

Jung

19/08/19

1X reação



10X reação

Master Mix

50  $\mu$ LH<sub>2</sub>O40  $\mu$ L ✓pfw (NFZ) ~~PT3 fw~~5  $\mu$ L ✓prv (VR) 5  $\mu$ L ✓

4X

Master Mix

~~20~~ 20  $\mu$ LH<sub>2</sub>O16  $\mu$ L ✓

pfw (PT3 fw)

2  $\mu$ L ✓

prv (VR)

2  $\mu$ L ✓ $T_m = 52^\circ\text{C}$ 

Elongation = 3 min 40 seg

Gung/Marco

	IX	20/08/19
pCR Blunt (25ng)	1ul	5,5 ✓
fragment (~100ng)	2ul ✓	5,5 X
5x Express Link T4 Ligase Buffer	2ul	11 ✓
H <sub>2</sub> O <sup>d</sup>	4ul	22 ✓
Express Link T4 Ligase (5U/ul)	1ul	5,5 ✓
	<hr/> 10ul	<hr/> 44ul
		55 )
		8ul

\* Cada bloco foi ressuspendido em 80µl de H<sub>2</sub>O MilliQ, de modo que a concentração do DNA ficou 50 ng/µl.  
 // Incubar a RT por 1 hora

A transformação foi feita em DH10B por choque térmico.

50ul de célula competente + 2ul da reação

30 min no gelo

45 seg a 42°C

2 min no gelo

Adicionar 250ul de SOC

Incubar por 1 hora sob agitação

Plaqueei com 50, 100 e 150 ul

Nas placas dos blocos 2, 3 e 4 o número de colônias formadas foi muito menor que nas placas dos blocos 1 e 5. Acredito que isso se deve ao fato de que a proporção frag:vetor foi menor que 10:1 em 2, 3 e 4 (não recomendado) e maior que 10:1 para 1 e 2. Houve formação de umas 40 colônias na reação do blunt sem o inserto

05/09/19

Digestion of pGGA

pGGA	15ul
Cutsmart	5ul
XhoI	2.5ul
H <sub>2</sub> O	27.5ul
	<hr/>
	50ul

Incubate at 37°C for 2 hours