

Contents

[illegible]
$$\frac{8}{24}$$

ちなみによく
EcoRIを使うのは
優秀で、ちゃんと
切ってくれるから

生物時計作用のこれから。

λ phage の $7 \mu\text{m}$ が 25 日ぐらゐに腐くそうです.

振動させる時のコンストラクト

○ $cI \sim cII$ $\in p15A$ $\rightarrow \lambda\psi_2$ (in fusion)

便のポリシー -

$\begin{cases} F-E-7M-c2 \pm cI \pm b' \\ F-E-7M+1acI-cI+c2-3 \end{cases}$ ← たゞの順かという、 b'/μ は、
 $cI \rightarrow cII$ の向きに、 λ, z をあらわす

vector $P_{1.7M} \wedge E \times z'' \text{ to } (2\lambda\mu z)$.

$$\lambda_{acI} \approx \lambda_{TC}$$

• lacI is double terminator :- 143

Ex S. 2" 47.7 λ 432.1 μm 6.50

P1.7L $\approx$ EPCR 67 P1,23L 12.

$$\begin{cases} F-E-9M-lacI+tag.5' \\ F-S-7M-tag+lacI=3' \end{cases}$$

- $[ac] + \text{terminator} \in E$ とおくと、

$p \mid 7M \wedge \lambda \nmid 2.$

これできたら $cI \sim cII$ を入れることが出来る。(あ、書き方順番逆でしたね。)

- $O_2 \sim N_2$. PCR. $\sim 15 A_1$ in fusion $2'' \lambda H_2$

1 F - E - 9M - N + 0L - 5'

$$F - S - 7M - 0L + N - 3'$$

2nd PI, 7M to 1st. Ex Section.

$$-cI, \text{ crou } \delta \lambda' \text{ \& } \delta \lambda'' \text{ u } t = \bar{b}.$$

また、この質粒を p15A と ColE1 に入れ

GFP_κ. *uraC* 用 *lacI* 用

- λ かつ τ あり、それら $NCOI$ と $XbaI$ の切、 τ .

GFP, *araC*, *lacI* & infection λ phage.

- $GFP \vdash \text{AraC} \notin \text{Th}(\mathcal{M})$. (τ_0, τ_1, τ_2)

＜10-ツの長士＞

cI ~ cII : 1426 bp

N = ~450 bp

c III = 164 bp

動脈硬化班のこれから。

今まで LDR と思っていたものは、^{これは25日とどくはず} どうやら変なものみたいなので新しいプライマーをたのみました。(2500bp はずなのに、3000bp くらいにさすがにちがうよね。) 1%ゲルでも bp が多いと分離がうまくいかないの、まちがったのでしょうか。
で、このプライマーというは LDR の周りにくっつくように設計してあります。(そうすると、GC 少し減るのでも) これで LDR を増やすと共に、本当に、もらった cDNA は、全長入ってるものなのかを同じプライマーでシーケンスをしたらと良いでしょう。
あと、- 応 ~~Gad1 promoter~~ ~~入る~~ YCplac111 に LDR を入らう。てなってます。田中さんが、これなら Lab にあるから使えよと、おっしゃいました。これは promoter の何かは私はまだしらへません。添付のプリントを見てさかして下さい。あと、MCS に EcoRI とかがあって、クイックチェンジしないといけません (パーツ登録には。)

7バコ 111E のこれから。

でか、25日やってほしいことしか書けないですか。
YgiT + terminator のシーケンス解析を行ってほしいです。
酵母だと、terminator いらないけど、パーツ登録する用にね。

10月25日のこれから。

8/24 僕はあんぱんが好きです。(3分) 兄さん、おめでとう。

(3分)

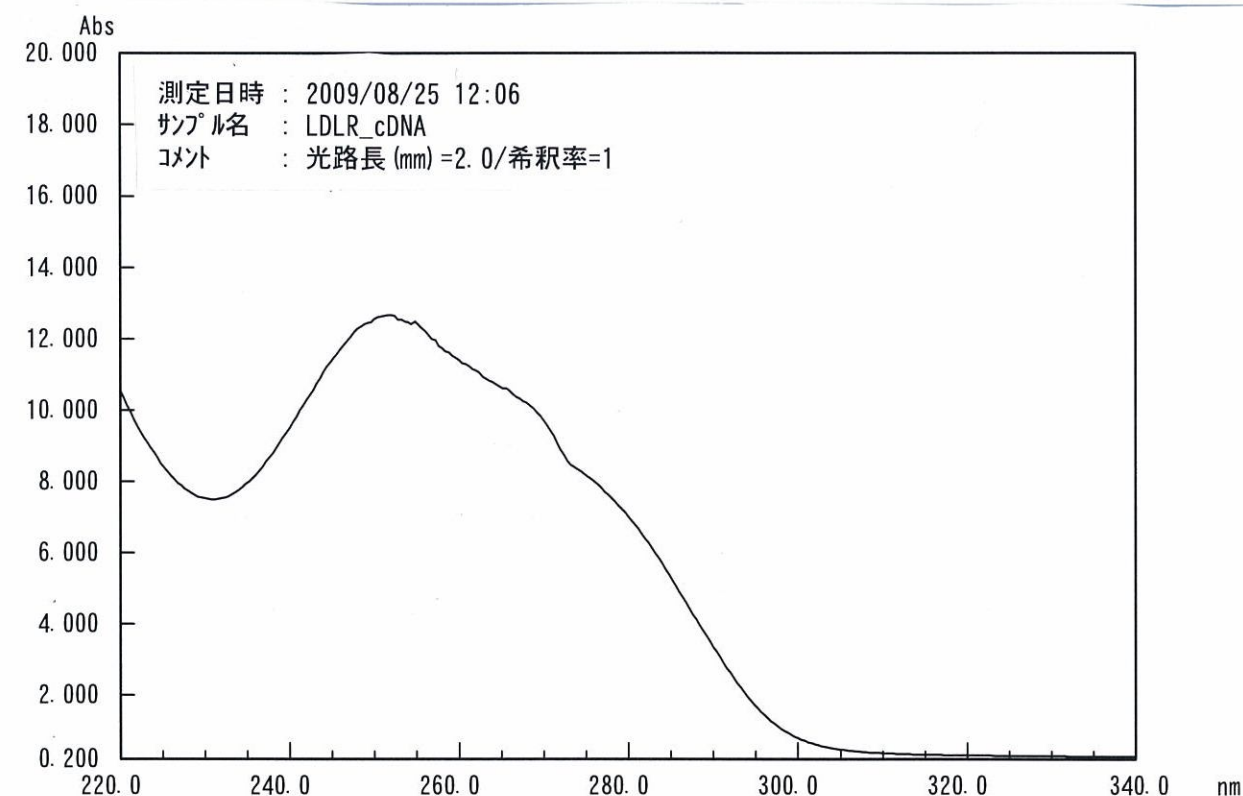
8/25

山本 10:00-

山崎 12:00-

山本 1:00-

山崎 3:00-



計算結果

230.0 (nm)	260.0 (nm)	280.0 (nm)	320.0 (nm)	Ratio	Conc (ug/mL)	Pure (%)	P. Conc (mg/mL)	M. Conc (uM)
7.521	11.403	7.011	0.309	1.655	554.70	92.0	1.957	25.329

① LDLR. 新たなプライマーを使ってもう1度クローニング。

・全長 ~2500bp

・プライマー

40625874-002 09/08/25
F.P. Op. LDLR out 3' 41mer
5' AGTGGTCTCTTGGCTCTGACAGG
GGACTCCAGGCAGATGTT3'

MW: 12608.28 (OD: 8.00)
(TW: 240.3) (EA: 19.1)
(TE: 190.6) (TM: 71.6)

40625874-001 09/08/25
F.S. Op. LDLR out 1.5' 34mer
5' CACCATGGAGACTAGTGGCAGAG
GCTGGAGCAT3'

MW: 10541.93 (OD: 8.00)
(TW: 222.6) (EA: 21.1)
(TE: 211.2) (TM: 70.2)

・Pfu-Ultra

① 95°C 2min

95°C 30sec

45°C 10sec

72.5°C 1min

↓

95°C 30sec

65°C 10sec

72.5°C 1min

25°C ∞

↓

※今までとプライマーが違っているので、2種類の

↓

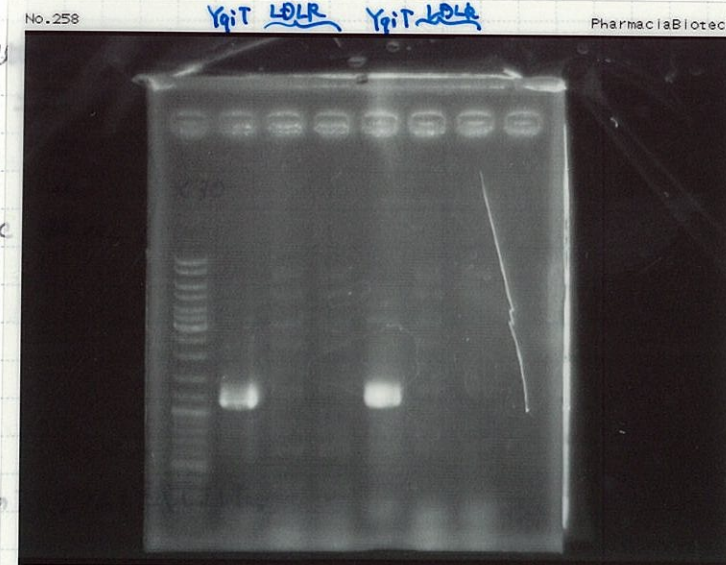
ポジコン (YqiT) は増えた → Pfu Ultra は元々

非特異的に色々な長さのものが増えている → 次回、アニーリング温度を 56°C - 60°C くらいで

色々な条件を試す。最初は 20μl でやって

一回 2500bp 付近のものをゲルで切出す。

ゲル
マーカー YqiT LDLR YqiT LDLR
707734 ① 707734 ②



LDLR の Pfu Ultra 2 の 70- $\rightarrow$ 7"

<100 μ l> $\times$ 2

2 μ l 5' primer

2 μ l 3' primer

16 μ l dNTP

20 μ l Pfu buffer < 2 μ l 100 $\times$ DMSO

152.5 154.5 μ l MQ

0.5 μ l cDNA LDLR² tapping

5 μ l Pfu Ultra 2

② LDLR の cDNA が チェンと全長あるかどうか シーケンス (準備)

LDLR cDNA 5'

" " 3'

YqiT 5'

" " 3'

} ポジションとして

1.5 ml イッペン

9 μ l B.D.3.1 buffer

2 μ l B.D.3.1

31.5 μ l MQ

*

↓

8連 イッペン

LDLR cDNA² $\rightarrow$ 0.3 μ l, MQ で 1 μ l に mess up.

YqiT $\rightarrow$ 0.6 μ l, MQ で 1 μ l に mess up.

↓

~~3' / 5' primer~~

3' / 5' primer 0.5 μ l

* 8.5 μ l

↓

B.D. の プログラム で PCR

↓

明日 シーケンス

8連 イッペン $\rightarrow$ -20 $^{\circ}$ C. LDLR 新 $\frac{1}{2}$ 以降 にあります

1 2 3 4 5 6 7 8

LDLR5' ↑ YqiT5' ↑

LDLR3' YqiT3'

8/26 にすると

• cIII の プライマー - 設計 (in fusion 用) (P1.7M と fusion させる)

• LDLR の シーケンス

• LDLR の PCR の 条件 検討 $\rightarrow$ プログラム ④ で. 55 $^{\circ}$ C を 23 (7- $\rightarrow$ 7") と 56 $^{\circ}$ C, 57 $^{\circ}$ C, ..., 60 $^{\circ}$ C で 行, 24 分.

• YqiT + terminator の シーケンス 準備. $\leftarrow$ プライマー が 届いた。

• cI ~ cII, lacI, araC, N など. PCR

↑ ~~増やして~~ 増やしてほしい 順に. lacI, cI ~ cII, N, araC,