



# Molecular Biology Lab Protocol

Feng-Yu Wang

Department of Life Science, NTHU

IGEM 2018  
NTHU

National Feng-Shan Senior High School

2018/8/10

## Day 1

### • 質體萃取(Plasmid Extraction):

#### Materials:

Bacteria

Plasmid mini PREP kit (Sol. I, II, III, wash buffer, spin column, collection tube)

ddH<sub>2</sub>O

Ultracentrifuge

#### Procedures:

Step 1: 用離心機將菌液離心。( 12000 rpm · 1 分鐘 )

Step 2: 將上清液倒掉，並加入 200  $\lambda$  solution I。以 pipeting 或刮 rack 的方式使 pellet 均質於 solution 中。

Step 3: 加入 200  $\lambda$  solution II，上下倒置 6-8 次。 **\*DO NOT VORTEX!**

Step 4: 加入 200  $\lambda$  solution III，上下倒置 6-8 次。 **\*DO NOT VORTEX!**

Step 5: 將細菌裂解液拿去離心。( 12000 rpm · 10 分鐘 )

Step 6: 組裝 spin column 及 collection tube。並將上清液吸至 spin column 中。

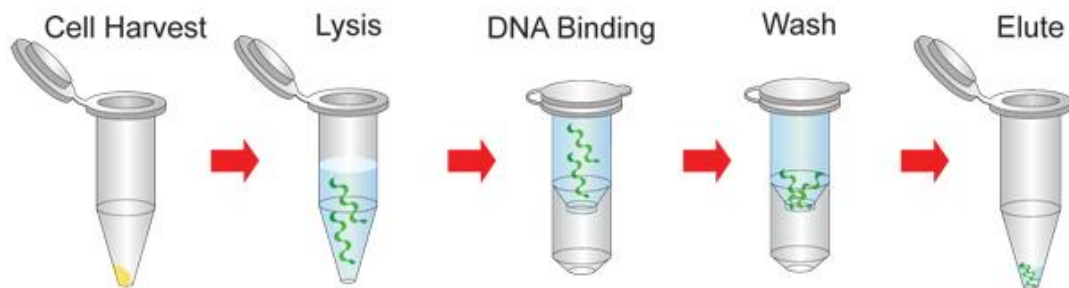
**\*DO NOT TOUCH THE PELLETT!**

Step 7: 將裂解液拿去離心。( 12000 rpm · 1 分鐘 )

Step 8: 加入 600  $\lambda$  wash buffer，並拿去離心。( 12000 rpm，1 分鐘；此步驟重複兩次 )

Step 9: 再度離心，移除殘餘的酒精。( 12000 rpm，3 分鐘 )

Step 10: 將 spin column 移至新的 Eppendorf 中，加入 40  $\lambda$  65 度 ddH<sub>2</sub>O。靜置室溫 1 分鐘後拿去離心。( 12000 rpm，1 分鐘 )



- 細胞轉型(Transformation):

- Materials:

Competent cell (DH5 $\alpha$ )

LB medium (w/ chloramphenicol)

LB plate (w/ chloramphenicol)

Plasmid (pSB1C3 + GFP/RFP)

Dry bath

Incubator

### **Procedures:**

Step 1: 混合 3  $\lambda$  DNA 與 20  $\lambda$  competent cells，靜置冰上 5 分鐘。

Step 2: 放至 45°C dry bath，靜置 45 秒。(Heat shock)

Step 3: 移至冰上，靜置 2 分鐘。

Step 4: 加入 200  $\lambda$  LB 至菌中。放至 incubator 培養 1 小時。(Recover)

Step 5: 將菌液塗至菌盤上，放入培養箱中培養過夜。

## **Day 2**

### **• Colony PCR**

#### **Materials:**

PCR premix (10X)

Bacteria

ddH<sub>2</sub>O

PCR machine

#### **Procedures:**

Step 1: 將 26  $\lambda$  ddH<sub>2</sub>O 及 3  $\lambda$  PCR premix 加入 PCR tube 中

Step 2: 用 tip 挑選一個 clone 的菌至 PCR tube 中

Step 3: 將 PCR tube 放至 PCR machine 中並設定條件

	Temperature	Time
Denaturation	98°C	3 minutes
Denaturation	98°C	30 seconds
Annealing	55°C	30 seconds
Elongation	72°C	40 seconds
(25-30 cycles)		
Elongation	72°C	2 minutes

• **DNA 電泳(DNA Electrophoresis):**

**Materials:**

Agarose powder

TBE buffer

Microwave

DNA

SYBR safe (1000X)

DNA loading dye (6X)

DNA marker

### **Procedures (Gel preparation, 2%):**

Step 1: 將 0.5 g agarose powder 加入 25 mL TBE buffer 中，以微波爐加熱約 50 秒。確認 powder 全溶即可

Step 2: 等待洋菜膠冷卻

Step 3: 加 2.5  $\lambda$  SYBR safe 進入膠內，將膠倒入鑄膠器中，等待膠凝固。

### **Procedures (DNA electrophoresis):**

Step 1: 在石蠟膜上混合 5  $\lambda$  DNA ladder 跟 1  $\lambda$  DNA loading dye

Step 2: 將 6  $\lambda$  DNA ladder 及 15  $\lambda$  PCR product 加入 well 中

Step 3: 用 100 V 啟動電泳，時間持續 25-30 分鐘。

Step 4: 觀察結果

IGEM 2018  
NTHU