

2/08

- > почистване лаб
- > деактивиране отпадъци чрез автоклавиране
- > приготвяне нови хранит. среди

overnight DH10B компетентни
 в 5ml чиста LB (защото е по-устойчив на антибиотици)
 плазмид pMPC (индуцира ↑ мутагенност)
 резистентност: CA (хлорамфеникол) - инхибитор белт. синтез

→ + CA
 + глюкоза (за сат експресия => гради-
 нозен промотор ↓)

Glc - 1M

μl/ml

LB
 5ml + 5μl CA
 + 125μl Glc

1M → 25ml

1000 → 25

40

$C_1V_1 = C_2V_2$

$1000x = 25.5$

$1000x = 125$

$x = \frac{125}{25}$

$\frac{4000}{200}$

0,125ml

рКМ200 (рекомб. протеини за рекомб.
функции - 1a & 1a2)
+ = 30°C за рекомб. (при по-1-HE)

23/08

култури-прораснали

* рКМ200-проблем с интатина → 32°C

~~6x10⁶ cells resuspended in 500ml
growth medium → induction~~

6x10⁶ cells LB + 300µl DHIQ3

рМРС - изолуване плазмидна ДНК

2ml max bacteria

4-5ml среда плазмид

+assess (errand) 2ml - +урати 4-5 =>
последователно

250µl resuspension solution (2°C в хладилник, ^{отпадна на стено}
защото ДНАзи) - премахва РНК

ресуспендиране с много тиге

250µl lysis buffer за 5ml (не повече!!!) ^{се мие и}
^{мазмидите}
^{генерира}

разбъркване 6-10 пъти с инвертиране (не

NaOH + SDS

много резво - го издирате & state саи
се ДНК се мие => не могат да

CH₃COOK (maxane SDS)

500µl neutralis. buffer → преуши тауце

5-6 мин инвертиране

5 мин центрофуг. max обороти - скелетне
преуши. на гено

Водна фаза зареждане в колония (надишва
се на ланана)

500µl 1 min max грм колония отмаване течността
от гелу)
wash solution (не позволява
зауреждане ДНК + ~~отмаване течността от гелу~~)
+ maxane протекти)

30-60 sec max грм

500µl wash solution

30-60 sec max грм

Въртене 1 min max грм изважда колония за
maxane + останки от wash buffer

~~2 min~~ спазване колония в епруветка

2 min стайна +°

2 min max грм

elution buffer (IRIS)

maxane колония → епруветка с
ДНК на -20° C

нормите ДНК от
оцетната среда

E. coli - не норм есеческата оцетска среда

→ инкубация! (неохватна е Асцит)

• енергосиловитетна и ~~не~~ ^{кислородна} среда.

• най-добри резултати

енергосиловитетна и - енергосиловитетна & кисела

ДНК р-ра също обзаведат! (неохватна/неохватна)

защото нондентарна и специална за нива специална

La енергосиловитетна / TS енергосиловитетна.

срещане за определена
оцетна нива от употреба => ~~неохватна~~ ^{енергосиловитетна}

→ голяма специална за специална оцетна среда &
распространена употреба

не толкова специална. → нондентарна употреба

норм

свежа среда за нива!

специална

нормална среда (SOG) на 37°C за нива за

само плазмид само носи програмата за
резистентност $\Rightarrow$ трябва трансформиране &
транслагация, и' отнема време

възстановяване и носене на мутата в
среда с антибиотиките за веднъж да
е лесно

трансформация - мутация процес! $\rightarrow$ директно
на мутата
САМО
с Ampicilin

при wild type щамове не е оптимална
трансформацията $\Rightarrow$ lab щамове се използват

$\rightarrow$ имат Δ -рестриктази (рестриктази навлезли
ДНК от бактерията, и' не са имали още
време да се метилират $\Rightarrow$ рестриктазите ги
разпознават & срезват)

$\Rightarrow$ трябва да се махнат рестриктази
+ ендонуклеази

✓ EcoRI

измерване оптичеството

800 μ l LB в пробата

800 μ l от колонията в друга пробата

$A = 0,103$ (opt. $A = 0,35 \sim 0,45$)

$T = 36 \pm 20$ min $A = 0,414$

SOB = SOC без Gln

8

† на пер

10 min 2400G предварит. охлаждка

50ml сука в 750ml TSS

ресусцитиране + етно! със симбо т.
† вклинване за крани

по 100ml амиклет в етредот

термо шок ^{на} 42° за 45 sec! после 2 min на пер

~~трансформация~~

плазмиди на пер 30 min

! плазмиди в - тимо до - 1-2 дано количество

1:10

=> 10 метки 1g T.C.

трансфер-метки
научно-
снес

Зръ от iGln в метките PSB/C3 w/RFP

900 μ l SOC в клетките
1h на 37°C в батерия

* когато трансформиране - в големи медията
поддържане културите в малки за
мониторинг на среда

~~900~~ μ l/ml среда
CA

90ml среда $\Rightarrow$ 90ml CA

$\sim$ 20ml среда за медия

Благодаря 2 големи медията със смърт

100ml клетки per petri

* медия вилтаги с дежето нагоре

анализи чихи 12.

LB среда
500 ml
12.5 g / 500 ml

аборнабурање (13:4%)

11/09

нозбна на Терна среда
60 ml LB + 500 μ l на 37°C

ноб TSS buffer пезеуа

20 ml:

2g PEG 1000 polyethyleneglycol

0,5 ml 1M $MgCl_2$

0,3 ml 1M K_2SO_4

LB to 19 ml & mix until PEG is dissolved

filter (0,22 μ m filter) sterilize

add 1 ml DMSO

-20°C (few months)

фитогриране през DMSO!!!

* гризци растат по 2-3 гми през
за което за се леаги DMSO от 1ex

800 μ l изотипа CDm

→ 0,049 abs

центрифуза + a 2°C
OTSS + a rep

800 μ l u

→ 0,342 abs

ТРАНСФОРМАЦИЯ

100 μ l abt b ~~ex~~ EP

10 min 2°C 2400 об

ресу. измелва се LB, 450 μ l TSS за
ресу. остатъците мелеца u b2 x 100 μ l b
EP

3 μ l GEN PSB1C3 c RFP construct +
EP

~~1~~ + на рег!
2 изпита на термостат (37°C)

Registry of Standard Biological Parts

1EP 45 sec на 42°C ←
2EP 60 sec на 42°C
моче + рег 2 min

размери SOC — и 900 μl в LP

или 37° инкубация

мощване на лезер за среда 100 μl
в термостат на 37°C

мощване ~~срещу~~ CTK
5 ml LB в колба + млечен
слой ил. от мези
инкубация 37°C overnight

* за употреба 50 ml среда в колба
+ 500 μl уран

12/09 ИМАНЕ КОРОНУ!!! ♡

→ 500µl инокум в 50ml LB

Registry

→ без промотора
amilCP

> хромозомные: син, белый, желт, розов, син,
мала, лайм

amilCP раст	K592009	plate 19E	pSB1C3 +a CA
amilGFP	K592010	plate 6 17C	n =
ajBlue	K592011	pl. 4 2I	n =
etorked	n = 2012	pl. 6 15I	n =
aeblue	K864401		
tsPurple	K1033906		
angajBlue	K1033916	pl. 4 6M	n =
fastPurple	K1033919	pl. 6 9K	n =
spisPink	K1033932	pl. 6 11K	n =
asPink	K1033933	pl. 6 21C	n =

> promoters (constitutive - постоянно активен)

strong Promoter & strong RBS K608002 pl. 1 30
sp. const. strong pr. w/ med. RBS & GFP K608008
p. 1 5I

f1- fazov origin za encupres
ednoleg ~~24K~~

high const. exp. cassette K314/100 pl. 1 1G

26 55min A $\rightarrow$ 0,395

6min цетр. (зреша в тарурането)
1ml TSS (за нолере ин.)

6.11 EP no 100ul мети

в инструктите no 10ul вода +

$\rightarrow$ вода за инхибиция

~~не е~~ след 10min разтворене

мети в EP + нолере

~~трансформация~~

6ul + 6ul ~~24K~~ + инструк
в ин. (100ul)

30min на рег

на рег

трансформация

термоблок на 42°C ! подготовка
45 sec по-оптимални за ДНОВ
(~ 296 колонии)

измерване ефективност на трансформация
ET

бр. колонии / 1 μg DNA

① = 10 в случая

$$ET = \underbrace{n \cdot \textcircled{1}}_{\text{цела трансф. смес}} \cdot 3333,33 \dots$$

(300 pg = 1 μg)

$$ET = 296 \cdot 10 \cdot 3333,33 = 9\,865\,680 \sim 9,87 \cdot 10^6$$

(близко до 10^7 (абс. max))

! transformation efficiency calculator
! за прилагане вектори max 10 pg

изрита с СА томи среда

от рег 45 sec 42°C 35 min рег

~~450~~ μl SOC

CA: 34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ в EtOH

мощие! 11 регистъ везно с
по 100 μl от една EP

използваните EP на 4°C

регистъ мощи на 37°C

13/09 ~~А~~ има колони везе ∇ регистъ

CA prep:

34 μg CA / ml EtOH

20 ml $\rightarrow$ 680 μg CA

20 ампули

LB + CA 100 ml

2 ml везе фактими

8 ml в везе

в изотерма
37°C

содим от мизрита ccle фамонии с
ипени за зтеди

содим P1 30 в иелда с ип. за зтеди

содим DH10B в иелда с лозе

PCR

→ мутагенизираща
процедура => Сангер

сиквениране
ако е нужно
важно

* #аннотацията части за ионизация

Phusion полимераза - 1 точка & термостабилна
Taq полим. (1 kb ~ 1 грешка => не е добре за
много гени)

→ с proof-reading активност

Q5 над 100 пъти по-точна от Taq

1. 50 μl реакция за ионизация, за да има
достат. материал

5x high fidelity buffer (HF buffer)

10 μl buffer

10 mM DNTP - 1 μl

10 μl праймери: forward & reverse (F & R)

по 2,5 μl / всеки

0,5 μl FP

32,5 μl H_2O

49 μl

=> 1 μl матрица!!!

иониз.
с най-↑
точност

CC-buffer
за CC-бозони
райони,
когато
HF не
работи,
тогава
на иониз.
но ↓

→ в нашия случай $\times 1 \mu\text{l}$ от 8 те
шугурки точности
урачуване контрола само сега,
защото урост + амниотаване фрагмент

! Задължително трябва контрола!

→ ако се работи с чов. ДНК с релативни
наличи под ръба

8 PCR-и

MasterMix:

в EP +, дори с 1 реакция повече
без матрица (различни елементи)

Водна
снес:

H₂O 295 μl ($\approx 300 \mu\text{l}$) минимална
буфер 30 μl HF $\rightarrow$ разбъркване с кенни
инверсии?

DNTP 3 μl

(R + F) праймери 22.5 μl (н/у 22-23 на пипета)

Prmision 4.5 μl $\rightarrow$ разбърква се

$\rightarrow$ намалява се в PCR-и до 4.9 μl

вортексуване шугури за урециитати

PCRки:

1 - PG 11K

2 - PG 15I

3 - PG 9K

4 - PG 17G

5 - P1 19E

6 - PG 21C

7 - P4 6M

8 - P4 2I

→ при прибиаване ~~на~~ ДНК директно разбъркване
с пипетата
↳ 1,5 ml

редим на блок като стигне 10°C
35 минути

важеша за изверка

по-големи времетрая за пречистване от гел

прибиране колоните на 4°C

Изолуване плазмидна ДНК

Н на стайна t°

Възв. се роба 2 min центрифуга до обр. на клетата
и измиване течността

* В центрифугата с етанол и азот

сгъзвиване останалата част от р130 по се
изправено и още 2 min центрофуза за
пелета; отново изливане течността

250 μ l resusp. solution (хлад. 4°C)

ресуспендиране с нитро пипета диметил
само на 1 cm ход

250 μ l lysis solution

3-4 min качане до ниво

инвертиране няколко пъти

350 μ l lysis buffer

инвертиране няколко пъти

5 min центрофуза

прехвърляне в колонка без да минава 'снопна'

центрофуза 1 min

500 μ l wash buffer

изливане боялуса от резервоар, а ДНК е в

снопна

1 min центрофуза

500 μ l wash buffer

1 min центрофуза

изливане боялуса

2 min центрофуза

40 μ l elution buffer (за да е концентрирана)
100-кратно се разрежда

махаме резервоарчетата и слагаме
сигнитите в EP

elution buffer близо до белото, но не го
докосваме

двуми канала

двуми центрифуга (каналите с машините
на EP по посока на въртене, за да ги
тегли назад)

хвърляме сигнитите
прехвърляме в ~~EP~~ едната EP +

$$\begin{array}{rcl} 50 \times 1 \times & & x = \frac{2000}{50} \\ 2000 \text{ ml} & & \\ \approx 400000 & & \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} \text{TAE} & 50 \times & 1 \times \\ & & 2000 \text{ ml} \end{array}$$

$$\frac{2000}{50} = 40 \text{ ml } 50 \times \text{TAE}$$

↳ 1980 ml H₂O

40ml 1% gel

? агароза

=> 0,4g & 39,6ml TAE

1,75ml багрило

* охлаждане агароза на мивка постепенно се
гелувателите и татче се вентилира
излива се гела в чехло ваничната

~~визуална~~
после се излива мидата

* агарозна ~~гел~~ ЕО на НК:

-> осветяване под флуор

-> багрило в агарозата

-> багрило в пробите

~~разделяне~~

наименование на марфини пробите и
буфер

5ml проба

$C_x \rightarrow 1x$

$cV = cV$

$C_x \cdot x = 1 \cdot (5 + x)$

~~$x = \frac{5}{C_x - 1}$~~

~~$x = \frac{5 + 5x}{C_x - 1}$~~

~~$x = \frac{5}{C_x - 1}$~~

$$= \cancel{0.82} + \cancel{0.85}$$

$$6x = 5 \times x$$

$$5x = 5$$

$x = 1 \mu\text{l}$ ~~уроде~~ ~~буфер~~

5 μl ~~уроде~~ +

намаляват се на параболни
уроде буфер, а после намаляват

с 35 min

успешно протеини PCR
уроде амил GFP (PG 17G-4) &
etor Red (PG 15E-2) +

* неуспешните
PCRи за боник

~~уроде~~ намаляват P130

↳ възможно заради Precision (не е финасен)

успешни PCR-намаляват уроде
45 μl ~~уроде~~ + 225 μl binding buffer
mix by vortexing
15 μl elution buffer

→ ДНК се детързва с илонната & останало
отива голямо в резервоара отива
от wash buffer

преклетване в 7. Clean & Concentrate
концетри

измиване
долу

- 1 min центрофуза
- 200 μ l wash buffer
- 1 min центрофуза
- 200 μ l wash buffer
- 1 min центрофуза
- измиване долуна
- 15 μ l elution buffer
- 1 min измиване
- 1 min центрофуза

преклетване в
чистите EP, в и' не
енциране
! супертно на
делото

HF: $10 \times 6 + 1 \rightarrow 40 \mu$
DNTP: ~~44~~ 4 μ
Pluricon: 3,5 μ
H₂O: $32,5 \times 7 \rightarrow 227,5 \mu$
primers $\times 2,5 \mu$

PCR с
Pluricon

+ 1,5 μ l от

11 | 32 | 53 | 61 | 71 | 82

уроди от гнес

Master

PCR c optiTag (ca 50 μ l)

10x Buffer B w/ $MgCl_2 \rightarrow 5 \mu$ l

dNTPs (10 mM) $\rightarrow 1 \mu$ l

primers (10 mM) $\rightarrow 2,5 \mu$ l

colorTag $\rightarrow 1,25 \mu$ l

DNA $\rightarrow 1 \mu$ l

H₂O $\rightarrow 36,75 \mu$ l

последно

x 49 μ l
за +
уход

18/09

x 100 μ l x.p. среда
1 μ l инкубация

инкубация

ген	уход за РД	* на камере на parafilm
1,5 μ l Базисно	1 μ l Базисно	
40 μ g 0,4% агароза	2 μ l H ₂ O	
40 μ l TAE	3 μ l инкубация + PCR-не уред	

30 min РД

инкубация 3h

* Э- анална фосфатаза → урехнахва фосфатите.
се уредотвратува самозатварување
нашите фрагменти са с фосфати => мошне
да има лигиране

$Spe + Pst \text{ I } \text{ (лево)} \text{ (S+P)}$
* double digest calculator

1x Taq buffer
2x Pst I

$Xba + Pst \text{ I } \text{ (фрагмент)} \text{ (X+P)}$

1x Taq buffer
Xba I
2x Pst I

термо инкување на 80° (Pst мо-термо-стабилен)

6 PCR mix

leucop ~ 50 ~~ng~~ ng/ μ l

x2

80 μ l

=> 10 μ l leucop
2 μ l Tango buffer
1 μ l Spe I
2 μ l Pst I
5 μ l H₂O

urocytu 284 (Pleusian) ~

=> x 5 μ l PCR mix urocytu
2 μ l Tango buffer
1 μ l Xba I
2 μ l Pst I
10 μ l H₂O

urocytu 1, 3, 6, 7, 8

=> x 12 μ l PCR mix urocytu
2 μ l Tango buffer
1 μ l Xba I
2 μ l Pst I
3 μ l H₂O

④ Семи ~ 8 μ l $\Rightarrow$ добавяне & 4 μ l H_2O

[+ PCR mix на $37^\circ C$ за 30-40 min за
срезване

A = ~~34~~ 0,374 2:55h

4 ампликони x 50 μ l фалконни 10 min
студена центрофуга

охлаждане EP (30 $^\circ C$)

x 450 μ l TSS в чепетите с ОХЛАДЕНА
синьо тинте & ресуспендиране

смесване в големи ампликони наизраз
за микс. 1 еднаква
после разделение в 30 ампликони x 100 μ l
в охладените EP с макс малко
водене от мда

след вадене от -80°C 5-10 min да се отпускат

2та вектора смесване в 1 PCR на + 10 μl H_2O
и на + останали по 30 μl H_2O

488 ~ 0 min
~~400 min~~

забъриване мгазни реакции
30-40 min стабилно

на ред 80 чреди трансформацията (1-2 min)

~~всичко на 100 да се вадят за фракционирани (10 min)~~

ако има - 4 аликвоти трансформация
(x 100 μl от фреймера на -80°C)

мгаза | 5 μl вектор
10 μl инсерт
4 μl мгазен бубер
0,5 μl мгаза
0,5 μl H_2O

20 μl

28 9:30h
368

10 μ l мизазна смес (останалото на -20°C).
1/2 h на лед $\rightarrow$ 45 sec на 42°C $\rightarrow$ 3-4 min на лед

400 μ l SOC среда
1 h инкубация на 37°C

$\times$ 100 μ l на метри с CA $\rightarrow$ 4 метри

антибиотите (100 μ l) им добавяме 10 μ l мизазна смес от PCR-ите 1/2 h на лед
....

мизаза силно термочувствителна. $\Rightarrow$
се замразява в бора в блок

19/09

Ampicillin-Gentle

нобли за експресиране на белтъци

сателитни колонии - β -лактамаза

в изходна stat фаза 1/4 от изходна миза

Векторите се издват бързо ако нямат survival advantage

PSB1A3 вектор - Амр резистентност
инициране PSB1C3 касета за CA резист. &
спазване

хидриден вектор

PCR на Амр касета

вкарване 'котва'

възст. функция на β -лактамаза

=> подбиране по Амр

весна stat с Амр -> гами задържаат

ssTetA -	}	възможни 'котви'
HBP -		
lpp - AmrA -		

Мрабмер:
100 μ M stock
завертане 5-6 sec

100 μ M stock

завертане 5-6 сек

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

$20,4 \text{ nM} \cdot A = 100 \mu\text{M} \cdot A$

$204000 \times 2 = 408000$

$$100x = 204\,000$$

x - 2040

0/10

~~$209 \cdot 10^{-9} = 100 \cdot 10^{-6}$~~

~~$\times$~~

~~$209 \cdot 10^{-9}$~~

~~$100 \cdot 10^{-8} = 209 \cdot 10^{-5}$~~

$$20,4 \cdot 10^{-9} = 20,4 \cdot 10^{-9} \cdot \frac{10^6}{10^6} = 20,4 \cdot 10^{-3} = 0,0204$$

20,9 mm - 1l

20,4 mM

$$\frac{100}{20.9}$$

20,4 mm

1ml

p-pse genelock fragment to Tleutter
leighton orlogerker, stockus +a -20°C

PCR Reaction | x3 copies
no detergent, без MM

10 µl HF •

1 µl DNTP •

0.5 µl Phusion •

32.5 µl H₂O •

x 2.5 primers •

1 µl mixture

→ 6 1 ssTcr

2 ssHBP

3 OmpA

25 minutes, so far as
preparation of mixture

Parafilm Tetter Cox → 1x

6 µl each volume → 1 µl reaction buffer
5 µl mixture

DNA loading dye

→

10 pel in wells
10 min $\uparrow$

Средств / в нем, на.

1/26 лнч. пох

45 mm 42°C

3-4 мин наг/

30 min 37°C und gere

40ml Amp & LB za 2 kultura
~40ml

x 50 μ l + a CA & 1A up

~~10/10/2020~~ 10/10/2020

5th Ha sp. Amp

wednesday Jul 11th Aug
in the company of Mr. ...

Без одзвучења 50 рл

Ques

2000

20/09

2x PCR & 1 CO

21/09

направа трајни култури

и вештача
на 80°C

- > културалната течност да е чиста OMC 300 ml
 - > криопротектант- глицерол 300 ml
- потоа да се
автоматизира

обгорени нитица & одрзување вентри на
ситно тити за вештача на глицерол
чиста
вештача

потоа се става глицерол!

глицерол на титица => неможе да се
нагоре - нагоре с титица метица да
се вештача

глицерол- криопротектор- да не се одр.
криоталекта, затоа што криоталекта метица

мозване от грайни култури - бърза се с
мозе директно во го фривера - не се ваде

> мозване от културите на метри

VF₂ & VR - unique primers

ген 20 min с PCR през от вгера с 6 ml през
ако има през елизиране в 40 ml &
+ PCR през от онзи ген пречистване с
Kit елизираиши в 20 ml

матрица за PCR от центроно метри на тиге
авил CR & etorkeд в 10 ml H₂O
PCRa с OptiTag, 10x B

× 5 ml от PCR в 1 & CAC

* вектора носене!

PCR c OptiTag 50 μ l

- 10 $\times$ Buffer B c MgCl₂ - 5 μ l
- dNTP (10 μ M) - 1 μ l
- primers (10 μ M) - $\times$ 2,5 μ l
- ColorTag - 1,25 μ l последно
- H₂O - 56,75 μ l
- DNA - 1 μ l

22/09

амплифициране

* в Top10 най-ефективно
от тестовите уамове

psb1A3

PCR-намонитаване уреднама
на вектора

2 $\times$ 50 μ l PCR Reaction

Дриг 1 μ l плазмид от вектора + 14 μ l H₂O $\rightarrow$ 1 μ l matrix
3- ~~PCR~~ - ретне само плазмидна ϕ ДНК, не и
PCR амплиф. ϕ (ретне само нелипирана
 ϕ ДНК)

РЕСТРИКЦИЈА

20 μ l lеuоrор

1,5 μ l Spe I

1,5 μ l Pst I

5 μ l Buffer

22 μ l H₂O

50 μ l

6 2 разн. $\times$ 10 μ l фрагменти

1 μ l Xba I

1 μ l Pst I

5 μ l Buffer B

33 μ l H₂O

50 μ l

37°C термодоби 30 min

* Fast AP - али фосфатаза

2 μ l Fast AP САМО НА ВЕКТОРА

* да се дефосф. & да не може да се забележи

още 10-15 min на 37°C

пречистване и трите проби (B, C, 4)
енуир. ϕ : B (25 μl), C и 4 (15 μl)

ED - 0,4 μl за PCR проб и B $\times 5 \mu\text{l}$
 $\uparrow$ μl багрино

от 2ра мазница

1 - маркер 5 μl

2 - ~~for~~ SST 4 μl + 1 μl багрино

3 - SST " =

4 - ~~Quipa~~ " =

5 - празно

~~6 - PCR ните в 1 и 5 μl~~

6 - от PCR ните от 1 до 5 μl

7 - B 5 μl

8 - C 5 μl

9 - 4 5 μl

$\left. \begin{array}{l} 7-9 \end{array} \right\} + 1 \mu\text{l} \text{ багрино}$

Вс нуклеотиди ~ 35 ng/ μ l
C (amplCP) ~ 37 ng/ μ l
Y (etorRed) ~ 37 ng/ μ l
pSP1C3 PCR ~ 25 ng/ μ l
ssT ~ 30 ng/ μ l
ssH ~ 35 ng/ μ l
DmsA ~ 50 ng/ μ l

pSB1A3 PCR от гнес с ~~DN~~^{DpnI} (2.5 μ l)
и от 2-те нуклеотида & в PCRa
в ~~гнес~~ гнес

24/09

Амплификация

в Top10 клетките

10 μ l H₂O 12 ng вектор на kb желатинизирани
инсерти: вектор 3:1

иницир. 1h при 37°C

вектор pSB1A3 (2kb) $\rightarrow$ 24 ng

инсерти ssT & ssH $\rightarrow$ 4,2 ng по 1 μ l + 8 μ l H₂O

DmsA $\rightarrow$ 15 ng

Лизазна реакция

2 μ l лемтор (B)
2 μ l фрагмент (C/4)
4 μ l 5x лизазен Buffer
0,5 μ l T4 лизаза
11,5 μ l H₂O

x 10 μ l в EP от -80°C

30 min инкуб. стайна 1°

термошок 45 sec

3 min на лед

+400 μ l SOC

инатаре

26/09 pr Aqua pSB_F & R

12 x 50 μ l

Plusion PCR

1 μ l matrix pl. PSB1C3 matrix (32 ng/ μ l) 1:5 4 μ l H₂O
зауоро low-copy 1 μ l

~~for DitzE~~ pr Tori_F
R

2 x 50 μ l

Plusion

pl ETFLP matrix 1 μ l без разр. (зауоро low-copy)

30,5 - 305 - 3050
H₂O. 100 μ M stock 10 μ M stock

→ 10 μ l 100 μ M stock + 90 μ l H₂O 3a

→ гурентно в IDT EP

23,1 - 231
ug/ml H₂O

2 μ l/ml Rifampicin

20

- 1. ~~ETFLP~~ ETFLP
- 2. PSB1C3

10 μ l stock pr. 6 90 μ l H_2O - рад. р-р

MM за 18 проб

+ от р-р $\times 6$ & 2 проб контрол

T1-5 H1-5 O1-5 + вертециране

всичко + PCR по 15 μ l $\pm$ MM & 1 μ l матрица
а в контрол $\times$ 1 μ l PSB1A3

~~450 μ l buffer binding~~

450 μ l buffer binding

25 μ l buffer elution

2
PET-FLP
PSB1C3

27/09 > 2er 0,4

$\times 5 \mu$ l от + репер. проб 1 μ l барьер

за матрица C - ~~2.5 μ l~~ 2.5 μ l
~~matrix~~ elutRed

↓ саграване UV снимка

petri dishes - iGEM Bulgaria

#TheLureCAS

ново

познание

1 etorRed
2 pET-FLP
3 pSB1C3

amilCIP & etorRed 2min yerop. & chemica

30min * 8 u 6 3to uonopona 8-9ul 20

~~XXXXXXXXXX~~

3ul fast dig kufft uen pSB1C3
1ul ~~at~~ DpnI
6ul H₂O

Ha T. DNA 37°C 25min

25ug leuop - pSB1C3

45ug ETFLP origiu

2ul pSB1C3 yper.
2ul ETFLP
6ul H₂O

2 μ l pSB1C3
1 μ l ETFLP
7 μ l H₂O

смесване в PCR mix & 1h stain at °

29/09

- Plasmid PCR
- метри с IPTG & червено изпони с ↓ CA
- приготвяне уредна за амплификация
- посеване ~~на~~ венто & червено
- пробен OptiTag PCR

~~202 & 205~~

pSB1A3 0,5 μ l матрица ~~из~~
работни stock of Assembly-vector F & R

4 x 50 μ l

PCR с Homemade Tag - ~~содержа~~

* сред optimal условия, при и'
действат най-малко 10 мин
* после-error-probe PCR

норме без $MgCl_2$ ce yridaly

reaction buff. без $MgCl_2$

3a 50 μ l: 2 unit $MgCl_2$

→ yridapcann

2.5 μ l yridapcann (VF2)

h = m = h → VR

1 μ l Tag (homemade)

1 μ l dNTP

5 μ l PCR buff. (без $MgCl_2$)

25 unit stock $MgCl_2$!

4 μ l $MgCl_2$

~~4 μ l $MgCl_2$~~

30 μ l H_2O

3a 50 μ l: 4 unit $MgCl_2$

h =

h =

8 μ l $MgCl_2$

20 μ l H_2O

в 2 EP 100 μ l MM

Matrix и за гелете:

pSB1C3 1,5 μ l

A1-G

B1-G

програма с термоградиент

→ c 4 μ l $MgCl_2$

c 8 μ l $MgCl_2$

за A MM:

- 5 μ l инициатори
- 2 μ l Taq (HM)
- 2 μ l dNTP
- 10 μ l PCR ен buff. без $MgCl_2$
- 8 μ l $MgCl_2$
- 65 μ l H_2O

за B MM:

|| = || =
16 μ l $MgCl_2$
54 μ l H_2O

x 15 μ l в 6 пробирки