

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:18

Eintrag 1/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:18

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 17.08.2019

Keine Tags verwendet

Got the TeLuc Sythesis from IDT

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:19

Eintrag 2/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:20

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Keine Tags verwendet

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Lvl0		entry Vector		15 fmol		Lvl 1	each part		20 fnmol
2			teLuc		60 fmol			T4-buffer		1
3			T4-buffer		1			Ligase		0,5
4			Ligase		0,5			Bsal		0,5
5			BsmBI		0,5			H2O		add 10
6			H2O		add 10					
7										
8			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3
9		1	37	20				37	20	
10		2	37	1,5	x35			37	1,5	x35
11		3	16	3				16	3	
12		4	50	5				50	5	
13		5	80	10				80	10	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1



labfolder_table_4612719_1.xlsx

Got colonies in frist try (celebrate)

Autor: Hinrik Plaggenborg

Eintrag 3/24: Noch kein Eintragstitel

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 00:20

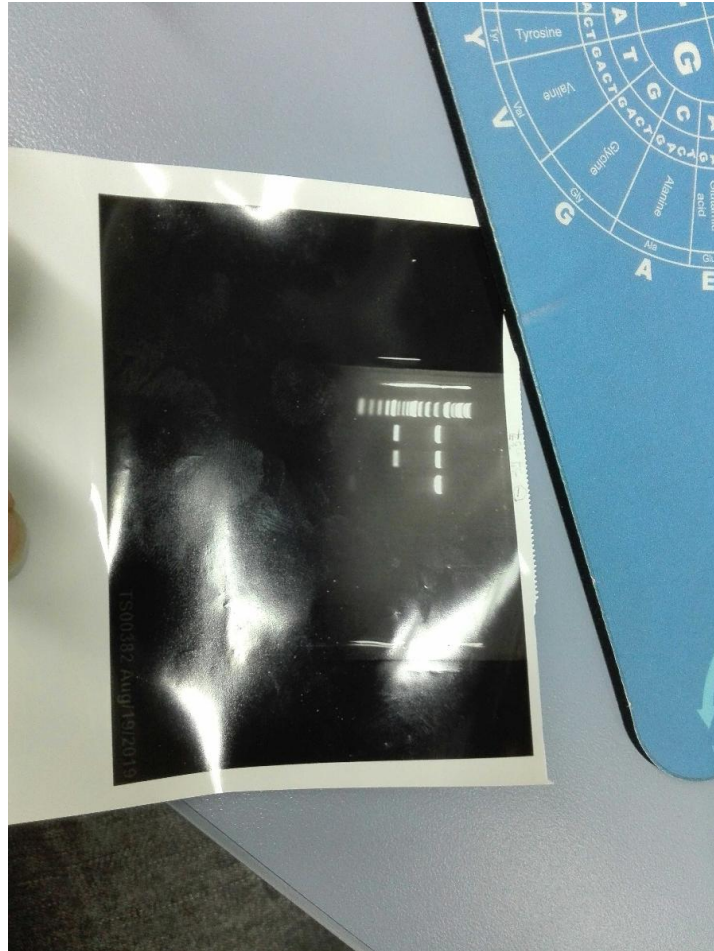
aktualisiert: 21.10.2019 00:24

Datum: 19.08.2019

Testdigestion with NotI

Burgis did the sequencing

IMG_20191021_002351.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:25

Eintrag 4/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:27

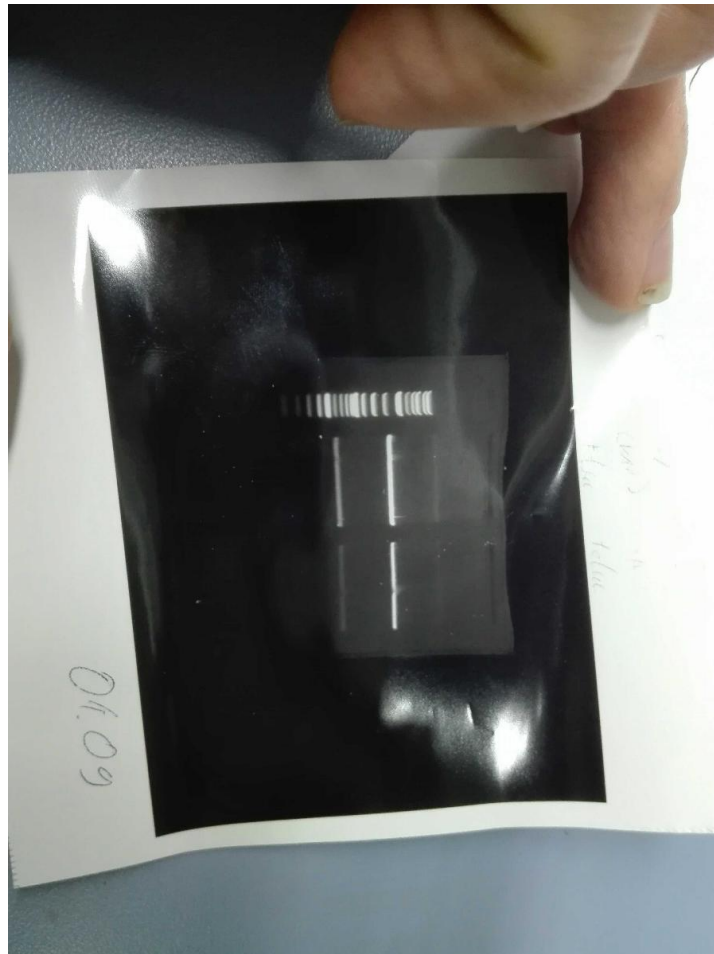
In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 01.09.2019

Keine Tags verwendet

Got the teLuc back, but retransformt
testdigesting first

IMG_20191021_002636.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:32

Eintrag 5/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 01:03

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 31.08.2019

Keine Tags verwendet

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Lvl0		entry Vector		15 fmol		Lvl 1	each part		20 fmol
2			Insert		60 fmol			T4-buffer		1
3			T4-buffer		1			Ligase		0,5
4			Ligase		0,5			Bsal		0,5
5			BsmBI		0,5			H2O		add 10
6			H2O		add 10					
7										
8			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3
9		1	37	20				37	20	
10		2	37	1,5	x35			37	1,5	x35
11		3	16	3				16	3	
12		4	50	5				50	5	
13		5	80	10				80	10	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1



labfolder_table_4612794_1.xlsx

Doing Lvl1 assembly with 1_05;2_20;3_07;5_03;6_02

And teLuc+ nanoLuc+ nanoLuc (Synechococcus codon optimised)

Got a few cells, picked 3 of them

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:38

Eintrag 6/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:41

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 01.09.2019

Keine Tags verwendet

Tab1: Double Digestion normal Enzymes

	Vol.
Plasmid (0,5-1 µg)	1 µl
10x Restriktionspuffer (enzymabhängig)	2-4 µl
[RNAse (1 mg/ml)]	[2 µl]
NoTI (1U/µg Template)	0,2 µl
H ₂ O	X µl
Vol.	20,00 µl

Incubation for 1 h by 37 °C

Tab2: Double Digestion fast Digest Enzymes

	Vol.
Plasmid (1,5-2 µg)	X µl
10x Restriktionspuffer (enzymabhängig)	2 µl
[RNAse (1 mg/ml)]	[2 µl]
enzym A (1U/µg Template)	1 µl
enzym B (1U/µg Template)	1 µl
H ₂ O	X µl
Vol.	20,00 µl

Incubation for 15 min by 37 °C

Prep. and test digestion of Lvl 1 nanoLuc teLuc and noluc op.

Looks not good, but te2 has a right band

IMG_20191021_003659.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:41

Eintrag 7/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:44

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 02.09.2019

Keine Tags verwendet

Tab1: Double Digestion normal Enzymes

	Vol.
Plasmid (0,5-1 µg)	2 µl
10x Restriktionspuffer (enzymabhängig)	2-4 µl
[RNAse (1 mg/ml)]	[2 µl]
BsmBI(1U/µg Template)	1 µl
enzym B (1U/µg Template)	X µl
H ₂ O	X µl
Vol.	50,00 µl

Incubation for 1 h by 37 °C

Tab2: Double Digestion fast Digest Enzymes

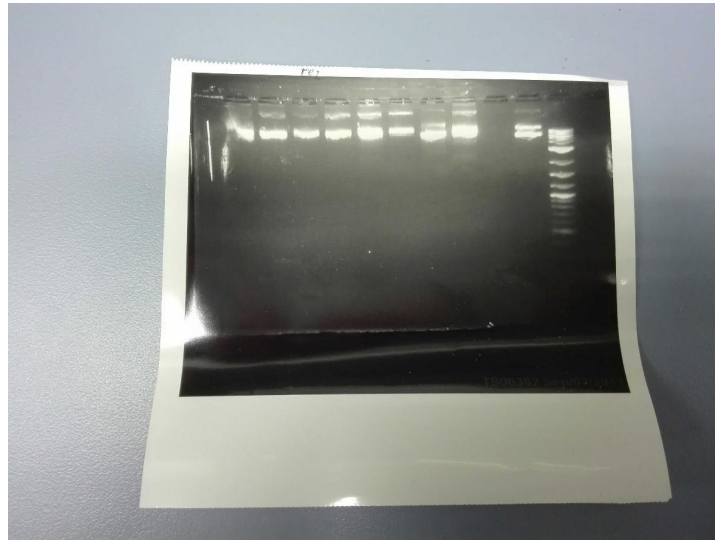
	Vol.
Plasmid (1,5-2 µg)	X µl
10x Restriktionspuffer (enzymabhängig)	2 µl
[RNAse (1 mg/ml)]	[2 µl]
enzym A (1U/µg Template)	1 µl
enzym B (1U/µg Template)	1 µl
H ₂ O	X µl
Vol.	20,00 µl

Incubation for 15 min by 37 °C

Because the Gel looked not good, tried the digestion again with BsmBI

Even worse

IMG_20191021_004315.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:44

Eintrag 8/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:47

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 04.09.2019

Keine Tags verwendet

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Lvl0		entry Vector		15 fmol		Lvl 1	each part		20 fmol
2			T7-Polymerase		60 fmol			T4-buffer		1
3			T4-buffer		1			Ligase		0,5
4			Ligase		0,5			Bsal		0,5
5			BsmBI		0,5			H2O		add 10
6			H2O		add 10					
7										
8			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3
9		1	37	20				37	20	
10		2	37	1,5	x35			37	1,5	x35
11		3	16	3				16	3	
12		4	50	5				50	5	
13		5	80	10				80	10	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1



labfolder_table_4612760_1.xlsx

Got T7-Poly. from IDT

Setup the Lvl 0

Also repetition of nanoLuc and nanoLuc codon op. Lvl1

No colonies for LVL1, but a few for T7

picked 2

Autor: Hinrik Plaggenborg

Eintrag 9/24: Noch kein Eintragstitel

In Projekt: New parts/Improve Parts

Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 00:49

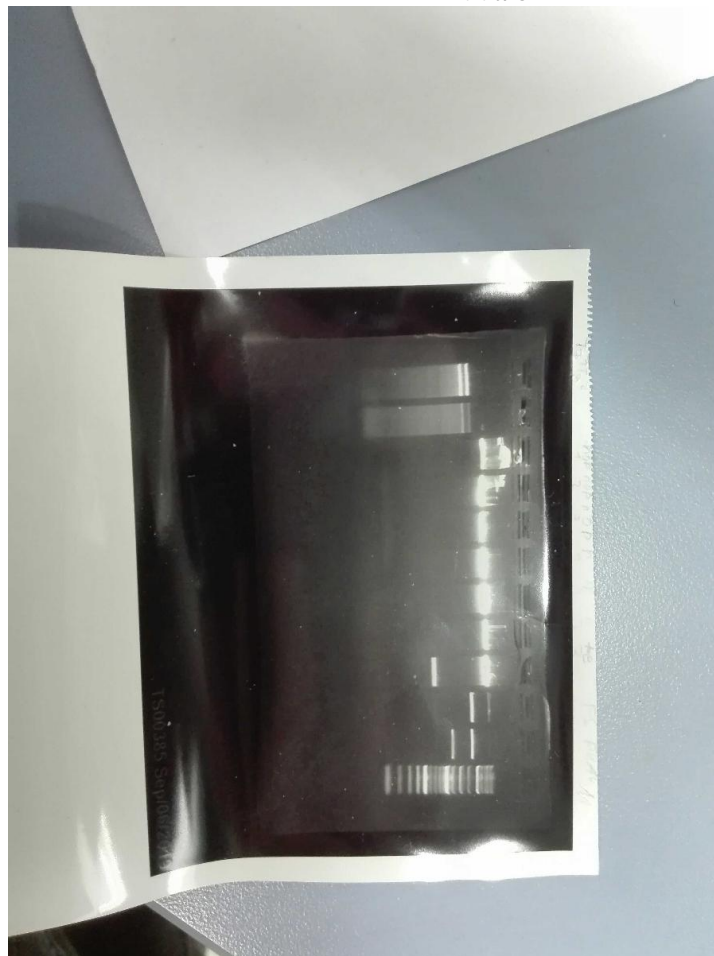
aktualisiert: 21.10.2019 00:51

Digestion of T7-Lvl0, retrofo of Farnesen Synthase and TeLuc (wrong Lvl1) as control

Plasmidprep seems to be wrong with nanoLuc and NanoLuc op.

Send teLuc to seq. PROMOTOR IS MISSING

IMG_20191021_004814(1).jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg
Eintrag 10/24: Noch kein Eintragstitel
In Projekt: New parts/Imporve Parts
Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 00:51
aktualisiert: 21.10.2019 00:55

Datum: 02.09.2019

Tab1: Double Digestion normal Enzymes

	Vol.
Plasmid (0,5-1 µg)	1 µl
10x Restriktionspuffer (enzymabhängig)	2 µl
[RNAse (1 mg/ml)]	[2 µl]
BsmBI(1U/µg Template)	0,1 µl
H ₂ O	X µl
Vol.	20,00 µl

Incubation for 1 h by 37 °C

Tab2: Double Digestion fast Digest Enzymes

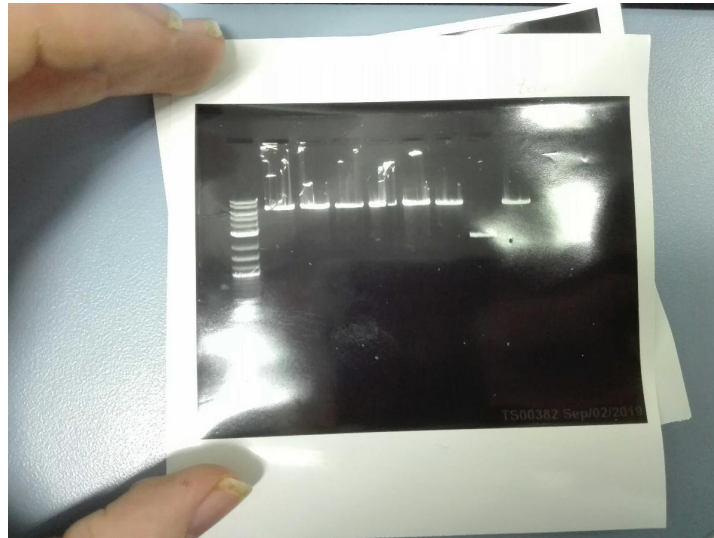
	Vol.
Plasmid (1,5-2 µg)	X µl
10x Restriktionspuffer (enzymabhängig)	2 µl
[RNAse (1 mg/ml)]	[2 µl]
enzym A (1U/µg Template)	1 µl
enzym B (1U/µg Template)	1 µl
H ₂ O	X µl
Vol.	20,00 µl

Incubation for 15 min by 37 °C

Again try to digest constructs with BsmBI,

Everything wrong

IMG_20191021_005327.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:55

Eintrag 11/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:56

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 11.09.2019

Keine Tags verwendet

Tried the nanoLuc+nanoLuc codon op. and teLuc again

No colonies after Golden Gate!!!!

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:56

Eintrag 12/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:57

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 13.09.2019

Keine Tags verwendet

And agian >>

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 00:57

Eintrag 13/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 00:58

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Keine Tags verwendet

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Lvl0		entry Vector		15 fmol		Lvl 1	each part		20 fnmol
2			Insert		60 fmol			T4-buffer		1
3			T4-buffer		1			Ligase		1,5
4			Ligase		0,5			Bsal		0,5
5			BsmBI		0,5			H2O		add 10
6			H2O		add 10					
7										
8			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3
9		1	37	20				37	20	
10		2	37	1,5	x35			37	1,5	x35
11		3	16	3				16	3	
12		4	50	5				50	5	
13		5	80	10				80	10	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1



labfolder_table_4612786_1.xlsx

Altered the konz. of ligase,

No effect, still no colonies

Autor: Hinrik Plaggenborg
Eintrag 14/24: Noch kein Eintragstitel
In Projekt: New parts/Improve Parts
Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 00:58

aktualisiert: 21.10.2019 01:01

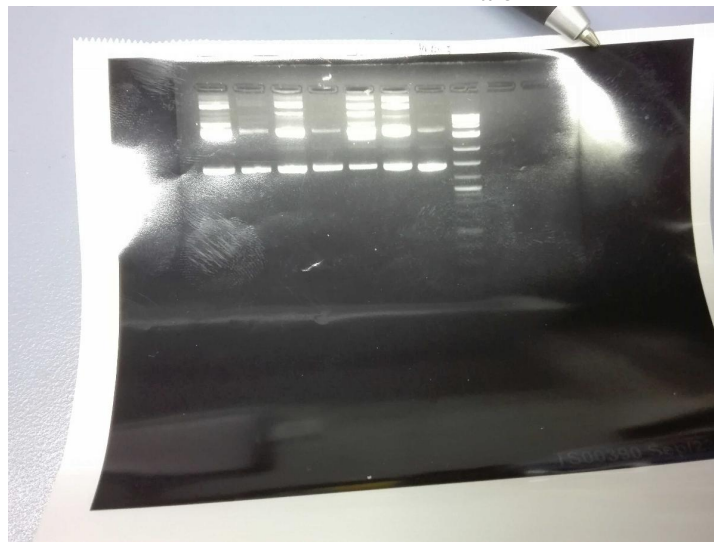
Datum: 23.09.2019

New Ligase buffer seems to work !!!!

Conlonies

But all without BsmBI cutting site => wrong

IMG_20191021_010015.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

Eintrag 15/24: Noch kein Eintragstitel

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 01:02

aktualisiert: 21.10.2019 01:09

Datum: 28.09.2019

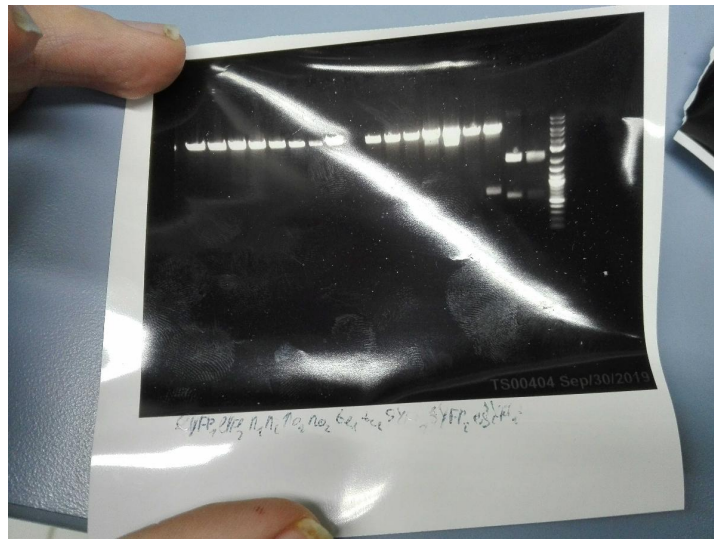
Trying Lvl1 now Golden gate with every reporter we have (EYFP, sYFP eYFP codon op., nanoluc nanoLuc codon op and teLuc+ CDS-Spaceholder)

(1_05;2_20:3_07;5_03:6_02)

Got colonies, picked 2of each and digestion with BsmBI

all wrong

IMG_20191021_010746.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 01:09

Eintrag 16/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 01:13

In Projekt: New parts/Improve Parts

Datum: 06.10.2019

Keine Tags verwendet

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1							Lvl 1	each part		20 fmol (
2								T4-buffer		1
3								Ligase		0,5
4								Bsal		0,5
5								H2O		add 10
6										
7										
8								Temp	Dur.	Cycles 2 a
9								37	20	
10								37	1,5	x35
11								16	3	
12								16	10	
13								4	0	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1



labfolder_table_4612805_1.xlsx

Eddited the protocoll for CDS-Spaceholder, wich is focus rigth now

Got one single green colonie, but 1000 white ones

Purification and testdigestion

Seems right but sending to seq.

IMG_20191021_011223.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 01:14

Eintrag 17/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 03:48

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 07.10.2019

Keine Tags verwendet

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Lvl0		entry Vector		15 fmol		Lvl 1	each part		20 fmol
2			Insert		60 fmol			T4-buffer		1
3			T4-buffer		1			Ligase		0,5
4			Ligase		0,5			Bsal		0,5
5			BsmBI		0,5			H2O		add 10
6			H2O		add 10					
7										
8			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3
9		1	37	20				37	20	
10		2	37	1,5	x35			37	1,5	x35
11		3	16	3				16	3	
12		4	50	5				50	5	
13		5	80	10				80	10	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1



labfolder_table_4612867_1.xlsx

Setting up every reporter with this space holder and making a new one with a new dilution of every part

Reports are nanoluc, teLuc, nanoluc op. eYFP eyFP codonop., 4_25, 4_29, 4_30, 4_31, 4_32+ FS synthase

Got alot of colonies

Inncoluated 3 of each

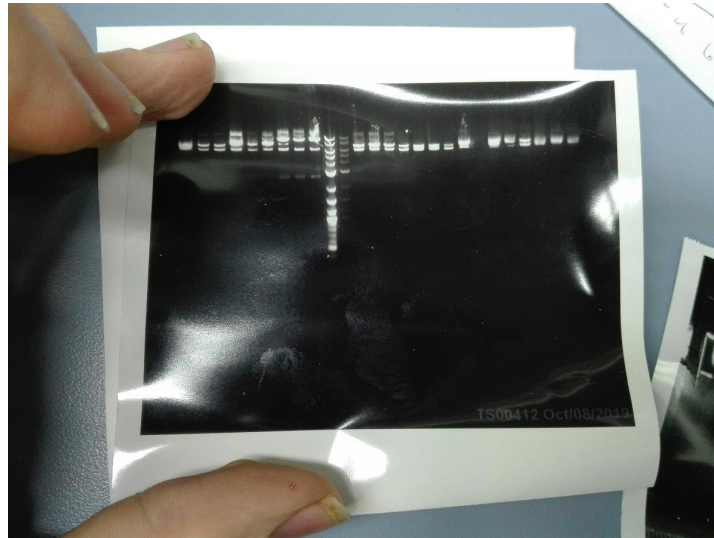
Autor: Hinrik Plaggenborg
Eintrag 18/24: Noch kein Eintragstitel
In Projekt: New parts/Imporve Parts
Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 01:17
aktualisiert: 21.10.2019 03:47

Datum: 08.10.2019

Testdigestion with BsmBI repition of Lvl1 CDS Spacholder assambly

IMG_20191021_012204.jpg



IMG_20191021_012212.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 01:19

Eintrag 19/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 01:21

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 08.10.2019

Keine Tags verwendet

SEQ is THERE IT IS THE DUMMY PROMOTOR

Sending the other dilution to seq.

Seems to be 2_05 in one of them.... better than nothing

Autor: Hinrik Plaggenborg
 Eintrag 20/24: Noch kein Eintragstitel
 In Projekt: New parts/Imporve Parts
 Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 03:47
 aktualisiert: 21.10.2019 03:53

Datum: 14.10.2019

Labfolder Table

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1	Lvl0		entry Vector		15 fmol		Lvl 1	each part		20 fmol
2			Insert		60 fmol			T4-buffer		1
3			T4-buffer		1			Ligase		0,5
4			Ligase		0,5			Bsal		0,5
5			BsmBI		0,5			H2O		add 10
6			H2O		add 10					
7										
8			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3			Temp	Dur.	Cycles 2 and 3
9		1	37	20				37	20	
10		2	37	1,5	x35			37	1,5	x35
11		3	16	3				16	3	
12		4	50	5				50	5	
13		5	80	10				80	10	
14										
15										
16										
17			5 yl used for Transformation							
18										
19										
20										

Sheet1

 [labfolder_table_4612870_1.xlsx](#)

Setting up every reporter with this space holder and making a new one with an part I KNOW is 2_20

Reports are nanoluc, teLuc, nanoluc op. eYFP eyFP codonop., 4_25, 4_29, 4_30, 4_31, 4_32

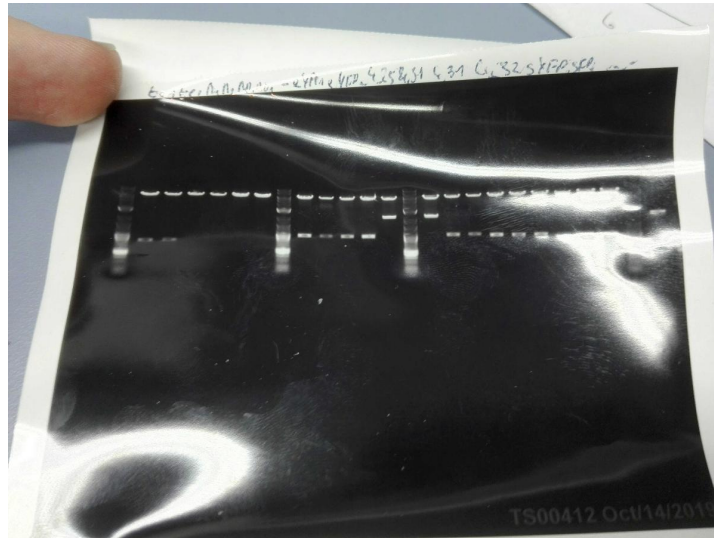
Inncoluated 2 colonies each

NotI digest

Everything seems right besides nanoLuc and nanoLuc codon op.....

Set this Lvl1 up again

IMG_20191021_034916.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

Eintrag 21/24: Noch kein Eintragstitel

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Keine Tags verwendet

erstellt: 21.10.2019 03:53

aktualisiert: 21.10.2019 03:54

Datum: 16.10.2019

NotI digest of naoluc and nanoluc codon op. colonies

IMG_20191021_035249.jpg



Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 03:55

Eintrag 22/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 03:57

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Datum: 18.10.2019

Keine Tags verwendet

Preaperqation of DTZ, 1mg of DTZ and 264,94 μ l of DMSO, than added 1,05976 ml of PEG 400, than 0,13247 ml tween-80 and 1,19223 Saline soulution (9g NaCl per liter)

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 03:57

Eintrag 23/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 04:09

In Projekt: New parts/Imporve Parts

Keine Tags verwendet

Retransformt nanoluc and teluc and inoculated new culture

Then incubating them till OD 0,8

Successfully got teLuc Signal in Platereader (1:50 dilution with PBS- buffer)

Autor: Hinrik Plaggenborg

erstellt: 21.10.2019 18:58

Eintrag 24/24: Noch kein Eintragstitel

aktualisiert: 21.10.2019 18:59

In Projekt: New parts/Improve Parts

Keine Tags verwendet

Messure spectra in platereader with OD0,713 teLuc and OD0,815 nanoLuc

 [Spectra.xlsx](#)