

17/05/19

## MEIO LB (Dona Alice)

2l

Tryptona 10g/l — 20g

Nocle 10g/l — 20g

Yeast extract 5g/l — 10g

agar — 15g/l — 30g  
↑

→ Vamos fazer 2 Litros de meio.

↓ para agar

2 garrafas 500ml

Tryptona	10g/l
Nocle	10g/l
yeast extract	5g/l
Agar	15g/l

↓ líquida

2 garrafas de 500ml

Tryptona	10g/l
Nocle	10g/l
Yeast extract	5g/l

## Material

- Tryptona
- Nocle
- yeast extract
- Agar
- garrafa para autoclave
- becker de 2 litros
-

## Procedimento:

para 1 litro

- 1) Pegue os materiais
- 2) Pegue primeiro 500ml de água e dissolva ~~em~~ tryptona (10g), NaCl (10g) e Yeast extract (5g) em um becker ~~em~~ no agitador magnético, utilizando 1 "peixinho".
- 3- Complete com 500 ml de água ~~potável~~ desionizada medida na probeta.
- 4- Espere dissolver totalmente todos os solutos.
- 5- Coloque no shot (garrafa)
- 6- autoclave por 20 min

P16

6 placas de C10

40 mL de LB + 40  $\mu$ l de C10

2 placas de LB + Amp + Espec

40 mL de LB + 40  $\mu$ l Amp + 200  $\mu$ l Espec

Fazer as seguintes placas:

- 5 placas de LB + Cloranfenicol
- 5 placas de LB + Espectinomicina
- 5 placas de LB + Trimetopim
- 15 placas de LB + Ampicilina

nas seguintes concentrações:

sal de Moises

Antibiótico	Solução estoque	Concentração de uso	Volume (20 ml)
Ampicilina	10 mg/ml	100 ug/ml	200 uL
Cloranfenicol	30 mg/ml	34 ug/ml	22,66 uL
Espectinomicina	10 mg/ml	50 ug/ml	100 uL
Trimetopim	10 mg/ml	10 ug/ml	20 uL

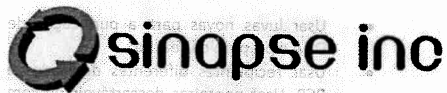
4, 5, 6

2

3

Realizar a quantificação do DNA no Nanodrop e obteremos os seguintes dados:

Amostra	I I	280/260	260/230
1: pJFR1	40,7 ng/ul	1,88	1,87
2: pJFR2	41,2 ng/ul	1,89	1,76
3: pJFR3	7,1 ng/ul	1,86	0,78
4: pJFR4	26,3 ng/ul	1,69	0,76
5: pJFR5	63,1 ng/ul	1,84	2,02
1192: pFM1192	6,5 ng/ul	2,12	1,21



## Taq DNA Polimerase P1011 (500U)

Concentração: 5 U/ul

Conteúdo: Taq DNA Polimerase 100ul

10x PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus) 1.25ml

6x Loading Dye 1ml

Armazenar a -20°C

Apenas para uso em pesquisa

### Descrição

Taq DNA Polimerase é uma enzima DNA polimerase termoestável recombinante derivada da bactéria *Thermus aquaticus*. O peso molecular da enzima é de 94kDa. Taq DNA Polimerase pode amplificar DNA de até 5kb. A velocidade de amplificação é de 0.9~1.2kb/min (70~75°C). A enzima tem atividade exonuclease 5' - 3', mas, não tem atividade 3' - 5' o que resulta em finalização com 3'-dA no produto da PCR.

### Definição de Unidade

Uma unidade é definida como a quantidade de enzima necessária para incorporar 10nmol de dNTPs em uma forma ácida insolúvel em 30 min a 70°C usando DNA de esperma de arenque como substrato.

### Tampão de armazenagem

20mM TrisCl (pH 8.0), 100mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 0.1% NP-40, 0.1% Tween20, 0.2mg/ml BSA, 50% (v/v) glicerol.

### 10x PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus)

100mM Tris-Cl (pH 8.8), 500mM KCl, 1% Triton-X-100, 16mM MgCl<sub>2</sub>.

### Aplicações

- PCR – amplificação de fragmentos de DNA de até 5kb
- Marcação de DNA
- Sequenciamento de DNA
- PCR para clonagem

### Protocolo para PCR convencional

O protocolo básico serve como um guia e ponto de Início para qualquer amplificação por PCR. As condições ótimas para reação (tempo e temperatura de incubação, concentração de enzima, primers, magnésio e amostra de DNA) podem variar e precisar de otimização.

#### 1. Adicione os seguintes componentes em um microtubo estéril disposto em gelo:

##### 1.1. Reação recomendada com PCR Buffer (Mg<sup>2+</sup> Plus):

Reagente	Quantidade para reação de 50ul	Concentração final
Água deionizada e estéril	Variável	-
10x PCR Buffer (Mg <sup>2+</sup> Plus)	5ul	1x
dNTPs (10mM cada)	1ul	0.2mM cada
Primer I	Variável	0.4-1uM
Primer II	Variável	0.4-1uM
Taq DNA Polimerase (5U/ul)	0.25-0.5ul	1.25 - 2.5U/ 50ul
Amostra de DNA	Variável	10pg - 1ug
Total		50ul

##### 1.2. Recomendações para amostra de DNA em uma reação de 50ul

DNA genômico Humano	0.1ug - 1ug
DNA plasmidial	0.5ng - 5ng
DNA de fago	0.1ng - 10ng
DNA genômico de <i>E. coli</i>	10ng - 100ng

#### 2. Misturar o conteúdo no tubo. Fechar os tubos e centrifugar brevemente para coletar o conteúdo no fundo do tubo.

##### 2.1. Ao utilizar um termociclador que não contém uma tampa aquecida, sobrepor-se a mistura de reação com 25 ul de óleo mineral.

**3. Realizar 25-35 ciclos de amplificação de PCR conforme abaixo:**

Denaturação inicial	94°C	3 minutos
25-35 ciclos	94°C	30 segundos
	55-68°C	30 segundos
	72°C	1 minuto
Extensão final	72°C	10 minutos

**4. Incubar por mais 10 minutos em 72°C e manter o produto de reação a 4°C. As amostras podem ser armazenadas a -20°C até o uso.**

**5. Analisar os produtos da amplificação em gel de agarose por eletroforese e visualizar com brometo de etídio ou outro corante intercalante de DNA. Utilizar marcadores de DNA apropriados.**

**Notas para condições de ciclagem**

- Taq DNA Polimerase é a enzima mais comum para a maioria das reações de PCR;
- A meia-vida da enzima é de >40 minutos em 95°C;
- A taxa de erro da  $H5^{TM}$  Taq DNA Polimerase é  $2.2 \times 10^{-5}$  erro por nucleotídeo por ciclo; A precisão de nucleotídeos incorporados antes de cometer um erro (inverso da taxa de erros) é de  $4.5 \times 10^4$ ;
- Taq DNA Polimerase aceita nucleotídeos modificados (com biotina, digoxigenina, fluorescência) como substratos para a síntese de DNA;
- O número de ciclos da PCR depende na quantidade de amostra de DNA presente no mix de reação e o rendimento esperado dos produtos de PCR. 25-35 ciclos é o suficiente para a maioria das reações de PCR. Para baixa concentração de amostra podem ser necessários cerca de 40 ciclos.

**Guia para prevenir a contaminação na reação de PCR**

Durante a PCR mais de 10 milhões de cópias de amostra de DNA são geradas. Por isso, é necessário tomar alguns cuidados para prevenir a contaminação com outras amostras e amplicons que podem estar presentes no ambiente do laboratório. Seguem algumas recomendações gerais para diminuir a os riscos de contaminação:

- Preparar a amostra de DNA; preparar o mix da PCR e realizar os ciclos no termociclador em diferentes áreas;
- Preparar o mix para PCR em uma capela de fluxo laminar equipada com uma luz UV;

- Usar luvas novas para a purificação de DNA e preparo da reação;
- Usar recipientes diferentes dedicados à PCR. Usar ponteiras descartáveis ou com filtros de aerossol para extrair o DNA e preparar a reação;
- Sempre fazer reações de controle sem amostras para checar se há contaminação.

**Controle de Qualidade**

A ausência de endodeoxirribonucleases e ribonucleases é confirmada por testes de qualidade apropriados. Funcionalmente testada na amplificação de uma única cópia de DNA genômico humano.

**Ensaio de Endodeoxirribonuclease**

Não se observou qualquer conversão detectável de DNA circular covalentemente fechada a um DNA cortado após incubação de 10U de Taq DNA Polimerase com 1ug de pBR32 ADN durante 4 horas a 37°C e 70°C.

**Ensaio de Exodeoxirribonuclease**

Não foi detectada degradação de fragmentos de DNA lambda-HindIII após incubação de 10U Taq DNA Polimerase com 1ug de DNA digerido por 4 horas a 37°C e 70°C.

**Ensaio de Ribonuclease**

0% da radioatividade total foi liberada para fração solúvel em ácido tricloroacético após incubação com 10U de Taq DNA Polimerase com 1ug de *E. coli* [3H]-RNA (40000 com/ug) durante 4 horas a 37°C e 70°C.

**Limitações de Uso**

Este produto foi desenvolvido e fabricado para uso exclusivo em pesquisa científica e uso apenas *in vitro*. O produto não foi testado para uso em diagnósticos ou desenvolvimento de drogas e não está adequado para administração a animais ou humanos.

## PREPARO DE BACTÉRIAS COMPETENTES PARA EETROPORAÇÃO

1. No dia anterior, realizar inóculo da cepa desejada em 10 mL de meio LB. Incubar em erlenmeyer à 37°C; <sup>22/05/2019</sup>
2. Realizar a diluição do inóculo overnight para uma D.O 0,1 em 200 mL de meio LB e incubar à 37°C por cerca de 2 horas; <sup>23/05/2019</sup>
3. Medir a D.O, que deve estar idealmente em 0,5;
4. Distribuir o conteúdo em 4 tubos de 50 mL (previamente imersos no gelo) e incubá-los por cerca de 15 minutos;
5. Centrifugar a 4000g, 12 minutos, 4°C;
6. Descartar o sobrenadante. Colocar os tubos imediatamente de volta no gelo;
7. Ressuspender gentilmente o pellet bacteriano em 10 mL de água MilliQ gelada estéril e completar o volume de água para 50 mL. Juntar os pellets de dois tubos em um só, ficando com dois tubos;
8. Centrifugar a 4000g, 12 minutos, 4°C;
9. Descartar o sobrenadante. Colocar os tubos imediatamente de volta no gelo;
10. Ressuspender gentilmente o pellet bacteriano em 10 mL glicerol 10% gelado estéril. Juntar os pellets dos dois tubos em um só;
11. Centrifugar a 4000g, 12 minutos, 4°C;
12. Descartar o sobrenadante. Colocar os tubos imediatamente de volta no gelo;
13. Ressuspender gentilmente o pellet bacteriano em 1 mL glicerol 10% gelado estéril;
14. Aliquotar em tubos de eppendorff (previamente imersos em gelo) e estocar a -80°C.

## PROTOCOLO PARA ELETROPORAÇÃO

1. Imergir previamente as cubetas (estéreis) em gelo;
2. Colocar 50 µl de bactéria competente + 1 µl do DNA em eppendorff;
3. Distribuir o conteúdo do eppendorff na respectiva cubeta batê-la na bancada para o conteúdo se depositar no fundo e retirar as bolhas;
4. Dar o choque na cubeta (1.8 KV, 25 µF, 200Ω) e imediatamente adicionar 1 mL de meio LB;
5. Incubar por 1h a 37°C;
6. Plaquear.

24/05/2019 - Leo e Jung

Fizemos as seguintes placas:

6 placas de LB + Ampicilina

2 placas de LB + Cloranfenicol

2 placas de LB + Espectinomicina

2 placas de LB + Trimetropim

3 placas

2 placas

Após a solidificação do meio, fizemos o replaqueamento das colônias, pegando os pontos mais isolados sempre que possível.

Colocamos as novas placas na estufa para que cresçam overnight.

25/05/2019 - Leo e Jung

Todas as placas (exceto a de trimetropim) cresceram. É possível que tenha ocorrido um erro na dosagem desse antibiótico em uma das placas (na última feita), ou que ele tenha sido trocado por espectinomicina. Para testar isso, as placas restantes de espectinomicina e trimetropim foram divididas em duas para o replaqueamento das mutantes correspondentes.

No re-estriamento, a cepa contendo pJFR3 cresceu em placa ~~de~~ contendo trimetropim. Provavelmente o <sup>não</sup> crescimento da cultura ocorreu devido à falta de seleção.

Jung e Pizzico

→ como kit da Promega

04/06/19

Fizemos a mini prep dos 6 plasmídeos que recebemos do Voigt. No dia anterior, Marco fez um estoque de gliceral de cada cepa.

A qualidade da extração não foi boa (exceto pJFR1):

	[ng/μL]	A260/A280	260/230
pJFR1	228,2	1,85	1,55
pJFR2	44,7	1,61	0,62
pJFR3	50,2	1,54	0,55
pJFR4	50,1	1,47	0,47
pJFR5	55,1	1,52	0,55
pFM1192	57,6	1,56	0,53

~~TS/19~~~~04/06/19~~

Proseguimos com a digestão dos plasmídeos pJFR1 ~ pJFR5 (pFM1192 não parece não tínhamos a sua sequência). Tamanhos esperados após a digestão:

pJFR1 + XhoI = 8452 + 2800

NEB Buffer

cut smart

pJFR2 + BamHI = 3841 + 2005

cut smart

pJFR3 + BglII = 7327 + 2185

3:1

pJFR4 + SspI = 4900 + 1367

2:1

pJFR5 + NdeI = 6999 + 3568

cut smart

Reação

500 ng de DNA

T incubação =

0,5 μL Enzima

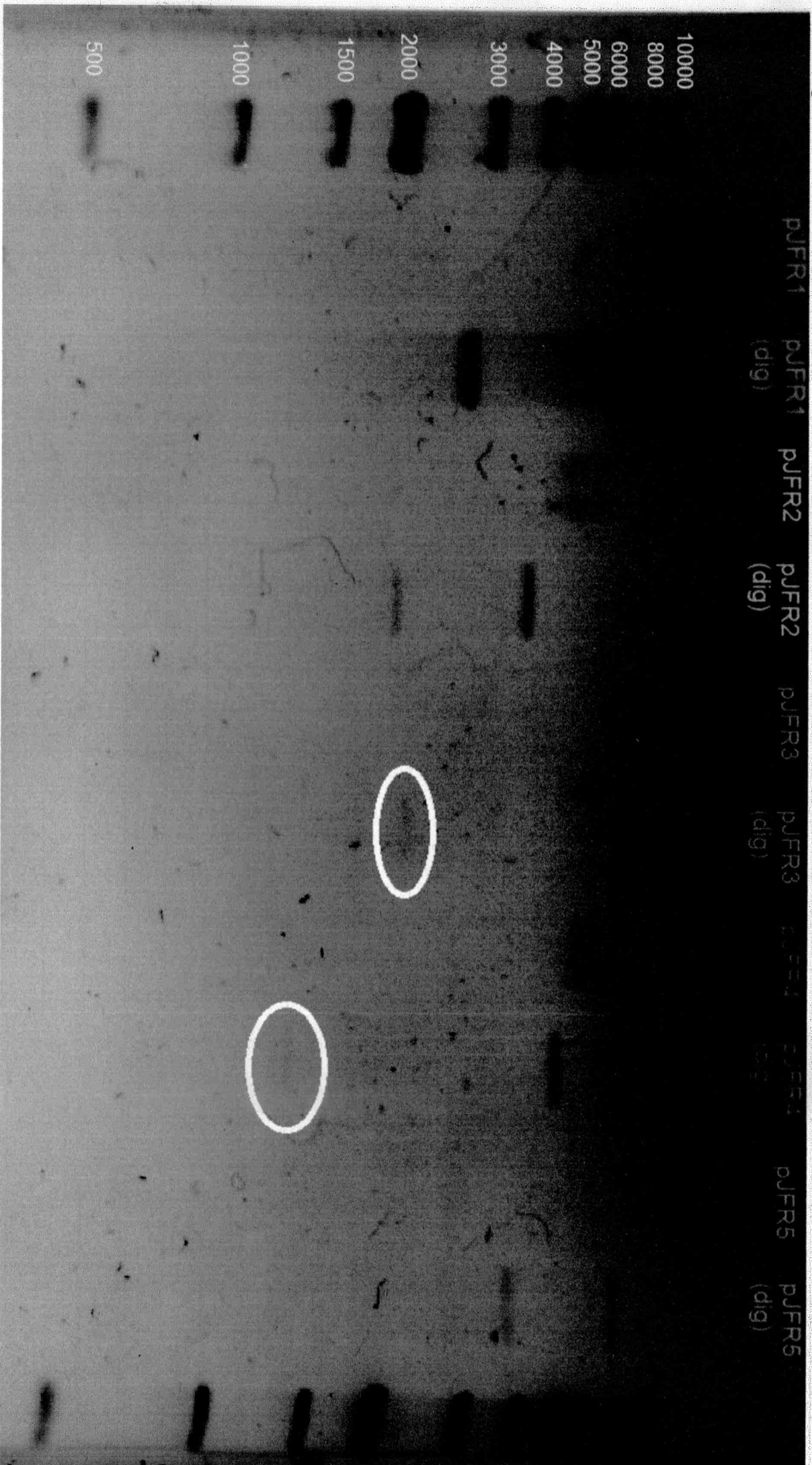
37°C por 2hrs

2 μL Buffer

up to 20 μL H<sub>2</sub>O



1 kb ladder  
(5 lanes)

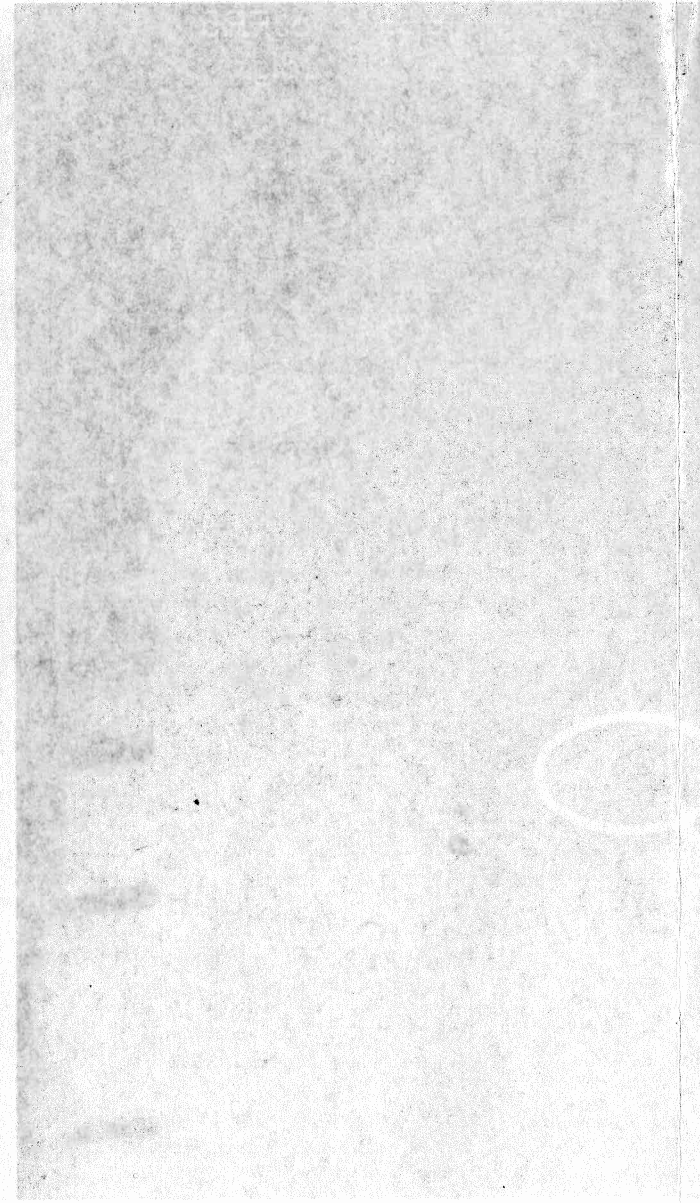
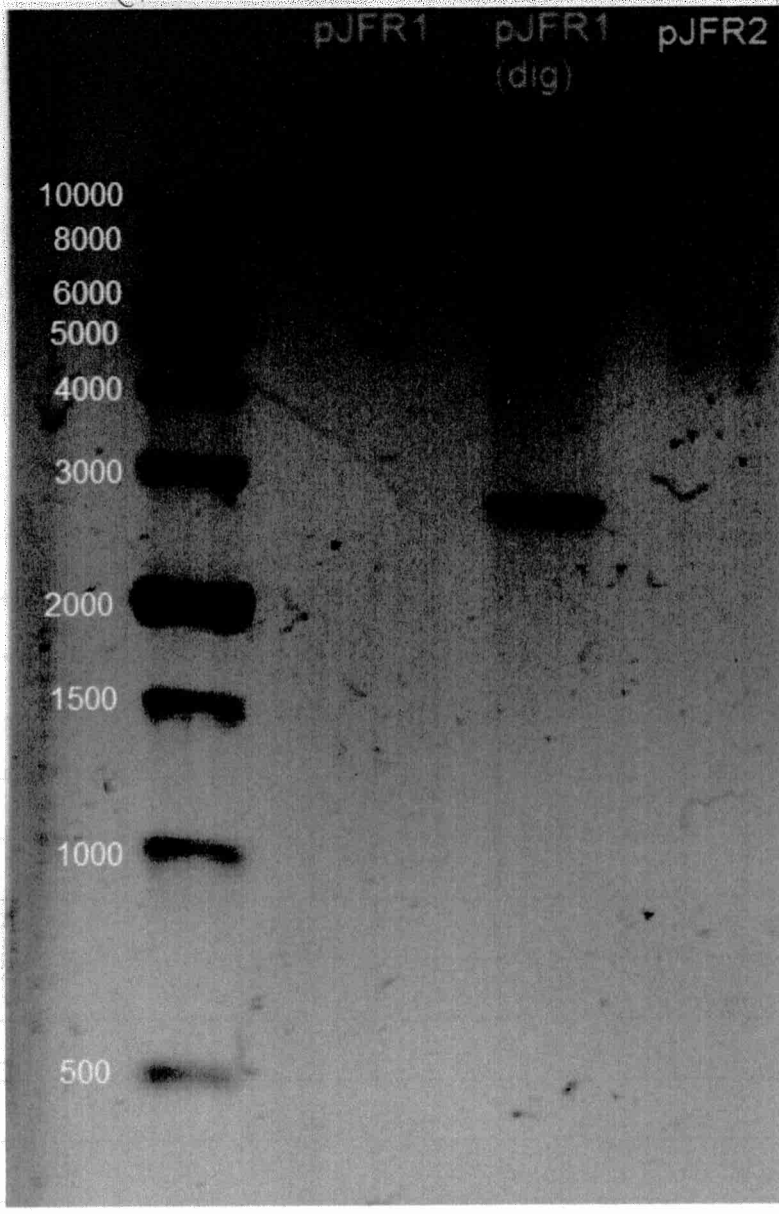


circulade = faint band

Jung

07/06/19

1 kb  
Ladder  
(51 mapse)



circulado = faint band

Como pode ser visto na figura do gel acima, os plasmídeos estão certos, pois os fragmentos batem com o tamanho esperado.

2000 bp de DNA  
 2000 bp de DNA  
 2000 bp de DNA  
 2000 bp de DNA  
 2000 bp de DNA

RA FERREIRA

13/06/19

## Mini-prep: pJFR2

→ Na noite anterior foram incubadas 20ml de LB com a E. coli transformada para com o pJFR2.

• O Lisado foi feito segundo as passas seguintes (Adaptado de: Wizard Plus Miniprep DNA)

1. 20 ml foram centrifugados em 2 tubos falcon (10 ml cada) por 5min.
2. Resuspendidos em 250µl de Resuspension Solution cada (Inversões 4x)
3. 10µl de Alkaline Protease Solution foram adicionados; 4 inversões mais 5 segundos no Vortex (baixa intensidade)
4. 250µl de Cell Lysis: 4 inversões, levemente vortexado
5. 10µl de

Juny

25/06/19

PCR-HF do T7 polymerase core do plasmideo pJFR1

2x

5x Buffer	10µL	20	✓
10mM dNTPs	1µL	2	✓
10µM pfw	2,5 µL	5	✓
10µM prv	2,5 µL	5	✓
H <sub>2</sub> O <sup>d</sup>	33 µL	66	✓
<del>DNA template</del>	<del>10µL</del>	<del>20</del>	<del>✓</del>
<del>DNA template</del>	<del>10µL</del>	<del>20</del>	<del>✓</del>
QS	0,5 µL	1µL	✓
DNA template	10µL	99µL + 2µL DNA template	

Lid = 108°C

98°C 30 seg

98°C	10 seg	} 35x
68°C	20 seg	
72°C	2 min 15 seg	

72°C	2 min
4°C	Hold

Apenas 1 banda visível, fiz só um Clean-Up

27/06/19

NEB Digestão do pJFR2 com BsaI-HF e EcoRI-HF de

BsaI-HF	2ul	✓
EcoRI-HF	2ul	✓
10x CutSmart Buffer	5ul	✓
DNA	12 (2ug)	✓
H <sub>2</sub> O	29	✓
	<hr/> 50ul	

Digestão do <sup>fragmento</sup> HF-PCR do T7 polymerase core com BsaI-HF e EcoRI-HF de NEB.

BsaI-HF	2ul	✓
EcoRI-HF	2ul	✓
10x CutSmart Buffer	5ul	✓
DNA	5ul (2ug)	✓
H <sub>2</sub> O	36ul	✓
	<hr/> 50ul	

Heat inactivation at 80°C for 20 min

28/06/19

28/06/19

Ligação ~~3:1~~ ~~fragmento~~ : vetor

DNA vetor linear	20 $\mu$ L (250 ng)	✓
DNA inserto	7,5 $\mu$ L (375 ng)	✓
10x T4 Buffer (thermo)	4 $\mu$ L	✓
H <sub>2</sub> O <sup>d</sup>	7,5 $\mu$ L	✓
T4 Ligase	1 $\mu$ L	✓
	40 $\mu$ L	

~~Inativação 80°C por 20 min~~ 22°C por ~ 8 horas  
 Transferência por Heat-Shock

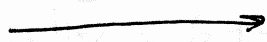
- [ Células Stellar (Takara bio), 200  $\mu$ L
- [ + 20  $\mu$ L da reação de ligação
- [ Incubar ~~em~~ em gelo por 30 min
- [ 2 min a 42°C
- [ 5 min no gelo denovo
- [ Adicionar 1  $\mu$ L de LB e incubar em agitação, a 37°C

por 1 hora. Plaqueei em LB agar + Spec com 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L da transformação. Obtive umas 40 e 200 colônias respectivamente.

29/06/19

## PCR de colônia para confirmação da construção

1X reacção



7X reacção

Master Mix	5 $\mu$ L	35 $\mu$ L ✓
H <sub>2</sub> O	4 $\mu$ L	28 $\mu$ L ✓
pfw (confl fw)	0,5 $\mu$ L	3,5 $\mu$ L ✓
prv (confl rv)	0,5 $\mu$ L	3,5 $\mu$ L ✓
	<u>10 <math>\mu</math>L</u>	<u>70 <math>\mu</math>L</u>

~~Incubação por 3 horas a 72°C~~

$T_{annealing} = 58,2^\circ\text{C}$

95°C

2 min

95°C

30 seg

58,2°C

20 seg

72°C

(1 min/kb)

} X 35

72°C

5 min

4°C

Hold

30/06/19

HF-PCR do YF1/fix J no pJFR1

2X →

SX Buffer	10 $\mu$ L	20 $\mu$ L	✓	X
10mM dNTPs	1 $\mu$ L	2 $\mu$ L	✓	X
10 $\mu$ M pfw (blue fw)	2,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	✓	X
10 $\mu$ M prv (blue rv)	2,5 $\mu$ L	5 $\mu$ L	✓	X
H <sub>2</sub> O	33,25 $\mu$ L	66,5 $\mu$ L	✓	X
DNA template (240ng/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L	0,5 $\mu$ L	✓	X
QS	0,5 $\mu$ L	1 $\mu$ L	✓	X
	<u>50 <math>\mu</math>L</u>			

Lid = 108°C

94°C — 30 seg

94°C — 10 seg

66°C — 20 seg

72°C — 2 min

} X 35

72°C — 2 min

4°C — Hold

Corri o gel e vi faint bands ~~em~~ por volta de 2kb e 600pb. Acho melhor fazer outra PCR com T annealing ~ 64°C.



01/07/19  
~~31/06/19~~

← Repeti o HF-PCR do dia anterior com a seguinte modificação:  $T_{annealing} = 64.5^{\circ}\text{C}$ , extension = 2 min 15 seg, 36 ciclos.

A foto do gel mostrou uma banda ainda mais fraca... Acho que um dos reagentes está degradado.

02/07/19

Fiz um gradiente de temperatura com  $T_{annealing} = 62^{\circ}\text{C}; 63.5; 64.5; 65.5; 66.5; 67.5; 68.5$  e  $70^{\circ}\text{C}$ . Mas desta vez usei 1  $\mu\text{L}$  de template por 50  $\mu\text{L}$  de reação.

Todas as amostras mostraram bandas fortes no tamanho esperado, indicando que talvez o problema fosse a baixa concentração de template, o que não faz muito sentido, pois a concentração utilizada nas primeiras reações anteriores deveria ser mais que o suficiente.

03/07/19

Repeti o HF-PCR do YFI/fix3 no pJFRI

5x Buffer	20 $\mu\text{L}$
10mM dNTPs	2 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ pfw (blue fw)	5 $\mu\text{L}$
10 $\mu\text{M}$ prv (blue rv)	5 $\mu\text{L}$
$\text{H}_2\text{O}^{\text{d}}$	65 $\mu\text{L}$
DNA template	2 $\mu\text{L}$
Q5	1 $\mu\text{L}$
	<hr/>
	100 $\mu\text{L}$

Lid = 108°C

98°C — 30 sec

98°C — 10 sec

66°C — 20 sec

72°C — 2 min 15 sec

} x 35

72°C — 2 min

4°C — Hold

03/07/19

Digestão do pJFR2ΔL66::T7 core com EcoRI-HF da NEB

EcoRI	3 $\mu$ L	✓	✓
10x CutSmart Buffer	5 $\mu$ L	✓	✓
DNA	20 $\mu$ L (3 $\mu$ g)	✓	✓
H <sub>2</sub> O	22 $\mu$ L	✓	✓
	<u>50 <math>\mu</math>L</u>		

Digestão do fragmento HF-PCR do YF1/tixJ com EcoRI-HF

EcoRI	3 $\mu$ L	✓
10x CutSmart Buffer	5 $\mu$ L	✓
DNA	20 $\mu$ L (3.8 $\mu$ g)	✓
H <sub>2</sub> O	22 $\mu$ L	✓
	<u>50 <math>\mu</math>L</u>	

Incubar a 37°C por 2 horas

$$\text{frag} = \frac{150 \cdot 2000 \cdot 5}{6500} = 231 \text{ ng}$$

vetor	10 $\mu$ L (150 ng)	✓
inserto	3 $\mu$ L (231 ng)	✓
10x T4 Buffer	2 $\mu$ L	✓
H <sub>2</sub> O	4,5 $\mu$ L	✓
T4 ligase	0,5 $\mu$ L	✓
	<u>20 <math>\mu</math>L</u>	

Incubação a 22°C por 3 horas

A transformação foi feita por Heat shock, como descrita anteriormente.

No dia seguinte pude visualizar milhares de colônias. As melhores placas com colônias isoladas foram obtidas com o plaqueamento de 50  $\mu$ L e 100  $\mu$ L das células recuperadas (uns 40 e 150 colônias).

Alfoldo

Master Mix

Master Mix	60 uL	✓
H <sub>2</sub> O	48 uL	✓
pfw (teste fw)	6 uL	✓
pfv (confi cv)	6 uL	✓
	<u>120 uL</u>	

T<sub>annealing</sub> = 57.7°C  
 elongation = 3 min

07/07/19

09/07/19

Master Mix

(fw teste fw)

(cv confi cv)

06/07/19

Master Mix	200 ul	✓
H <sub>2</sub> O	160 ul	✓
pfw (blue fw)	20ul	✓
pv (teste fw)	20ul	✓
	<u>400ul</u>	

Master Mix	250 ul	✓
H <sub>2</sub> O	200 ul	✓
pfw (teste fw)	25ul	✓
pv (confi pv)	25ul	✓
	<u>500ul</u>	

... ..

... ..

07/07/19

1	Master Mix	10 uL	✓
2	H <sub>2</sub> O	7 uL	✓
3	p(fw)	1 uL	✓
4	p(rv)	1 uL	✓
	sopa DNA	1 uL	✓

Fiz mini prep do plasmídeo contido na colônia SB, e fiz PCR pra determinar a orientação do inserto YFI/fix. 08/07/19

Master Mix	10 uL
pfw (blue fw)	1 uL
prv (conf1 rv)	1 uL
H <sub>2</sub> O	8 uL
DNA	0,1 uL

06/07/19

10/07/19

NOVA DIGESTÃO DO pJFR2  $\Delta$ EGG  $\therefore$  T7 core  
 para montar o pAZUL-2  $\therefore$  yFyf...  
 (pg 11) para juntar as duas a orientação  
 de fragmento

FOSFATASE

fosfatase ~~35~~<sup>4</sup>ul (para 50ul)  
 incubar por 30 min a 37°C

TRANSFORMAÇÃO DO pAZUL-1  $\Delta$ CGG  
 $\therefore$  T7 core  $\therefore$  FyF

pAZUL-1 + pJFR3 + DH10 $\beta$   
 pAZUL-1 + pJFR5

ANTIBIÓTICOS pJFR2 - Spect  
 pJFR4 - Amp  
 pJFR5 - Amp



Transformação com as plasmídeos pJFR1, 2, 3 e 4 para teste do sistema do Veigt.

pJFR<sub>n</sub> pl. de plasmídeo

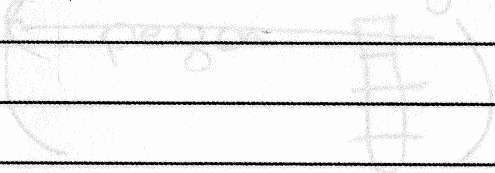
1 0,5

2 0,5

3 0,5

4 0,5

- Espuma 30' met gelat.
- Calaca 2' met bambu maria (37°C)
- Pega no globo novamente por 30'

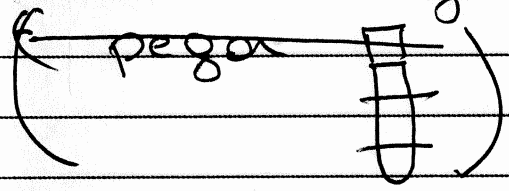




- Pega ependida 1 com as contagem por tubo com 250 ul de de meio 1 h. Pega no globo se tubo 1
- Calaca no shaker por 1 hora

# Transformação <sup>✓</sup>, PLoc e PBod (16/7)

na	Normalmente
1 ul Amostra	5 ul "
12 ul de bacteria	50 ul bacterio
<u>13 ul</u>	

- Esperar 30' no gelo
- Colocar 2' no banho maria, (37°C)
- Por no gelo novamente por 30'



- Pegar ependora com as amostras nessas pender com ~~1/3~~ 250 ul de a de meio Lb. Passar para o tubo 
- Colocar no shaker por 1 hora 

- 1 → 303,6 ng (3,5 μl) ✓
- 2 → 379,5 ng (1,65 μl) ✓
- 3 → 379,5 ng (4,5 μl) ✓
- 4 → 379,5 ng (1,15 μl) ✓
- 5 → 338,1 ng (2,2 μl) ✓

Buffer → 2 μl ✓

pGGA → 1 μl ✓

Mix → 1 μl ✓

vector

- 62,10 (1,24) ✓
- 138,0 (2,76) ✓
- 138,0 (8 μl) ✓
- 138,0 (2,76) ✓
- 96,60 (1,94) ✓

Buffer → 2 μl ✓

pGGA → 1 μl ✓

Mix → 1 μl ✓

fragmento

Fazer placa com meio Lb + antibiotico.

- Pegar meio Lb e 1 agar e aquecer.
- No fluxo colocar no fal com a qtd de antibiotico que você quer e depois adicionar o meio Lb e por nas placas de petri.
- Cada placa vai 20ml.
- Deixar secar em um lugar seco.

Usando a mequina de luz.

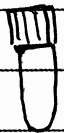
1,09 Imo diencia  
20 horas.

17/07/19

Imóculo dos promotores Plac / PBad / sistema do Brasil.

- todos os 3 foram selecionados por clonagem.
- as placas foram deixadas over night de 16/07/19 → 17/07/19.
- Elas cresceram bem.

Fazendo Imóculo.



3ml de meio Lb + concentração do antibiótico de interesse.

no caso fizemos 20ml de Lb + 20ul de clonagem para:

[ 3 amostras x 2 (cada amostra vem de 2 imóculos) x 3ml = 18ml ]

Colocando 3ml de Lb + Clo em cada tubo foi selecionado de cada placa 1 colônia de bactéria e com cuidado cutucamos e colocamos no tubo.

Colocamos no incubador Shaker.

17/07/19 Imóculo sistema azul + PJFR5

Igual página 17

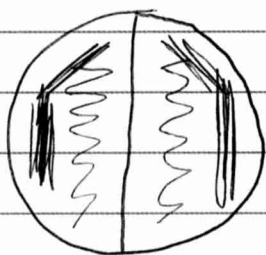


~~2~~ 2 ml + 2  $\mu$ l + 10  $\mu$ l  
Amp ESPEC



2 ml + 2  $\mu$ l + 10  $\mu$ l  
amp ESPEC

Placa para testar a indução por luz  
de circuito azul + PJFR5 e azul + PJFR4



~~AT PJFR5~~ ~~for~~

Estufa 16:11  
1,003 mW/cm<sup>2</sup>  
24:00h

## Glossário das partes:

### 1. P<sub>Bad</sub>

anobimose placa 2 - 7E registry

### 2. P<sub>Lac</sub>

[LocI + LocIq promoter] reverse + [tec promoter  
~~er~~ + Lac operator] forward. placa 6  
12.

### 3. P<sub>Baa</sub>

BBa - K2771020 IGEN team USP BR 2018

23/07/19

NOVA MONTAGEM  
DO CIRCUITO AZUL

	1,15	1
	RNAm	prot

→ 37 mg / ~~100~~ μl (260/280) (260/230)

PDR2-dig e purificado → plasmídeo  
YFi / pUCJ digerido → fragmento  
de azul

proporção ~~veter~~ / fragm fragmento / veter 5:1

quantidade  
de fragmento = massa • tamanho do . 5  
mg do veter frag.

tamanho do veter

para 10 μl de veter

$$\text{frag} = \frac{170 \cdot 2000 \cdot 5}{6.500} = 260 \text{ ng}$$

(figuras no  
lab. de Jung)

- 3,5 μl de fragmento ✓
  - 10 μl de veter ✓
  - 2 μl buffer da T4 ✓
  - 0,5 μl T4 ligase ✓
  - 4 μl H<sub>2</sub>O ✓
- total 20 μl

INCUBAR à 22°C por 60 min  
INATIVAR 70°C por 5 min

Heat Shock seguindo o protocolo da página 08

Cel. usada: Stellar



PLACAS Dora/Sony

Spec → p

- 100 ml de LB + Spec. (circuito azul) ←
- 100 ml claromphenicol (para a primeira geração)
- 100 ml Amp + Spec ←
- 100 ml LB Spec + Clarap. + amp. ←

	[C] de uso	volume p/50ml
Spec → 50 ml LB	50 µl	- 50 µl
claromphenicol → "	22,66 µl	- 56,65 µl
Amp → "	100 µl	- 500 µl

24/07/19

LB Líquido 85 ml

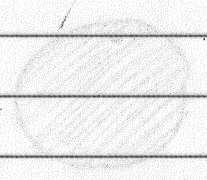
A transformação da ligação deu certo, mas cresceram somente umas 40 colônias, pois usamos apenas 200 µl de cultura recuperada. Se não acharmos a construção certa teremos que repetir a transformação.

Recebemos o plasmídeo de integração da Itália

Helper plasmid (BBa-J72008) 17 ng/µl

Integration plasmid 38 ng/µl

Cultivar a 37°C dentro das câmaras de luz (Bioland) a 100 µV/cm² overnight. Mas antes a placa foi totalmente lavada com água balanceada para bloquear a contaminação de bactérias. Um pequeno quadrado foi feito em uma das bordas.



June

# PCR de colônia

Mastes	Mix	200
H <sub>2</sub> O		160
pfw (teste fw)		20
pcv (confi cv)		20

25/07

1403 - COLONIAS QUE O FRAGMENTO

1423 - PODE ESTAR NO PLASMÍDO

1403 - 8, 16, 19, 21, 22, ~~27~~, ~~28~~, ~~29~~

26, 27, 29, 36

30/07/19

~~ESTOQUE~~ do pJFR4 e miniprep  
(lepa Stellas)

ESTOQUE

ESTOQUE do pJFR1 + pJFR2 + S e hoste na placa  
(lepa Stellas) com triptofeno

ESTOQUE do circuito gup-pw e miniprep

Fizemos <sup>ensaiio de</sup> ~~o~~ plaqueamento

em L-Triptofeno (Marilys) <sup>stock</sup>. Mas lembrando que o pré-cultivo, que deveria ter sido feito no escuro, foi feito sem nenhum bloqueio de luz. Foi utilizado uma placa de Petri de tamanho padrão (D = 9 cm)

LB Líquido 8,5 mL

L-Triptofeno (10g/L) 2 mL

+

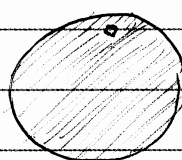
Ab { Cloranfenicol 25  $\mu$ L  
Spectinomilina (10mg/mL) 100  $\mu$ L  
Ampicilina (10mg/mL) 220  $\mu$ L

+ 8,5 mL LB agar  
(1,5%)

Plaquear 15 mL e esperar solidificar

Adicionei 50  $\mu$ L do pré-inóculo nos 5 mL de meio restantes e plaqueei encima da camada de agar previamente solidificada

Inubei a 37°C dentro da câmara de luz (Biolambda) 1,09 mV/cm<sup>2</sup> overnight. Mas antes a placa foi totalmente selada com fita isolante preta para bloquear a incidência de luz, somente um pequeno quadrado foi feito em uma das bordas.



Dona / Rana

July

No dia seguinte olhei a placa e a princípio não parecia ter dado o resultado esperado (coloração escura ante a luz incidida), no entanto, ao analisar com cuidado, percebi que a área exposta estava com uma tonalidade mais escura, mesmo que bem fraca.

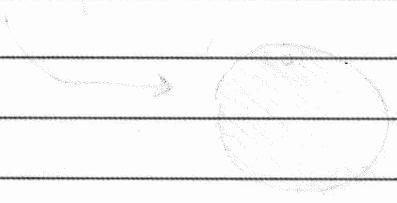
Vou repetir o ensaio, mas dessa vez tomando o cuidado de crescer o pré-inóculo no escuro.

... (faint text) ...

... (faint text) ...

... (faint text) ...

... (faint text) ...



30/07

## Experimento Paomofors

## - Digestão

Brosilida = EcoRI / XbaI

Prod = EcoRI / SPEI (mesmo

↳ ( &gt; 2000 pb)

↳ vetor ≈ 2000pb

overhang

XbaI)

Plac = EcoRI / (SPEI) (mesmo

(1239)

↳ vetor ≈ 2000pb.

overhang

XbaI).

## - Confirmar c/ gel de

## Protocolo da digestão EcoRI / XbaI

## DNA

Buffer

enzima de restrição (1)

enzima de restrição (2)

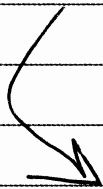
Nuclease free water

1 ul

1 ul

premixer.

50 ul



A Alice resolveu fazer isso

outro dia (p26 / a Alice voltou!)

Dora/Sony 00/07

Refiz o ensaio da cepa  $E. coli$  Stellar + pJFR1 + pJFR2 + pJFR5 para planejamento em triptofano. Para isso usei mini placas de  $D=35\text{mm}$ . O pré-inóculo cresceu em uma estufa  $37^\circ\text{C}$  escura, mas o tubo mãe foi coberto com papel alumínio:

6,5 mL LB Agar

+

6,5 mL LB Líquido

+ 1,5 mL de Triptofano (10g/L)

Cloranfenicol 17,5  $\mu\text{L}$

Spectinamicina 50 mg/mL 15  $\mu\text{L}$

Ampicilina 100 mg/mL 15  $\mu\text{L}$

Usar 1,6 mL dessa mistura de LB agar ~~estéril~~ esteril pra fazer a caminha.

Adicionei 200  $\mu\text{L}$  do pré-inóculo e misturei.

Adicionei 800  $\mu\text{L}$  desse meio semeado na plaquinha com a cama sólida.

No total foram feitas 4 placas, 2 placas feitas com o triptofano de Prof. Marilys e 2 placas com o triptofano do prof. Mario. Além disso, em cada grupo, uma das placas foi selada com fita isolante preta, mas com uma pequena fresta perto da borda. <sup>A</sup>

As placas foram incubadas a  $37^\circ\text{C}$  em luz azul (BioA) (1,09  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) overnight.

A mistura de LB agar que sobrou foi levada à luz de dia (não diretamente) até anoitecer (por umas 4~5 horas) e então levadas para o box da bio  $\lambda$ .

data: 13/08/19

Digestão com EcoRI HF XbaI SPEI HF

Alice / Jung

NEB Digestão Inativo com

EcoRI 37°C 65°C

XbaI 37°C 65°C

SPEI 37°C 80°C

Basílica = EcoRI / XbaI ✓

DNA

~~NEB Buffer~~ <sup>cutsment (100/100)</sup> (50/75)

EcoRI HF

XbaI

Nucleose free water

3ug (16, 8ul)

5ul

20ul

20ul

24ul

50ul

PBAD XbaI / SPEI ✗

DNA

~~NEB Buffer~~ <sup>cutsment (100/100)</sup>

~~XbaI~~

SPEI HF

Agua DPC

3ug (10ul)

5ul

2ul

2ul

30ul

50ul

Plac x

DNA	3 $\mu$ g (10 $\mu$ l)
<del>Water</del> Cutsmat (100/100)	5 $\mu$ l
XBAI	2 $\mu$ l
SPEI HF	2 $\mu$ l
Agua DPC	<del>30 <math>\mu</math>l</del> 31 $\mu$ l
	50 $\mu$ l

ERRADO

Basilica	178 $\mu$ g — 1000 $\mu$ l
	3 $\mu$ g — x
	↳ 16,8 $\mu$ l

PBAD	300 $\mu$ g — 1000 $\mu$ l
	3 $\mu$ g — <u>10 <math>\mu</math>l</u>

Plac	290 $\mu$ g — 1000 $\mu$ l
	3 $\mu$ g — <u>10 <math>\mu</math>l</u>

Note quando for a fazer o protocolo de digestão é importante sempre verificar se tem \*

↳ indica que não é específica nessas condições.



13/8/19

LIGACÃO DOS PRIMERS

PTB FW e RV

lul

Preparação com 25  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O

[ ] do estoque 100  $\mu$ molar

Ligação:

10  $\mu$ l de cada

[ ] final 50  $\mu$ molar (na verdade 75  $\mu$ M)

5 min a 95°C

60 min temp. ambiente

14/8/19 - Alice

Refazendo digestões de PBAD e PLAC c/ enzimas de restrição corretas!

Cutsmart + buffer

↳ (100/100)

↳ EcoRV

↳ SPEI

PBAD

DNA 3 µg — 10 µl +

Cutsmart 5 µl

SPEI — 2 µl

EcoRV — 2 µl

H<sub>2</sub>O milig — 31 µl50 µl

PLAC

DNA 3 µg — 10 µl

Cutsmart + buffer — 5 µl

SPEI — 2 µl +

EcoRV — 2 µl

H<sub>2</sub>O milig — 31 µl50 µl

Digestão PT3

DNA — pegar 9 µl ~~de 30 µl de H<sub>2</sub>O milig (20 µl)~~ → (7700 mg)

↳ da ligação (7,5 µM)

Cutsmart + buffer — 2 µl

EcoRV — 1 µl

Xba I — 3 µl

H<sub>2</sub>O milig — 33 µl

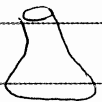
15/8/19

Jung / Alice

Gel de agarose 0,8%

- 100ml TBE (1x)

- 0,8g agarose

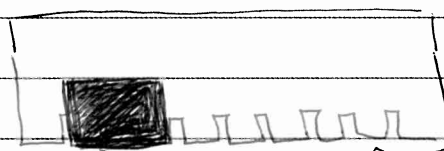


→ microondas - potencia baixa

- ~~fezer~~ aquecer de pou-  
co em pouca

Quando estiver em uma temperatura ótima, colocar no cubito que já está com o pente.

→ Maridlis Endimou



cada poço  
da 20ml,  
usa fita  
verde p1  
cobrir 2  
de antes faz  
um poço  
grande que  
entra 60ul

# Ordem do gel

PBAD	Plac	Ladder	Mix
10ul	60ul	10ul	50ul PBAD
			+ 10ul 6x loading buffer
			<hr/> 60ul

$$\text{Plac} = \frac{50\text{ul Plac} + 10\text{ul 6x loading buffer}}{60\text{ul}}$$

$$\text{ladder} = \frac{5\text{ul ladder} + 1\text{ul 6x loading buffer}}{6\text{ul}}$$

Colocamos por 2 horas a 180V

15:30 → 17:30

Quando me geladeira pq o lab

Não tinha mais gente

16/8/19

Continuação dia 15/8/19

Após as 2 horas, o gel ficou na geladeira.

Pegamos o codo como em uma solução de BamHI } 120

mutagenico  
= cuidados

(Jung colocou  
direto na solução  
do morão,)

Pegar o gel cuidadosamente e por no papel, depois levar para uma câmara de UV.

- colocar o gel sobre a prateleira preta
- Colocar a máscara de proteção
- Apagar a luz, ligar o UV e cortar com o bisturi bem rente a banda que você quer pegar. (Não é bom deixar a amostra muito tempo na UV → liga UV, corta, desliga UV) (quanto menos tempo de exposição melhor).

- Pegue as regiões cortadas e coloque no seu respectivo eppendorf

No caso queremos: 1,2 kb p1 os 2

PBAD

1,2 kb

1,8 kb

PLAC

1,2 kb

1,8 kb

Promotor

vector

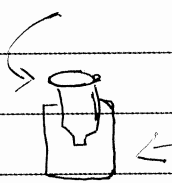
# DNA extraction from <sup>Agarose</sup> polyacrylamide gel

1º Desenotar o gel que contém a amostra a 65°C.



2º Para cada 300mg de gel adicionar 300µl Buffer NT1, deixar a 50°C por 5-10 minutos.

3º Coloque Nucleosom gel end PCR clean up column em um tubo de coleta.



4º Adicione até 700µl da amostra e centrifugue 30s a 11000g. Descarte o sobrenadante. Repita até ter feito com toda a amostra.

~~5º Centrifugue novamente 30s a 11000g e descarte o sobrenadante.~~

6º Adicione 700µl Buffer NT3. Centrifugue 30s a 11000g.

7º Repetir

8º Centrifugue por 1 minuto a 11000g.

9º Edição, coloque o "fiducialzinho" em um novo 1,5ml tubo, incubar a temperatura ambiente e adicionar 15-30µl Buffer de DNAse e inativar a DNAse antes de centrifugar, por 2'.

Alcornoque

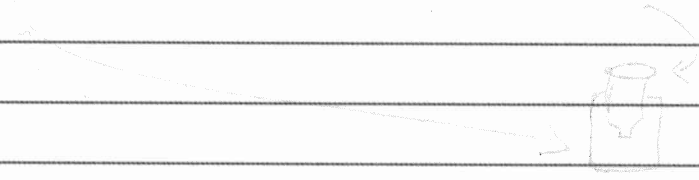
depois centrifugar por 5' a 11000g

1º Permitir a gel que contenha o conteúdo



2º Para cada reação de gel adicionar 100 µl de buffer LTI, deixar a 20°C por 5-10 minutos

3º Colocar no gel de 1% agarose 100 µl de cada amostra



4º Adicionar 100 µl de 10x TBE e 100 µl de DNA a ser analisado. Para a 1ª amostra adicionar o conteúdo

5º Correr o gel em 100V por 2 horas em 1x TBE

6º Adicionar 100 µl de 10x TBE e 100 µl de DNA a ser analisado

7º Reportar

8º Permitir que o gel seque por 1 hora

9º Filtrar o gel e colocar no "ethidium bromide" para visualizar as bandas. Para isso, colocar o gel em uma solução de 100 µl de 10x TBE e 100 µl de DNA a ser analisado. Para a 1ª amostra adicionar o conteúdo

PBAD -&gt; 300mg

600ul Buffer  
NTI

PLAC -&gt; 153mg

306 ul ...

~~do~~ coloquei 25 ul elution bufferPT3 -> 20ul + 30ul H<sub>2</sub>O + 100ul NTI

PBADs -&gt; 50ul

100ul NTI

PT3 possui 25ul elution buffer

PBADs possui 50ul elution buffer.

PT3 (digerido)

Lac (digerido)

PBAD (digerido)

40 ng/ul

40 ng/ul

40 ng/ul

1,24

1,2

PBADs (digerido)

45 ng/ul

1,32

Reação de Ligação

$$1) \text{ PLAC} = \frac{200 \cdot 1200 \cdot 3}{4000} = 180 \text{ ng} = 4,5 \text{ ul}$$

$$2) \text{ PT3} = \frac{200 \cdot 25 \cdot 3}{4000} = \sim 4 \text{ ng} = 0,1 \text{ ul} \text{ ou diluir } 10 \times \text{ e add } 1 \text{ ul}$$



pLac/pBad + pBrasilia

frag	4,5 $\mu$ L
Vektor	4,4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	8,6
T4 Buffer	2 $\mu$ L
T4 Ligase	0,5 $\mu$ L

PT3 + pBrasilia

frag	1 $\mu$ L
Vektor	4,4 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	12,1 $\mu$ L
T4 Buffer	2 $\mu$ L
T4 Ligase	0,5 $\mu$ L

12/05/00

10/1

10/1

10/1

10/1

10/1 ✓

~~10/1~~

10/1 ✓

10/1

10/1 ✓

10/1

~~10/1~~

10/1

10/1 ✓

10/1

10/1 ✓

10/1

10/1 ✓

10/1

10/1 ✓

10/1

10/1 ✓

10/1

10/1 ✓

Gene 1º aula

IX

20/03/19

5,5 X

CR Biont (25mg)	1ul	5,5 ✓
Fragment (~100ng)	2ul ✓	
Express Link T4 Ligator Buffer	2ul	11 ✓
H <sub>2</sub> O <sup>2</sup>	4ul	22 ✓
Express Link T4 Ligator (50U/L)	1ul	5,5 ✓
	<hr/> 10ul	<hr/> 44ul
		50)
		2ul

\* Cada bloco foi resuspendido em 50ul de H<sub>2</sub>O Millig de modo que a concentração de DNA fosse 50ng/ul.  
 \* Incubar a RT por 1 hora.

A transformação foi feita em DH10B por 2 vezes consecutivas.

50ul de cultura completa + 2ul de resíduo

- 50ul em 100ul
- 45ul em 42°C
- 2ul em 100ul

Alguns resultados de PCR

100ul + 100ul = 200ul

Clonagem em 50ul e 150ul

Alguns pontos dos blocos 7, 8 e 9 a respeito de colônias e plasmídeos. Muitas vezes os blocos de DNA são muito pequenos e não são detectados. Isso pode ser devido ao fato de que a concentração de fragmentos de DNA é muito baixa (2,5 e 4,5 ng/ul recomendado) e não há um controle de qualidade. Há uma tendência de usar DNA de colônias para obter um melhor resultado.

AE  
Jung

PCR de Colônia

21/08/19

X Reação → 18X

Gotaq Master Mix	5	90 $\mu$ L ✓
pfw (M13fw) ✓	0,5	7,2 $\mu$ L (100ng/ $\mu$ L) ✓
prv (M13rv)	0,5	7,2 $\mu$ L (100ng/ $\mu$ L) ✓
H <sub>2</sub> O	4	<del>7,2</del> 75,6 $\mu$ L ✓

T<sub>m</sub> = 51°C

Jung/Dora

PCR de Colônia

22/08/19

dos Blocos 2, 3 e 4

45X

Gotaq Master Mix	225 $\mu$ L
pfw (M13fw) (100ng/ $\mu$ L)	10 $\mu$ L
prv (M13rv) (100ng/ $\mu$ L)	10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	205 $\mu$ L

→ meio Mineral (M/min)

Mene o Master plate não cresceu. Vou ter que fazer mais PCR de Colônia

Jung

PCR de Colônia

23/08/19

dos Blocos 2, 3 e 4

50X

Gotaq Master Mix	250 $\mu$ L	✓
pfw (M13fw) (100ng/ $\mu$ L)	10 $\mu$ L	✓
prv (M13rv) (100ng/ $\mu$ L)	10 $\mu$ L	✓
H <sub>2</sub> O	230 $\mu$ L	✓

23/08/19

## marco Reação Golden Gate

Cálculo da razão molar inserto : vetor (2:1):

- insertos com 2Kb (2, 3 e 4) : 138 ng
- insertos com 1,4Kb (5) : 96,60 ng
- insertos com 0,9Kb (1) : 62,10 ng

Preparo da reação:

- pGGA vector : 1  $\mu$ l
- DNA's 2Kb : 2,75  $\mu$ l (x3)
- DNA 1,4Kb : 1,95  $\mu$ l
- DNA 0,9Kb : 1,25  $\mu$ l
- T4 DNA ligase buffer : 2  $\mu$ l
- Golden Gate Enzyme mix : 1  $\mu$ l \*
- H<sub>2</sub>O MilliQ : 4,55  $\mu$ l
- \* for assembly  $\leq$  10 insertos : 1  $\mu$ l or  $\geq$  10 insertos : 2  $\mu$ l

Ciclo para reação de 5-10 insertos

37°C → 1min	} 30 vezes
16°C → 1min	
60°C → 5min	

# PCR de Colônia Bloco 3

27/08/19

21/01/16

## PCR de Colônia Bloco 3

- Gotas 60  $\mu$ L ✓
- M13 fw (100ng/ $\mu$ L) 2,4  $\mu$ L ✓
- M13 rv (100ng/ $\mu$ L) 2,4  $\mu$ L ✓
- H<sub>2</sub>O 55,2  $\mu$ L ✓

30/08/19

manus

## Golden Gate Plasmid B

69ng (1Kb) = 1,38  $\mu$ L (x5)  
 9,1 H<sub>2</sub>O  
 resto igual

volume 0,1-2 ab. volume 0,002 ab. volume 0,002 ab.

0,1 ml + 0,002  
 0,1 ml + 0,002  
 0,1 ml + 0,002



2/9/19

TRANSFORMAÇÃO DNA + Plasmídeo

- circ. AZUL + PT3-1 (~~Cloram~~ Spec, Cla)
- INTEGR K300000 (Cloram)
- HELPER J72 (comp)

~~PT3~~ plasmídeo + comp. ~~CIRC. AZUL~~  
 1ul 50ul

IN. K300 plasmídeo + S17 (comp)  
~~1ul - (1ul)~~ 50ul  
 0,5ul

HELPER J72 + S17 (comp)  
 1ul 50ul

TRANSFORMAÇÃO

- colocar o DNA em 50ul de comp
  - 30 min → gelo
  - 42°C → 2 min
  - gelo → 10 min
  - adicionar 500ul de LB e incubar por 1 hora
- Fazer as placas neste tempo

PLACAS	para 20ml		load.
5 placas PT3	Spec - 100ul	cla - 22,7ul / 20ml	50ul - 100ul - 150ul
1 placa INTEGR		cla - 22,7ul	50ul - 100ul
HELPER		comp	

05/09/19

Digestion de pLysA

pLysA	15ul
antibiot	5ul
XhoI	2.5ul
H <sub>2</sub> O	27.5ul
	50ul

Incuber à 37°C pour 1h



Alto PO

05/01/19

CRESCIMENTO PT3 plac, PBAD

exc um

→ Fluorescência 1 - 434,477  
503,543

placa com 12<sup>6</sup> poses

plac plac PBAD plac PT3

0	0,25					B
0,25	0,25					
0,5	0,25					
1	0,25					

0 0,25

0,5	1				
0,5	1				
0,5	1				
0,5	1				

plac plac

Não fitados

$$100V = \int \frac{20}{V} \cdot 20$$

06/09/19

p66A (50mg/ $\mu$ L)	0,5 $\mu$ L ✓
Blocc 3 lane A (50mg/ $\mu$ L)	2 $\mu$ L ✓
SaI	0,5 $\mu$ L ✓
T4 ligase	0,5 $\mu$ L ✓
ATP	0,2 $\mu$ L ✓
O buffer	2 $\mu$ L ✓
H <sub>2</sub> O	14,3 $\mu$ L ✓
XhoI	0,5 $\mu$ L ✓

37°C — 15 min

37°C — 1 min

22°C — 1 min

} 30x

80°C — 20 min

4°C — hold

25/09/2019

### Integração

Giulia fez a PCR do circuito azul (T.A = 68°) e da integração (T.A = 61°)

usamos a T.A. 65:

MM → 25 μl

DNA → 1 μl

P. FW → 2,5 μl

P. mev → 2,5 μl

H<sub>2</sub>O → 19 μl

antes eu diluí os primers 1:10 vezes: 10 μl de primers + 90 μl de H<sub>2</sub>O!

---

### Plano B - Henrique

Mini-Prep do plasmídeo pJN105.

Kit da Promega (feito em 100 μl, x3)

Medição na na nodrae

Plano B (PG6B(6)) - 49,9 ng/μl; 260/280 = 1,96; 260/230 = 1,65

pJN105 - 7,5 ng/μl; 260/280 = 2,14; 260/230 = 0,94

~~Mini-Prep~~ Mini-Prep do pJN105 (com 300 μl) foi feito evaporado  
~ 1:35

Na amostra pJN105 (aprox 50 μl) - 58,2 ng/μl; 260/280 = 1,96; 260/230 = 0,99

26/09/2019 Plano B - Henrique

Digestão de pJN105 e pGGB(6) com EcoRI e XbaI

NEB Buffer - Cut Smart; Temp 37°C; 2h

Enzyme 1ul/mg(DNA) - Reação cl Enz de DNA

~~pJN105~~ - <sup>40.1</sup> 40.1 ul, 2ul EcoRI; 2ul XbaI, 5ul Buffer, 0.9ul <sub>H<sub>2</sub>O</sub>

pJN105 - 34.5 ul; 2ul " ; 2ul " ; 5ul " ; 6.5ul H<sub>2</sub>O

16h - 18h (Tempo) - Inativação 20min a 65°C

27/09/19 - Alice

→ Purificação das partes do plasmídeo B e do vetor PJN105

Foi seguido o protocolo do NucleoSpin Gel and PCR Cleanup (Lab da marca)

No fim obtivemos 30  $\mu$ l de amostra de cada

no momento drop:

PJN105 - 44,4 mg

Plasmídeo B -

Foi realizado a ligação

Buffer	4 $\mu$ l
Vetor	1 $\mu$ l (44,4 mg)
Inserto	6,27 $\mu$ l (112,3 mg)
Ligase T4	1 $\mu$ l
ATP	0,5 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	7,23 $\mu$ l
	<u>20 <math>\mu</math>l.</u>

Esperamos 1 hora.

transformação

PJN105 + Plasmídeo B e controle

# Sequimos protocolo de marca

2. Mm<sup>02</sup>  
 ATTP  
 1. 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

( ) Mm<sup>02</sup> ST9 ab 2000  
 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

Guia de uma Mm<sup>02</sup> de ST9  
 2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

2. 3. 4. 5. 6. 7. 8. 9. 10. 11. 12. 13. 14. 15. 16. 17. 18. 19. 20. 21. 22. 23. 24. 25. 26. 27. 28. 29. 30. 31. 32. 33. 34. 35. 36. 37. 38. 39. 40. 41. 42. 43. 44. 45. 46. 47. 48. 49. 50. 51. 52. 53. 54. 55. 56. 57. 58. 59. 60. 61. 62. 63. 64. 65. 66. 67. 68. 69. 70. 71. 72. 73. 74. 75. 76. 77. 78. 79. 80. 81. 82. 83. 84. 85. 86. 87. 88. 89. 90. 91. 92. 93. 94. 95. 96. 97. 98. 99. 100.

03/10/19

## LIGAÇÃO PT3 (primeira)

PT3 FW  $\rightarrow$  100 mM  $\rightarrow$  chegar em 50 mM  
 PT3 RV  $\rightarrow$  100 mM

$$75 \mu\text{l } C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_2 = \frac{C_1 V_1}{C_2} \rightarrow V_2 = \frac{75 \cdot 20}{50} = 30 \mu\text{l}$$

adicionar 10  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O

$\rightarrow$  final 30  $\mu\text{l}$  de PT3 50 mM (chama PT3 lig)

90 $^{\circ}$ C por 5 min  
 temp ambiente por 60 min

## LIGAÇÃO DIGESTÃO DO PT3 E LIGAÇÃO

colocar 5  $\mu\text{l}$  da ligação PT3

+ 100 ng de pBRAS.

1  $\mu\text{l}$  EcoRI

1  $\mu\text{l}$  XbaI

[ng/ $\mu\text{l}$ ]

(660g/mol  $\times$  tamanho pB)

5  $\mu\text{l}$  PT3 (50 mM) ou pBRASílica (fig dos dois)

- 1  $\mu\text{l}$  (100 ng) pBRAS (

- 1  $\mu\text{l}$  EcoRI

- 1  $\mu\text{l}$  XbaI

- 1  $\mu\text{l}$  cutsmont buffer

- 3 H<sub>2</sub>O

- 37 $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  2h

- inativação a 65 $^{\circ}$ C

$\times$  3 (para 30  $\mu\text{l}$ )

chama dig pBRAS  
 dig PT3

## PCR plasm B

2  $\mu$ l Buffer  
 0,5  $\mu$ l dNTP  
 0,5  $\mu$ l primer FU  
 0,5  $\mu$ l primer RV  
 colonia (DNA)  
 Tag 0,2  $\mu$ l tag  
 16,8  $\mu$ l H<sub>2</sub>O  


---

 20  $\mu$ l

20 colonias

MM  $\rightarrow$  22 reações  
 44  $\mu$ l Buffer  
 17  $\mu$ l dNTP  
 17  $\mu$ l primer FU  
 17  $\mu$ l primer RV  
 4,4 tag  
~~358,6~~ H<sub>2</sub>O  
 358,6 H<sub>2</sub>O  $\checkmark$   
~~402~~

## miniprep Integração

02/10/19

**GIULLIA** fez uma ligação de PT3  
 digerida com a plasmídeo de Brasília  
 como vetor, usando tel de enzima e deixando  
 1h a T.A.

Enquanto esperava a ligação fez uma  
 miniprep de plasmídeo de integração  
 volume final total: 50  $\mu$ l.

conc: 505, 2 mg

A 260/280 : 1,39

A 260/230 : 0,52

Fez 6 ~~6~~ placas 20 ml p/ cada (tirando de  
 40 ml  $\&$  45  $\mu$ l de clorofenical)

$\downarrow$



usamos 5  $\mu$ l da ligação + 50  $\mu$ l de bactéria  
 e damos heat shock por 2 min na  
 banho maria (37°C?)

4/10/19

DORA - PCR de confirmação de PT3

|                |                        |
|----------------|------------------------|
| primers:       | tamanho esperado       |
| PT3 conf FW    | caso de certo 2.067 bp |
| VR - RV        |                        |
| TM 60°C e 60°C |                        |

|                         |                   | M.M. (pou 29)     |
|-------------------------|-------------------|-------------------|
| H <sub>2</sub> O        | 16,3 $\mu$ l      | - 472,7 $\mu$ l ✓ |
| dNTPs                   | 0,5 $\mu$ l       | - 17,5 $\mu$ l ✓  |
| Buffer                  | 2 $\mu$ l         | - 58 $\mu$ l ✓    |
| primer FW               | 0,5 $\mu$ l       | - 17,5 $\mu$ l ✓  |
| primer <del>FW</del> RV | 0,5 $\mu$ l       | - 17,5 $\mu$ l ✓  |
| DNA (colônias)          | colônias          | -                 |
| Tag pol                 | 0,2 $\mu$ l       | 5,8 $\mu$ l       |
|                         | total: 20 $\mu$ l |                   |

1-12 - Homogeneiza q pipeta. 13-25 - Sem pipeta

3  
 Doa PCR de confin. do T3 GCL

meia MG e LB ágar (1L)  
 (1L)

G MG foi feita e autoclavada separadamente:

PPC (125 ml)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 4,25 \text{ g}$

$\text{KH}_2\text{PO}_4 \rightarrow 1,875 \text{ g}$

$\text{NaCl} \rightarrow 0,312 \text{ g}$

$\text{NH}_2\text{Cl} \rightarrow 0,625 \text{ g}$

Solução de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaCl}_2$

ATENÇÃO!

↳ colocar primeira a solução  $\text{CaCl}_2$

para 390 ml

$\text{CaCl}_2 \rightarrow 1 \text{ ml (1M)}$

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,49 \text{ g}$

autoclavamos as duas soluções p separadas

Em autoclave 37°C até OD 0,3 (12:00)

1 ml 1,0 = 1000 x 5115

1,875 g 1,0 ml (3:00)

Distribuir a placa em cada placa

de grandes e pequenas x = 1 ml 1,0 ml 1,0 ml

01 x 10 = x 1508

1000 ml

SA  
9/10/19 FMSato Promotora

Para PCR (di)g...  
(12)

$$OD \rightarrow \frac{CV}{OD} = \frac{CV}{OD}$$

$$PBros. 1,356 \xrightarrow{2} 8 \text{ ml} = x \cdot 1 \text{ ml}$$

$$C: 678 \quad \hookrightarrow 2,712$$

$$2,712 \times 10 = 0,1 \cdot 10 \text{ ml}$$

$$\hookrightarrow 0,368 \text{ ml} \rightarrow 368 \mu\text{l}$$

$$PBAD 1,007 \xrightarrow{3} 4 \text{ ml} = x \cdot 1 \text{ ml}$$
$$\hookrightarrow 3,021$$

$$3,021 \times = 0,1 \times 10$$


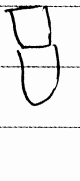
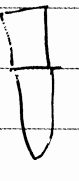
$$\hookrightarrow 302 \mu\text{l}$$

$$PLAC 1,102 \xrightarrow{3} 1 \text{ ml} = \times 3 \text{ ml} \\ \hookrightarrow 3,306$$

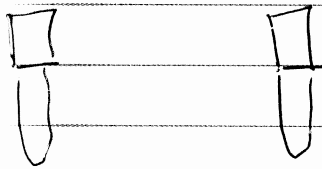
$$3,306 \times = 10 \times 0,1$$

$$\hookrightarrow 0,302 \text{ ml}$$

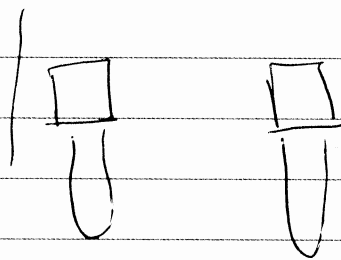
$$\hookrightarrow 302 \text{ ul}$$

| PBRASÍLIA   | PBAD  | PLAC  |
|---|---|---|
|  OD = 2,712<br>V = 1 ml |  OD = 3,021<br>V = 1 ml |  OD = 3,306<br>V = 1 ml |

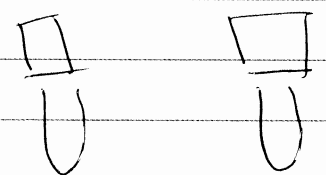
OD = 0,1



368 ul  
10 ml



331 ul  
10 ml



302 ul  
10 ml

Incubar 37°C até OD 0,3 (12:00)

(3:00)

Distribuir a <sup>200ul</sup> ~~placa~~ em cada poço  
segundo o mapa.

2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

|   | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| A |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| B |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| C |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| D |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| E |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| F |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| G |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

|| |

Medicção OD

OD @.1 - 12H

Medicção 13h30

Glicero1 e Glicose cada amostra

pBra, pBad e pLac

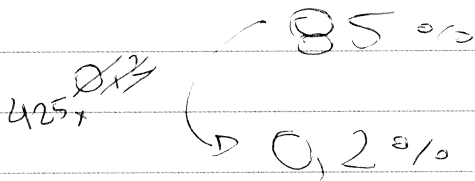
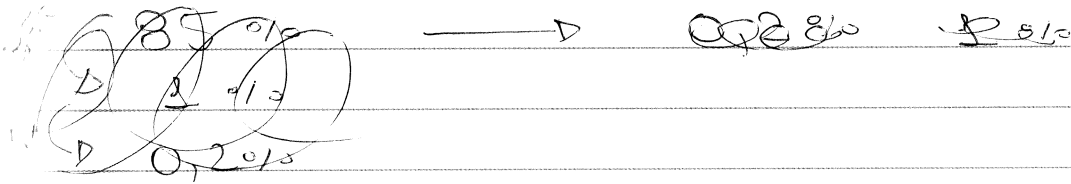
Mede Hank (Glicose e Glicero)

1ml

| $\times 10^{-5}$ | pBra                  | pBad                  | plac |
|------------------|-----------------------|-----------------------|------|
| Glicose          | <del>0,008</del> 1,73 | <del>0,114</del> 1,21 | 1,70 |
| Glicero          | 2,73                  | 2,17                  | 2,23 |

Medição fluorescência YFP/CFP

# Protocolo PBAD/PLAC 15/10/19



425 ml — 1 ml glicerol

35 ml — x 0,2%

↳ 82 ul de glicerol

## Glicose (20%)

x100 ↙ 20%  
↘ 0,2%

100 ml — 1 ml glicose 20%

35 ml — x

↳ 0,35 ml ou 350 ul

Misto: 1 = 350 ul glicose (20%)

+ 350 ul leucina (100x) (5g/L)

34,8 ml

35 ml (glicose 0,2%)

Muco 2: 82 ul glicerol 85%  
+ 350 ul leucina

34,568 ml MM

35 glicerol (0,2%)

~~de clonoferricel~~

Antibiotico → clonoferricel 3,45 ul/ml.

3,45 ul — 1 ml

~~3000~~ — ~~35~~ ml

↳ 120,75 ul

de clonoferricel

PBRAS OD.

$$1,53 \times 6 \text{ cm}^2 = 9,18 \text{ } \mu\text{m}^2$$

$$9,18 \times \frac{0,109 \text{ ml}}{109,1} = 0,9 \times 10 \text{ cm}^2$$

PBAD

$$2,08 \times 6 \text{ cm}^2 = 12,48 \times 1 \text{ cm}^2$$

$$12,48 \times \frac{0,081 \text{ ml}}{81} = 0,1 \times 10 \text{ cm}^2$$

$$\frac{12,48}{10} = 1,248$$



PLAC

$$2,86 \times 6 = 11,16 \times 2 \text{ ml}$$

$$11,16 \times 0,0896 \text{ ml} = 0,2 \times 10 \text{ ml}$$

~~90~~  $\mu\text{l}$

§3.10

OD 16:34

BRAS glicerol  $\rightarrow 0,106$

PBAD glicerol  $\rightarrow 0,08$

BRAS glucose  $\rightarrow 0,1,2$

PBAD glucose  $\rightarrow 0,1,2$

|          | PBAD | PLAC | BNA   |
|----------|------|------|-------|
| glucose  | 0,15 | 0,23 | 0,167 |
| glycerol |      |      |       |