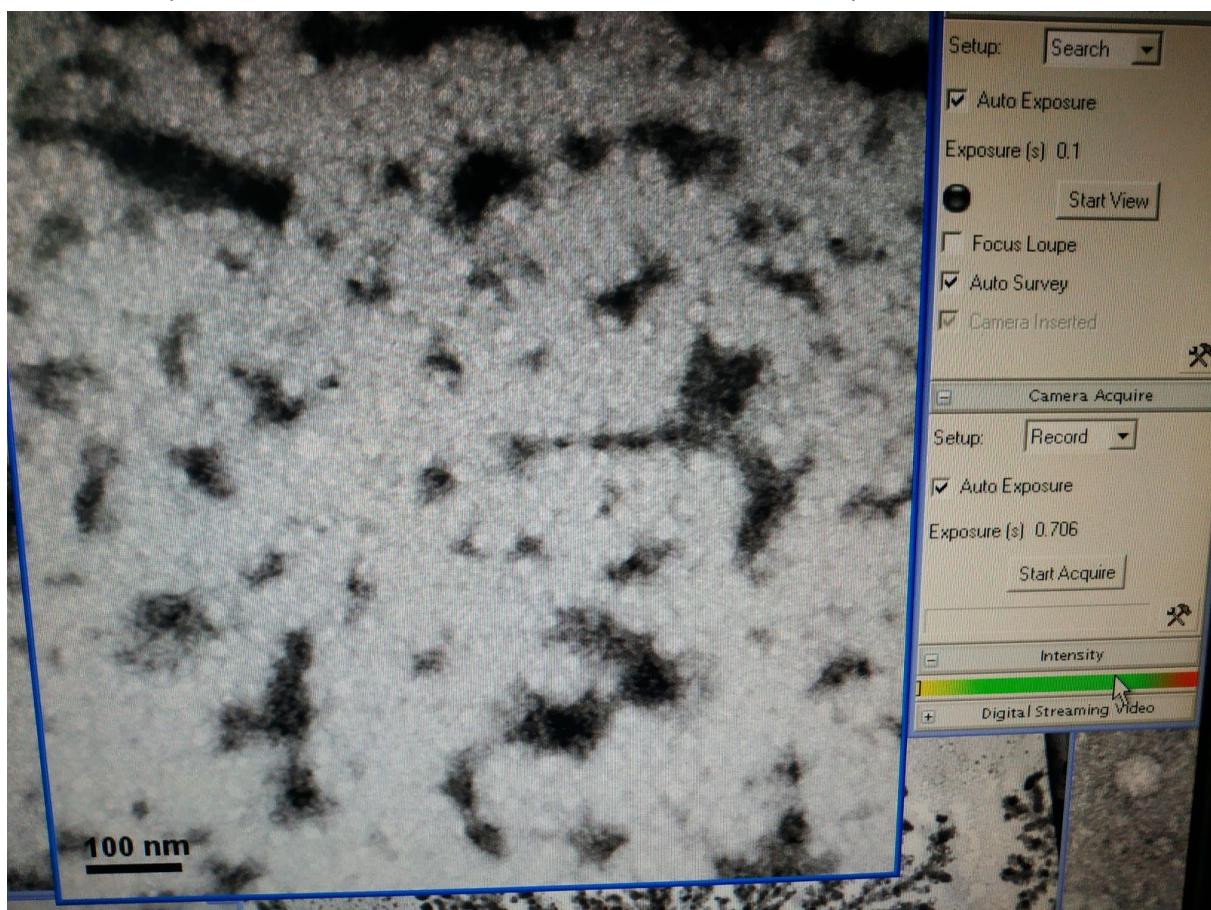
lid可能純到U2即可？

bottom這次band幾乎看不到(連原液都很淺)

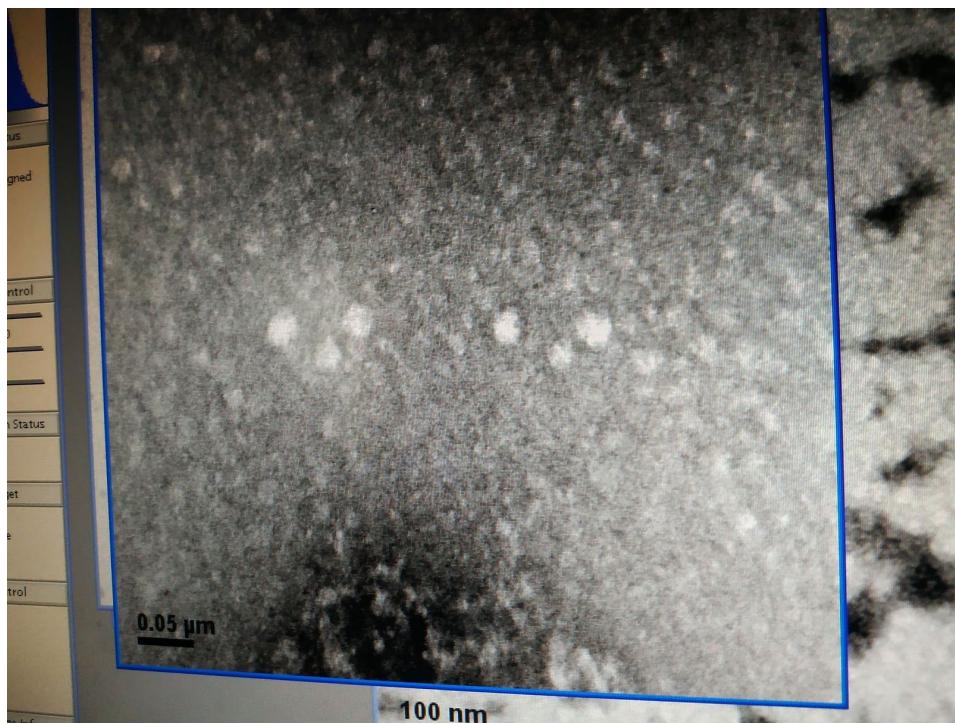
**8/16** 照TEM(早上：苡寧、采蘩、清璽)

(下午：苡寧、清璽)

- 1.不要做discharge 樣品的附著效果變差 且銅網破損多
- 2.震盪完後若閒置較久 在製作樣本前可再震盪1-2min才不會讓先前的震盪沒有效果
- 3.今天新製作的樣本有找到大小一致重複出現的白色小方格( 推測就是我們的box) 但對比不明顯難以觀察 下次做染色時染色的時間應該可以加長
- 4.檢查廠商製作DNA時曾用過什麼enzyme(找廠商的報告) 確認沒有類似大小的蛋白質會影響觀察(DNA照出來的結果應該會和蛋白質差不多的顏色)

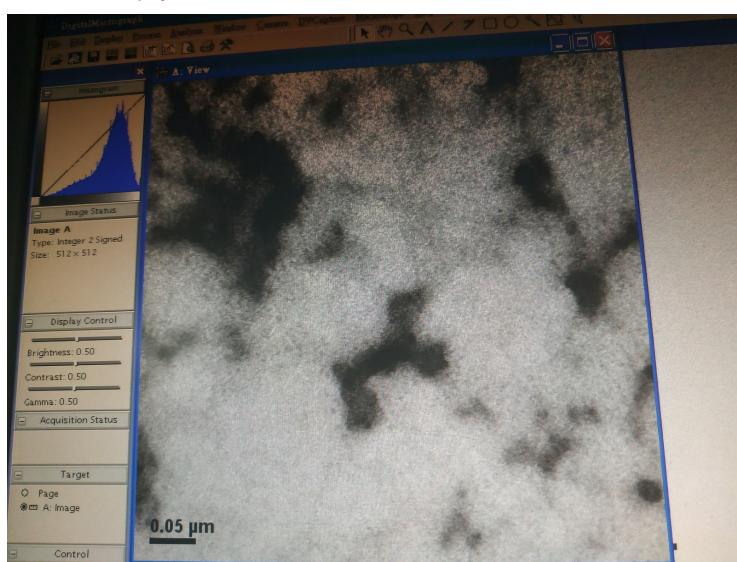


settle5min,stain1min,震15min



settle5min,stain1min,震30min, new pro.

Bonus:貴賓狗！！！



## **8/17** 開會紀錄(睿謙 重旬 鈺璇 滕靈 泉浩)

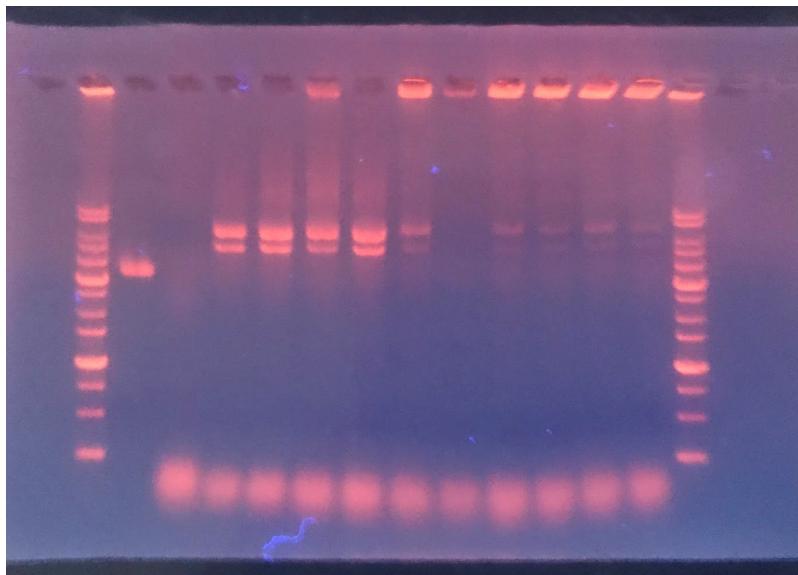
若使用目前材料繼續折疊，所需改變之變因。

- 1.震盪時間可以試試1分鐘、5分鐘、10分鐘，休息時間、頻率加長。
- 2.使用共同儀器中心(系館5樓)之震盪儀降低功率。 (現在440W/
- 3.溫度降低，以燒杯裝取冰塊，置放飄浮板。
- 4.染劑時間加長
- 5.MgCl<sub>2</sub>濃度上升
- 6.agarose 濃度下降

**8/18采葉，鈺璇**

**BOX 13小時protocol**

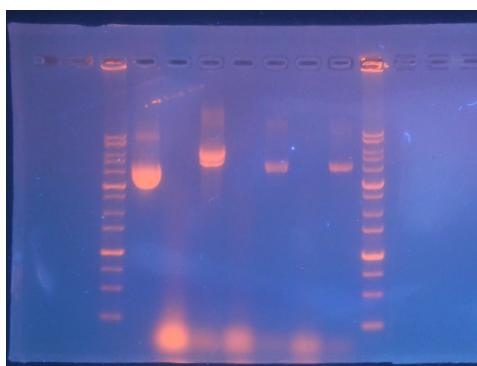
(marker/scaffold/staple/10mM/10mM/15mM/15mM/20mM/20mM/25mM/25mM/30mM  
/30mM/marker)



舊protocol濃度15:看3和4的band是什麼？之前沒看到可能只是沒震  
舊protocol濃度25:看卡在well裡的是什麼？

**8/10 pcr跑24小時之成果**

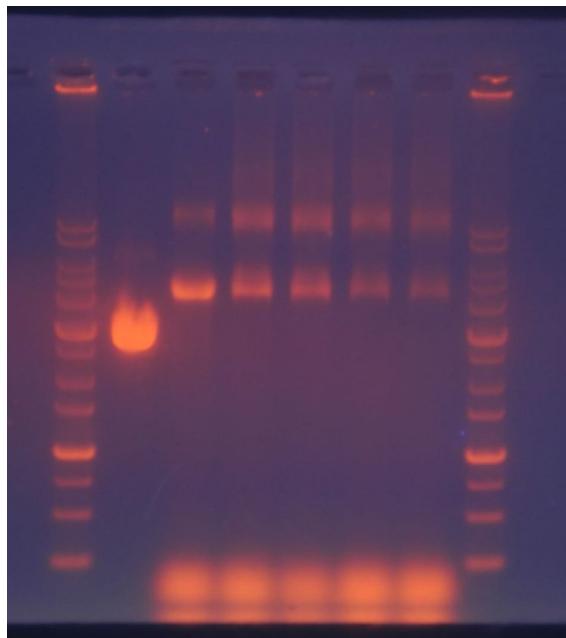
各well分別是：marker/ scaffold / X staple / X / B p / B / T p / T / marker



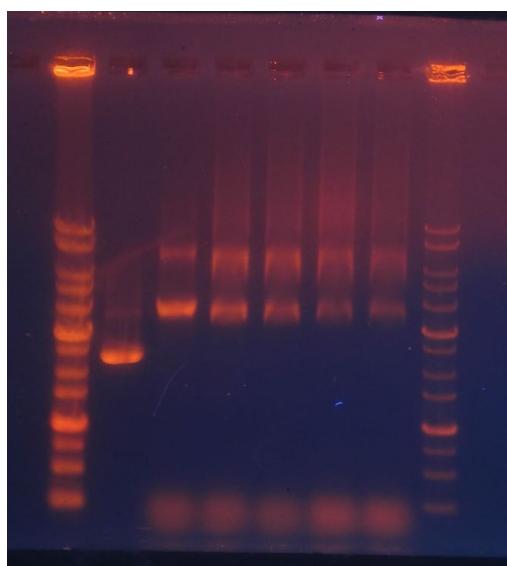
8/18

Box(24protocol): scaffold/10/15/20/25/30

0.8%膠



0.5%膠



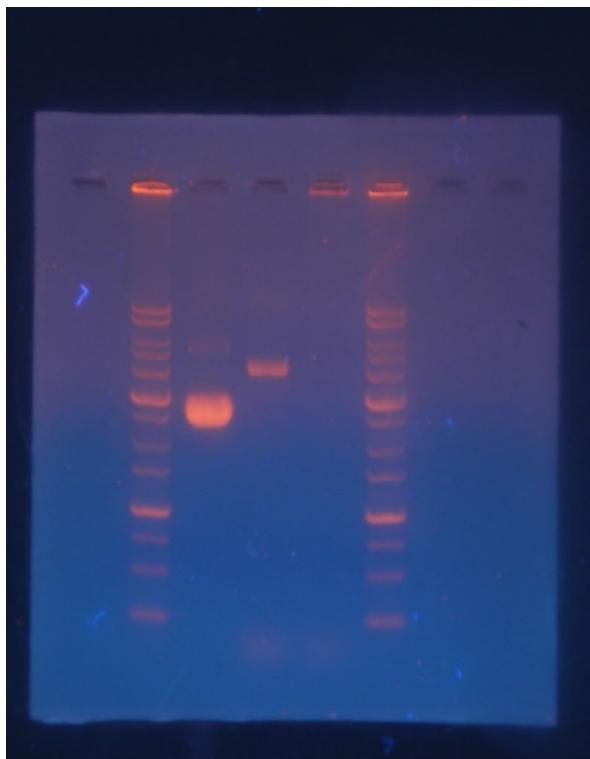
新protocol鎂濃度15,20:看上面新跑出的band是什麼

結論:跑舊protocol鎂15,25      新protocol鎂15,20      純化照TEM

## 8/20 嘗試 重甸

(舊protocol / 0.8% GEL/ 純化一次產物(U1))

ladder / scaffold / 10(應該是15??)mM / 25mM / ladder



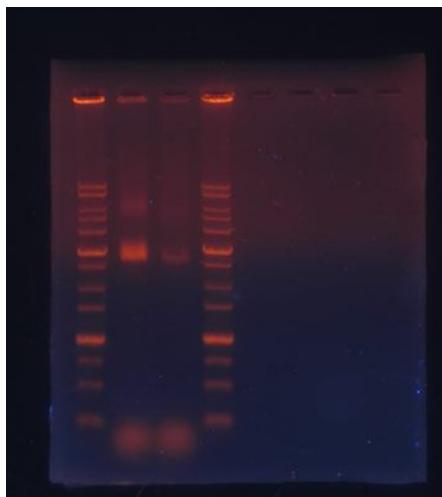
15mM沒有看到新奇的band 25mM 有卡住的跡象 可以試試0.5%GEL並且觀察不純化的產物

跑舊protocol的PCR 15mM/ 25mM

**8/21采葉、清蠻，鈺璇**

(舊protocol /0.5% GEL/未純化)

ladder / 15mM / 25mM / ladder



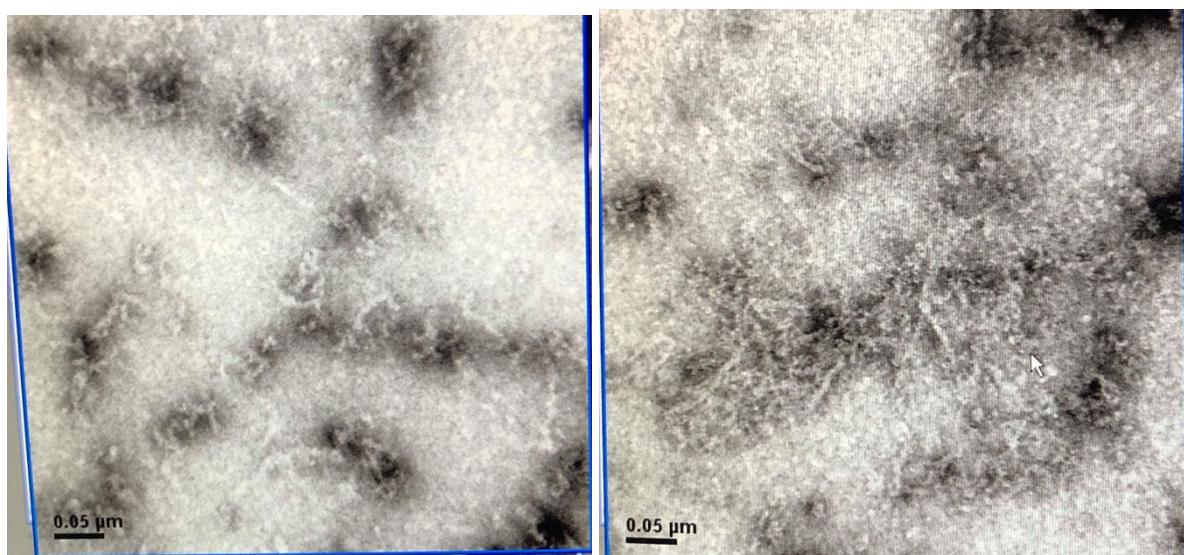
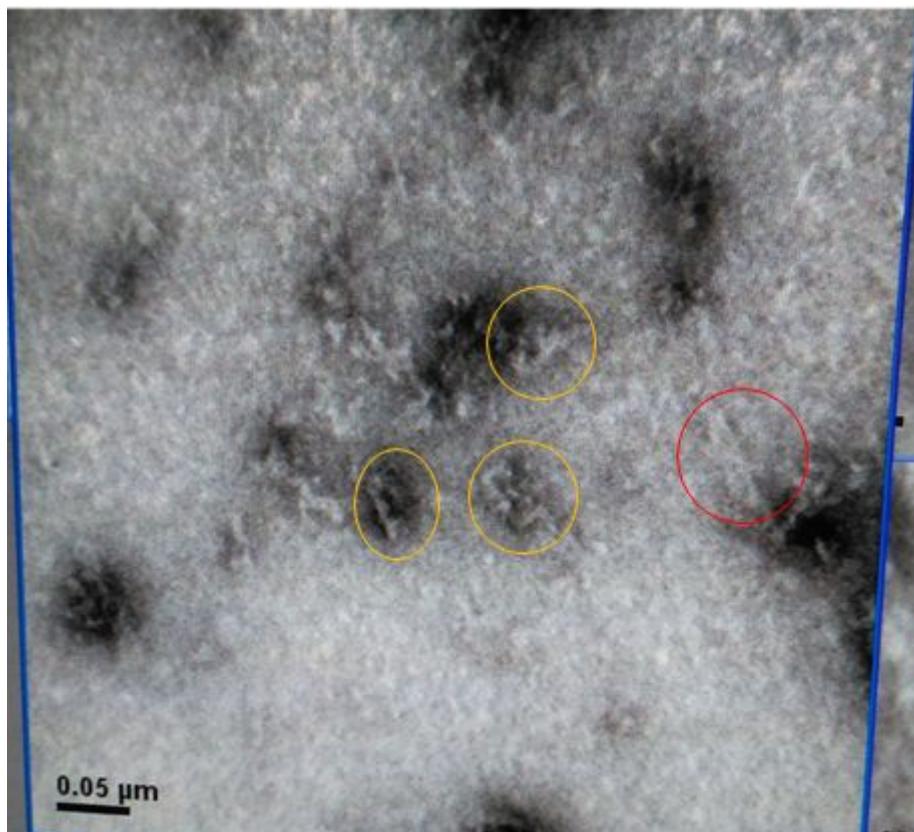
上面都有一個很糊很不明顯的band, 可能不是一制的結構

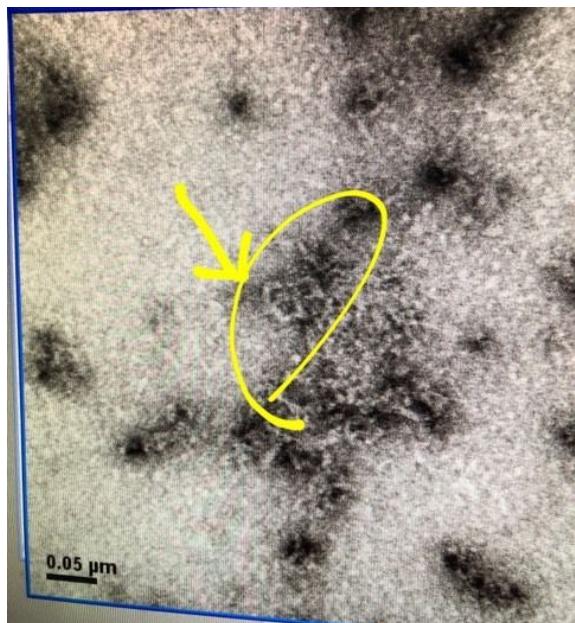
8/22早:清璽、鈺璇 下午:睿謙, 鈺璇

舊protocol未純化Box/震15min(90W)/Mg:15mM/

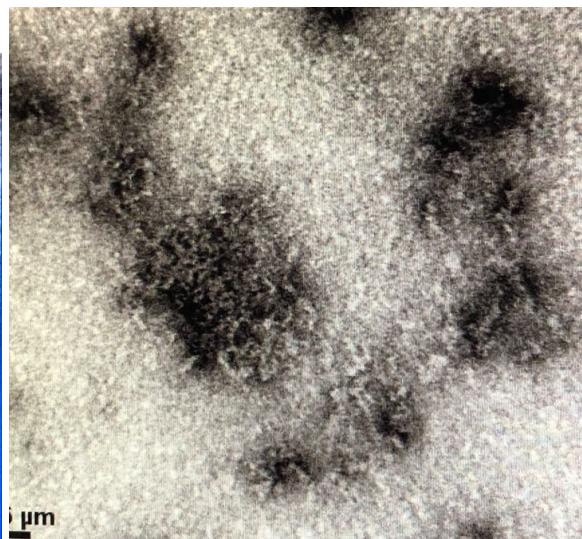
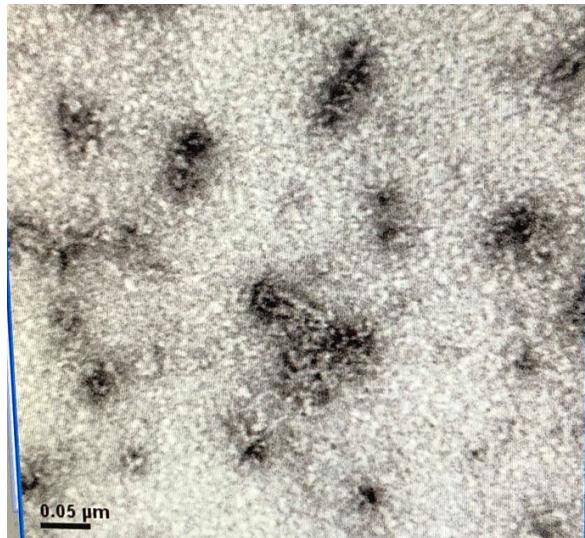
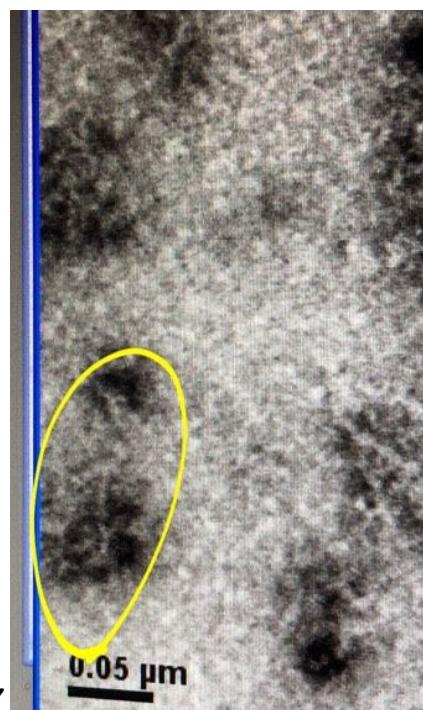
黃圈內的E很像側面的Box, 紅圈內似乎有底面的Box

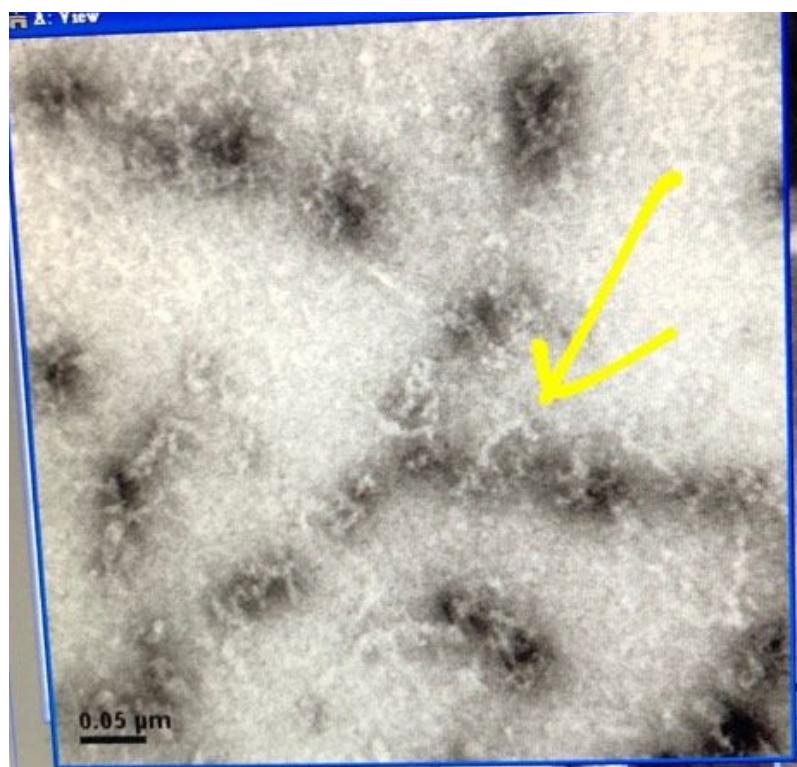
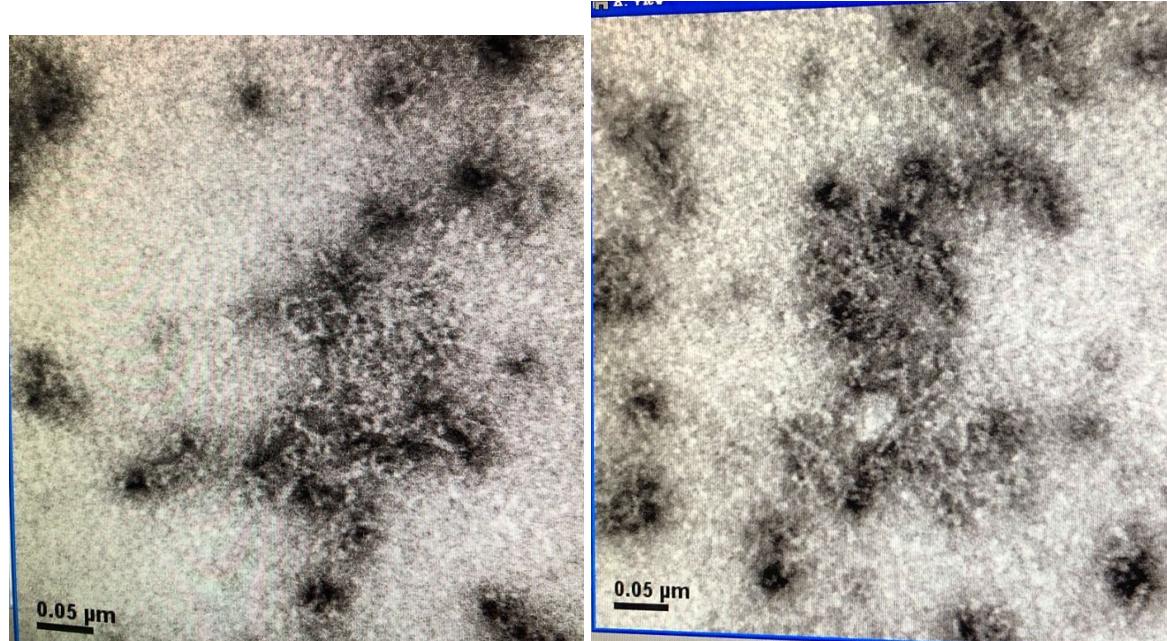
幾乎都看到側面的, 沒有從上或下的角度(長方形)可能厚度太薄?沒染出來?





877





## 8/23 賈謙 重甸

以新的protocol 做 scaffold 20nM ; staple 100nM MgCl<sub>2</sub> 15mM

## 8/24 泉浩 鈺璇

0.5%GEL 新 protocol 的 box (sca 20nm, sta 100nm, MgCl<sub>2</sub> 15mM.)

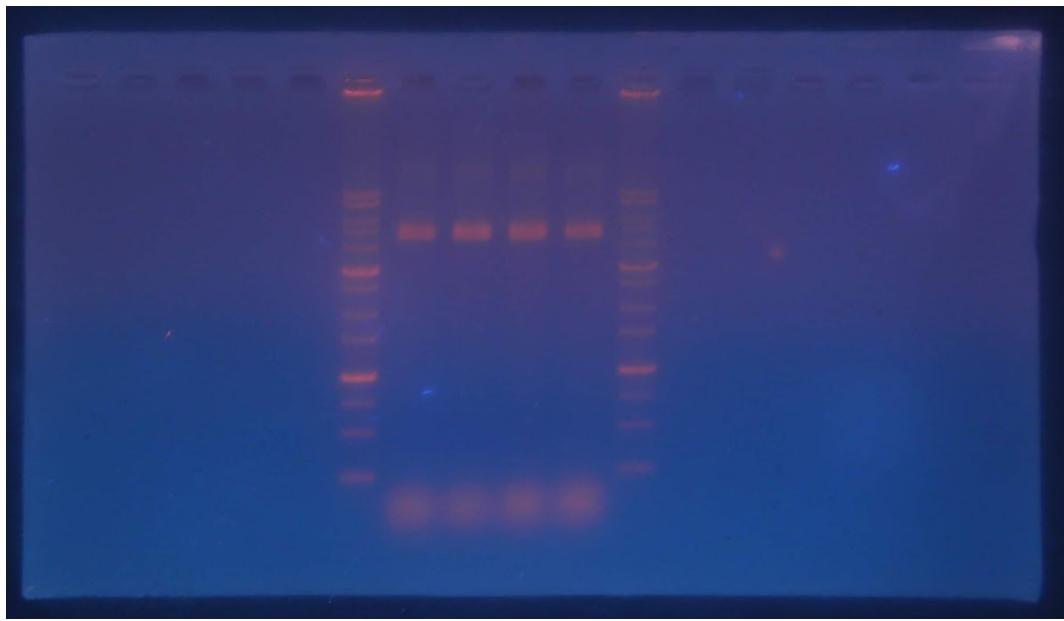
control / 沒震 / 震 5min / 震 10 / 震 15



震完後多出了一個卡 well 的巨獸

**8/25** 重旬 睿謙

舊protocol 15 MgCl 1%GEL



由左至右是震盪 1、5、10、15分

四位小朋友看起來一模一樣，且都沒有卡，推測在15min內結構還算穩定

## 8/27 滅靈 鈺璇

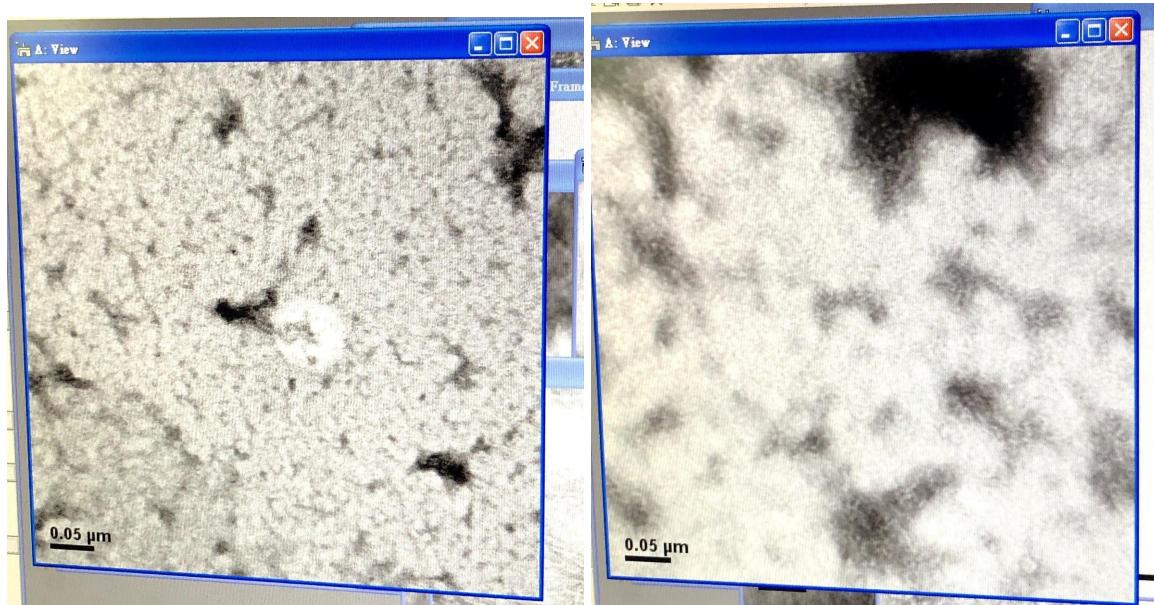
### 早上處理樣品

- 目的: 測試染2min.效果。
  - 舊pro 15mM 15min.改染2min. & control(only buffer) 染2min. 相互比較。
  - 新舊pro一起在五樓震15min.先不染新pro.
  - 下午照電顯依據染色效果決定染色時間。若舊pro染2min效果不好，新pro可以染1min和豪棒棒(舊pro)比較。
-

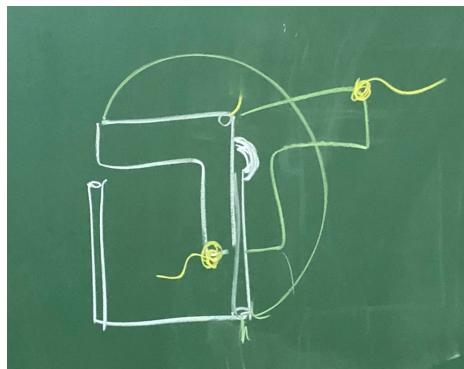
**8/28** 肇謙 鈺璇

下午觀察新protocol之震盪15min 和不震盪之TEM

結論：沒有發現產物



## B計畫：重訂staple之結構



1.改成半個盒子

2.旋轉270度，做到隱藏/露出的效果

動機應注意問題：

不能同時把不相干的藥物加入盒子裡

8/29 上午 清靈、采蘩—跑膠、震盪、製不純,震15 min片

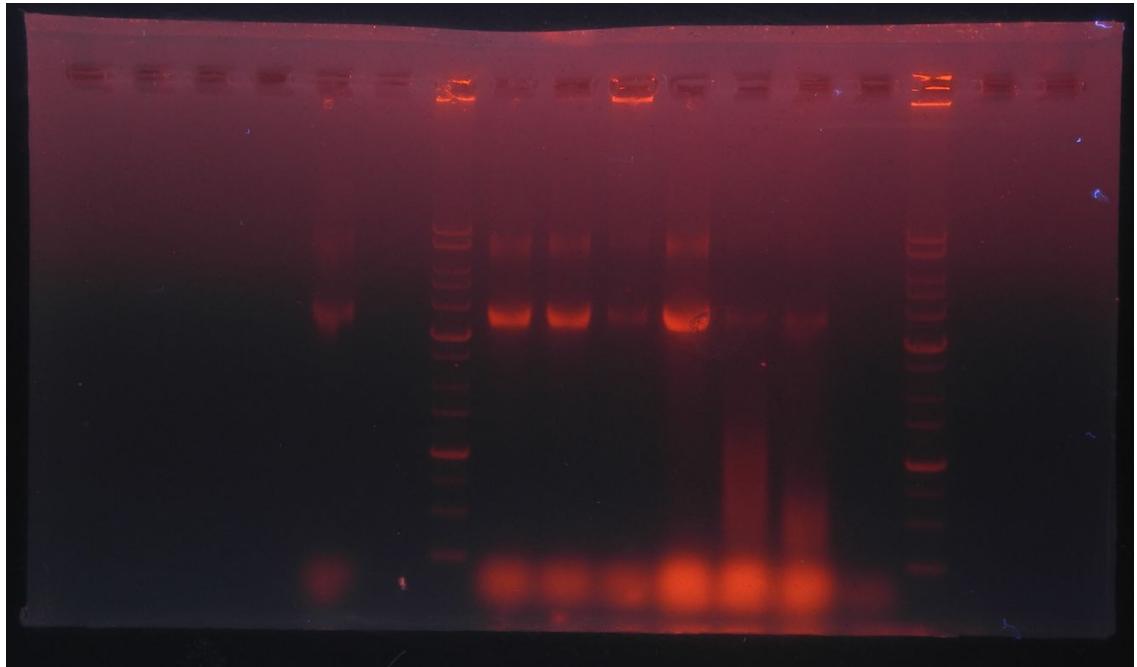
由左至右依序為：

Ladder／

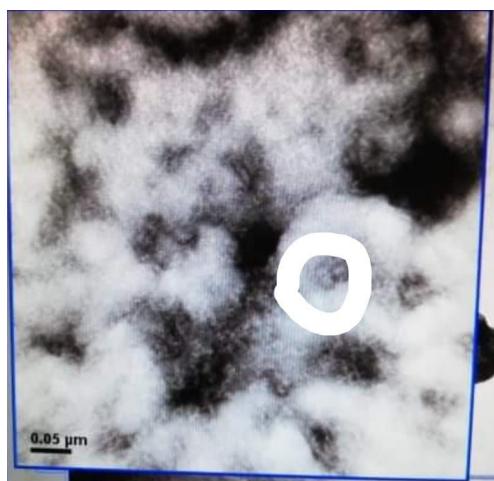
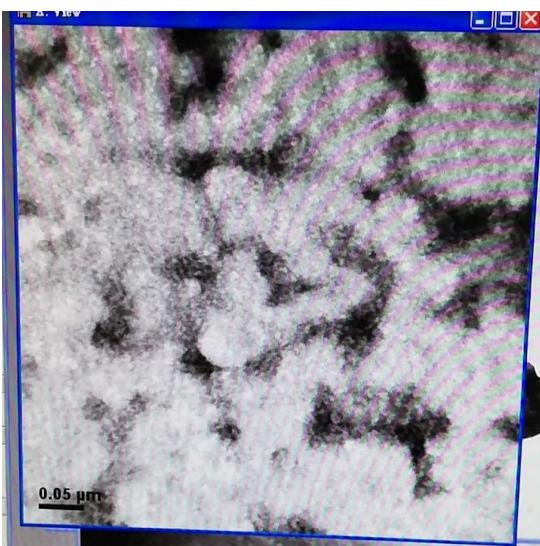
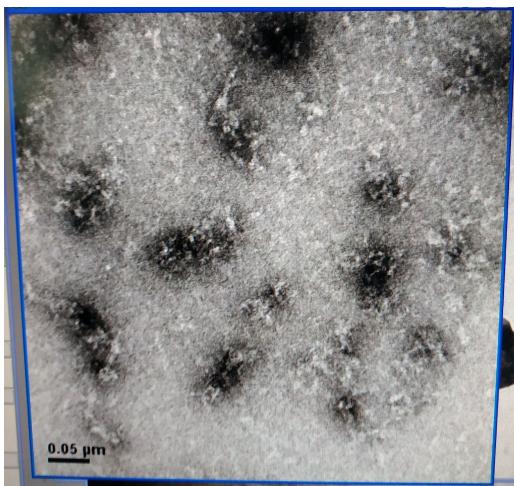
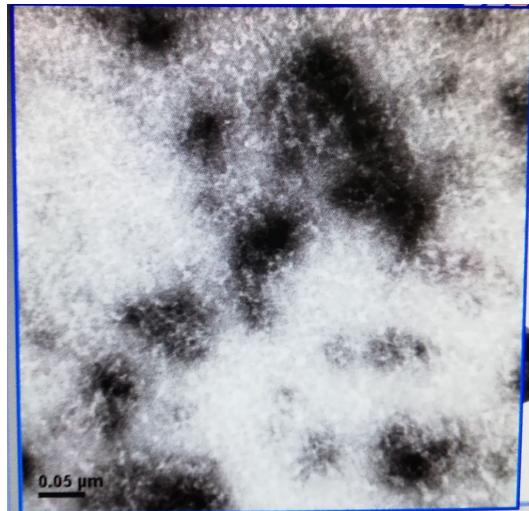
不純，不震／不純，震5 min／不純，震15 min／

純一次，不震／純一次，震5 min／純一次，震15 min／（純化）down／

Ladder



8/29 下午 采鑑、苡寧—TEM看不純,震15 min片 (好棒棒2.0)

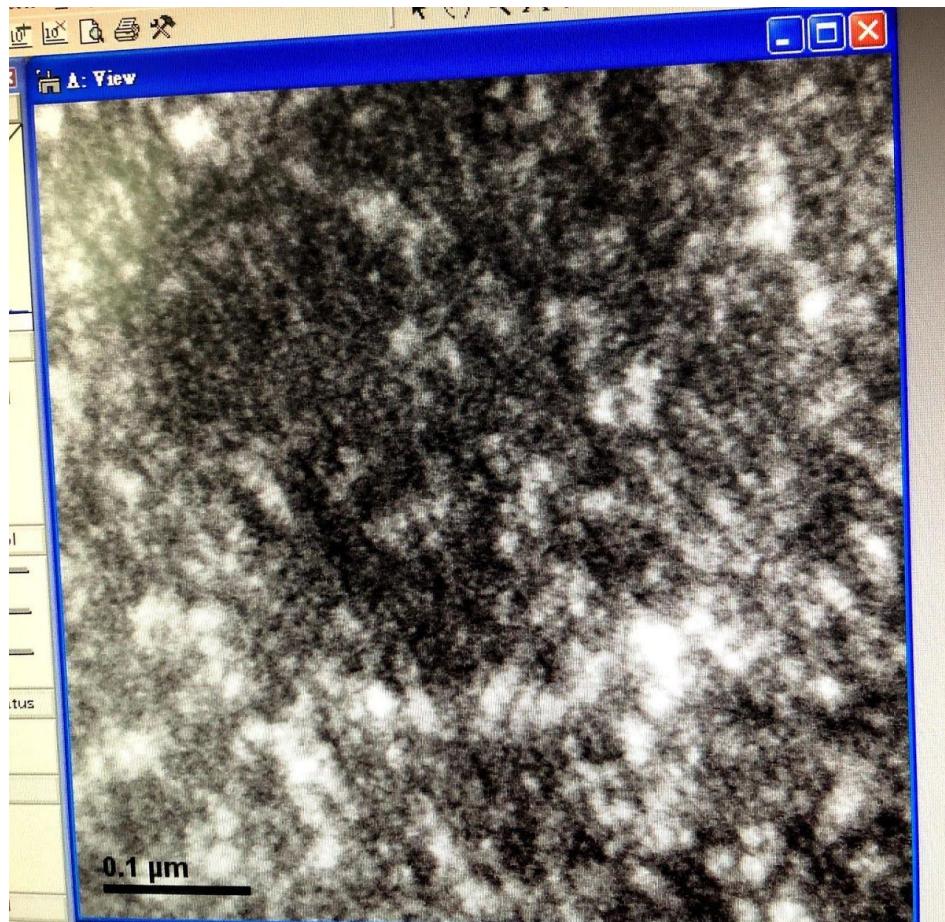


學姊建議換ratio(1:7 or 1:10)跑舊protocol

## 9/2 鈺璇 睿謙 滕靈

靈：早上樣本處理 - 舊20:100 15mM 不純不震 染前小震1min. settle5 stain1。

上午：20:100不純不震 舊pro 15mM, 血球抹片。



下午：彥榮meeting。建議用簡單的定點翻面機制作動機，例如：

旋轉門、變裝娃娃、東南西北、電影院椅子。健妤建議用1:10或1:7跑跑看

晚上：下PCR for 10:50以及10:100 scaf:staple (Mg 15mM/ 舊protocol)

預計做：

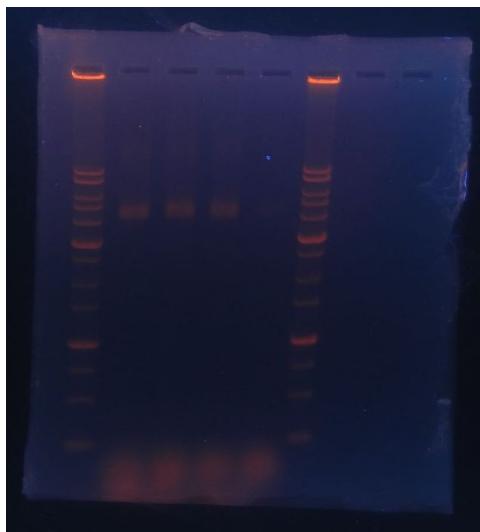
10:50 震15min 15mM diute2X 染2min

10:100 震 5/10 min X dilute/no dilute

**9/3**早上鈺璇 滴蠶

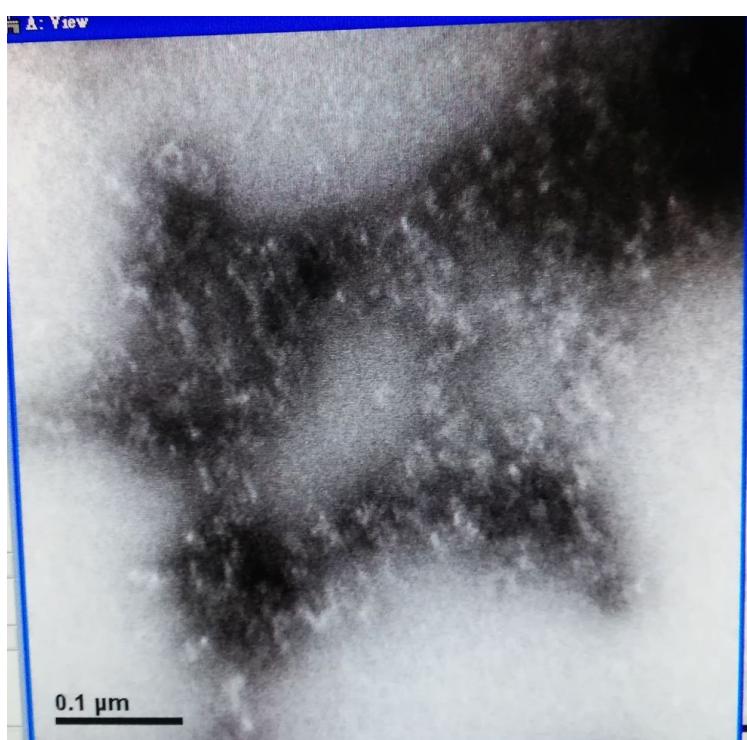
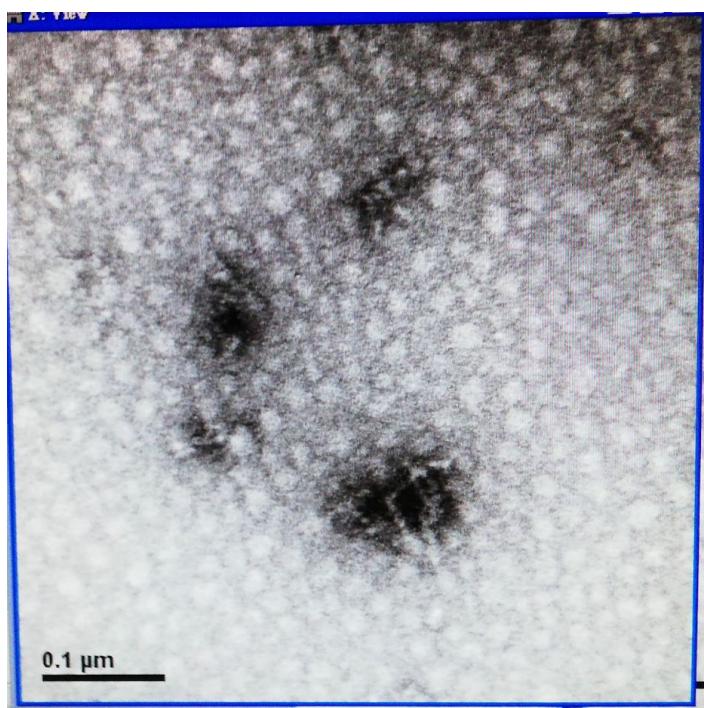
Box舊pro,sca:sta10:100/Mg15mM

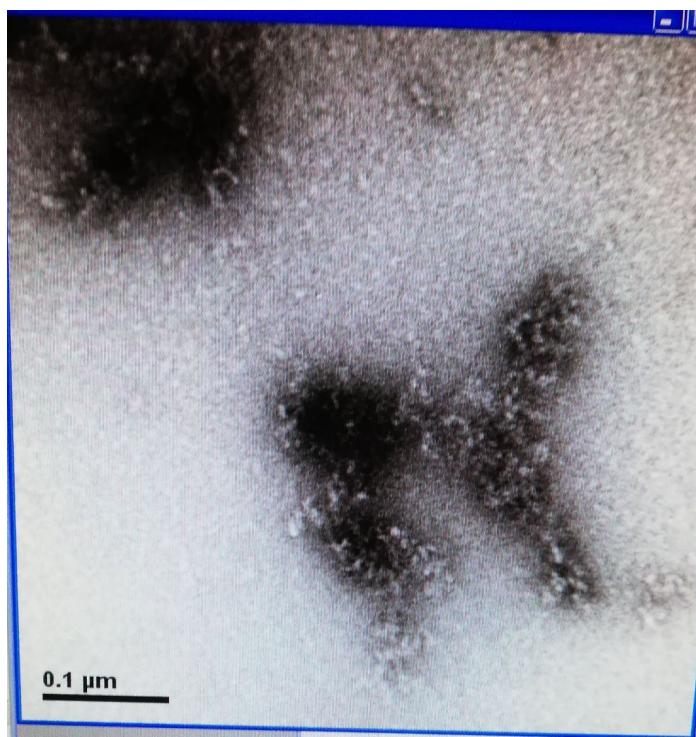
沒震/震5min/震10min/震15min



下午采蠶 重甸 鈺璇

box舊pro/10:50/dilute2X/Mg15mM/震15min/stain for 2min

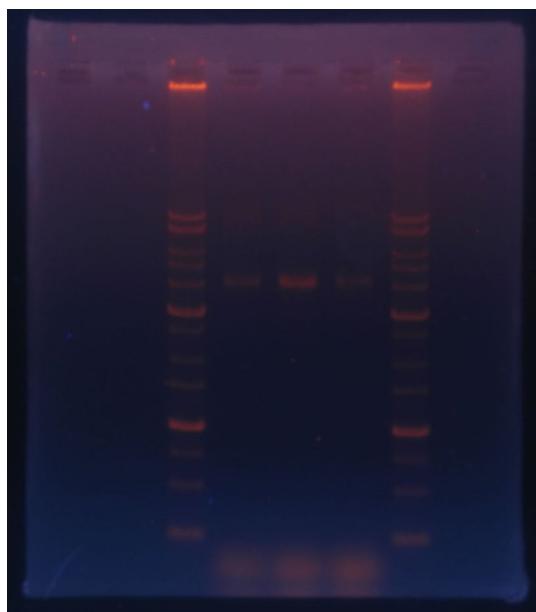




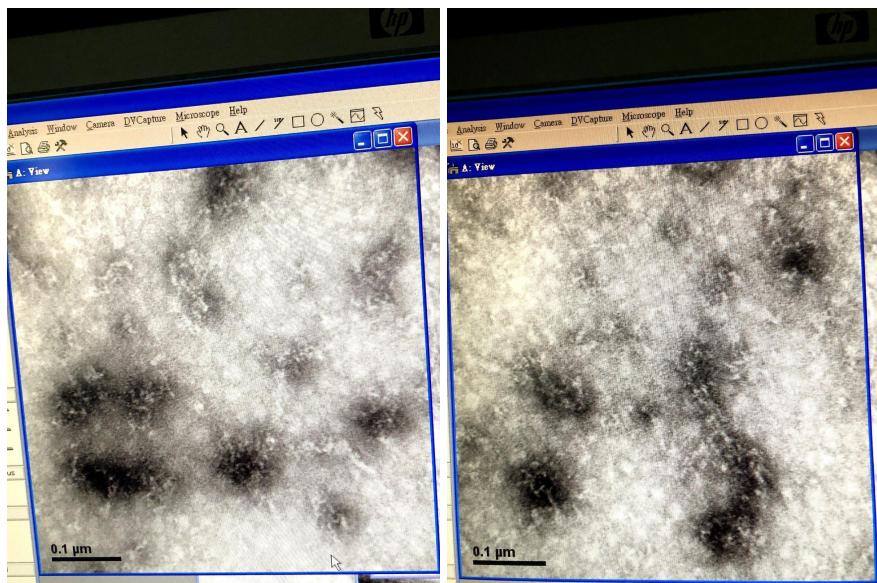
box舊pro/10:100/dilute2X/Mg15mM/

9/4 早上 采繫 睿謙 泉浩

跑膠 : MgCl<sub>2</sub> =15mM, 測三種FP比的box—由左至右依序為  
ladder/1:5/1:7/1:10/ladder, 感覺1:7的效果最好。



觀察舊protocol 10:100/震5min/染2min 不dilute



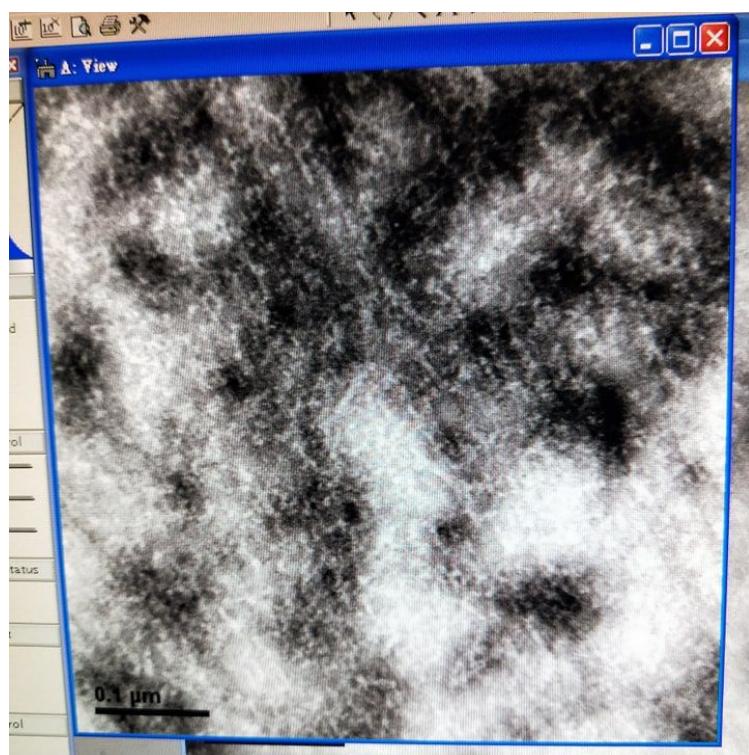
## 9/5 滅靈 重旬 泉浩

- 待觀察
  - 20 : 100 舊pro 震5min 染2min
  - 20 : 100 舊pro 震10min 染1min(已補一分鐘，共染2min).
  - 10 : 100 舊pro 震10min 染2min (今天做)
  - 10 : 70 舊pro 震10min 染2min (今天做)
- tem
  - 重看舊pro 震5min. 不純。(紅圈上面的那個銅網)
    - 太髒，破太多。沒結果。
  - 舊pro 震10min. 1:7 不純。
    - 未找到成品。
  - 舊pro 震10min. 1:10 不純



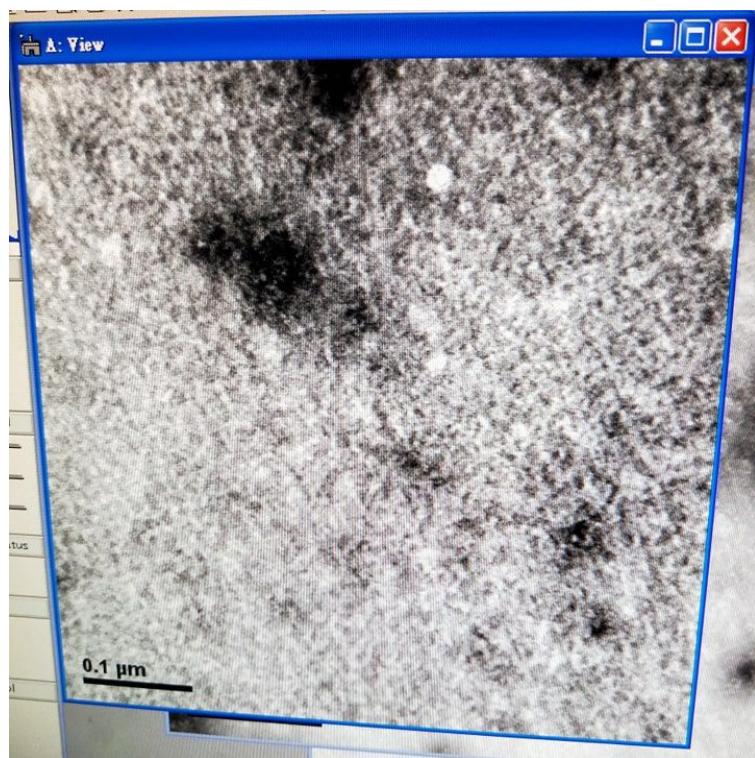


(可能是短邊，大約25nm左右，姐姐說可能稍微縮水，所以不會太精準。)



1:7 震10min 染2min 無dilute

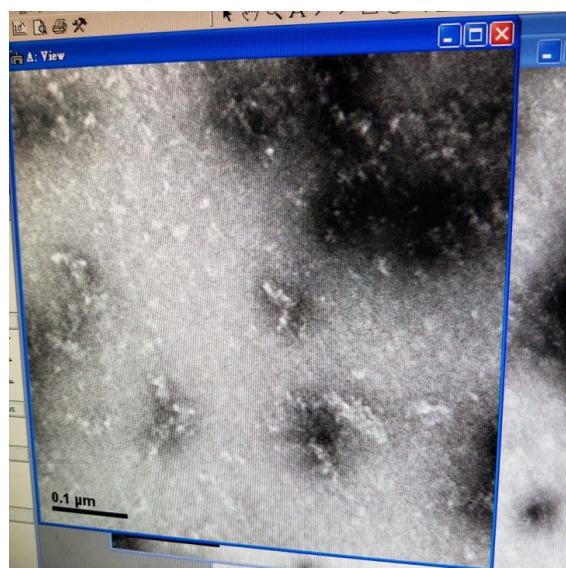
有大量的DNA，但是摺疊不完整，有直角特性的重複性不高



1:7 震10min 染2min 無dilute

有大量的DNA，但是摺疊不完整，有直角特性的重複性不高

並且出現許多朝著同一方向突起的DNA毛毛

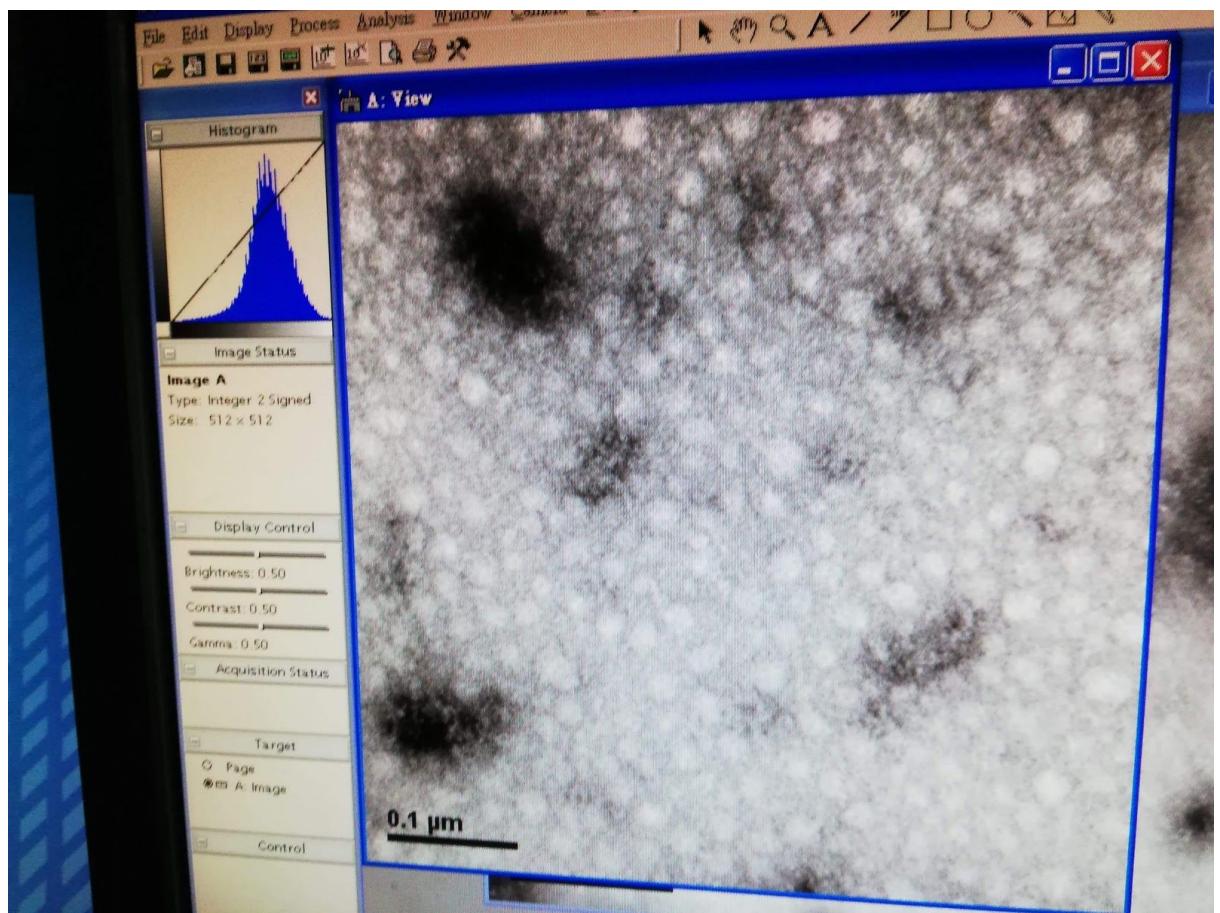


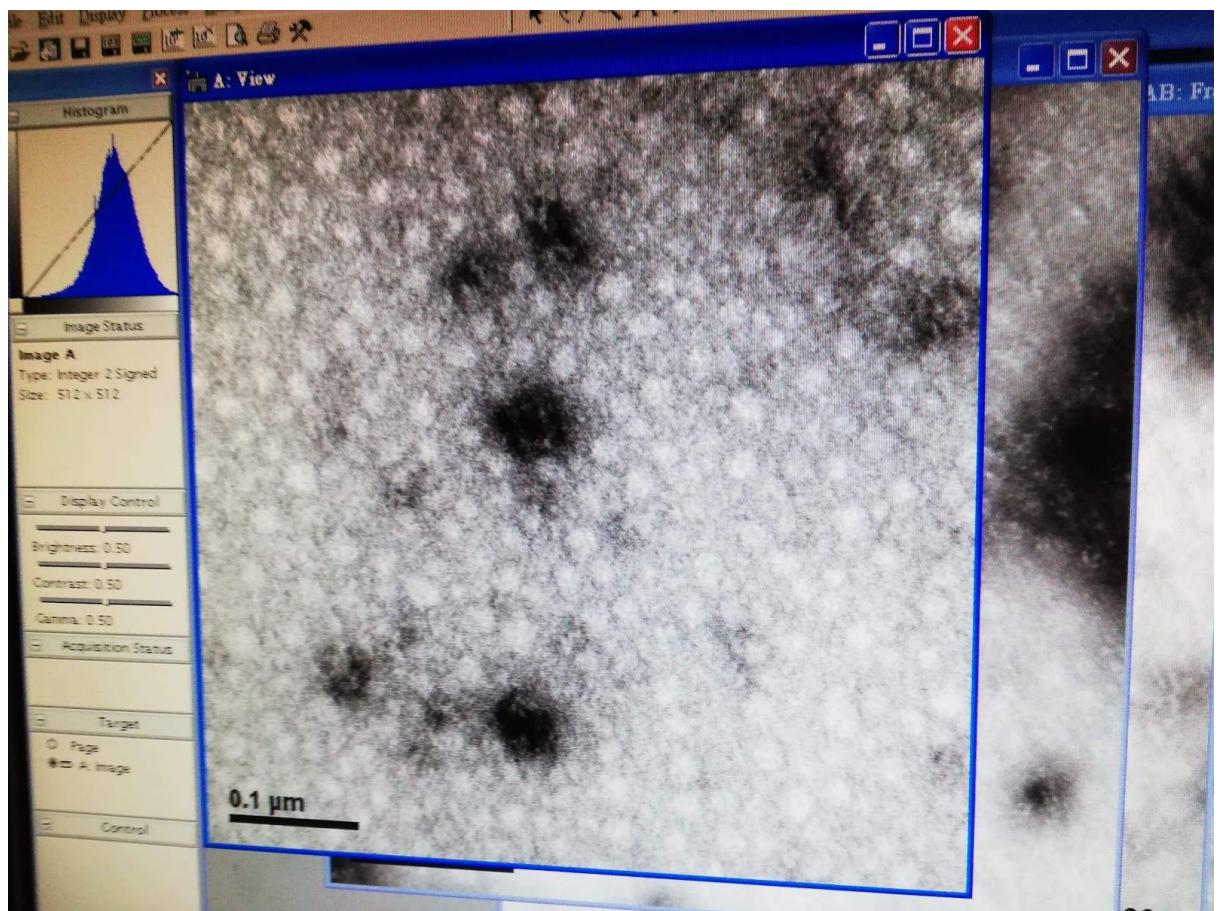
1:10 震10min 染2min 不dilute

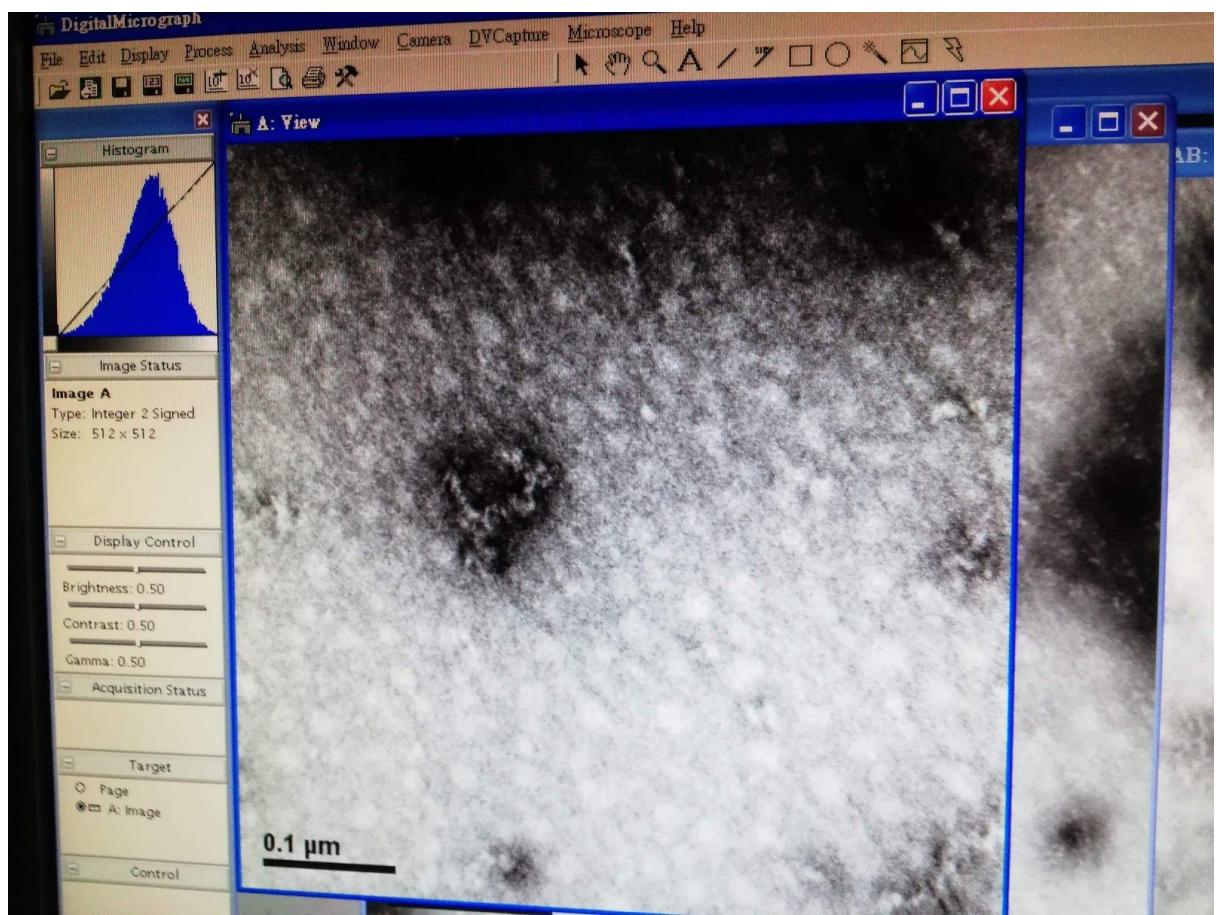
銅網大多破掉，但仍可看到DNA產物，可是形狀再現性不高

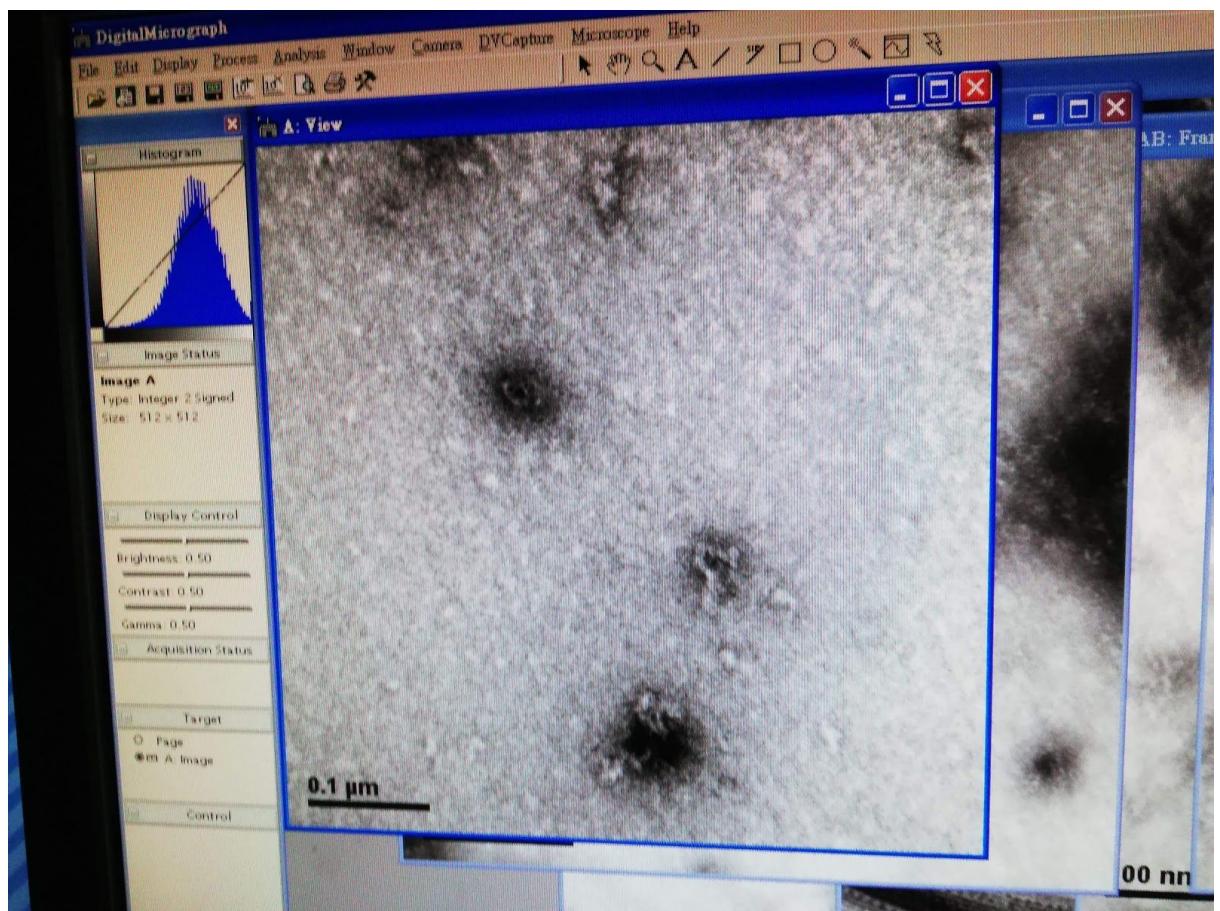
## 9/6 采蘩 滅靈 睿謙 泉浩

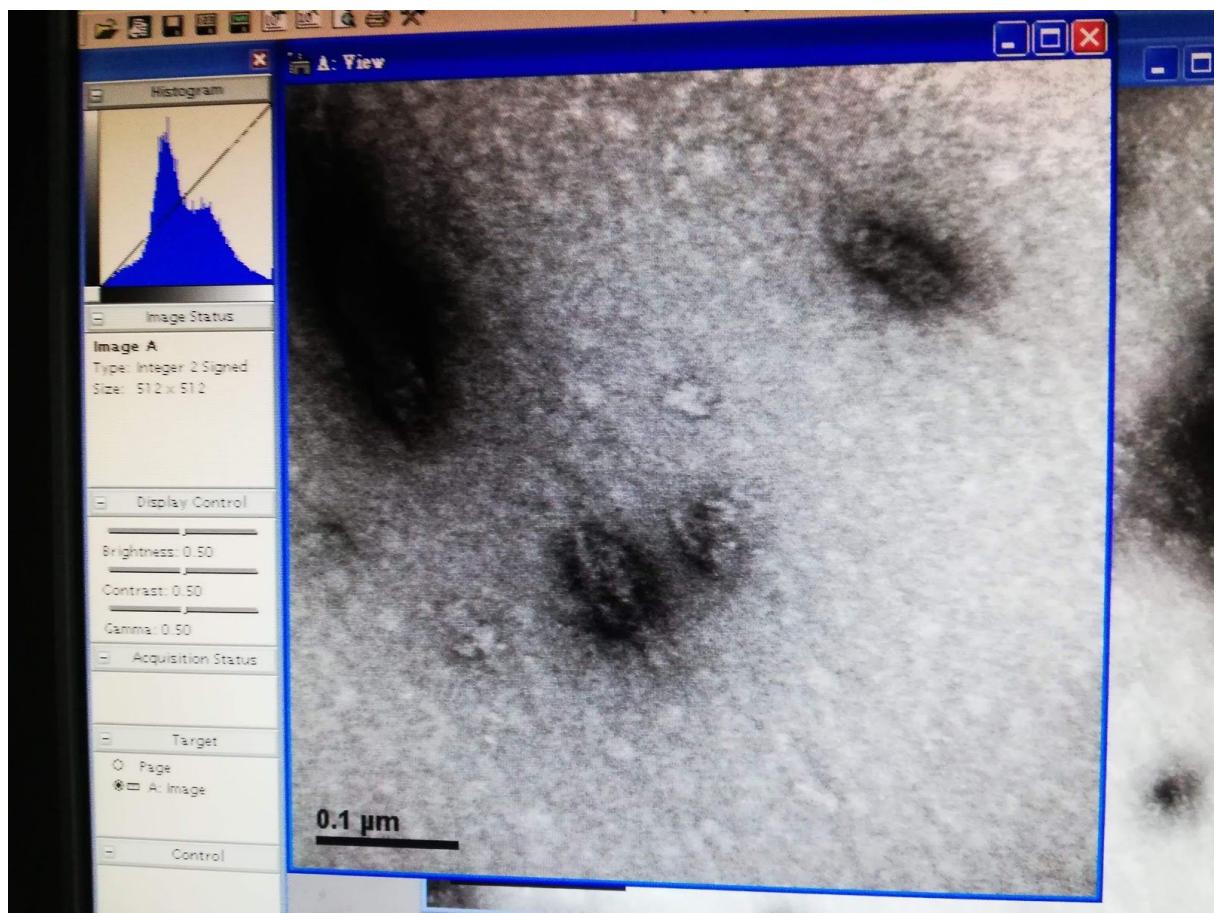
- 1:7 震10min. 15mM box stain 2min.

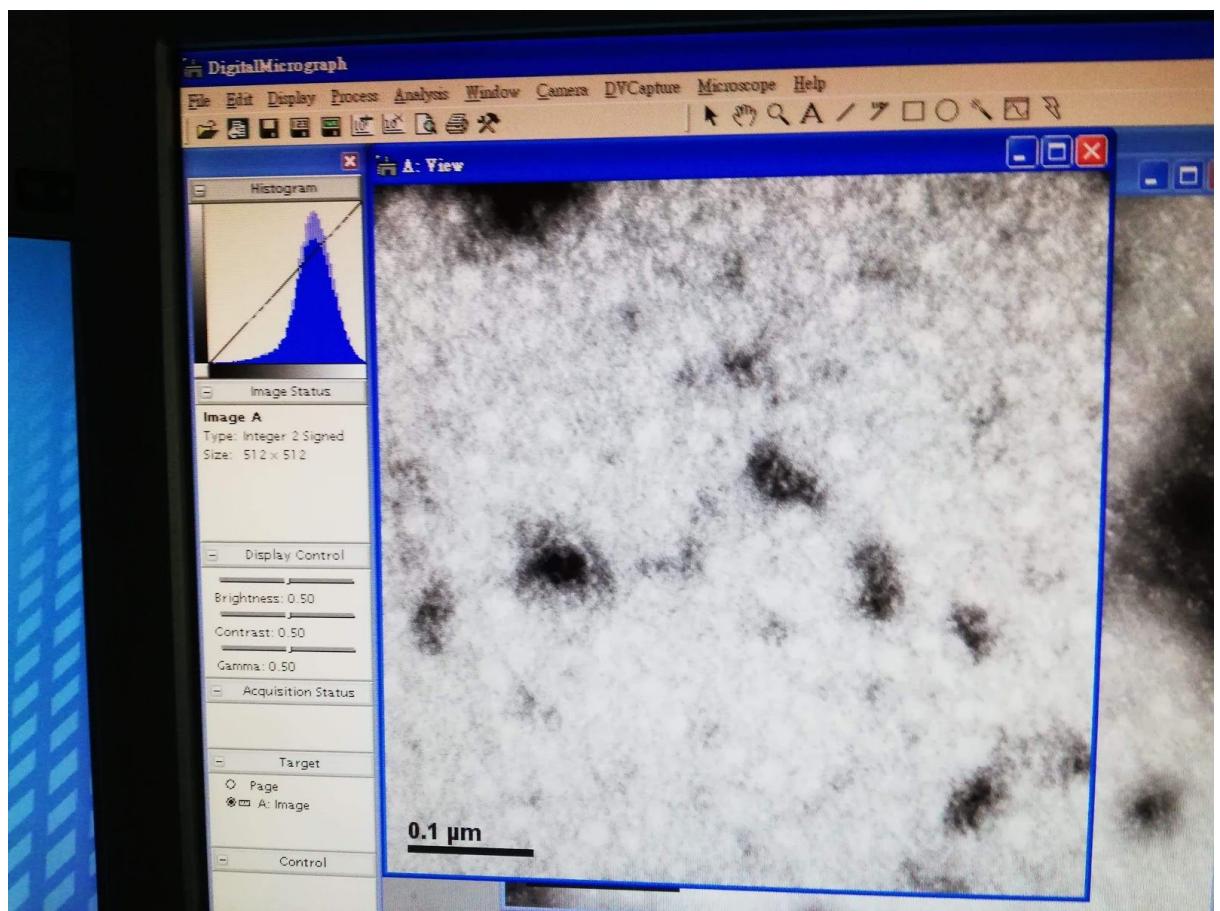


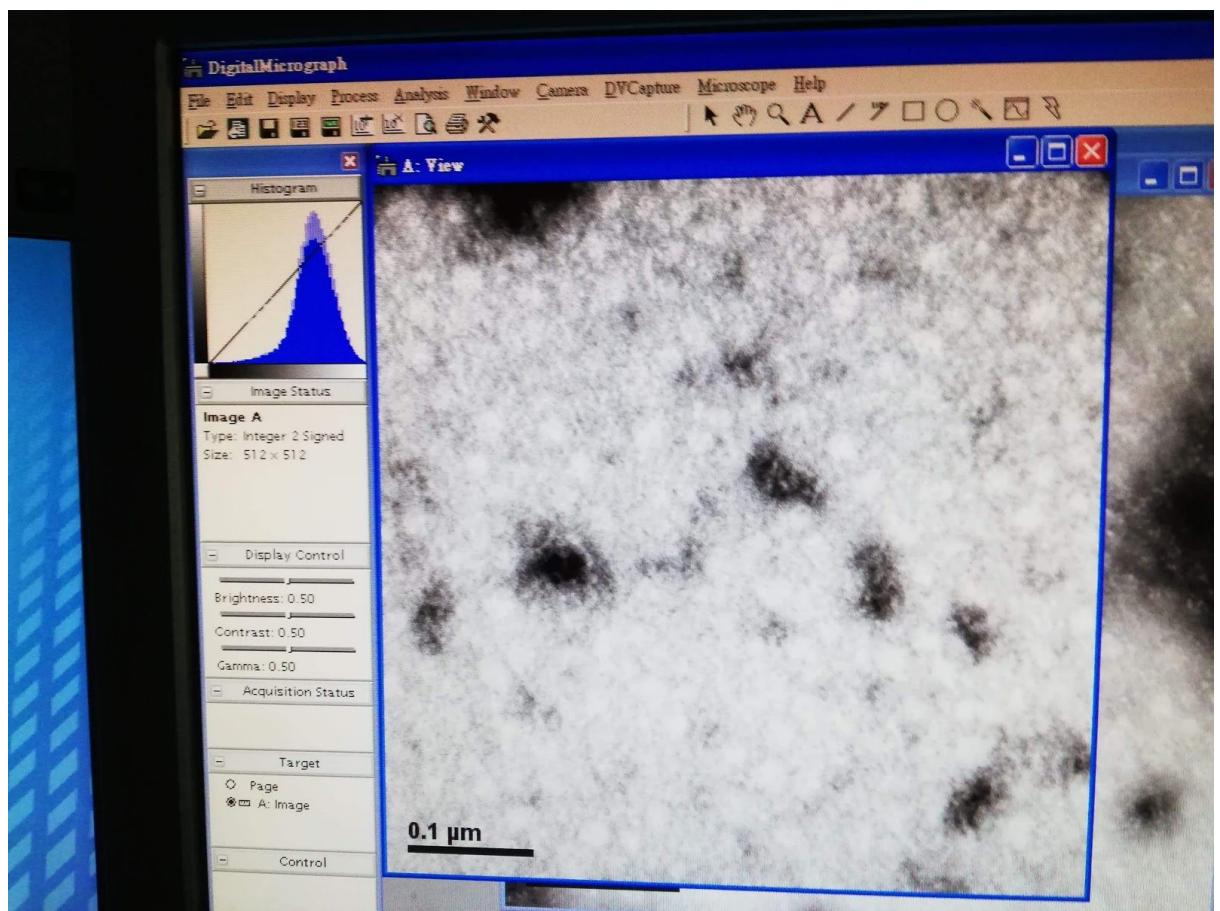


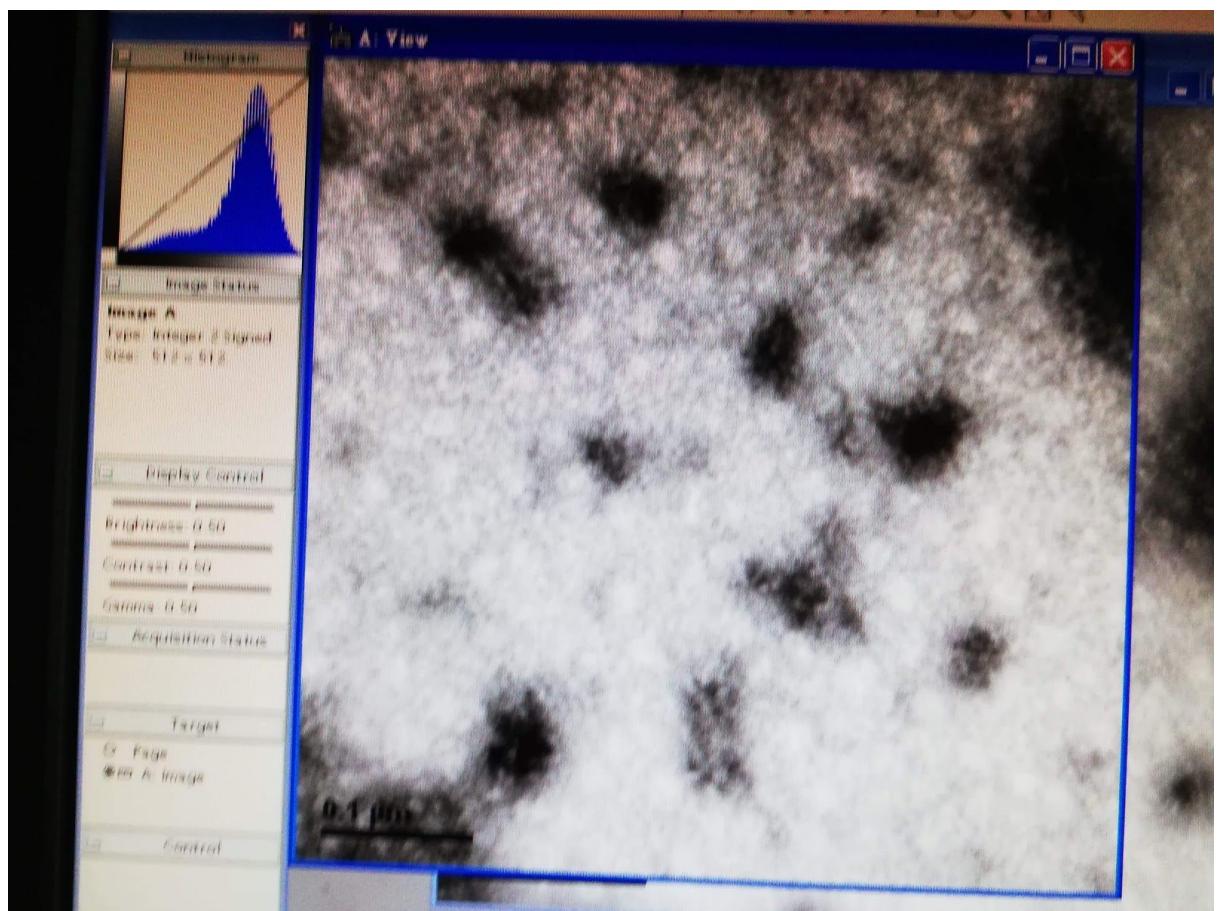


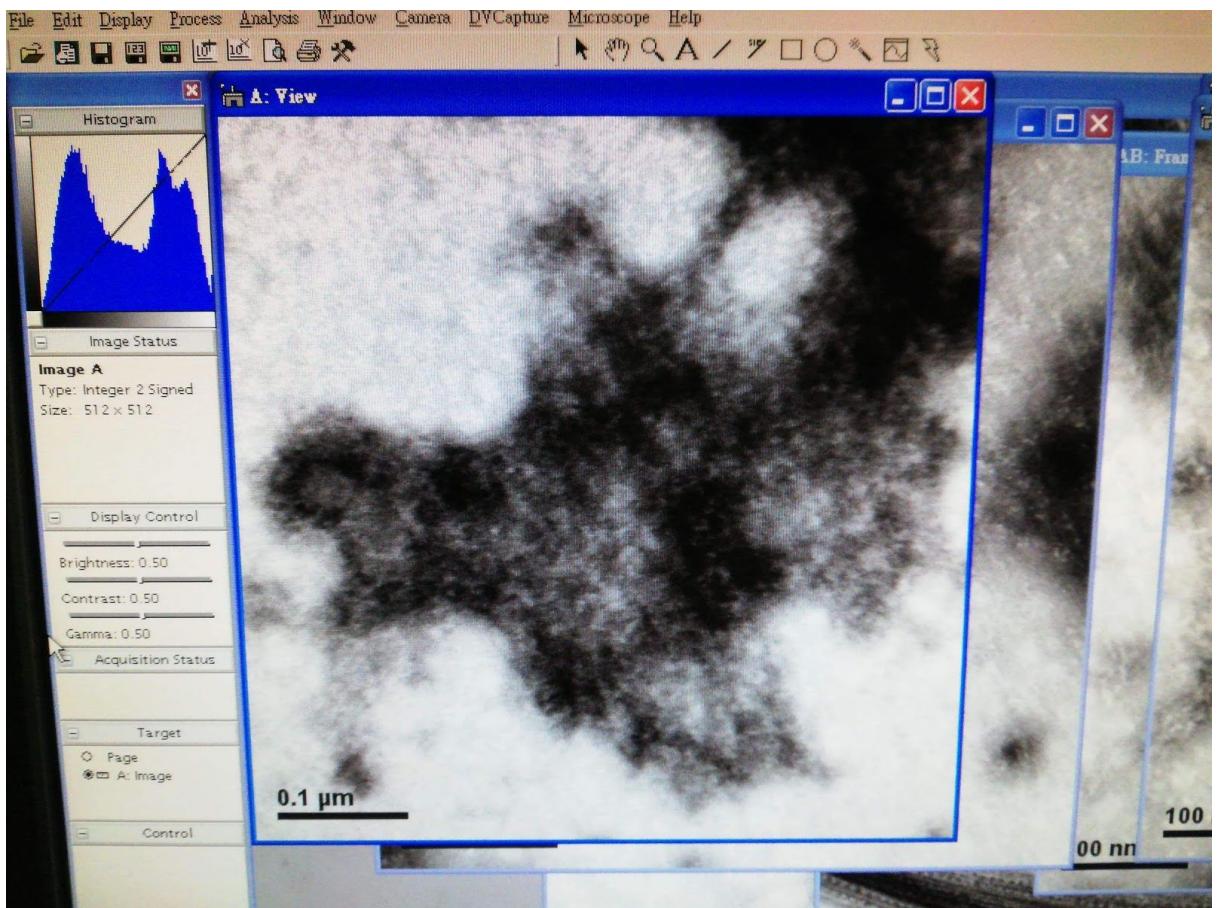




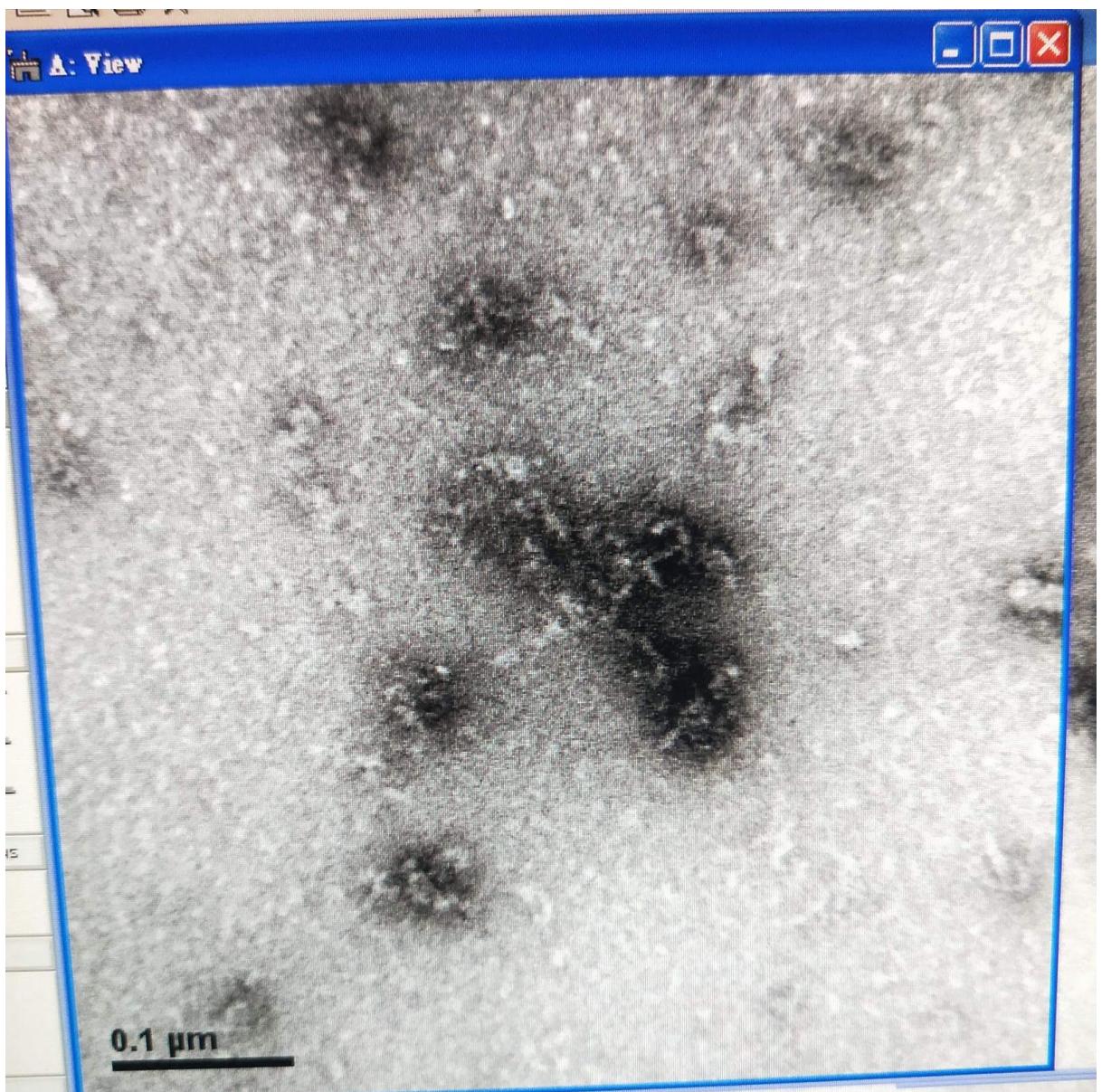


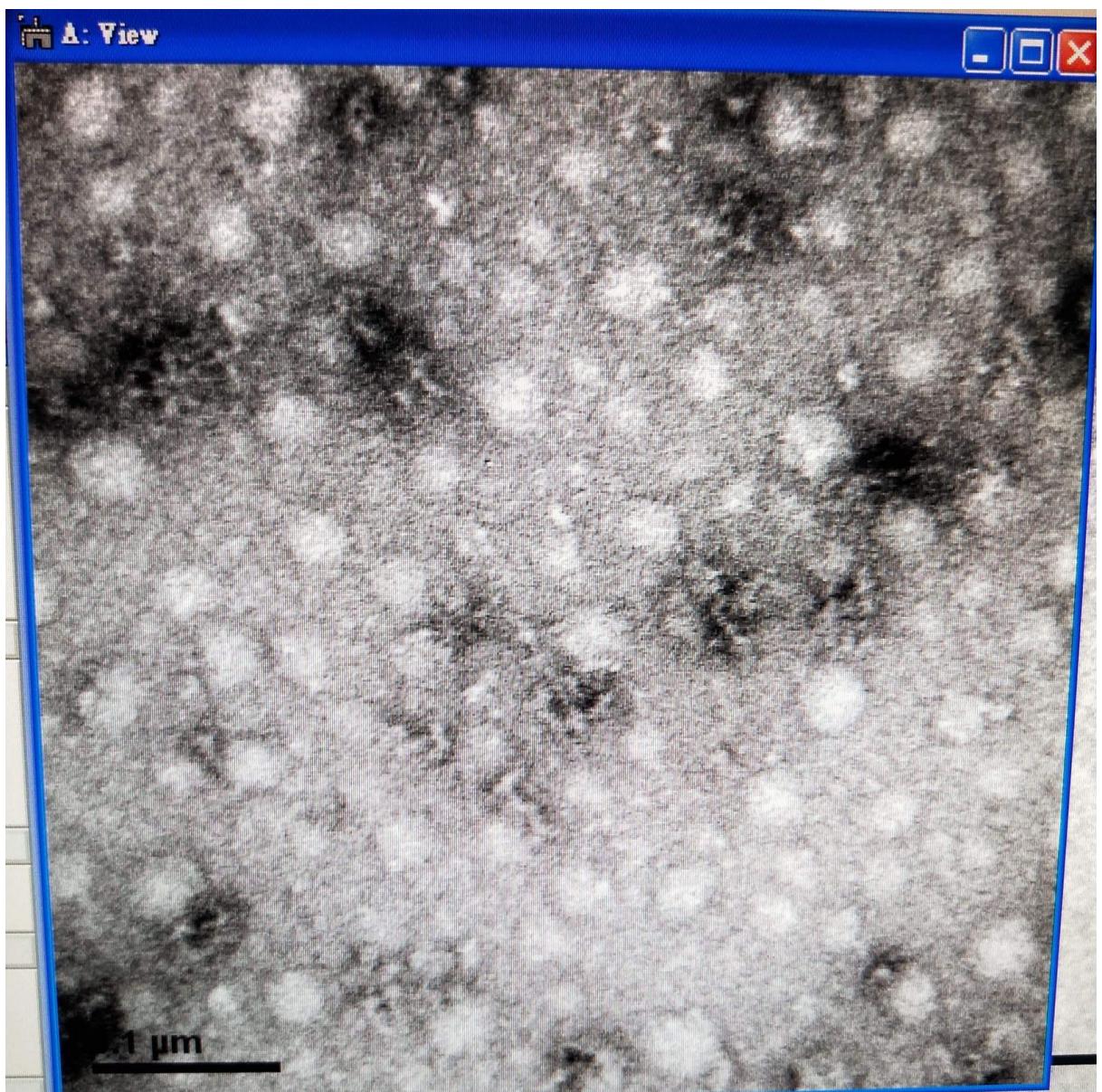




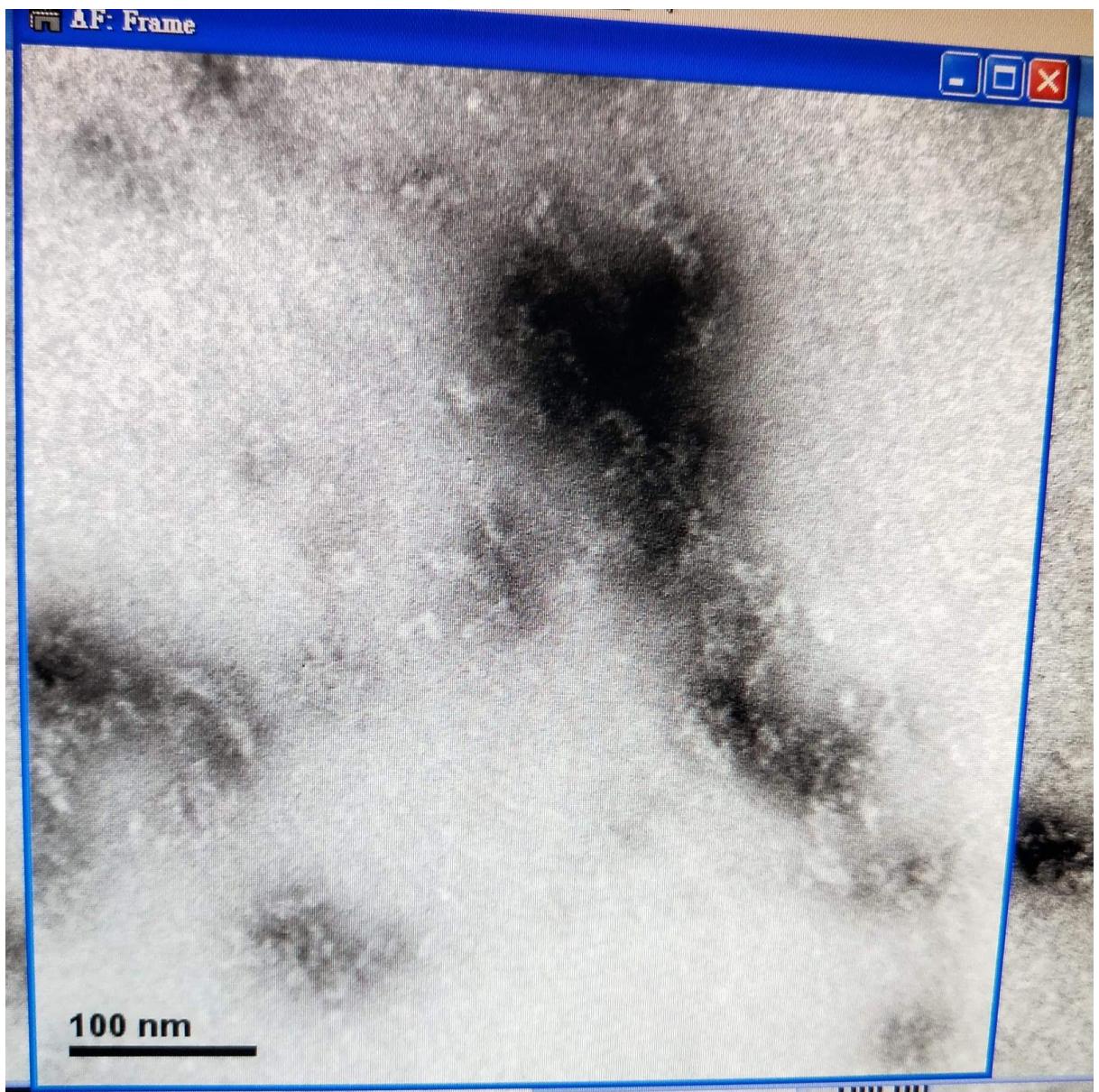


- 結論：東西不少，對比也夠，可惜沒有出現明顯產物形貌，多零碎狀。
- 染 1:7 bottom 不震 15mM / 1:7 bottom 震5min. 15mM / 1:10 bottom 不震 15mM
- 1:7 bottom 不震 15mM stain2 settle5 舊pro





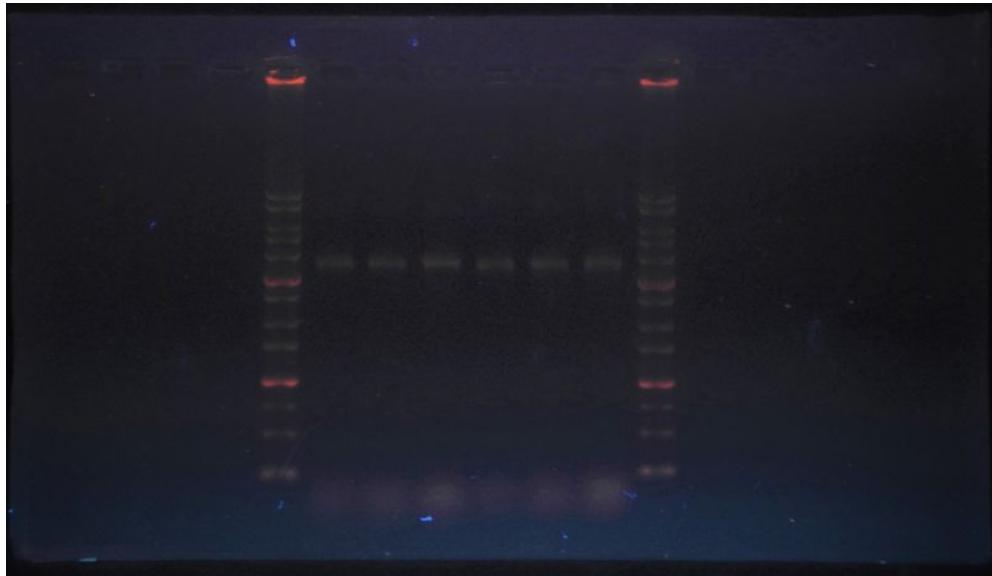
- 1:7 bottom 震5 15mM stain2 settle5 舊pro



- 結論：感覺震5跟不震似乎沒有太大區別。東西頗多，對比夠，但因為很小，所以必須到電腦上才可清楚分辨出L型。
- 待觀察銅網(已做好，在陪養皿中): 1:10 15mM 不震 stain2 settle5 舊pro
- 晚上
  - 采葉下了1:5/1:7/1:10 bottom, top lid 的pcr(故一共6管，每管體積40mul)。預計明天約9.可以收。
  - 收完明天就可以跑膠。算是對今天lid跑膠的補做。

## 9/7 睿謙 重甸

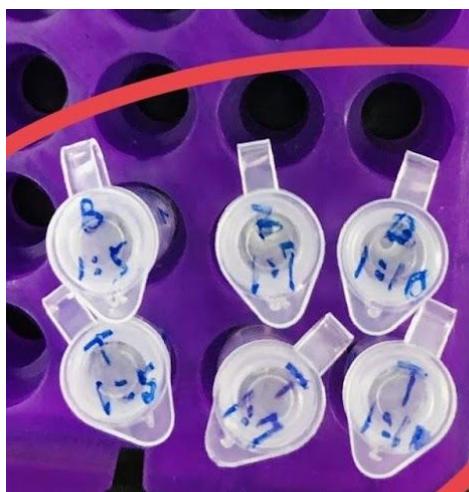
跑膠結果：



0.8% ladder/ B 1:10/ B 1:7/ B 1:5/ T 1:10/ T 1:7/ T 1:5/ ladder

感覺比例沒有太大影響

再做一次1:5/1:7/1:10 bottom, top lid 的pcr



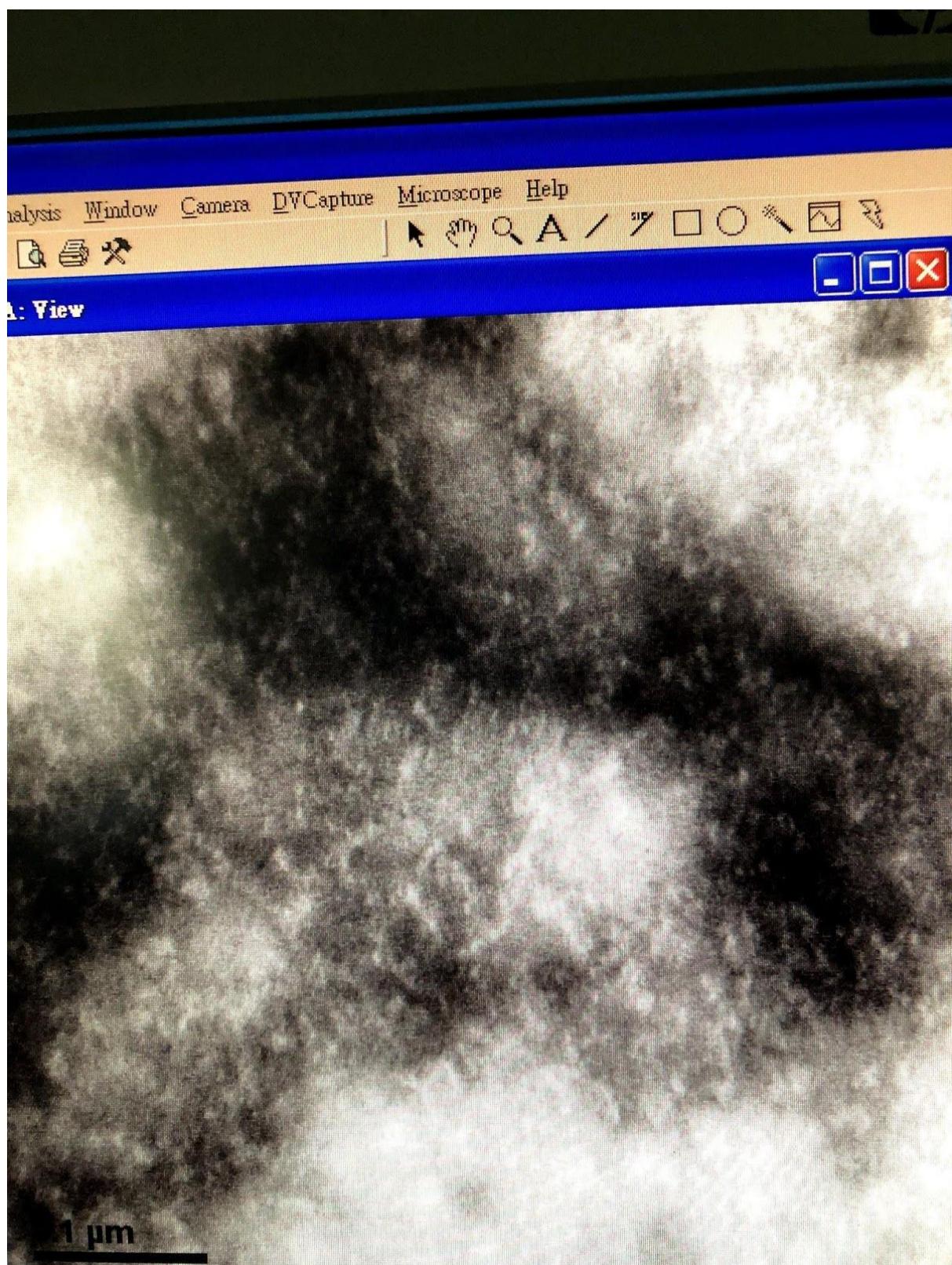
9/8 睿謙

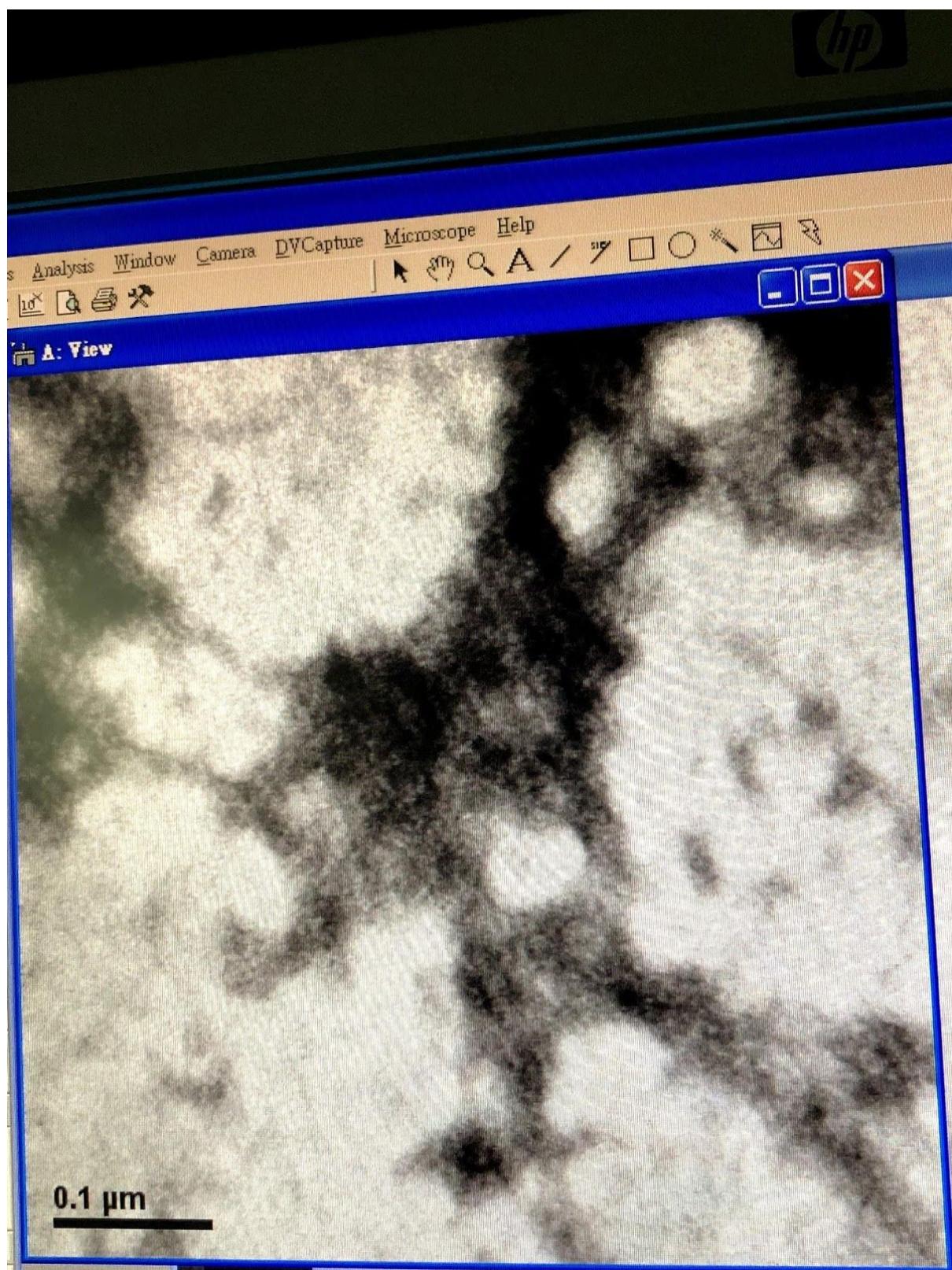


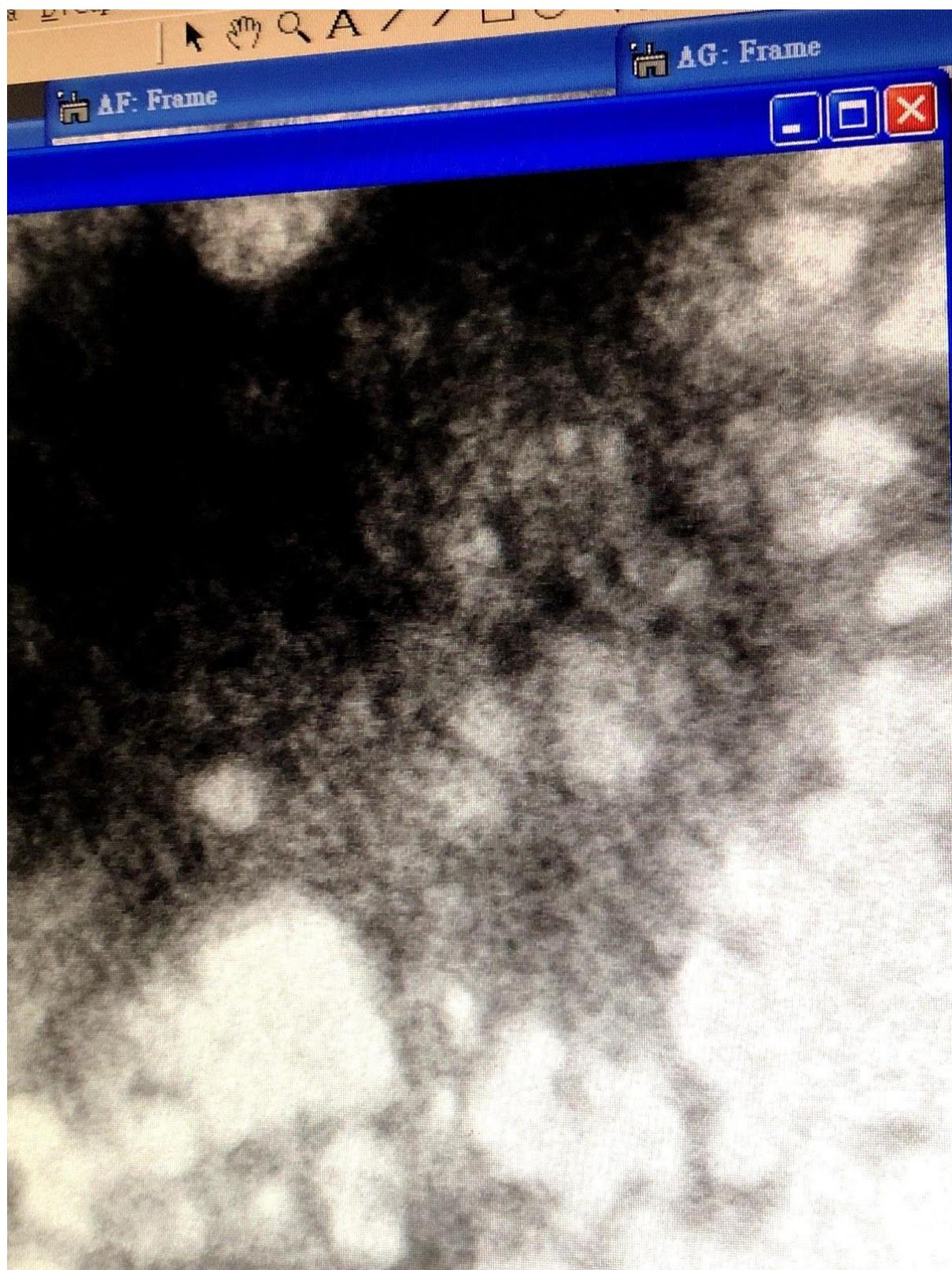
做 box 1:10 / top 1:5/ bottom 1:5 各50 mu l (15mM MgCl<sub>2</sub>)

**9/9 聲謙 故寧 原豪( 重旬 淸靈 鈺璇 泉浩 采葉 全員到齊**

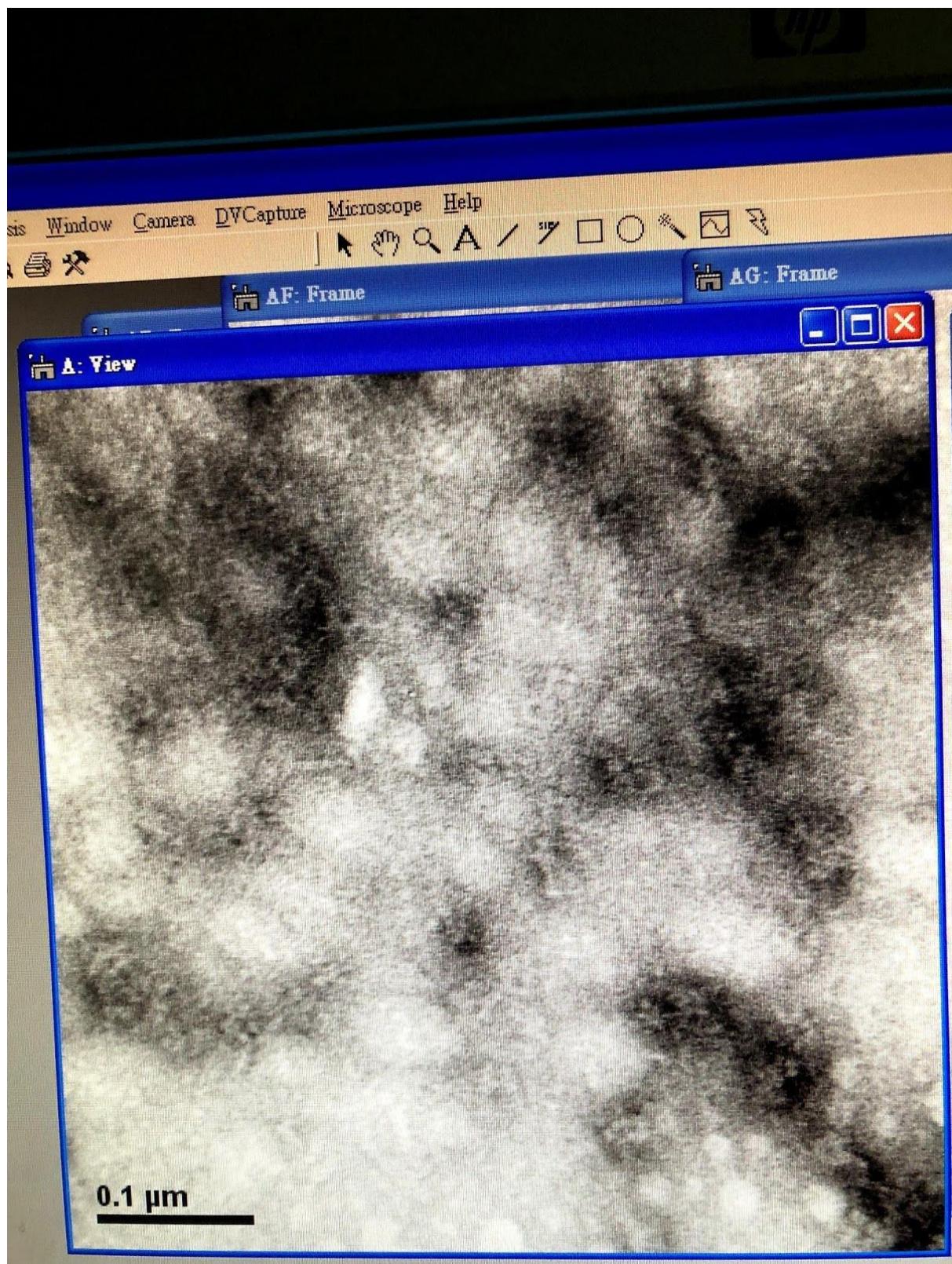
照 1:10 bottom 不震 15mM 2min 不純化

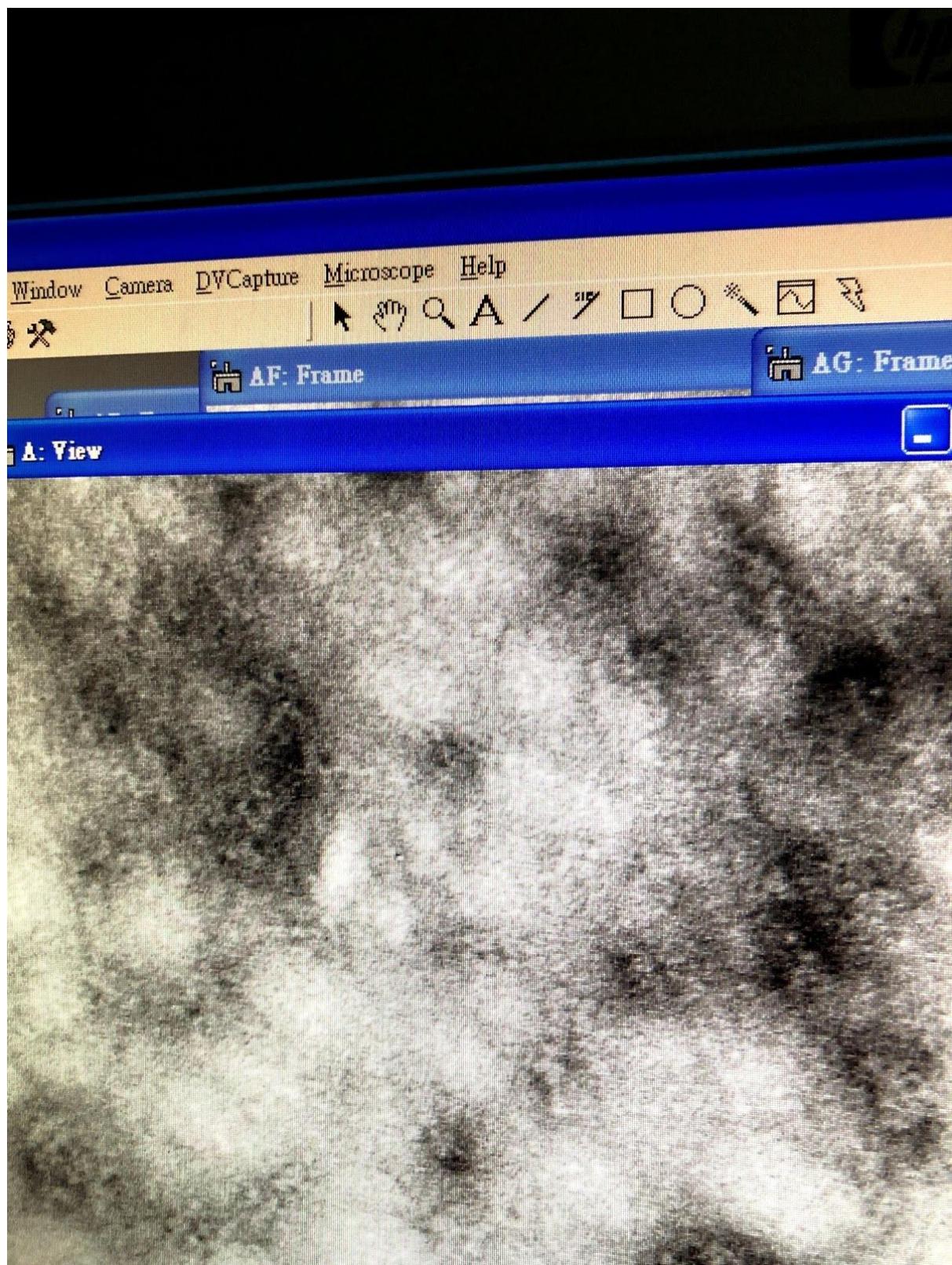


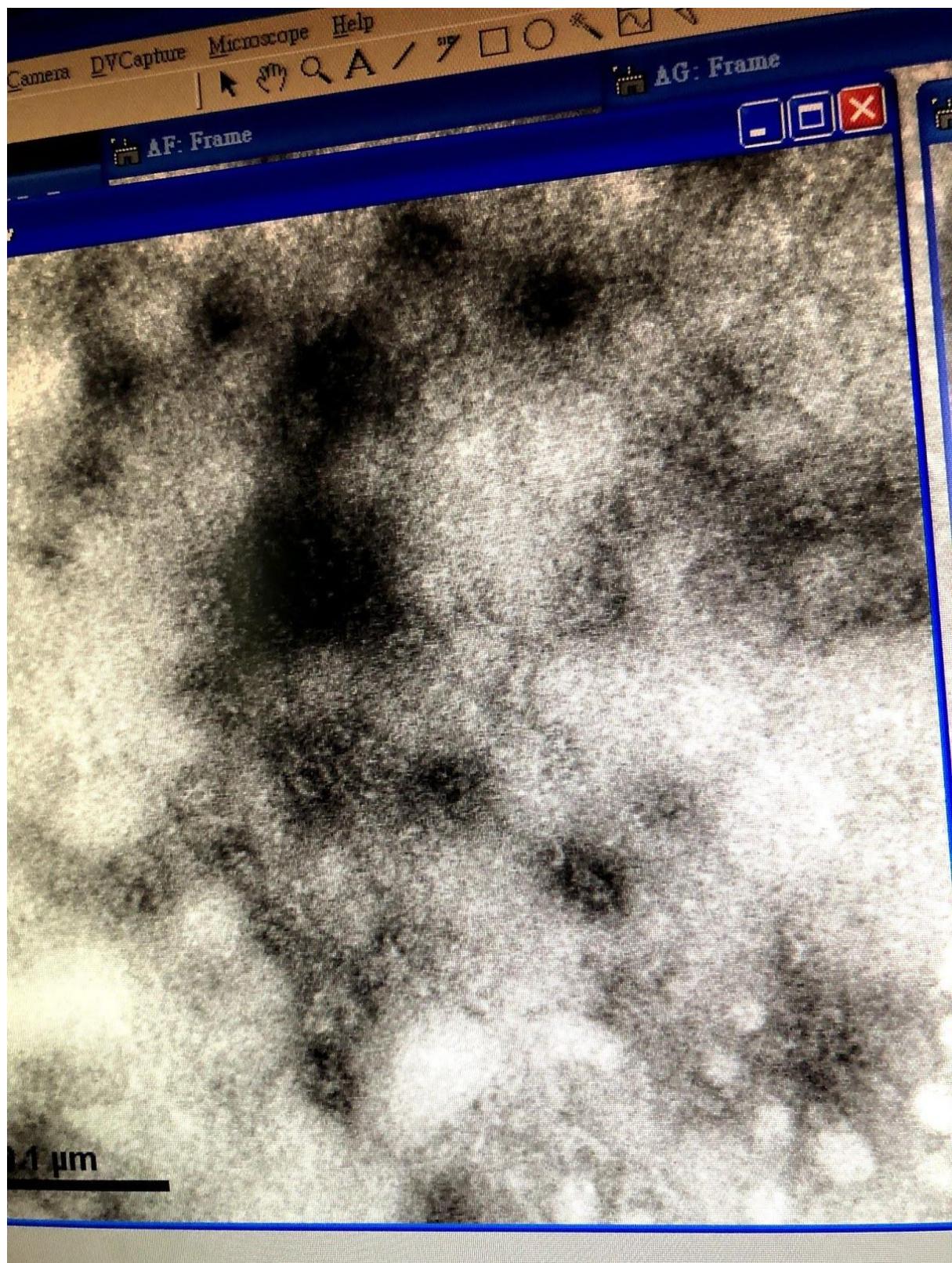


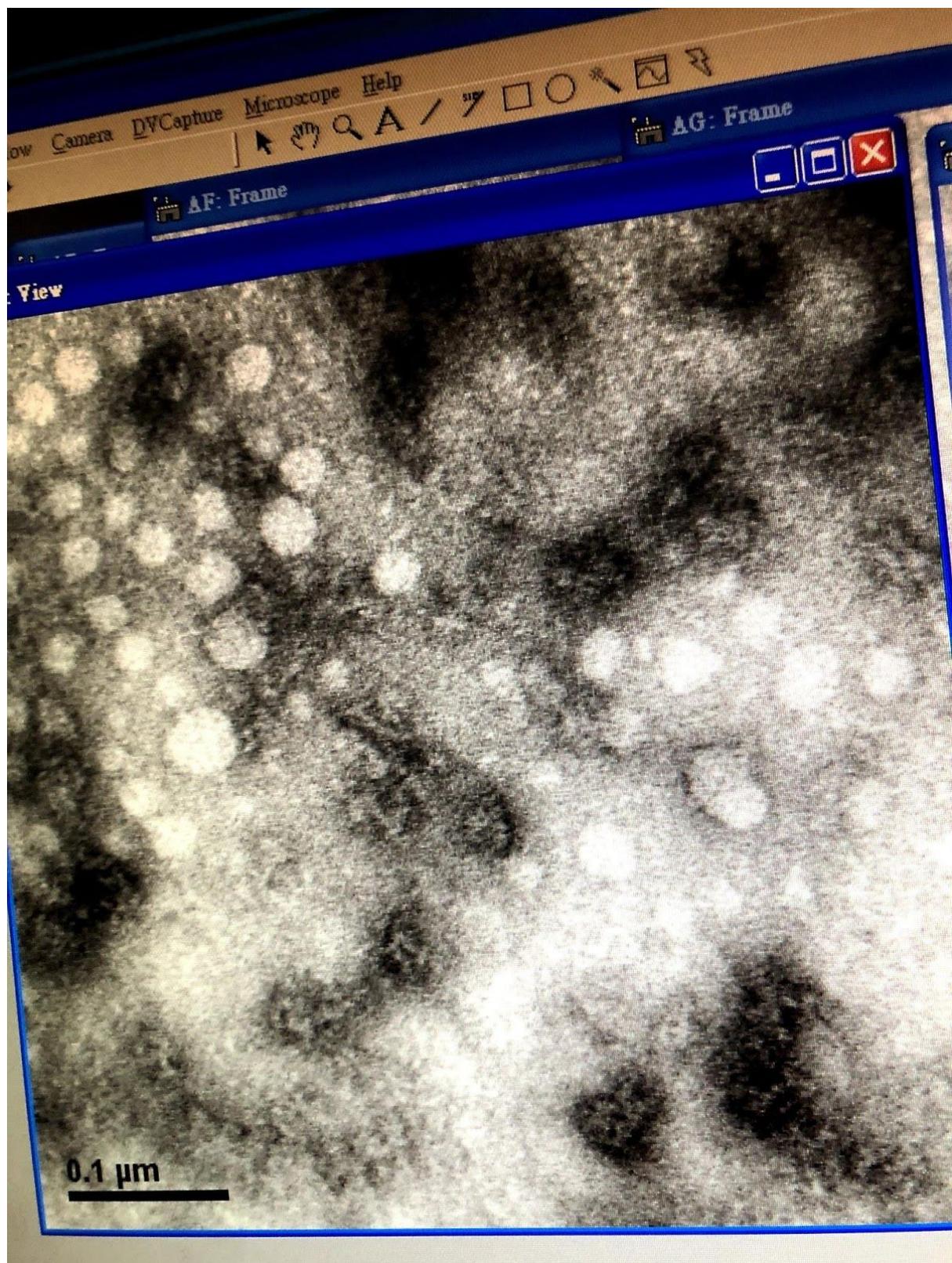


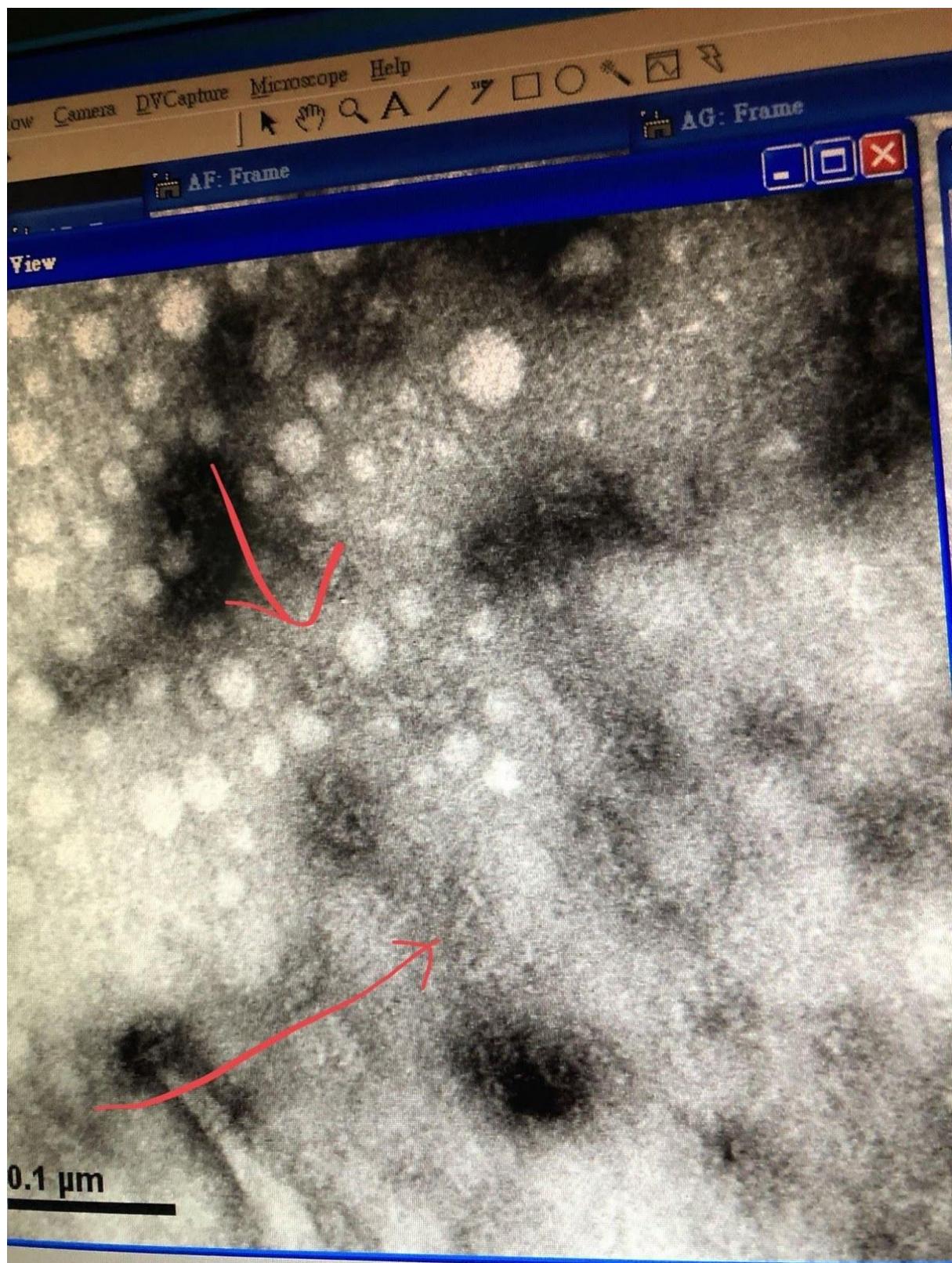
純化一次 1:5 bottom 不震 15mM 2min



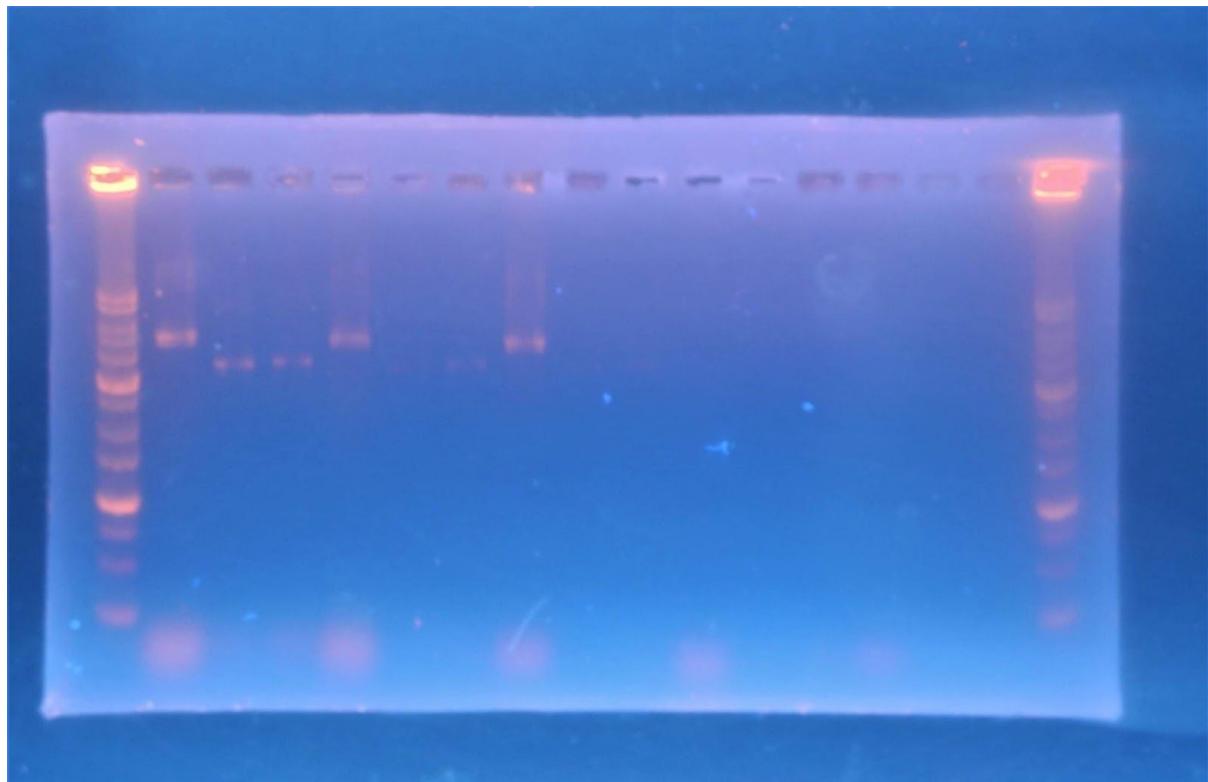








**9/9**睿謙 重甸

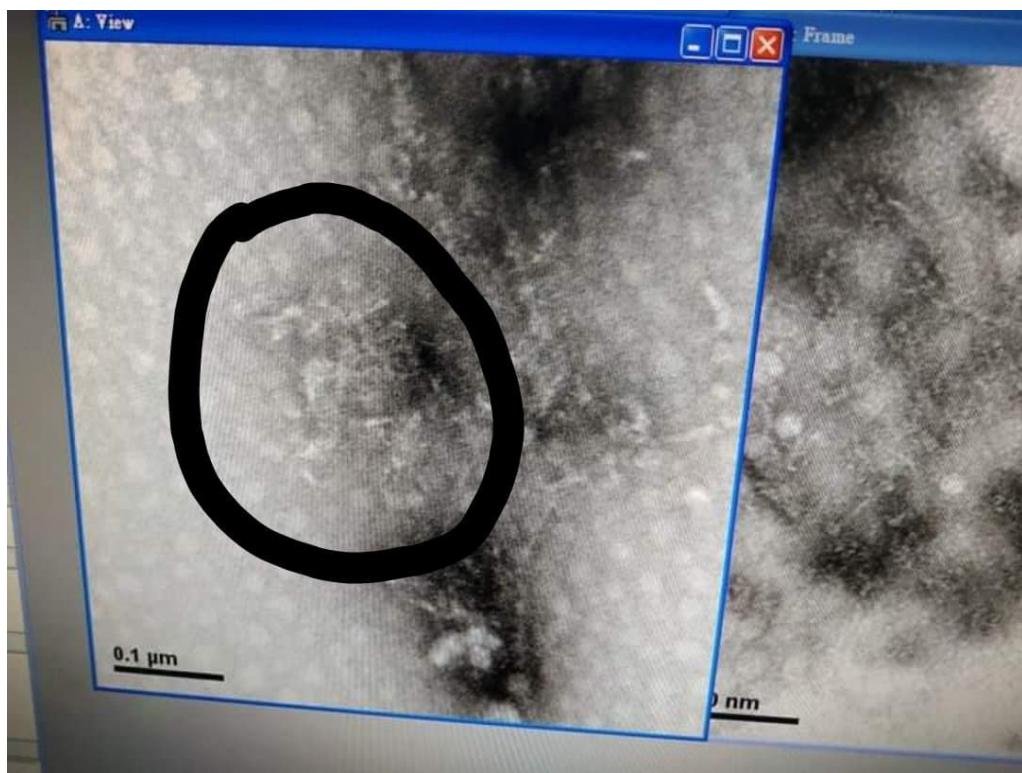
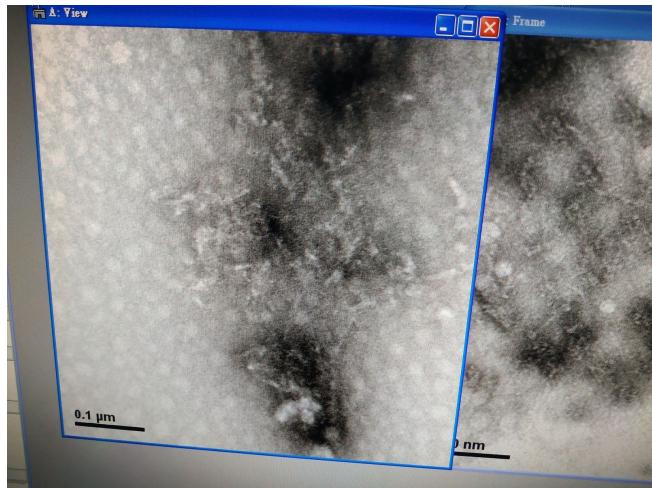


ladder/ X u1/ T u1/ B u1/ X u2/ T u2/ B u2/ X u3/ T u3/ B u3/ X d1/ T d1/ B d1/ X d2/  
T d2/ B d2/ X d3/ T d3/ B d3/ladder 曝光60sec 可以看出蓋子純化三次後影響不大

**9/10**TEM采繫鈺璇苡寧

boxU1不震:堆在一起, 太黑

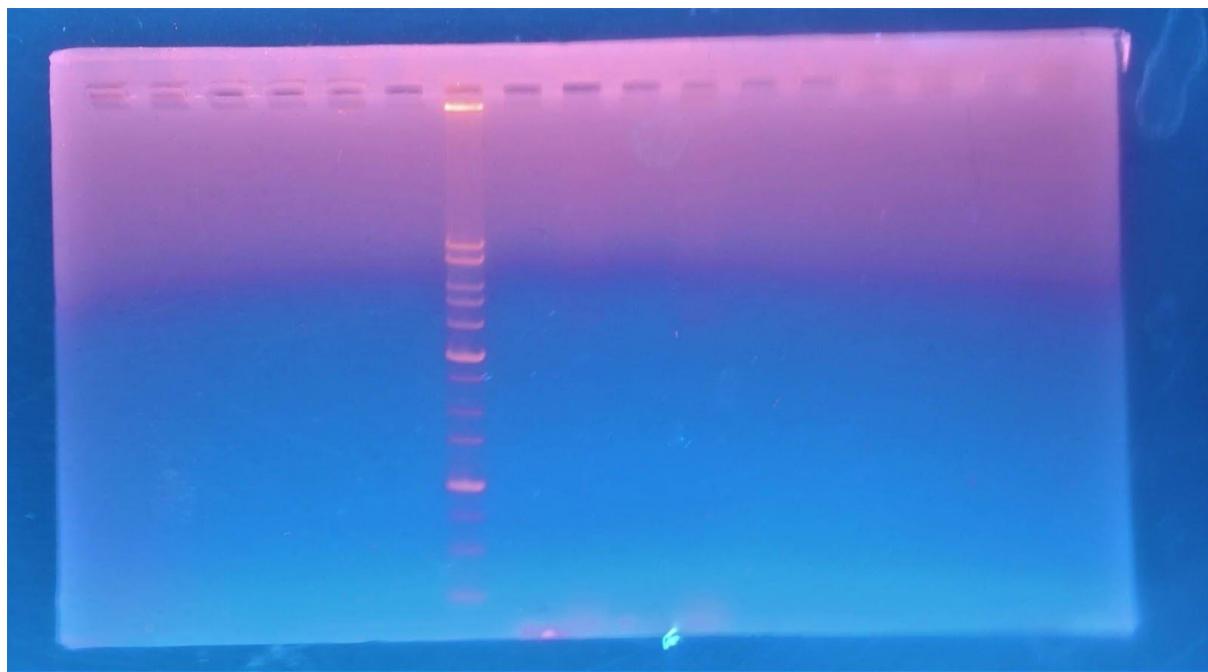
U5震5min:仍然有E, 但整片銅網中間很多格都很空, 只有周圍有點東西



TU1不震

樣本製作BT-U1-震5

X-U4和U5-震五



ladder/X D4/ X U4/ X D5/ X U5 曝光60sec 之後box純到第三次即可

組裝(protocol from nanomuscle):

method1(muscle)

### 1加initial blocker於box

(nanomuscle的big monomer的blocker濃度是scaffold的5倍)

(nanofolding有做unit:linker不同比例的跑膠測試)

2,Put the mixture in Mini-Shaking-Hybridisation Oven, and shake at 30 °C overnight

3,mix the blocked box and purified lid

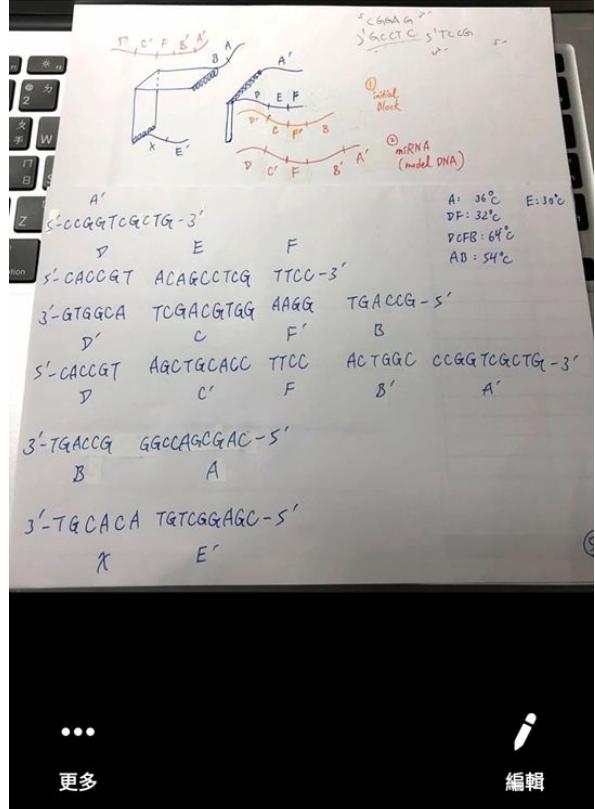
4,Put the mixture in Mini-Shaking-Hybridisation Oven, and shake at 30 °C for 3 day

bug:1沒純化，多餘的staple會干擾(和block接在一起)

2如果跑膠確實有疑似組起的，無法確定是A相接(有block好)，或E相接(沒block好)



## BIOMOD BRAINSTORM!!!

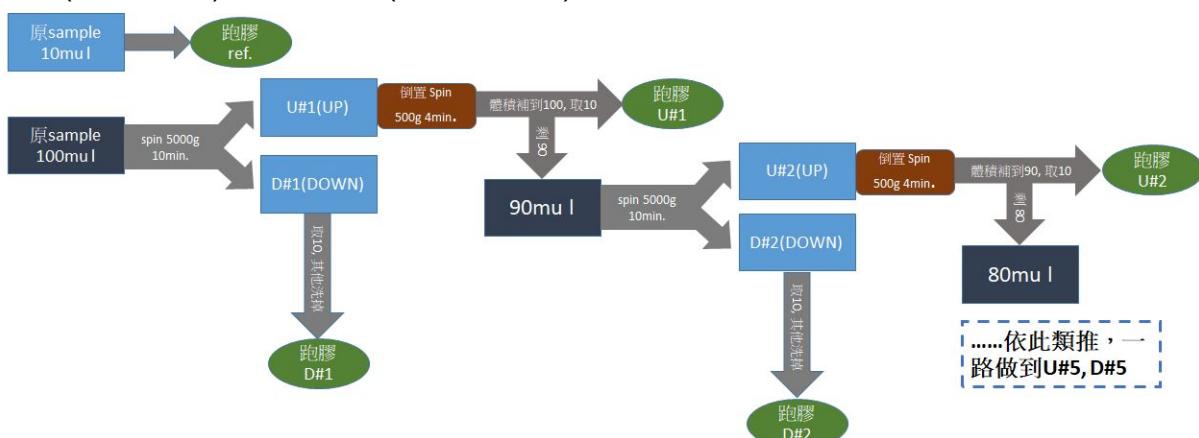


method2(folder)

incubated for 30 mins, in 25 °C

**annealing**

40度(1min hold), 降至25度(-0.1度/1min)



這是原計畫。(一樣的步驟同時處理box, bottom, top lid 的材料。原材料各共有500 μl，也就是說處理一次如此純化要用兩管迷你eppendorf, 共計100μl。)

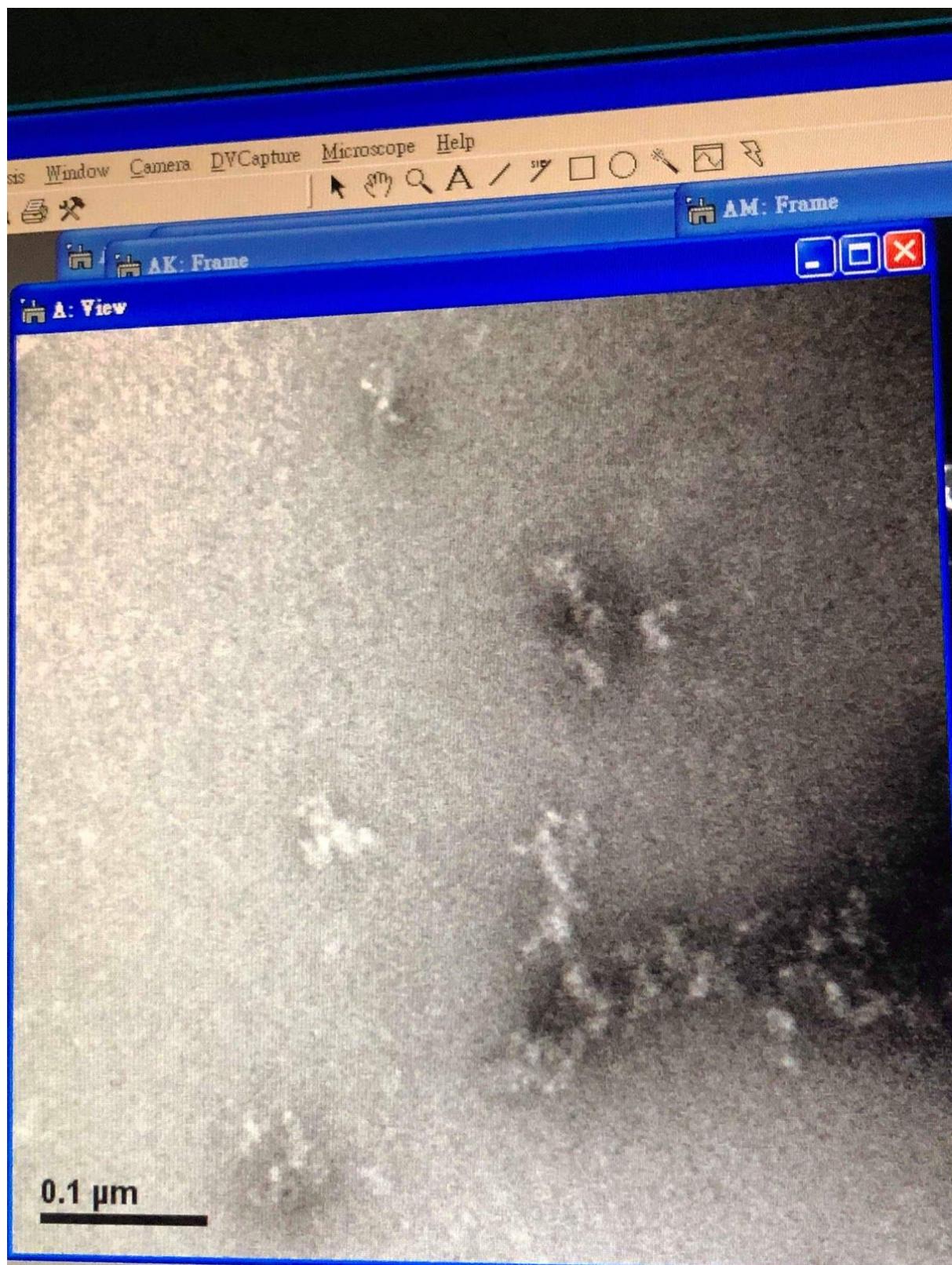
註1: BOX的TOP 記做X T; BOTTOM的DOWN 記做B D. 另外，所有要跑膠的現在都在迷你eppendorf中(ref, U#1, D#1...)，標記皆在蓋子上。

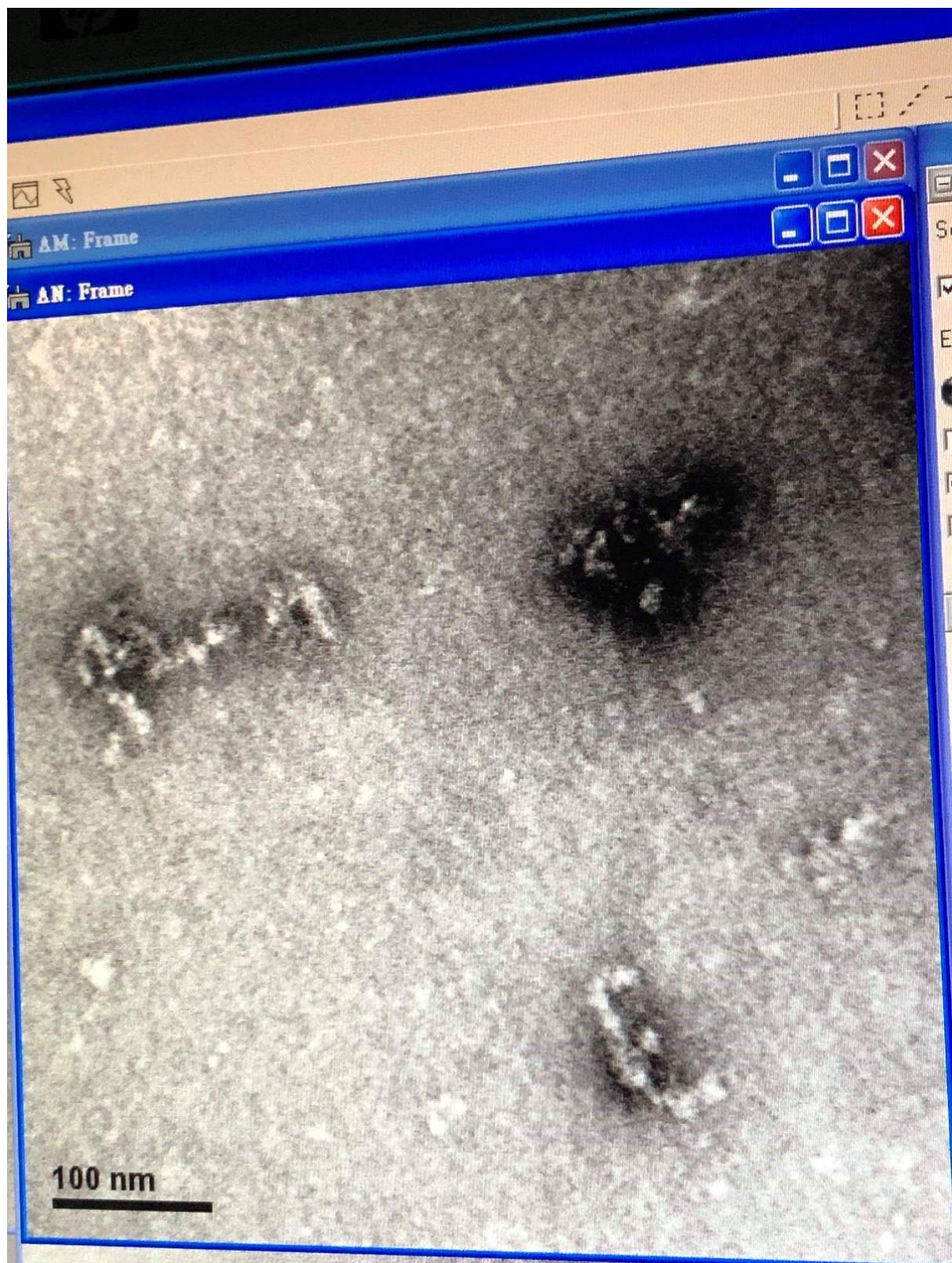
註2: 之所以要補體積是為了要讓跑膠的每個well濃度皆相同，因為純化的目的就是要讓底部的濁度逐漸消失，當濃度相同時，亮度相同，這樣比較時較有說服力。

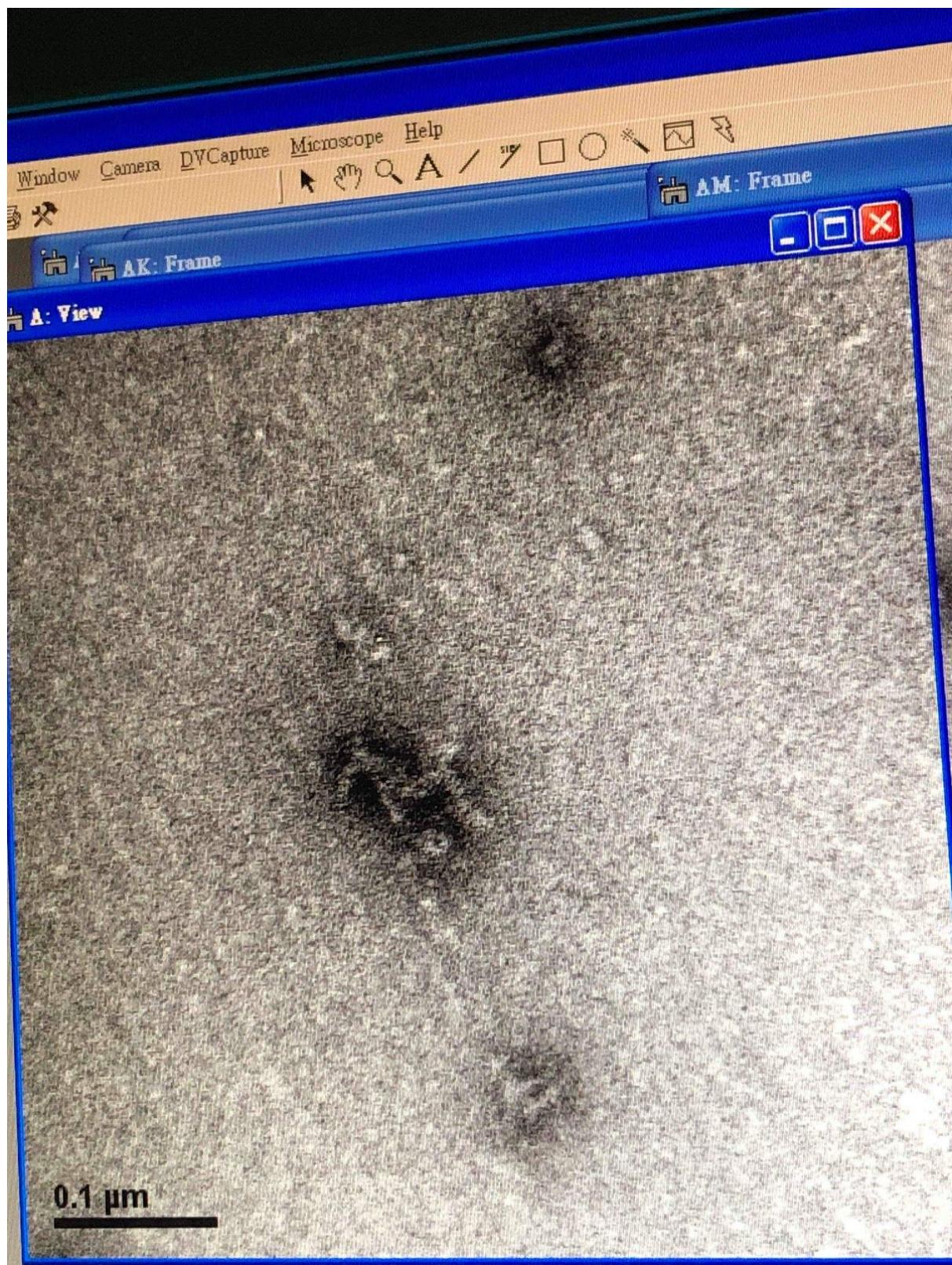
**9/11** 泉浩 采蘩 滴蠶 睿謙

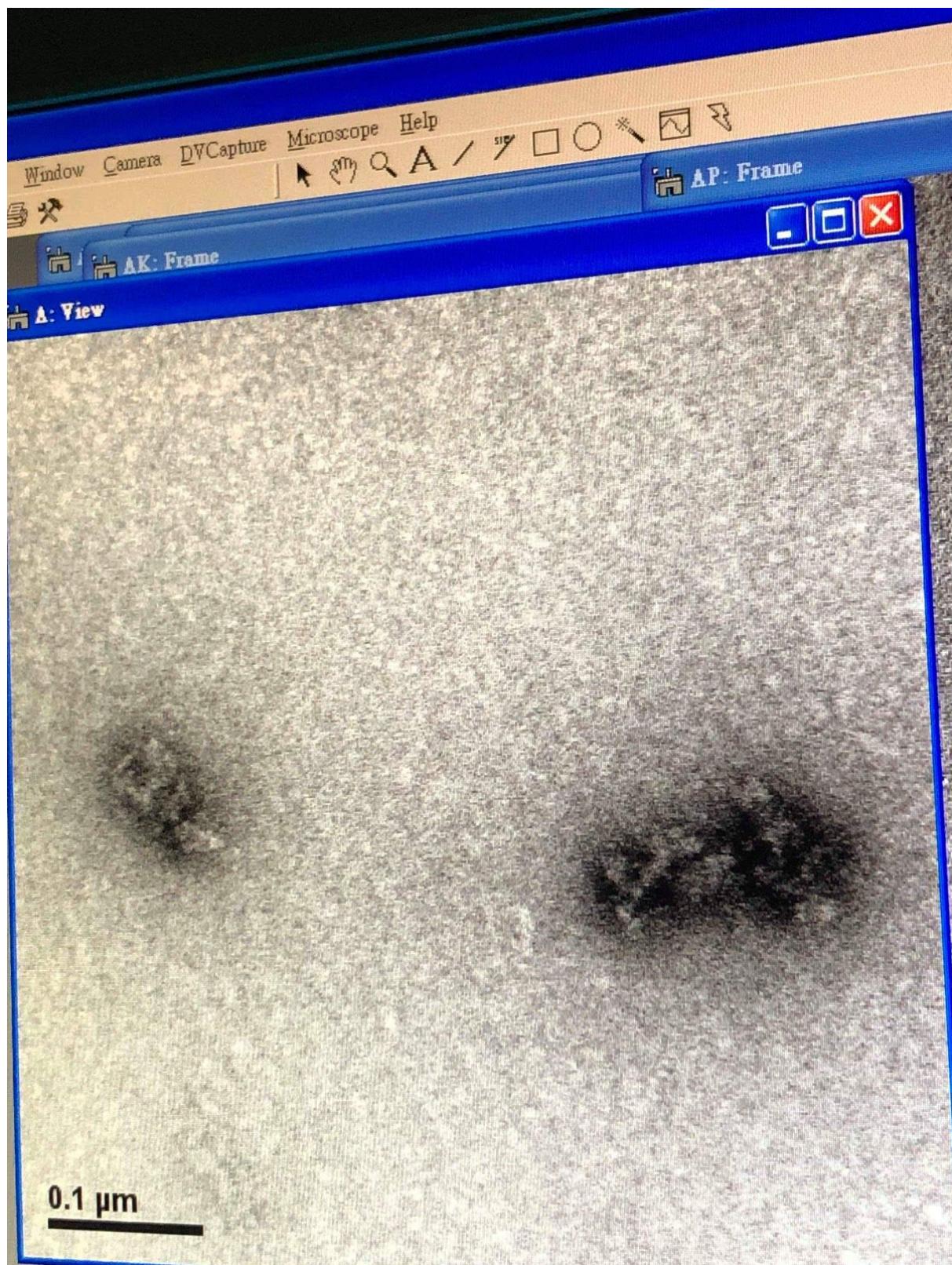
- lid 純1 震5min. 1:5 舊pro
  - 發現lid 震5min.效果很不錯，今天拍了5張照片。

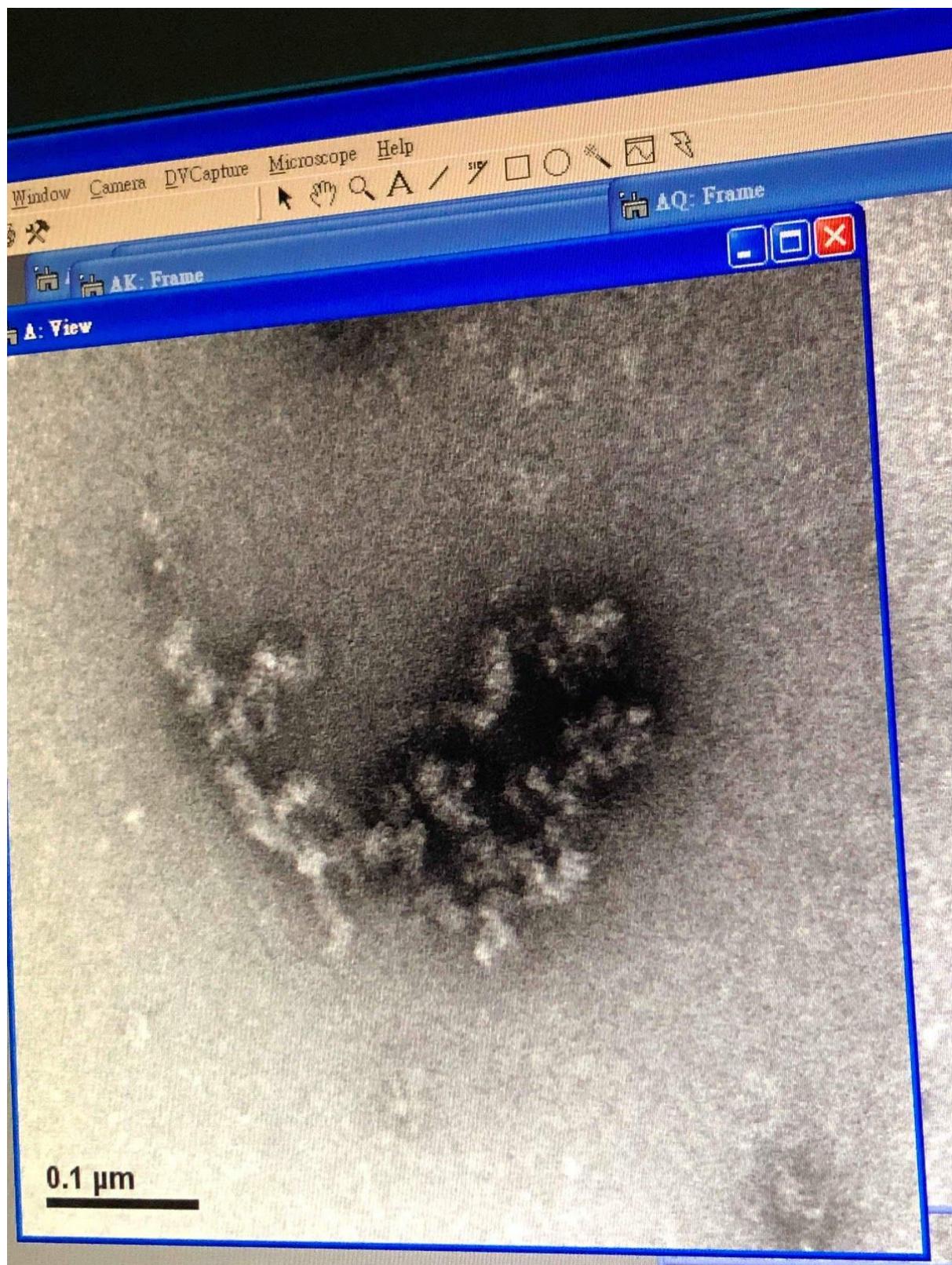




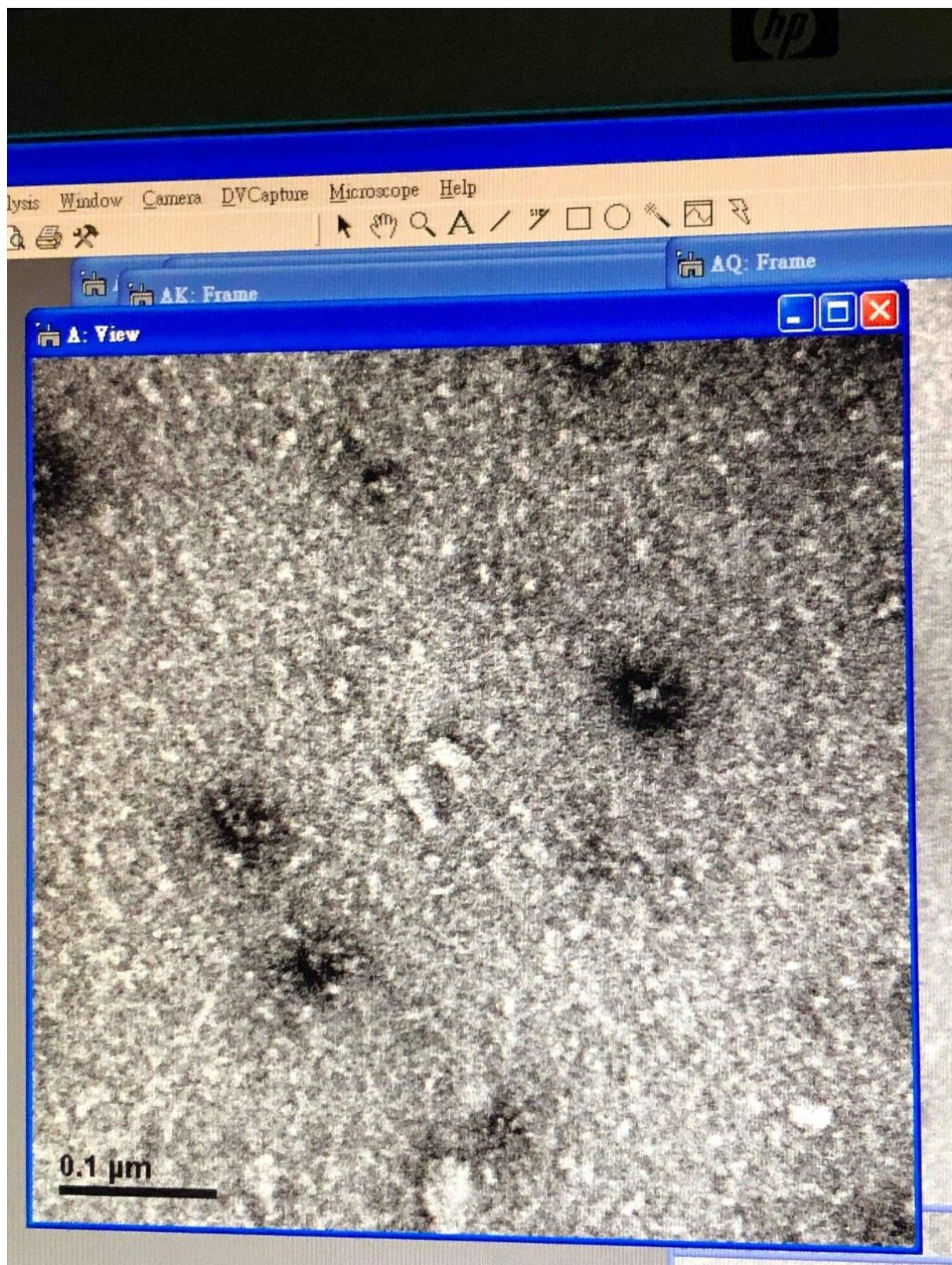




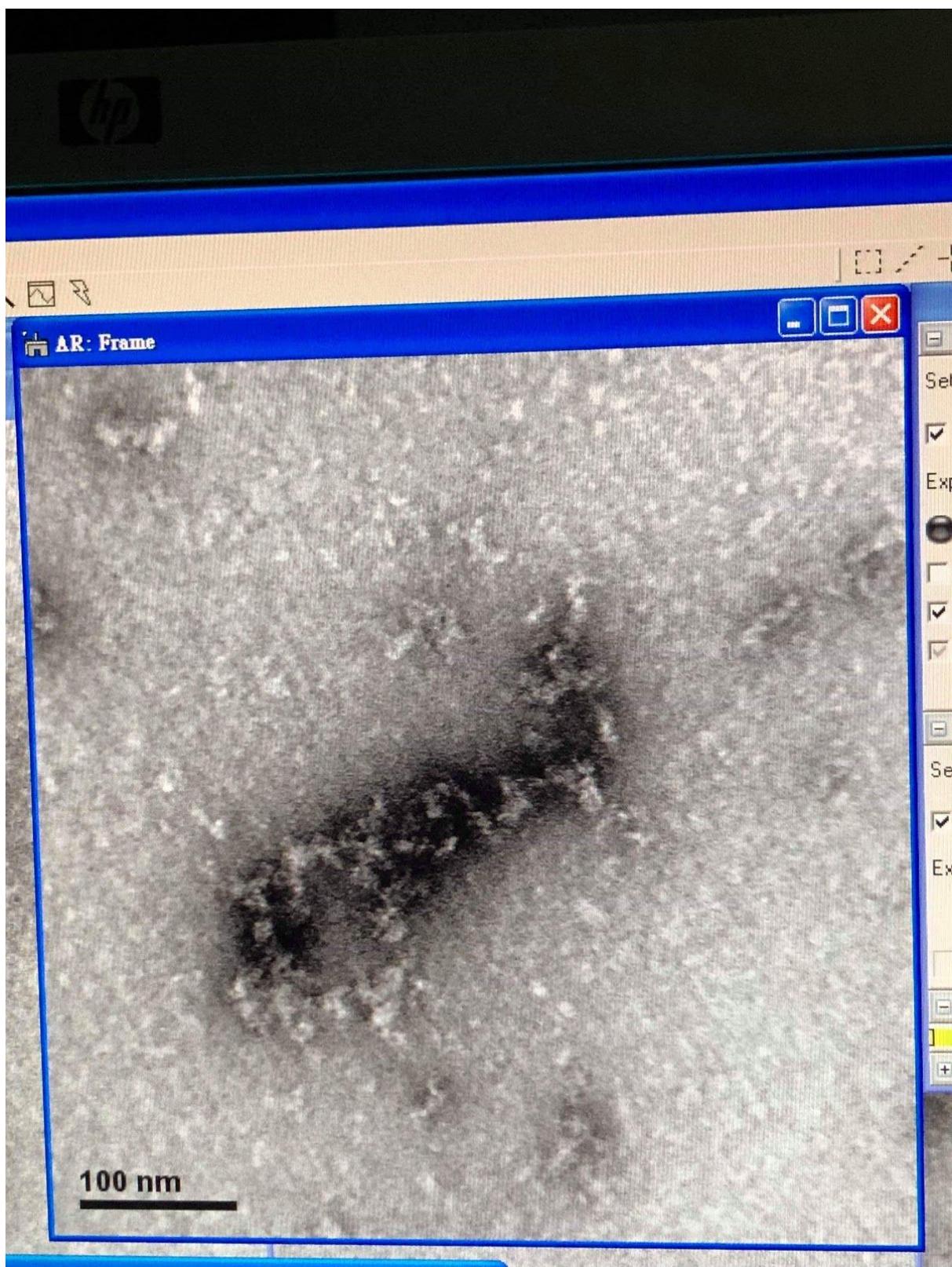


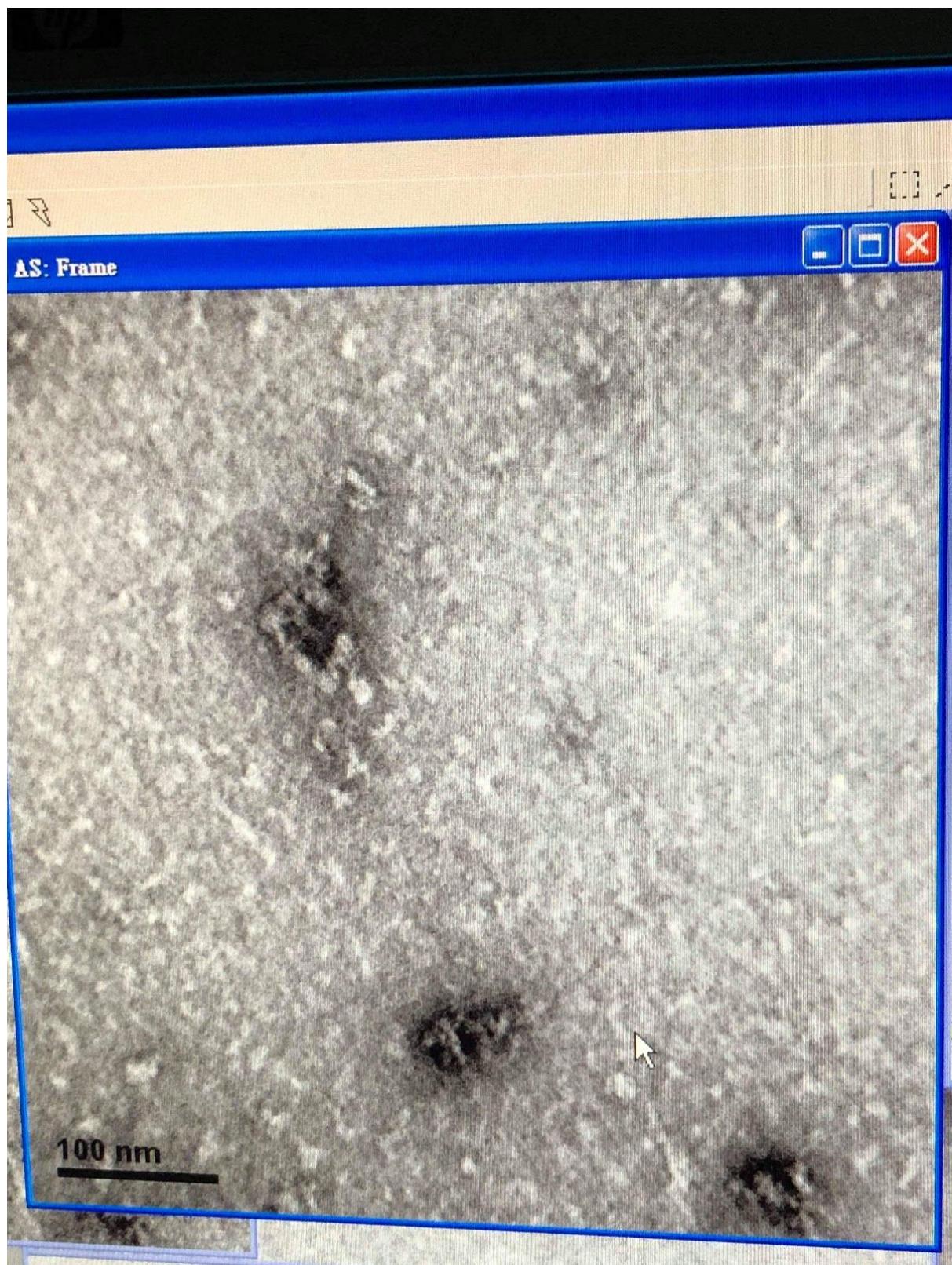


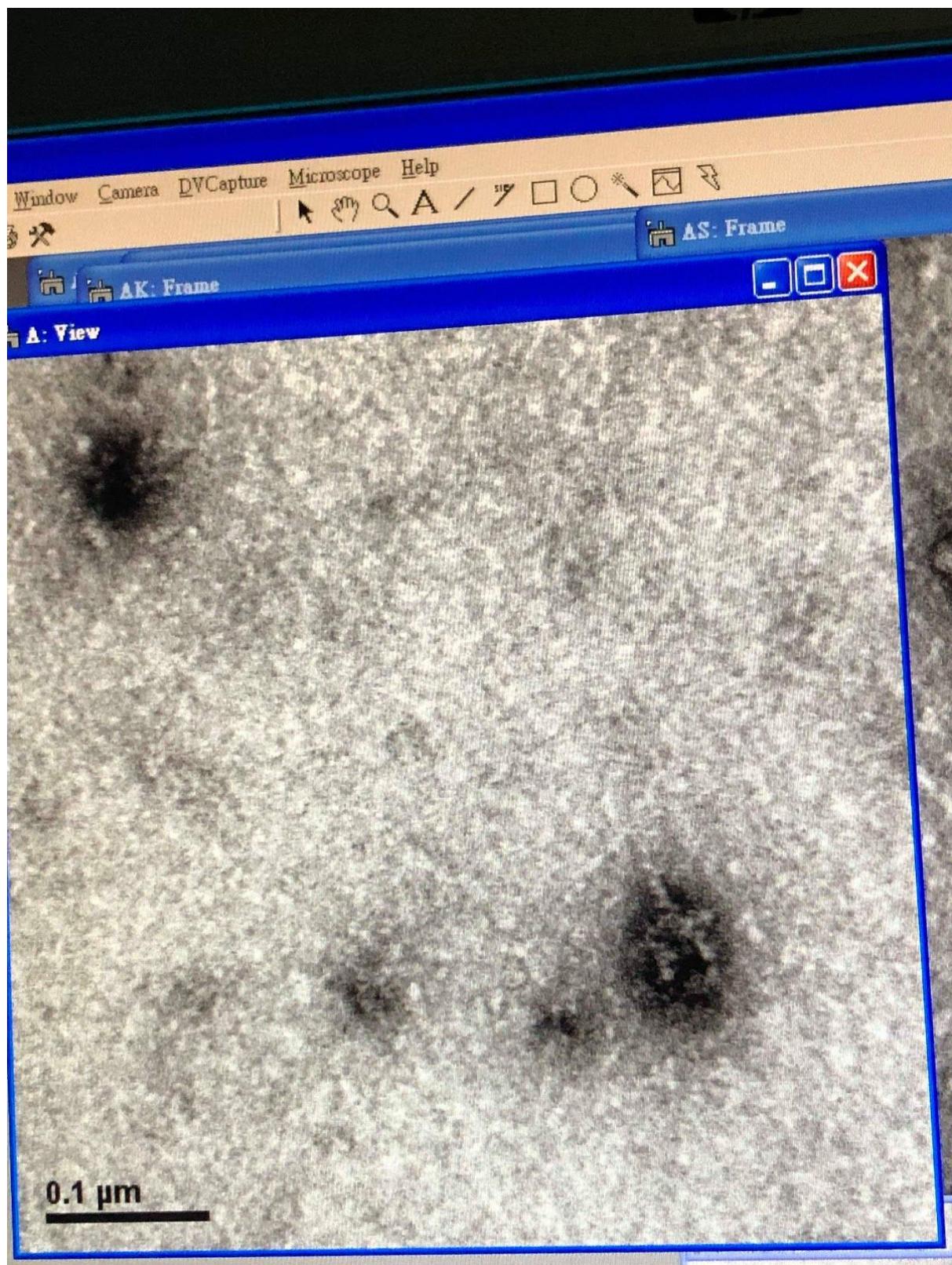
- box 1:10 純4 震5min.



N







9/13 采采 滕璽 泉浩

- 早上

- 我跟采采一起完成box純2 / BT純1。 分裝結果如下。



- 下午

- 開始進行零件組裝， 詳細實驗紀錄請見最上方pro的藍色字體。

## 組裝共八組protocol

PCR1→over night	→PCR2(9/14收)	簡稱PP
PCR1→over night	→shake1天(9/15收)	PS1
PCR1→over night	→shake2天(9/16收)	PS2
PCR1→over night	→shake3天(9/17收)	PS3
shake→PCR2(9/14收)	SP	
shake→shake1天(9/15收)	SS1	
shake→shake2天(9/16收)	SS2	
shake→shake3天(9/17收)	SS3	

## 9/13

### ※藍字為今天下午進度

1,U2box分300mul共兩管，每管加12mul稀釋20倍的blocker(435和437)

blocker皆取1.4mul, 加入 $1.4 \times 19 = 26.6$  ddH<sub>2</sub>O

2,U1lid分200mul共兩管，每管加2mul稀釋20倍

hinge(T:439,440/B:441,442)

hinge 取1mul, 稀釋成20mul, 再取2mul. (剩餘保留)

翻面:BTX 取30 mul+3mul的Signal (稀釋10倍)

3,一管X和1管BT放進shaker(調30度, 不要搖太劇烈)

搖過夜, 預計9/14早上收。搖晃時直接擺在儀器底部即可, 跟上面的架子無關。

一管X和1管BT放進PCR1 40度(1min hold), 降至25度(-0.1度/1min)

PCR1需時150min.

4,跑完PCR1的box再純一次

清璽純化完已裝入寫有X 純化3的eppendorf.



5,PCR1完且又再純完一次的box和PCR完的lid,照下表配4組(共3\*4=12管)

	x+B(50)	x+T(50)	x+B+T(75)
X	25	25	25
B	25		25
T		25	25

6,其中一組再跑PCR2(初溫代訂), 跑完今天跑膠

7,其餘三組放shaker

**9/14**

8,搖完一天的box純一次, 配四組(配法同step5), 三組拿去繼續搖, 一組跑PCR2

9,跑PS1和SP的膠

## **9/14** 齋謙 重旬 鈺璇

將組裝後、加入blocker(hinge)做完pcr1跟shake後，再做組裝。

進行跑膠

加 Blocker or Hinge 時 shake overnight	加 Blocker or Hinge 時 PCR1(150 min)	組合時 PCR2 (120min)	組合時 shake 1 night	組合時 shake 2 night
DS1	DPI	APII	AS1	AS2

D:add block or hinge

S:shake

PI:PCR1 (150 min)

A:assembly (兩兩組裝)

PII:PCR2 (120 min)

數字：隔夜數

DS(18hour) / APII: Box+Top(30mul)完成; Box+Bottom(30)完成;

**Box+Top+Bottom(55)**

DS(18hour) / AS(9/14 15:30開始 預計一天、二天) 今日做 尚未收

DS(18hour) / AS(9/14 15:30開始 預計三天) : BTX(45 ul); BX(30 ul); TX(0 ul)

DPI(9/13 21:17收)/APII: Box+Top完成(30); Box+Bottom(30)完成;

**Box+Top+Bottom(55)**

DPI(9/13 21:17收)/AS1(9/14 16:00開始):

DPI(9/13 21:17收)/AS2(9/14 16:00開始):

DPI(9/13 21:17收)/AS3(9/14 16:00開始): BTX(75 ul); BX(20ul); TX(30ul)

(橘色字那六管在紫色rank上有標9/14made)

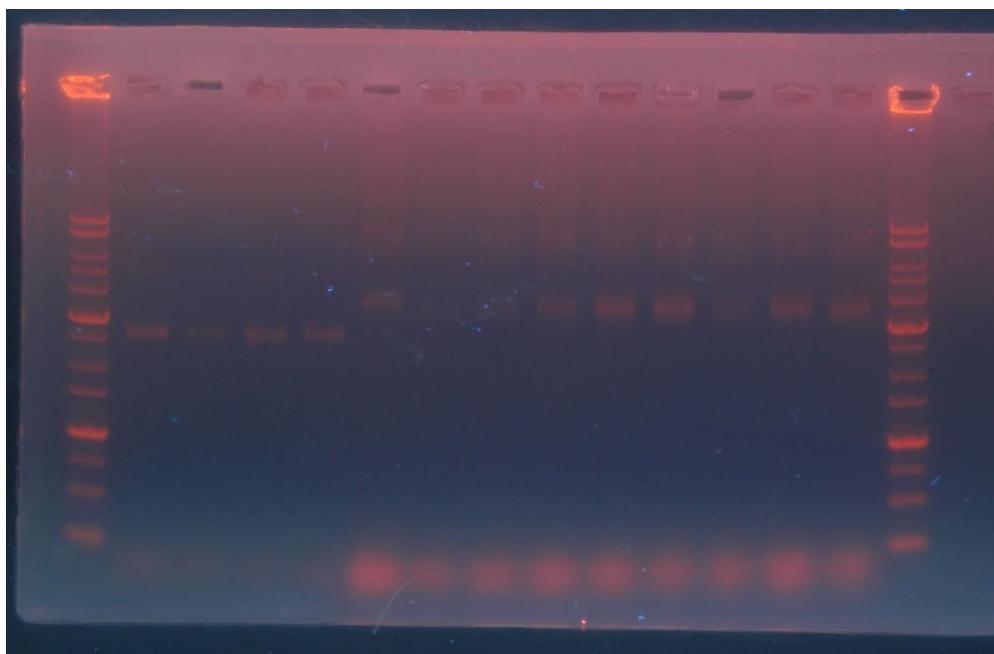
shaker內PS1和SS1的標示上都有塗改痕跡，明天收的人注意一下

**9/14晚 鈺璇 泉浩**

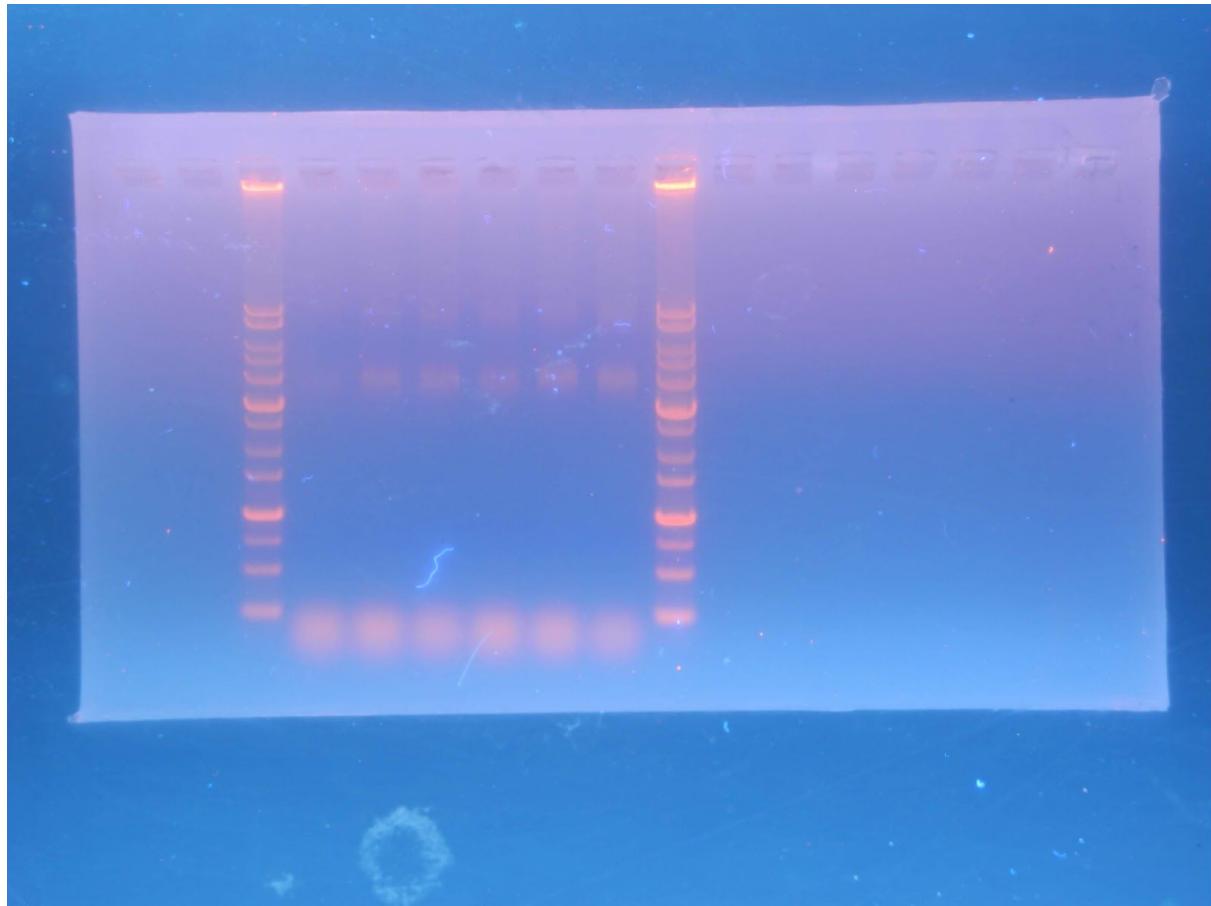
跑膠:

load10mul: DBS/DBP1/DTS/DTP1/DXS-U2/DXS-U3/DXP-U3

load20mul: SPII-BX/SPII-TX/SPII-BTX/P1PII-BX/P1PII-TX/P1PII-BTX



9/15 睿謙 重旬



Ladder/ PSI BX/PSI TX/PSI BTX/SSI BX/SSI TX/SSI BTX/LADDER

綜合兩張測試照片，SS 跟 SP 表現較佳

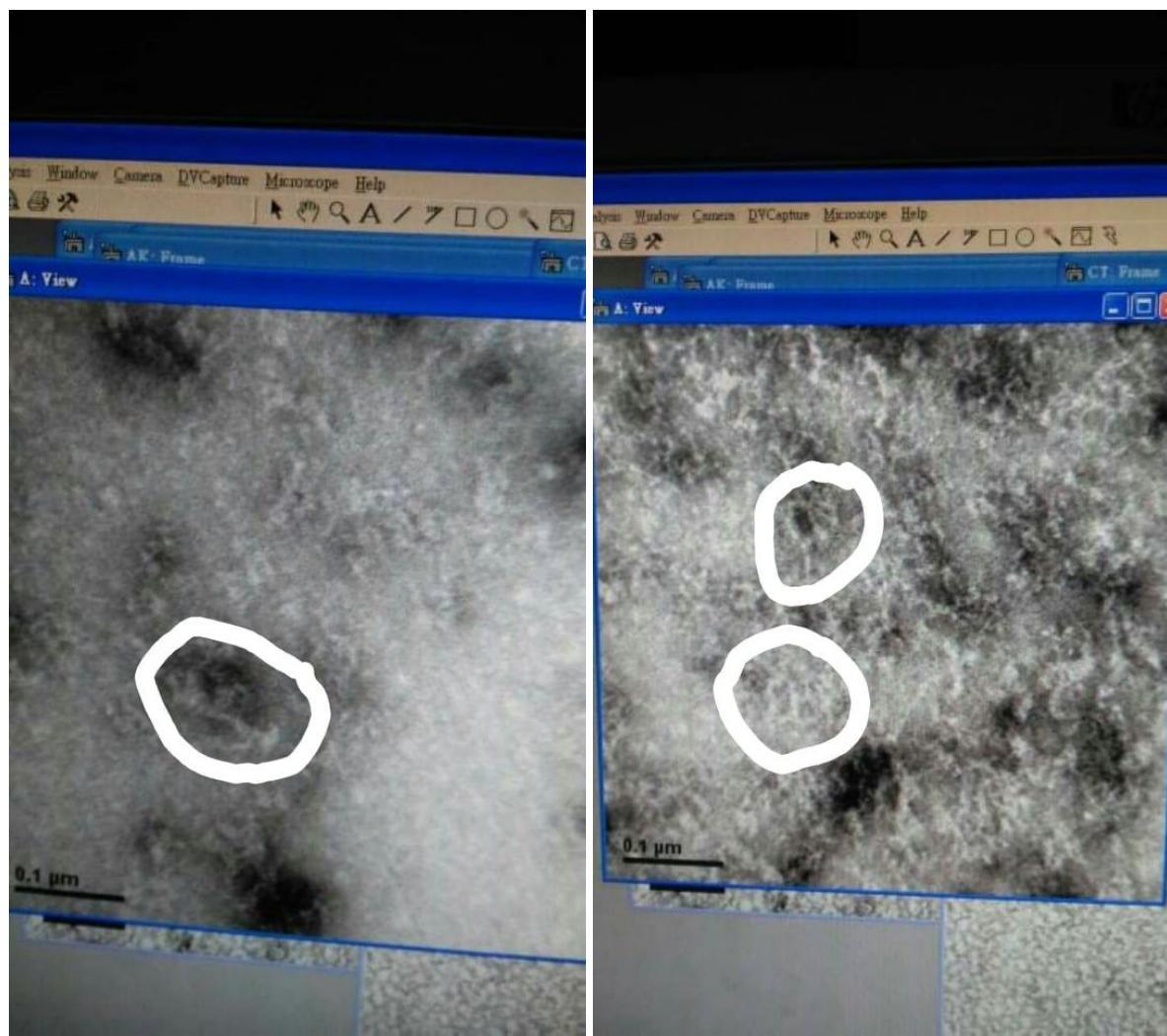
9/16 泉浩 清靈

下午2.多tem 热機中

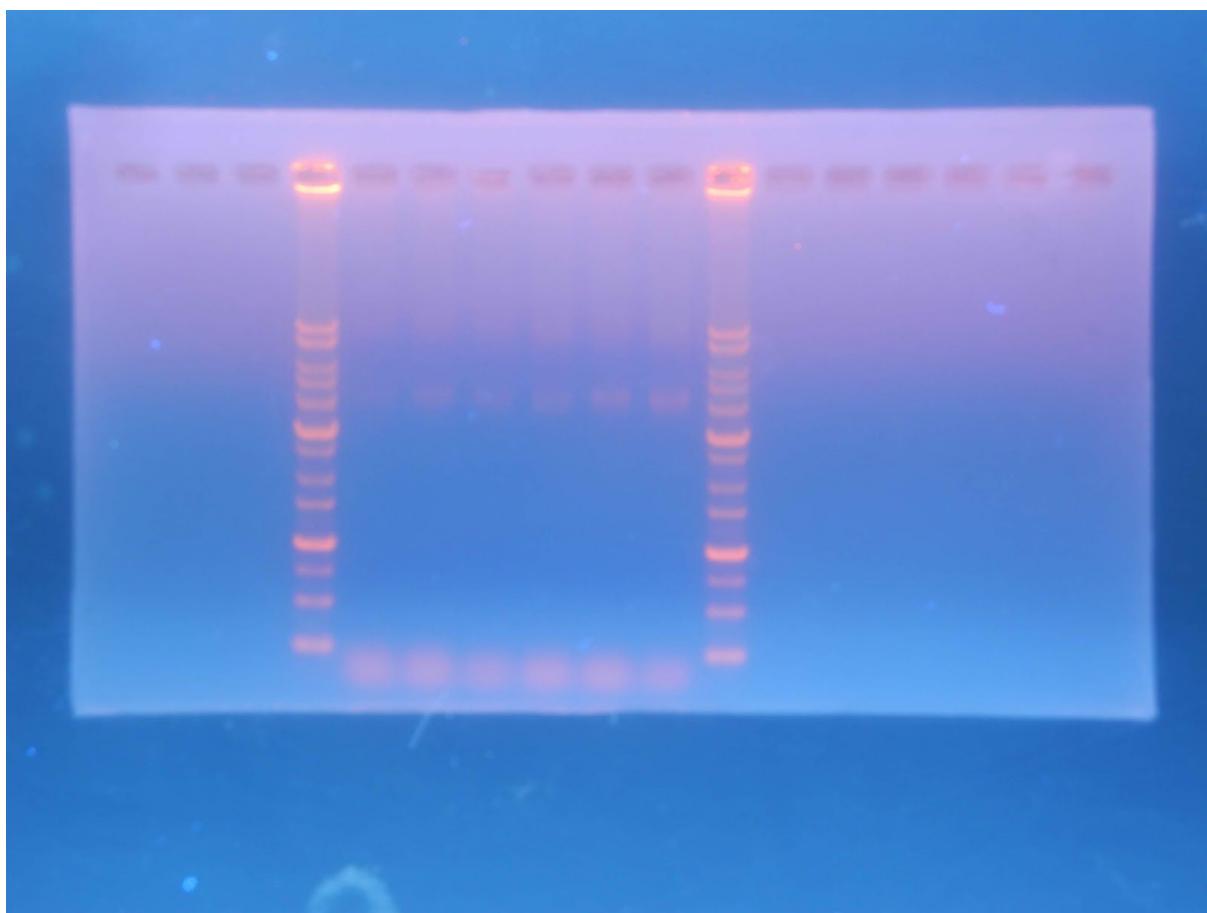
- settle5, 染色條件都是2min. 濃度15mM (box 1:10; lid1:5), 染前震1min.
- 染TX SS1很乾淨，推測應該是因為沒震導致全有全無。或是因為剛剛學姐的樣品有跟我們一起震，可能不小心卡到我們的東西，所以那1min.沒有震開。
  - 因為沒有東西所以我們會再重染，預計在BTX 後看。
- 染BTX

鈺璇 原豪

SS1-BTX 染前震1min



睿謙



LADDER/PS2 BX/PS2 TX/PS2 BTX/ SS2 BX/SS2 TX/SS2 BTX/LADDER

似乎喜歡SS protocol, 之後要用單獨的box、 lid、 scaffold做對照組

9/17 晚上:采 粧

scaffold/box/lid +SS3

待補

故事發想

## 9/18 采采 滅靈 泉浩 睿謙 重旬

- PS1-BTX(沒震)可以繼續看，週一幾乎沒有看到。(采繫先看)
  - 染色、分散狀況很好，並未發現結塊。
  - 只是結構不完整，僅有看見一兩個E。未看見日字型。
- SS1-BTX、PS1-BTX皆震10min。之後染前小震1min.，一樣settle5, stain2。
- SS1-BTX (震10min.)
  - 背景有很多白泡。

## 9/19 睿謙 鈺璇 滅靈

- 晚上 (滅靈 鈺璇)
- 用完的離心機最後要將白色塑膠架取出，內部黑色轉子也要取出。故若是第一個要用，需要安裝的人務必要將螺絲鎖緊。
  - lid們留20mul跑膠(小eppendorf上標有20不純)，剩下80mul純1. 純完體積補回80mul.
  - box跟lid們混合，拿去shake過夜(助教建議)
    - 注意shake要記得開fan才會為設定溫度，否則會是室溫。
  - 後續處理：amicon清洗完浸泡在新amicon酒精 / buffer\*2, hinge, blocker, 200nM Mg已冰回大冰箱的muscle 盒。
- 

## 9/20 滅靈 重旬

跑膠

sca/x/T/B/X+blocker(XD)/TH不純/BH不純/TH-U1/BH-U1/BTX不純/BTX-U1

- 震overnight BTX 小管60mul 取10震5min., 10min. 做成TEM sample.

## **9/23** 鈺璇 淳璽 原豪 睿謙 泉浩

- BTX純1 震5min. / 震 10min.
- 酚網製作
  - BTX 純1 震 5min dilute 2X
    - 沒東西。
  - BTX 純1 震5min. 沒有稀釋做稀釋效果比較
    - 沒雜質， 沒有破。
  - BTX 純1 震10min. 沒有稀釋做震盪時間比較
- 晚上
  - 純化 T+hinge (因為僅40mul所以純化前先補到100,之後純化完再補回40mul)一次。
    - 因為體積僅有40mul所以將體積補到100,根據以往經驗純化後應該為30幾，預計補回40.但發現竟然體積還有52mul, 故目前濃度約為80%.
  - 將TX加在一起, shake overnight.

## 9/28采葉 鈺璇

XD/TH/BH shake for 1hour(30度)

TH/BH純一次(剩80mul放4度冰箱)

BTX(480mul)/TX(100mul)/BX(100mul)----4:30進shaker(30度)

預:

9/29

BTX,TX,BX先取20, 再純一次後取20(跑膠)

BTX:80mul(冰起來)

signal:blocker	BTX	signalT	signalB
10:1	60	12	
	60		12
	60	12	12
7:1	30	4.2	
	30		4.2
	30	4.2	4.2
5:1	30	3	
	30		3
	30	3	3

## 9/30

1,可先做BTX+signal10倍的樣品、 BX和TX樣品

2,跑膠

(1)組裝:scaffold/x/B/T/XD/BH-U1/TH-U1/BX-U1/TX-U1/BTX-U1

(放在4度冰箱)

(x,B,T留20, 可以兩片膠各load10)

(BH,TH,BX,TX,BTX未純也有留20, 看要不要跑)

(2),翻面:跑不同ratio signal 的膠

scaffold/x/B/T/BTX/BTX-FT(5x,7x,10x)/BTX-FB(5x,7x,10x)/BTX-FBT(5x,7x,10x)

(在shaker, 預計9/30下午4:00取出,20跑膠,其餘冰4度)