

STAIN- susSTAinable INk



IGEM 2019

MADRID_UCM_HS

Name: ALICIA CARO MARTÍN

Date: 11 /06 /2019

STAIN-susSTAinable INk

PROJECT: The **STAIN** project focuses on the production of a "**sustainable ink**" or "**bioink**", completely manufactured from natural products, and exhibiting a highly-stable color. However, the oxidation of these natural products frequently results in the alteration of their original color, which limits their current use as bioinks. Therefore, solving this oxidation bottleneck will facilitate the use of natural products as inks in printer cartridges, markers, cosmetics solutions and textile dyeing. This research project will be carried out by the Alpajes Anranjuez High School Team in the Department of Biochemistry and Molecular Biology of the Biology Faculty of the Complutense University of Madrid (UCM).

MAIN GOAL: The Alpajes Aranjuez High School Team will participate in the "International Genetically Engineered Machine" competition (iGEM 2019) with the STAIN project. However, this participation has basically an educational objective, given that the development of the outlined research project will result in the development of transversal competences in the students, allowing them to face new challenges. Moreover, through this project the students will develop strategies and pedagogical materials useful to the entire educational community. Likewise, this project seeks to encourage students to take an interest in science and research, basic pillars in the advancement of society.

iGEM: **iGEM** is worldwide synthetic biology competition for pre-graduate and high school students (about 6,000 students from around the world) that annually takes place at the Massachusetts Institute of Technology (MIT) in Boston, USA. Multidisciplinary teams work for about 3 months during summer, inside and outside of a laboratory, on a project using genetically modified systems provided by iGEM, the so-called **BioBricks**. All projects are then presented in Boston, this year from October, 31st to November, 4th.

The Team:

The team, registered in iGEM as **MADRID_UCM_HS**, consists of 9 high school students (5 Girls/ 4 Boys) from the IES Alpajés (Aranjuez, Madrid, 1st year of Bachillerato in science and technology programs), coordinated by **Juan Carlos Cambronero Madrid** (principal of the IES Alpajés), **Javier Medina Domínguez** (head teacher of the sciences department at the IES Alpajés) and the researchers **Dr. Mercedes Echaide Torreguitar** (Biology Faculty; Dept. of **Biochemistry and Molecular Biology**, UCM), **Dr. Paolo Natale** (Chemistry Faculty; Dept. of Physical Chemistry, UCM) and **Dr. Laura Rodríguez Arriaga** (Higher Technical School of Industrial Engineers, Dept. of Chemical and Environmental Industrial Engineering, Polytechnic University of Madrid).

Normas básicas de seguridad

En el laboratorio existen peligros, especialmente si no se cumplen las normas de seguridad. En ocasiones pueden utilizarse mecheros de gas y otras fuentes de calor, o productos que pueden ser tóxicos o inflamables, por ejemplo, y cuyo manejo puede resultar peligroso para quien trabaja y/o para quienes comparten el laboratorio. Pero los accidentes en general suceden por el manejo inapropiado de productos o equipamiento, y son debidos a cuestiones como que no se siguen las normas de seguridad o de operación de los equipos, no se presta la debida atención o se realizan experimentos no autorizados. Por ello **es muy importante trabajar en todo momento de forma responsable, con concentración y precaución, y conocer y cumplir las normas básicas de seguridad** que se enuncian a continuación:

1. No se permite realizar experimentos no autorizados por el profesor. Nunca se permite trabajar sólo en el laboratorio.
2. No dejar sin vigilancia ninguna reacción química, incluidos los mecheros encendidos.
3. Siga siempre las instrucciones de seguridad adicionales recogidas en el guión de prácticas, en los envases de los productos, en los equipos y en el laboratorio, así como los consejos y avisos dados por el instructor durante la realización de la práctica.
4. En todo momento deben utilizarse gafas de seguridad de laboratorio. Si el alumno no lleva las suyas, en el laboratorio habrá unas disponibles. Deben evitarse las lentes de contacto, pues pueden agravar algunos accidentes. Especialmente si se manejan solventes orgánicos volátiles, no deben usarse lentes de contacto.
5. En cuanto a la vestimenta, es conveniente llevar la menor cantidad de piel expuesta a posibles salpicaduras. Por ejemplo, se recomienda no llevar sandalias o calzado abierto. La ropa debe ser recogida, sin vuelos, y no deben llevarse pulseras, colgantes, bufandas o pañuelos de cuello holgados, para reducir el riego de enganches que provoquen accidentes. Por estos motivos, y para proteger también la ropa, es obligatorio llevar y utilizar bata de laboratorio (abrochada).
6. El pelo largo debe ir recogido para reducir riesgos.
7. Averigüe desde el primer momento la localización en el laboratorio de las salidas y de los principales elementos de seguridad (ducha, lavaojos, extintor...).
8. Está prohibido comer, mascar chicle y beber en el laboratorio (ni siquiera agua).
9. Deben lavarse con agua y jabón las manos después de terminar las prácticas.
10. En la mesa de laboratorio sólo puede estar el material en uso, la calculadora y el cuaderno o el ordenador portátil. Todo lo demás (ropa, mochilas, bolsos, libros, carpetas...) deben situarse en el lugar indicado por los instructores para evitar riesgos.
11. Abra siempre con cuidado y atención los envases de productos químicos. Cierre siempre los envases cuando no se usen. No devuelva los reactivos sobrantes al envase original salvo que lo autorice expresamente el instructor.
12. Nunca huela ni toque los productos químicos, y si se desprenden vapores (y siempre que se le indique) use las vitrinas con extracción de gases. Para manejar productos químicos use guantes, disponibles en el laboratorio.
13. Nunca pipetee con la boca.
14. Tenga especial cuidado al introducir material de vidrio, como pipetas o termómetros, en dispositivos como aspiradores o acopladores. Debe hacerse con cuidado, con lubricación con agua si es posible, manteniendo la mano a 3 cm como máximo del extremo a insertar y sin brusquedades, para evitar roturas que pueden causar cortes o pinchazos.

15. Extreme las precauciones y el cumplimiento de las instrucciones cuando caliente algo o maneje equipamiento que pueda estar caliente.
16. Asegúrese de que está suficientemente frío antes de manejarlo. Jamás caliente un recipiente cerrado.
17. Nunca dirija la parte abierta de un tubo de ensayo hacia sí mismo o hacia los compañeros.
18. Visitas y salidas: está prohibida la entrada en el laboratorio a toda persona ajena al mismo. Avise al instructor si tiene que salir.
19. Al terminar el trabajo, asegúrese de que los aparatos están apagados, de que agua y gases están cerrados y de que todos los materiales
20. están limpios y correctamente recogidos.
21. Todos los residuos se retiran a los contenedores indicados para sólidos y líquidos. Ningún residuo se vierte por la pila.
22. No toque ningún equipo o material presente en el laboratorio que no esté relacionado con el trabajo que se está realizando.
23. Ante cualquier duda o incidente, pregunte o avise al instructor.
24. Si se conoce alergia a algún producto químico que se vaya a utilizar en el laboratorio, debe comunicarse al instructor.

En caso de accidente, avise inmediatamente al instructor y a los compañeros y, además:

1. Si un producto químico cae en la mesa o el suelo, avise, informe de su naturaleza y colabore en la limpieza siguiendo las instrucciones.
 1. Si hay contacto en la piel o en el ojo con un producto químico tóxico, irritante o corrosivo, o desconocido, avise y lave con abundante agua. Si es en el ojo no dude en usar la ducha lavaojos. Si el instructor se lo indica, no dude en usar la ducha.
 2. En caso de prenderse la ropa o el pelo, de usted o de un compañero, intente apagarlo inmediatamente con agua o un material ignífugo.
 3. En caso de rotura de material limpio, por ejemplo de vidrio, recoja inmediatamente los restos con el material adecuado (no con la mano).
- En caso de otros accidentes, avise y siga las normas y procedimientos de seguridad del centro, que se encontrarán en el laboratorio

- 1) Trituramos los arándanos enteros pero no conseguimos el color azul.
- 2) Pelamos los arándanos y trituramos la piel en un mortero.
- 3) Añadimos agua a la mezcla y la filtramos con gasas dividiéndola en tres tubos Falcon etiquetados (nada, yecu, ascorbic acid)
- 4) Guardamos las muestras en el frigorífico.
- 5) Dividimos en cinco tubos (1, 2, 3, 4, 5) *

#	COLOR	LEVADURA
①	10 ml	= 10ml + 0 ml
②	10ml	= 7'5ml + 2'5ml
③	10ml	= 5ml + 5ml
④	10ml	= 2'5ml + 7'5ml
⑤	10ml	= 0ml + 10ml.

- 6) Centrifugamos.

1) Medimos 100±05 g de lombarda. y añadimos 10ml de agua.

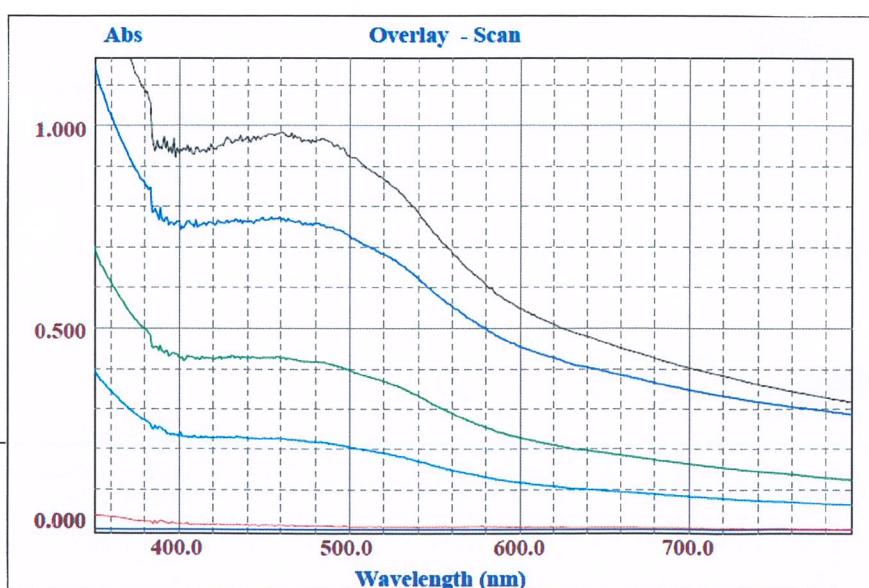
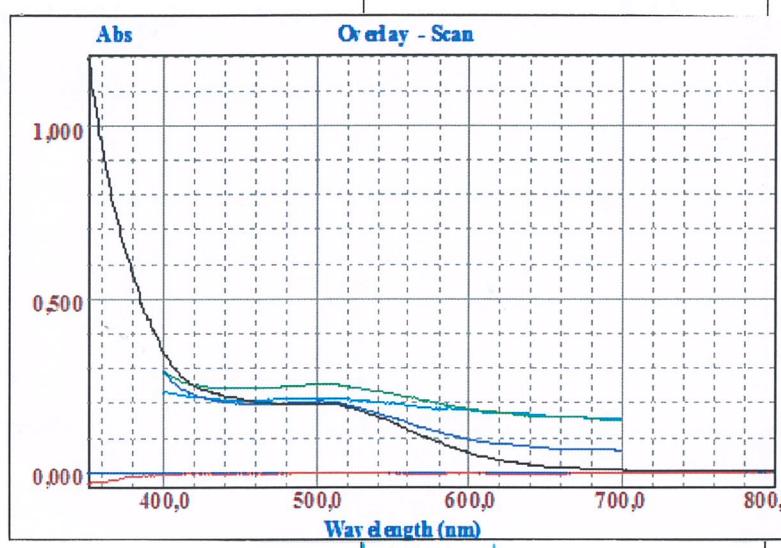
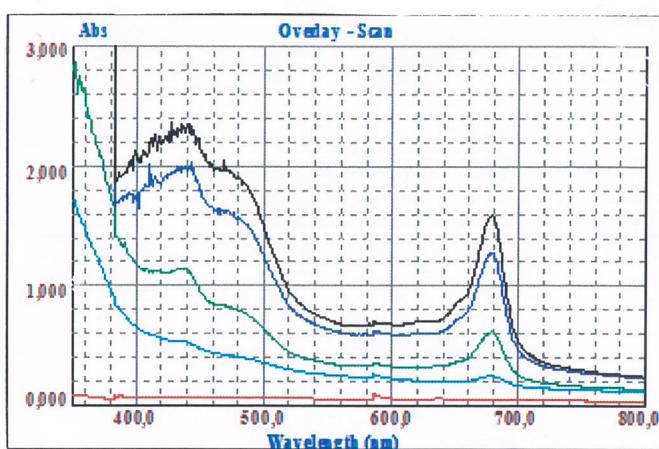
2) Hiervemos en el microondas y machacamos.

3) Medimos las muestras de arándanos (11/6/19) en el espectrofotómetro. $\frac{1000 \text{ ml agua}}{500 \text{ ml muestra}}$

4) Hacemos de nuevo la medición $\frac{1400 \text{ ml agua}}{100 \text{ ml muestra}}$.

5) Preparamos las muestras de lombarda según lo hicimos con las muestras de arándanos (11/6/19).

B-190612-1
B-190612-2
B-190612-3
B-190612-4
B-190612-5



1) Preparamos tubos Eppendorf con 1ml de cada una de las muestras (lombarda y arándanos). En total 10 tubos.

2) Centrifugamos.

* 3) Medimos de níquel en el espectrofotómetro las muestras de arándanos del día 11/06/19

B-190613-1-5 (Muestra 1)
 B-190613-1-4 (Muestra 4)
 B-190613-1-3 (Muestra 3)
 B-190613-1-2 (Muestra 2)
 B-190613-1-1 (Levadura)

puede que haya un residuo de levadura.

reusamos las puntas.

4) Preparamos disolución de cloruro de sodio:

1g de cloruro de sodio + 100 ml de agua,
 matriz de 100ml.

5) Preparamos las muestras de lombarda para el espectrofotómetro como anteriormente.

B-190613-2-1 (Muestra 5)
 B-190613-2-2 (Muestra 4)
 B-190613-2-3 (Muestra 3)
 B-190613-2-4 (Muestra 2)
 B-190613-2-5. (Muestra 1)

* 3) Preparamos las muestras para el espectrofotómetro como hicimos el día 12/06/19.

1400ml agua
 100ml muestra.

1) Volvemos a medir las muestras 1 (arándanos) y 2 (lombarda)

ARÁNDANOS { B-190617-1-1 (muestra 1)
B-190617-1-2 (muestra 2)
B-190617-1-3 (muestra 3)

LOMBARDA { B-190617-2-1 (muestra 1)
B-190617-2-2 (muestra 2)
B-190617-2-3 (muestra 3)

2) Preparamos disolución de ácido ascórbico.

{ 1g
11.354 ml ➔ 500mH.

3) Añadimos a los tubos Eppendorf de lombarda 1'5 ml de ascórbico.

4) Medimos en el espectrofotómetro.

{ B-190617-2-1-AA (muestra 1)
B-190617-2-2-AA (muestra 2)
B-190617-2-3-AA
B-190617-2-4-AA

1) Extracción masiva de lombarda.

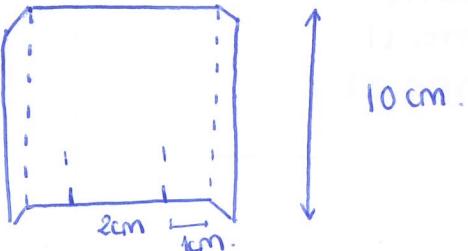
2) Hacemos en el espectrofotómetro los tubos Eppendorf con agua oxigenada.

- | B-190618 - 2-5 (Muestra 5)
- | B-190618 - 2-4 (Muestra 4)
- | B-190618 - 2-3 (Muestra 3)
- | B-190618 - 2-2 (Muestra 2)
- | B-190618 - 2-1 (Muestra 1)

Date: 19/06/2019.

1) Hacemos cromatografía de capa fina.

- *Cogemos papel de filtro de 8 x 10.
- *En el lado de 8cm doblamos 1cm a cada lado.



* Cargamos 5 gil de lombarda y de arándano.

* Introducimos el papel en un recipiente con aprox 1cm de cloruro sódico preparado el 13/06/19.

Dejamos secar y añadimos otros 5 gil más de cada.

2) Preparamos dos tubos Eppendorf con 1nl de lombarda y arándano, y añadimos ~~0.25~~ 0.1g de gelatina en láminas muy partida

3) Preparamos otros dos tubos pero con 0'05 g de gelatina en polvo.

* 8'4 g de bicarbonato en un matraz de 100ml.

4) Preparamos 5 tubos Eppendorf
100µl Lombarda
400µl agua.

* Repetimos el proceso de la gelatina.

5) A dos de los tubos añadimos vinagre, a otros dos disolución de bicarbonato y a otro agua para igualar.

ÁCIDO } (1) → 100µl vinagre
 } (2) → 50µl vinagre.

BÁSICO } (1) → 100µl bicarbonato.
 } (2) →

NEUTRO } 100µl agua.

6) Repetimos el proceso de la gelatina

{ 1ml lombarda y gelatina
0'05 g gelatina en Lámina
0'02g gelatina en polvo

1) Preparamos dos disoluciones para formar la solución tampón.

ÁCIDO CÍTRICO.
FOSFATO.

ÁCIDO CÍTRICO

50ml de agua y 1.29 g de ácido cítrico.
Preparamos la disolución como otras veces.

FOSFATO

Preparamos una disolución de 50 ml.
Lo hacemos a partir de una disolución ya preparada de 1M.

2) Preparamos 14 tubos Eppendorf con color puro.

7 TUBOS (7 pH) \rightarrow 100 μ l muestra + 900 μ l tampón.

7 TUBOS (7 pH) \rightarrow 500 μ l muestra + 500 μ l tampón.

1) Medimos en el espectrofotómetro.

LONBARDA } B. 190624 - 2 - 5 (muestra 5)
 } B. 190624 - 2 - 4 (muestra 4)
 } B. 190624 - 2 - 3 (muestra 3)
 } B. 190624 - 2 - 2 (muestra 2)
 } B. 190624 - 2 - 1 (muestra 1)

ARÁNDANO }

2) Repetimos el proceso del pH del día 20/06/19.

Date: 25/06/19

1) Hacemos el proceso de la gelatina explicado el día 19/06

2) Medimos en el espectrofotómetro las muestras de pH hechas el día 24/06/19.

} pH - 190625 - 2 - 2.

3) ESFERIFICACIÓN.

Alginato } 50 ml.
 } 0,5 g.

Color of 1 ml color + 0,04g CaCl₂.
puro

4) Pipeteamos el color puro + CaCl₂ en el alginato.
↳ pipeta Pasteur.

5) Retiramos las esferas, enjuagamos en agua y guardamos en agua.

Date: 27/06/19.

1) Repetimos mediciones en el espectrofotómetro (lombardia)

{ B-190627-2-4 (muestra 4 - 75% levadura) } NO CENT.
{ B-190627-2-1 (muestra 1 - 100% color) }

{ B-190627-2-4 } CENTRIF
{ B-190627-2-1 }

1) Repetimos el proceso de cambio de pH de la lombarda.

↳ 80 ml ácido cítrico \rightarrow 1'54 g.

↳ 80 ml fosfato \rightarrow

Preparamos 7 Falcon con 12'5 ml de tampon y
12'5 ml de lombarda.

• 1) Repetimos la medición.

Date: 11/07/19.

1) Hacemos espectrofotómetros.

\rightarrow Muestras de lombarda con levadura del día ~~12/06~~ 13/06.

O $\left\{ \begin{array}{l} B_190711_2_5 \text{ (Muestra 5 - solo levadura)} \\ B_190711_2_4 \\ B_190711_2_3 \\ B_190711_2_2 \\ B_190711_2_1 \text{ (Muestra 1 - solo color).} \end{array} \right.$ *

$\left\{ \begin{array}{l} B_190711_2_34 \text{ (75% levadura).} \\ B_190711_2_1 \text{ (color)} \end{array} \right.$

* Mirar cuaderno Víctor.

FASE 2**CLONAJE**

26/7/19

- ✗ Genes — Amp.
- ✗ 009 RBC - Cm
- ✗ 0026 T_C - Cne
- ✗ 007 P - ~~Kan~~ Cne
- ✗ d1 V - Kan.

① ANTIBIÓTICOS } 1000 X
10 ml + 10 µl
LB Antibiot.

② ↳ dividimos en tubos de 1 ml.

③ Picamos colonias de bacterias con un palillo y lo introducimos en su tubo de LB + Antib. correspondiente.

④ Dejamos crecer las bacterias.

30/07/19.

MINIPREP. → lisar bacterias y liberar los plasmidos.

- DHS α → cepa de E.coli.

Grupo Elena y Alicia

↳ 009 RBS

↳ V α L.

- ① En un Eppendorf rotulado transferimos el cultivo. y centrifugamos. a 11.000g durante 30".
- ② Extraemos el sobrenadante. y metemos al congelador 10'.

- ③ Añadimos 250 µl de BA1 y vortexeamos.
- ④ Añadimos 250 µl de BA2 y volteamos
- ⑤ Añadimos 300 µl de BA3 y volteamos.
- ⑥ Centrifugamos a max. velocidad 10'.
- ⑦ Colocamos una columna en un Eppendorf nuevo. y echamos el sobrenadante del Eppendorf anterior.
- ⑧ Centrifugamos 1' a 11000G.
- ⑨ Descartamos lo que queda en el Eppendorf y volvemos a colocar la columna.
- ⑩ Echamos 700 µl de BERB. y centrifugamos 1' a 11000G.
- ⑪ Echamos 650 µl de B AQ* y centrifugamos 1' a 11.000g.
- ⑫ Descartamos lo que queda abajo. y volvemos a centrifugar 1' a 11.000g para escurrir bien.
- ⑬ Colocamos la columna en un Eppendorf nuevo y añadimos BAE. 50 µl.

↑
y para terminar de secar ponemos
2' a 70 °C. en el termobloque +

* BAQ a 50°.

* el vector no
pq se añadió el
Baffer antes.

(14) Añadimos 50 μ l de BAE y e incubamos a RT
($T \approx$ ambiente)

* El Buffer que
hay que calentar
es el último
(AE)

(15) Centrifugamos 1' a 11000g. sacamos el
líquido y volvemos a pasarlo por la columna.

(16) ~~Metemos en la nevera alrededor de t.~~

(16) Volvemos a centrifugar. 1' a 11.000g.

(17) Medimos la concentración en un Nanodrop.

$$\circ \text{TT} \rightarrow 260 \rightarrow 2.221$$

$$\rightarrow 280 \rightarrow 1.022$$

$$\rightarrow \text{ng } 1\mu\text{l} \rightarrow 111.0$$

$$\circ \text{FSH} \rightarrow 260 \rightarrow 6.352$$

$$\rightarrow 280 \rightarrow 3.268$$

$$\rightarrow 260 / 280 \rightarrow 1.94$$

$$\rightarrow \text{ng } 1\mu\text{l} \rightarrow 317.6$$

$$\circ \text{Vd1} \rightarrow 260 \rightarrow 0.891$$

$$\rightarrow 280 \rightarrow 0.369$$

$$\rightarrow 260 / 280 \rightarrow 2.41$$

$$\rightarrow \text{ng } 1\mu\text{l} \rightarrow 44.5$$

$$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} + \text{ng } 1\mu\text{l} \rightarrow 310$$

$$\circ \text{009 RBS} \rightarrow 260 \rightarrow 0.591$$

$$\rightarrow 280 \rightarrow 0.253$$

$$\rightarrow 260 / 280 \rightarrow 2.34$$

$$\rightarrow \text{ng } 1\mu\text{l} \rightarrow 29.5$$

$$\left. \begin{array}{l} \\ \\ \\ \end{array} \right\} 22 \text{ ng } 1\mu\text{l} \rightarrow 470.1$$

• DFR \rightarrow 260 \rightarrow 5'208
 \rightarrow 280 \rightarrow 2'570
 \rightarrow 260/280 \rightarrow 2'03
 \rightarrow ng / μ l \rightarrow 260'4

• OOT (pronator) \rightarrow 260 \rightarrow 5'320
 \rightarrow 280 \rightarrow 2'542
 \rightarrow 260/280 \rightarrow 2'09
 \rightarrow ng / μ l \rightarrow 266

• ANS \rightarrow 260 \rightarrow 7'987
 \rightarrow 280 \rightarrow 4'245
 \rightarrow 260/280 \rightarrow 1'88
 \rightarrow ng / μ l \rightarrow 399'4

• ZGT \rightarrow 260 \rightarrow 9'176
 \rightarrow 280 \rightarrow 4'840
 \rightarrow 260/280 \rightarrow 1'9.
 \rightarrow ng / μ l \rightarrow 458'8

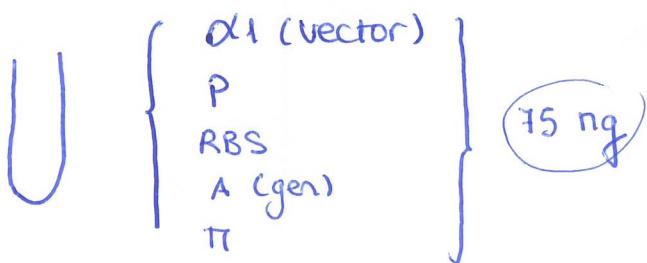
1) Medimos en el espectrofotómetro las muestras de 75% levadura y de color puro

↳ preparamos una nueva dilución.

ENSAMBLAJE

4 ensamblajes ↗

A (3GT)
B (ANS)
C (F3H)
D (DFL)



Genes ↓
3GT
ANS
F3H
DFL

$$[V_F = 20 \mu\text{l}]$$

(volumen final)

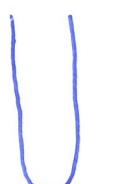
(1) Diluir plásmidos.

$$\boxed{1/10} \quad V_F = 100 \mu\text{l.} \rightarrow 10 \mu\text{l} \text{ Plas} + 90 \mu\text{l} \text{ H}_2\text{O}$$

(2) Cuánto necesitamos de cada plásmido?

$$\textcircled{α1} \quad \begin{array}{l} 310,0 \text{ ng / } \mu\text{l.} \\ 31,0 \text{ ng / } \mu\text{l} \end{array} \rightarrow \begin{array}{l} \text{Para tener 75 ng} \\ \text{necesitamos} \\ \underline{2,4 \mu\text{l}} \end{array}$$

(3)



$$\begin{array}{l} \alpha_1 \rightarrow 2,4 \mu\text{l} \\ P \rightarrow 2,8 \mu\text{l} \\ RBS \rightarrow 1,59 \mu\text{l} \\ F3H \rightarrow 2,4 \mu\text{l} \\ \pi \rightarrow 6,8 \mu\text{l} \\ \hline \text{Total} \quad 15,99 \mu\text{l} \end{array}$$

$$\left. \begin{array}{l} 3 \mu\text{l} \text{ ligasa +} \\ \text{buffer} \\ + \\ 1 \mu\text{l} \text{ assembly} \\ \text{mix} \end{array} \right\} 24 \quad \hline 18,99 \mu\text{l.}$$

$$V_F = 20 \mu\text{L} \rightarrow 20 \mu\text{L} - 18.99 \mu\text{L} = 1.01 \mu\text{L}$$

de H₂O.

(4) Ponemos en el termocidador.

1 ciclo \rightarrow 10' \rightarrow 37 °C

27 ciclos \rightarrow 1:5' \rightarrow 37 °C
└ 3' \rightarrow 16 °C

1 ciclo \rightarrow 5' \rightarrow 50 °C

1 ciclo \rightarrow 60' \rightarrow 80 °C.

2-09

TRANSFORMACIÓN BACTERIAS.

1)  50 μL + 20 μL DNA.
└ células competentes.

2) @ ice 30'

3) Termobloque \rightarrow 42 °C
└ 2' 30"

4) @ ice 5' - 10'

5)  1 mL LB
37 °C / 1h. / 3000 rpm

centrifugación 10' C 3000 rpm / Sⁱ.



7) Resuspended in 100 µl LB

8) Plate 100 µl LB en agar plates + Kanamycin (5µg/ml).

3/9/19

- $\alpha_1 \rightarrow B \text{ y } C \rightarrow$ cultivo medio líquido
(1ml LB + Kan)

- Miniprep $\alpha_2 /$ medir concentración / ensamblaje de
AyD en α_2

5/9/19 STAND

En el laboratorio estuvieron Jose, Víctor, Carmen y David.

6/9/19

PROTOCOLO DIGESTIÓN B Y C

$$V_F = 50 \mu\text{l}$$

- 2µg $\alpha_1 + B / \alpha_1 + C$
(299,05ng / µl) (0,3071ng / µl)
 \downarrow
6,7 µl \downarrow
6,5 µl.

- 2 µl Eco RI (enzima restricción)

- 5 μ l Buffer CutSmart (10x)
- X μ l H₂O miliQ $\rightarrow \alpha_1 + B =$
 $\overbrace{\hspace{10em}}$ $\downarrow \alpha_1 + C =$
50 μ l.
- Incubar 60° → 37 °C
- Incubar 20° → 65 °C.