

08.08.18

- $0.5 \mu\text{l}$ от топлата култура в 5 ml LB
- инокулираме на 37°C на клатка $250 \mu\text{l}$ or overnight в 30 ml LB
- $\text{OD} = 0,35$
- на центрифуга на 2°C за 10 min

- приготвяме нова млазката plus:

10 μl :

1. $4,87 \mu\text{l}$ diH₂O
2. $2 \mu\text{l}$ T4 Ligase Buffer
3. $0,6 \mu\text{l}$ Vector
4. $2 \mu\text{l}$ Insert
5. $0,5 \mu\text{l}$ T4 Ligase

инкубираме за 10-15 min на ст. t°

клетките - изливаме супернат. и 5 min. на рег. g както
стане млазката plus!

- рецепт на 6 μml $1 \times$ TSS
- в аликвот по 100 μl :

1. 100 μl + 10 μl млазката plus от вчераш
2. 100 μl + 10 μl лиг. plus от вчера
3. K: 100 μl + 5 μl psB1C3

- за 30 min на рег
- 45 sec. на 42°C
- 2 min на рег
- + 800 μl SOC (homemade)
- за 1 h на клатка на 37°C
- сеен на LB + ~~ant~~ (5 перлита):

1 петри: R (pSB1C3) - 50 μ е - LB + chl + Amp

2 петри: 50 μ е от комп + лиг. от вѐра

3 петри: 100 μ е комп + лиг. от вѐра

4 петри: 50 μ е комп. + лиг. от рhes

5 петри: 100 μ е комп. + лиг. от рhes

тс
ка

- в температурата та 30°C

- в 5ml LB - сега O+5d overnight и на китатаката

- от харилника от петринос MP6 сега колония
в тѐно LB (5ml) + chl (μ е/ml) + 25ml глюкоза.

* глюкозата тие 1M, т.е. вземаме от тѐд;

$$c_1 V_1 = c_2 V_2$$

$$1000 \text{ ml} \cdot x = 25 \text{ ml} \cdot 50 \text{ ml}$$

$$x = \frac{25 \cdot 50}{1000} = 1250 \mu\text{е за } 50 \text{ ml LB}$$

и ги използваме за компетентни за утре!
се вкарваме вектор pSB1A3 (1, 2 μ е)

09.08.1*

~~храки тѐта среда за MP6~~

в 50ml LB 50 μ е chl + 1250 μ е glucose

10.08.17

- разредяване на прајмерите Amil CP R и Amil CPF;
те са 100μM, са разредяване до 10μM:

Вземаме 45μL от ~~Amil CP R~~ TE-буфер и додаваме
ме 5μL от 100μM прајмер.

PCR-a:

- 1. 2x 50μL pusi
- 1. 30μL dH₂O
- 2. 10μL 5x Phusion Buffer
- 3. 1μL dNTPs
- 4. 2,5μL primer Amil CP R (10μM)
- 5. 2,5μL primer Amil CPF (10μM)
- 6. маспуца pSB1C3 1μL / lucky strike (6μL μL)
- 7. Phusion polymerase - 0,5μL

98°C - 30 sec

98°C - 10 sec

60°C - 30 sec

72°C - ~~1 min~~ ^{1,30 min}

72°C - 5 min

4°C - ∞

~~25x~~ 25x

ка електрофореза с 1% TBE:

1. 5μL - leader

3. 5μL - lucky strike (5μL) + 1μL TBE

4. 5μL - Amil CP (5μL) + 1μL TBE

- lucky strike - OK, Amil CP - няма ниво?

- (5μl) (15μl)
- 5ml LB + Che, Amp и Glucose + от Трансформативите от Аре рSB1A3 и 100μg ИР6. → 2 колонии (но 2 в колба)

$$1000\text{ml} \cdot x = 25\text{ml} \cdot 5\text{ml}$$

$$x = \frac{25 \cdot 5}{1000} = \frac{125}{1000} = 125\mu\text{g glucose}$$

и на матаката на 37°C

- на петри с КА добави 15μg IPTG и сеи селективно от матаките при (общо 9 колонии) и на 30°C.
- DH5α - overnight в 5ml LB

11.08.17 Криминиране на 1x TSS

- инкубирате на трохтата DH5 α :
100ml LB + 500μg DH5α и на мата на 37°C
- при OD = 0.3 ÷ 0.4 вземате 50ml и центрофугирате за 10min на 4°C. Останалото колесат в вращава на матаката - тегло рд ~ 0.6 за електропумп и

Колониевото определение :

- 2 старт - leader - 5μg — ~~60-60~~ 80-60
- 3 старт - рSB1A3 прецизиан 29.07.17 —

- 4 steps - pSB1C3 mini prep - 11 -
- 5 steps - pSB1C3 PCR prep - 11 - 2.5 mg/μl!
- 6 steps - pSB1C3 plasmid DNA - 11 -
- 7 steps - pSB1A3 26.07.17 - 11 -
- 8 co - V (4 μl) + 1 μl TB-1 + 1 μl dH2O
- 9 steps - I (4 μl) + 1 μl TB + 1 μl dH2O

- проверка успешна prep раба

Трансф.	$\frac{ng}{\mu l} \cdot x = \frac{ng}{\mu l} \cdot 100$	$25 \cdot x = 100$
	$x = \frac{100}{25} = 4 \mu l$	$x = 4 \mu l$

- overnight DH5α (5 ml LB), overnight pSB1A3

18.08.17

- Koun-ka
- трансф. с aut. plus, pSB1C3

- miniprep на pSB1C3 or overnight
- на 0,8% ren са конкурентно импегране, accepto с pSB1C3
- 2 steps - leader
- 3 co - pSB1C3 (4 μl) + 1 μl dH2O + 1 μl TB (6x)
- 4 co - pSB1A3 (4 μl) + 1 μl dH2O + 1 μl TB (6x)

- успешна prep на V и I (10 μl)

- 4,8 μl dH2O
- 2 μl T4 ligase Buffer
- 0,6 μl vector
- 2 μl I
- 0,5 μl T4 ligase

incubi + 5 min на 42°C

Κοιμητήριο: οπρ. κα pSB1C3 & pSB1A3

Leader: 80 - 80

pSB1C3: x - 116, 129

pSB1A3: x - 95, 95

pSB1C3: 1 φρασ. = $\frac{116 \times 80}{80} = \frac{29}{4} = 7.25$ ng/μl

2 φρασ. = $\frac{129 \times 80}{80} = 129 = 32.25$ ng/μl

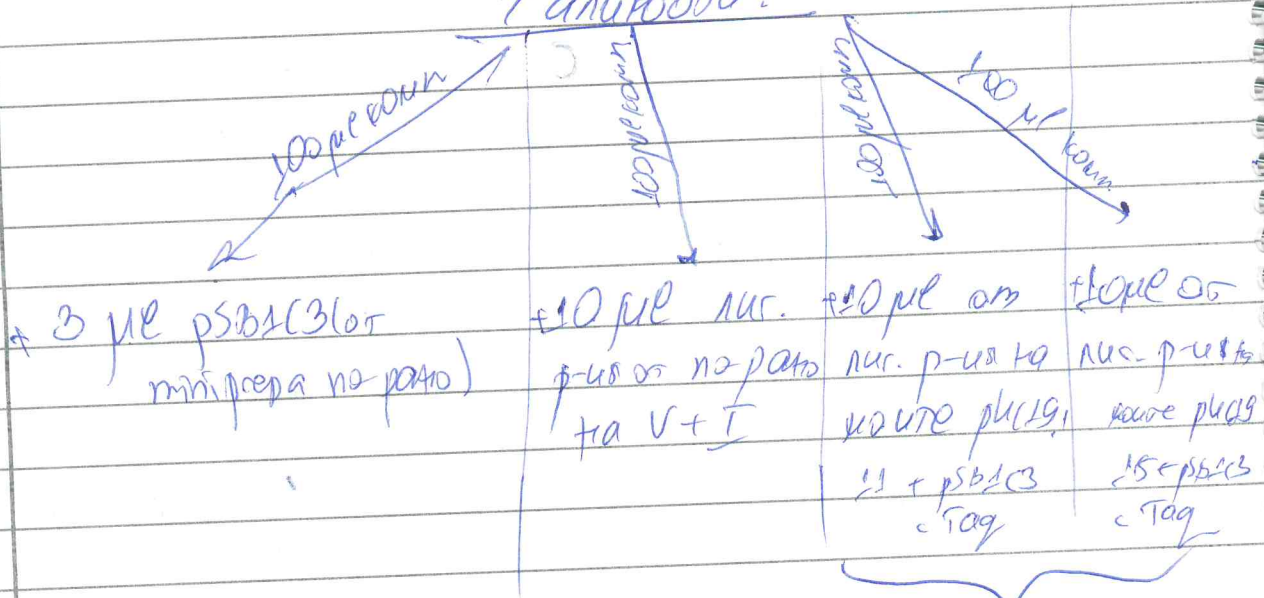
pSB1A3: 1 φρασ. = $\frac{95 \times 80}{80} = 95 = 23.75$ ng/μl
2 φρασ.

3α φάση

3α. x = 1 x 100

x = $\frac{100}{32} = 3.1$ μl οτ pSB1C3

4 ανιχν.:



η κυβαντισια ημ ε 18 min. απη ταυ ηα φρασε 2 φρασ.

- 45 sec на 42°C
- 2 min на рег
- по 1 me SOC
- на клетката на 37°C за 1h (лигазата е $1,30\text{h}$ на макс.)
- сеен в/у петри:

лигазата риа LB+KA - 50 μe от ^{на 30°C} метиос
 минипеп на рбас : LB+Ch - 50 μe от ел
 монт 2 ($\mu\text{C}1911$ и 15) на Amp + X-pal + IPTG по
 50 μe в/у петри

Компетентни за електропорация (10¹⁰ cfu)

- с остатките клетки в колбата - оставаме и за
 стигнат OD = $0,6 \pm 0,8$. Сигнална OD = 0,7
- изливаме 2 me метиос и центрофуираме на
 $8000 \times g$ за 3 min. (имаме 2 x 2 me)
- изливаме супернат
- ресус в 2 ml d.H₂O (се сипам)
- центрофуираме на $8000 \times g$ за 3 min, изливаме супернат
- разтваряме клетката с 60 μe d.H₂O
- на електропоратора:

1700V
 5ms

- верната стер електропорацията се добавя 1 ml
 SOC и се ресуспендира в самота кубета.
- сместа се издърбва с пипета от кубетата и се
 прехвърля в чиста електричка
- инкубираме за 1h на 37°C в клетката на
 умерено клетке

29h

- cells 6/4 nempuma LB + Che, no 30 μ e omkret-
klime

~~LB (3l, 5 μ e glucose (2M)~~

- ces 6 teko LB (5me) + DH5 α
6 teko LB (5me) + 5 μ e Amp + 5 μ e Che + 25 μ e
LM glucose + MP6
u ~~2 μ e~~ ~~teko~~ DH5 α - ka 37 $^{\circ}$ C } ka klime
MP6 - ka 37 $^{\circ}$ C }

- 10ml voda + 100 μ e Amp, Che, Glu

14.08.18

miniprep ka MP6 + Glu u MP6 + Glu + tra.

- uscunbau overnight kultura 6 μ l enepo.

- uetmpodvurpau za (2 min ka $\rho > 10000$)

- uzilvabe cyneptatattata

- pesen ytaikato c 250 μ e ot Resuspension Solution (ka 90e)

- nosko sedavame 250 μ e ot Lysis Solution u utverturame

dobro friskono notu

- добавяме 350 μ е от Neutralisation Solution и инкубираме отново няколко часа
- на центрофуга за 5 min на 14000 xg
- пречистваме супернат. та колонка
- центрофугираме за 1 min на 14000 xg, изхвърляме супернат.
- добавяме 500 μ е от Wash Solution
- центрофуга за 1 min на 14000 xg, изхвърляме супернат.
- добавяме 500 μ е от Wash Solution
- центрофуга за 1 min.
- изхвърляме р-ра, партиан в пудлицата
- центрофуга отново за 1 min
- носим колонката в кутия енерг
- добавяме 40 μ е Election Buffer
- 2 min инкубация на ст. 2°
- 2 min центрофуга на 14000 xg
- изхвърляме колонката, а пудлицата съхраняваме

- пускаме Q870 електроден с пробите

4 старт Leader - 5 μ е

5 старт - МРБ + вода - 4 μ е + 1 μ е H₂O + 1 μ е ПБ

6 старт - МРБ + вода - 4 μ е + 1 μ е H₂O + 1 μ е ПБ

7 старт - старият фрагмент + PCR product - 4 μ е + 1 μ е H₂O + 1 μ е ПБ

старият фрагмент (Ampl CP) е 0.7 ng/ μ е, 6, 7 кв.

22.08.17

PCR overnight (50µl)

1 di H ₂ O	32
2. Phusion Buffer (20µl) (5x)	10
3 dNTPS Mix 10mM	10 1
4 pr. PF2 (10µM)	2,5
5 pr. VR (10µM)	2,5
6. pSB1C3 (DT miniprep)	1,5 1
7. Phusion polymer (2U/µl)	0,5

98°C - 30 sec

98°C - 10 sec

60°C - 30 sec

72°C - 1,30 min

72°C - 5 min

4°C - ∞

} 25x

репен, сун хромосому

pSB1C3

pSB1A3

DH5α

} сөөг 6 5ml LB

29.08.18

Вектори за клонинг

- мини-репер на KP, KO, KL, KH, KT

- залагаме рестрикционна р-из: (за 10 μ е)

0,5 μ е EcoRI (10 U / μ е)

0,5 μ е pSTI (10 U / μ е)

1 μ е 0 buffer (10x)

5 μ е плазми (KP / KO...)

3 μ е dH₂O

- инкубираме за 1h на 37°C

- електропороза в 0,8% гел.

- кои виска от рестрикциите добавяме по 2 μ е пБ и нагн-
ваме:

2 старт - 5 μ е маркер

3 ст. - KP - 10⁻⁷ μ е с 10⁸ ер - колони подже старта (10 μ е)

4 ст. - KO - 10 μ е

5 ст. - KL - 10 μ е

6 ст. - KH - 10 μ е

7 ст. - KT - 10 μ е

8 ст. - pSB1C3 (mini-rep) - 5 μ е + 1 μ е пБ

- екстра са ова филма!

- Съединяване на конструктите: (в плоче 50µm d.к.д. radius, 10µm инкуб.)

Part BBa_J45199 : Plate 4/151 pSB1C3

Part BBa_P0140 : Plate 3/15H pSB1C3

Part BBa_K1357010 : Plate 5/20F pSB1C3

Part BBa_K395602 : Plate 1/4H pSB1C3

Part BBa_K081012 : Plate 3/21L pSB1C3

Part BBa_K081014 : Plate 3/21N pSB1C3

Part BBa_K145201 : Plate 3/14K pSB1C3 (input TetR gene)

Part BBa_R0040 : Plate 7/21D ^{pSB1C3} (Tet repressible promoter)

Part BBa_K145280 : Plate 4/1I pSB1C3

- В компет. DH5α трансф. с конструктите

01.08.17

- В 50µm LB 50µm от overnight DH5α и инкубирание

- инаме срезани плазмиди вектори (K0, K1, K2, K3 и K4)

- инаме и срезана касетата pSB1C3

- на 0,870 гел пускаме векторите (с юлните стартове) -
K0, K1 и K2

- преживяване от гел с ина

- K0 и условно кол. вектор (40µm) добавяме ПБ (8µm)

1 стъп. - 5µm маркер

2 стъп. - условно кол. (40µm) K0

3 стъп. - - II - K1

4 стъп. - - II - K2

ошо енег

- R - 0,984g, тарчрине

- KO - 0,111g

- KH - 0,1161g

- KT - 0,097g

- ~~на 115 mg~~ на всеки рел: дудер в отнашение 1:3

⇒ по 350 μl от дудер L3 (от кето на invitrogen) кета ботко

- и на термоблока на 50°C го раставаме (~ 10 min) и додаваме

- прехвърляме в кето в кюветка

по 115 μl изотопна

- центрифугираме за 1 min на 14000 xg, изваждаме р-р

- додаваме 500 μl L1

- центрифуг. за 1 min на 14000 xg, изважда р-р

- центрифугираме за 3 min на 14000 xg

- носим колонката в туба tube

- додаваме 40 μl от Election Buffer (E1)

- штирваме за 1 min на 14000 xg

- центрифуг. за 1 min

- на 0,870 гел пукаме вие предизащите вестра

- 2 ст. - маркер

- 4 ст. - KO (5 μl) + 1 ПБ

- 6 ст. - KH (5 μl) + 1 ПБ

- 8 ст. - KT (5 μl) + 1 ПБ

80 → 160

80 → 160

80 → 160

KO → 136

KH → 144

KT → 155

KO = 68/5,5

KH = 72/5

KH = 15 ng/μl

KO ≈ 15 ng/μl

KT = 15 ng

20 μl лигосна р-ца (за трите вектора KO, KHK и K1)

Вектор → 6 μl

PSB 113 → 3 μl

T4 ligase → 0,5 μl

H₂O → 6,5 μl

5x T4 ligase buffer (Invitrogen) - 4 μl

- инкубираме за 30 min. на ст. t°

- трансформираме 10 μl лиг. р-ца в 100 μl ком. DH5α
~~и 10 μl 500 μg~~

- после им добавяме по 500 μl SOC

- сесм на петрига с кап и на 30°C. Како клетките слег
како ги свалим от клатагоста ги центрофузираме за
3 min. на 14000 rpm, за да парнат клетките. После от
средата в петрига дъга вземам 100 μl, остатъкът в
излива и цялните клетки ресуспендирам с тези 100 μl

50 μl сес на среда с 10 μl антибиотик

другите 50 μl сес на среда с 20 μl антибиотик

Така и са 3-^т енерг по 2 петрига с различна
конц. антиб.

04.09.14. DH5α в 5ml LB overnight

05.09.18

→ overlap PCR: (Ka Dea 6 rep) → Lucy Shine + Amil CP-cassete
не 1% на нукале:

2 ст. - маркер (5 μe)
4 ст. - прѡдот overlap

→ прѡставане рѡла:

→ прѡтѡвање среди с разликни конц. на K_n:

(stock 50) конц. K _n :	20	10	5	2,5
μe за 5ml LB	0,4	0,2	0,1	0,05
μe за 20ml LB	8	4	2	1

В/у тези петрига с разн. конц. сеем DMSO от overnight
и на 30°C петригата (марки) → то 2 петрига за конц.

→ от петригата с вектори с KO/10 и 20/ и KH (10 и 20), както и от тези с лигазните рѡи (100 μe KH от 05.08.18 и 100 μe от KO от 05.08.18) вземаме ерѡ-низики колонии и ги сеем на петрига с LB и K_n (1 μe за 5ml LB) + IPTG (10 μe) - сектор рѡи (2) - и на 30°C

→ секи $0.15 \mu\text{l}$ на 4°C и на 37°C

→ автоклав средата и др.

прегистване от гел:

→ гелът е 0.080 g

- добавяме $240 \mu\text{l}$ бучер $L3$ (бучер : гел = 3:1)

→ на термоблока на 50°C за 10 min (на всеки 3 min се инвертира)

- добавяме $80 \mu\text{l}$ изопропанол и смесваме

→ прехвърляме в колонка виско

- центрофуг. за 1 min на $14000 \times g$

- изхвърляме надналия р-р

- добавяме $500 \mu\text{l}$ WT

- центрофуг. за 1 min на $14000 \times g$

- изхвърляме надналия р-р

- центрофуг. за 3 min на $14000 \times g$

→ местим колонката в гиста tube

- добавяме $40 \mu\text{l}$ $E1$ бучер

- инкубираме за 1 min на ст. $^{\circ}$

- центрофуг. за 1 min на $14000 \times g$

- изхвърляме колонката

- прегистанният продукт на 4°C с етикет:

Overlap PCR
gel extraction
Dec 05.09.17

→ overnight PCR:

1. di H_2O - $32 \mu\text{l}$

2. $5 \times$ Phusion Buffer - $10 \mu\text{l}$

3. dNTPs Mix (10 mM) - $1 \mu\text{l}$

4. primer Amie CP_CVR ($10 \mu\text{M}$) - $2.5 \mu\text{l}$

5. primer Amie CP_OVF ($10 \mu\text{M}$) - $2.5 \mu\text{l}$

6. lucky stick + Amie CP cassette - $1 \mu\text{l}$

7. Phusion polymerase ($2 \text{ U}/\mu\text{l}$) - $0.5 \mu\text{l}$

35 цикли
 мулти-45s
 ↓
 CVRF
 R

98°C → 30sec
 98°C → 10sec
 60°C → 45sec } 35x
 72°C → 1,30min
 72°C → 5min
 8°C → ∞

06.09.18. - петричката с антибиотичните конци се оставя за 1 ден на ст.^o

07.09.18.

- Антибиотикът действа във V конци, ^{при overlap 30°C и 1 ден на ст. ка} DMSO не пасва ^{ка}
- секторните са прозрачни и тънки
- конци и конци с някои от бактерите на различни антибиотични на ниска ст.^o
- проверка на колоничите от секторните петричката с PCR

- 1% гел и проверка от overlap PCR + gel extraction от ^(05.09) възра;
- 2 ст. - Unmarked - 5µl
- 3 ст. - overlap PCR + gel ext. Decm - 5µl + 1 ТБ - от не е пробвано ^{не е!}

с CHE резултат.

- POSIP CH и DMSO се обр в 5µl LB (POSIP CH е с CHE) и на 30°C, а DMSO на 37°C на миксера/за угре.

08.0918

- mini prep на pOSTP от с кита на fermentas - GeneJet
Plasmid Mini prep kit

- в 2 ме епепс от коцката култ. и центрофуџ
за 2 min на $\sim 14000 \times g$.

- изхв. супернат.

- доповнаме с култура от ново го 2 ме
и от ново центр. за 2 min.

- изхв. супернат.

ресусп. ~~с~~ ~~250~~ ~~µl~~ Resuspension Solution (на $4^\circ C$)

- доповнаме 250 µl Lysis Solution и инкубираме
толково пати внимателно и инкубираме за 4 min

- доповнаме 350 µl Neutralization Solution, инвер-
тираме внимателно ~~и инкубираме за 4 min~~ ~~и инвер-~~

- центрофуџ. за 5 min. на $14000 \times g$.

- прехвърляме супернатанта в колонка

- центрофуџ. за 1 min на $14000 \times g$.

- изхв. супернат.

- доповнаме 500 µl Wash Solution

- центрофуџ. за 1 min на $14000 \times g$

- изхв. супернат. ~~от ново центрофуџ.~~ ~~за~~

- доповнаме 500 µl Wash Solution

- центрофуџ. за 1 min на $14000 \times g$

- изхв. супернат. ^{от ново центрофуџ. за 1 min} прехвърляме колонката в киста епепс

- доповнаме 50 µl от Elution Buffer

- инкубираме за 2 min. на rt°

- центрофуџ. за 2 min. на $14000 \times g$.

рестрикция с EcoRI и pSTI

20 μ е р-из: (6 3 по 20 енерг.)

1. ~~1~~ μ е EcoRI (10U/ μ е)
2. ~~1~~ μ е pSTI (10U/ μ е)
3. 2 μ е 0 buffer (10x)
4. 7 μ е плазмид pOSIP CH (от mini-prep)
5. 9 μ е dH₂O

- на 37°C за 1h.

- 0,8% гел с полени стартове

~~0,8% гел~~ ^{събираме 3-т в една ч} ~~вска от енерг.~~ ^{на} 12 μ е ПБ добавяме

2 ст. - маркер - 5 μ е

4 ст. - проба

6 ст. - проба

- инокулираме от overnight DH5 α 400 μ е в 50ml LB.

- гелът от електрофор. е 0,164.

48 500 μ е от LB дучера и на 50°C за 10 min (като на всеки 3 min инвертираме).

- преципитираме с кет:

- добавяме 104 μ е isopropanol, смесваме

- ~~центро~~ центрофугираме в колонка

- центрофуг. за 1 min на 14000x

- изхв. р-ра

- добавяме 500 μ е W1

- центрофуг. за 1 min на 14000x

- изхв. р-ра

- центро за 3 min

- изхв. р-ра

- 40 μ е EI, 1 ml вода и 1 центро

- на 0,8% рен

2cm - marker - 5 μ e

3cm - 5 μ e POSIP CH (injected) - 1 μ e TIR

4cm - 5 μ e overnight PCR at 05.00 + 1 μ e TIR

80 \rightarrow 152

POSIP \rightarrow 98

POSIP = 10ng/ μ e

микста р-уш (20 μ e)

1 4 μ e T4 reverse dyfer (5x)

2 0,5 μ e T4 ligase

3 9 μ e POSIP-CH вектор (10ng)

4 4 μ e инсерт (pSB1C3)

5 2,5 μ e d.H₂O

- 1h на 37°

~~и в р-уш~~
~~4 μ e T4 reverse dyfer~~
~~0,5 μ e T4 ligase~~
~~9 μ e POSIP-CH~~
~~4 μ e pSB1C3~~
~~2,5 μ e H₂O~~

- за време 6 5me LB + 5 μ e Tet + 1комк
от POSIP-TH (с тетрациклин резист.) и на клата
ката на 30°C overnight

- комк. DH5 α 100 μ e + 10 μ e от мик. р-уш с POSIP-CH

- LB + RA (2,5 комк.) \rightarrow 50me LB + 2,5 μ e RA

- в 2 петри на 100 μ e комк кн

11.09.17.

0,8% reni

2 c. - маркер

3 c. - сразаниса и gel extraction postp TH

80-136

postp TH - 138

postp TH = 16,6 ng/μl

12.09.17

- с непуца 1, 3, 4, 6 и 7 → на свотв. кондове PCR
с Phusion с VFRu VR np. no 15 μl plus (180 μl
Master mix)

сг. нпр. с 35 укрона

annealing 58°C

elongation 72°C → 455

напуца no 1 μl от кунтупуце

→ от 2, 5 и 8 кондове уса. нмак днк свот, решем
с EcoRI и pSTI (7 μl от нмамура решем), елуцаме
с 50 μl от куца

	30 50 μl	x 3, 5 (30! 50 μl)
Master Mix:	2. 3.2 d.H ₂ O	11.2 μl
(30 10 PCR-KU no 15 μl)	2. 1.0 5x Phusion Buffer	3.5 μl
	3. 1 μl dNTPs Mix (10 mM)	3.5
	4. 2.5 VFR	8.75
	5. 2.5 VR	8.75
	6. 0.5 Phusion polymer	1.75
	7. -	

1 μl марк
от решемте кунт.

98°C - 30s

98°C - 10s

58°C - 30s

72°C - 45s

72°C - 5 min

4°C - ∞

} 35x

→ ит вымывание с 2a, 2b, 5a, 5b и 8a и 8b по 5ml (6) mini prep
→ перепузылка с ECORT и Pst I:

0,5 μl ECORT (5U/μl)

0,5 μl Pst I (5U/μl)

2 μl O'Buffer (10x)

7 μl ~~masup~~ mini prep

10 μl d.t20

на 37°C за 2h

2 ren

→ 190 ren и та ~~на~~ на 1a, 1b, 3a, 3b, 4a, 4b, 6a, 6b и 7a, 7b

1 ren

1 cr. - ~~mapker~~ 5 μl

2 cr. - ~~3a~~ PCR ^{1h overnight} ~~mapker~~ (5 μl) + (1 μl) ПБ

3 - ~~3b~~ PCR ~~mapker~~ - 11 -

4 - 3a PCR ~~mapker~~ - 11 -

5 - 3b PCR ~~mapker~~ - 11 -

6 - 4a PCR ~~mapker~~ - 11 -

7 - 4b PCR ~~mapker~~ - 11 -

8 - 6a PCR ~~mapker~~ - 11 -

9 cr - 6b PCR ~~на mini prep~~

10 cr - 7a PCR ~~на mini prep~~

1 cr - на prep 5 μ l

2 cr - 7b PCR ~~на mini prep~~

3 cr - 2a mini prep + EcoRI + PstI (5 μ l) + (1 μ l) ПБ

4 cr - 2b mini prep + EcoRI + PstI - 11 -

5 cr - 5a mini prep + EcoRI + PstI - 11 -

6 cr - 5b mini prep + EcoRI + PstI - 11 -

7 cr - 8a mini prep + EcoRI + PstI - 11 -

8 cr - 8b mini prep + EcoRI + PstI - 11 -

Проду: 6a и 6b - има + зкони

при рескрипциите - също, 8a и 8b изглеждат най-добре

Препробаваме от тегните от сточи, в които работихме
преди, препробаваме с нове в тегна (5 ml) и che 6a,
6b и 8a, 8b и на 37°C на края.

13.09.17

повтаряме PCR-ните при на 1a, 1b, 3a, 3b, 4a, 4b,
с Phusion 7a и 7b

Mix: (3a 50 μ l)

1. 32 μ l d.H₂O

2. 10 μ l 5x Phusion Buffer

3. 1 μ l dNTPs Mix (10 mM)

4. 2,5 μ l np. VR (10 μ M)

5. 2,5 μ l np. VF2 (10 μ M)

6. 0,5 μ l Phusion polymerase (2 U/ μ l)

x 2,5

80 μ l H₂O

25 Ph. Buff

2,5 dMT

6,25 VR

6,25 VF2

0,25 poly.

98°C - 30s

98°C - 10s } 35x

58°C - 30s

72°C - 1,30min

72°C - 5min

4°C - ∞

15 μl - probe реакции

1% gel: 1 ст. - маркер

2 ст. - 1a - 5 μl + 1 п.б.

3 ст. - 1b - 1

4 ст. - 3a - 11

5 ст. - 3b - 11

6 ст. - 4a - 11

7 ст. - 4b - 11

8 ст. - 7a - 11

9 ст. - 7b - 11

^(конструкция)
Всичность прочтите са: 7a } P3121N K081014 RFP

7b } protein generator RBS_RFP-
terminator, 714 bp

2a } P314H K395602 Apde ge-
2b } nerator, 1813 bp

3a } P3121L K081012 GFP
3b } generator RBS_GFP-term
788 bp

4a } P315H P0140 TetR ge-
4b } nerator RBS_TetR-term-1-
term2, 842 bp

5a } P411I K145280 GFP_LU + TetR
 5b } усложнение конструкции 1868bp
 6a } P4121D R0640 TetR promoter
 6b } 546p
 8a } P415I Banana, 145199 RBS
 8b } CDS term1 term2, 17396p
 1a } P3114K K145201 Input TetR
 1b } generator Prom_RBS_TetR term1
 term2, 8836p.

(СНИМКА!)

- само 1b е успешно, останалите трябва да се повторят (с Tag colony PCR)

56-305

72-130

14.09.17

PCR та конструиране с Tag (30:10 µl):

1. 6,86 µl d.H2O
2. 1 µl Tag Buffer (1x)
3. 1 µl Nucle (2,5 mM)
4. 0,2 dNTPs (0,2 mM)
5. 0,2 VR (10 µM)
6. 0,2 VF2 (10 µM)
7. 0,04 µl Tag Poly (1 µg/50 µl)
8. DNA 0,5

~~6,86 µl d.H2O
 1 µl Tag Buffer (1x)
 1 µl Nucle (2,5 mM)
 0,2 dNTPs (0,2 mM)
 0,2 VR (10 µM)
 0,2 VF2 (10 µM)
 0,04 µl Tag Poly (1 µg/50 µl)
 0,5 DNA~~

Colony PCR

3a 8 проб по 15µe Mix от ~150µe

	µe:
1. d. H ₂ O	- 102,9
2. Taq Buffer (1x)	- 15µe
3. MgCl ₂ (2,5mM)	- 15µe
4. dNTPs (0,2mM)	- 3
5. VR	- 3
6. VFLi	- 3
7. Taq polymer (1U/50µe)	- 0,6
	0,5µe DNA

98°C - 30s

98°C - 10s

56°C - 30s

72°C - 1,30min

72°C - 5min

4°C - ∞

} 35x

190 пир: 1 пр - маркер - 5µe

2 пр - 1a - 5µe + 1 ПБ

3 пр - 1b - 5µe + 1 ПБ

4 пр - 3a - -11-

5 пр - 3b - -11-

6 пр - 4a - -11-

7 пр - 4b - -11-

8 пр - 7a - -11-

20.09.17

- изотипирање плазмидна ДНК RFP и GFP :
- елуирање = 40 μL

- tetr generator + VR и VF2, елиминатор, од 16.09.17
преживување со каг, елуирање со 35 μL (сребрената
панка кува инуитроген) - елуирање со 50!

Ретшени

- со EcoRI и XbaI ретшени векторите RFP и GFP
со EcoRI и SpeI ретшени параметра tetr generator

30 μL р-ис:

8 μL вектор/плазмид

1 μL EcoRI

2 μL XbaI

6 μL (20x) Tango Buffer or (10x)

13 μL d. H₂O

20 μL р-ис:

10 μL параметра tetr gen.

~~10 μL~~

1 μL SpeI

2 μL Tango Buffer (10x)

7 μL d. H₂O

- инкуб. 1h на 37°C со²-та респирација со плазмид и тази со инсерта^(RFP и GFP) (tetr gene)

- 1 μL EcoRI и 4 μL Tango Buffer додаваме към смеската
со параметра и инкубираме отново 1h на 37°C!

1% гел.

- преживување со 3^{та} респирација елуирање со 35 μL и по
5 μL на гела ?

1 гр - тапер 5 μL

дста. - tetr gener. 5 μL + 1TB

3 гр - GFP - 5 μL + 1TB

1 гр - ...

22.09.17

- среќа од петријата со GFP-TetR gene^(зелено) и Pfl TetR gene^(црвено)
 на 5ml тежна LB + Chp
 на брзо петри вземаме по 2 колонии
 => одуво 4 колони

23.09.17

от 1M MgCl₂ → треба 2.5ml

$$1M \cdot x = 250M \times \cancel{1000} \mu l \cdot 1ml$$

$$x = \frac{250}{1} = 250 \mu l \text{ MgCl}_2 \text{ и по 1 ч H}_2\text{O}$$

$$\Rightarrow 250 \mu l \text{ MgCl}_2 \text{ (от 1M)} + 750 \mu l \text{ d. H}_2\text{O}$$

- за подготовка colony PCR **с Tag** и за 4-те тежни култ.
 за 10 μl р-уа:

Colony
 PCR
 с
 Tag

1. (10x) Tag Buffer - за 1x 1 μl
2. (25ml) MgCl₂ - за 2.5ml 1 μl
3. 10mM dNTPs Mix - за 0.2ml 0.2 μl
4. 10 μl прајмер VR - 0.2 μl
5. 10 μl прајмер VF2 - 0.2 μl
6. 5U/μl Tag. polymerase - 0.04 μl
7. d. H₂O - ~~0.7~~ 8.5 μl
8. 0.5 μl DNA

- за 4 реакции
 по 20 μl - Mix 100 μl
1. Tag Buffer - 10 μl
 2. MgCl₂ - 10 μl
 3. (np) VR - 2 μl
 4. np VF2 - 2 μl
 5. Tag. poly - 0.4 μl
 6. dNTP Mix - 2 μl
 7. d. H₂O - 68.6 μl
 по 19 μl от mixa
 и 1 μl DNA

98°C - 30s

98°C - 10s

56°C - 30s

72°C - 2 min

72°C - 5 min

4°C - ∞

} 35x

- трансформирание с : $\begin{matrix} (5\mu\text{l}) \\ \text{PSB1A3} \\ (5\mu\text{l}) \end{matrix}$ в 100 μl DH5 α
(от плейта по растворяме \rightarrow $\begin{matrix} (5\mu\text{l}) \\ \text{J23110} \\ (5\mu\text{l}) \end{matrix}$ в 100 μl DH5 α
в 10 μl d.H₂O)

- на 1% електрофор:

- 1 ~~CT~~ - 2 μl моркер
- 2 ~~CT~~ - GFP 1 (5 μl) + ПБ (1 μl)
- 3 ~~CT~~ - GFP 2 (5 μl) + ПБ (1 μl)
- 4 ~~CT~~ - RFP 1 (5 μl) + ПБ (1 μl)
- 5 ~~CT~~ - RFP 2 (5 μl) + ПБ (1 μl)
- 6 ~~CT~~ - master mix (5 μl) + ПБ (1 μl)

- това пикой на електрофората...

\rightarrow Трансформантите и сеел по 75 μl : на LB + Amp PSB1A3
на LB + Che J23110

и на 37°C overnight

- за чупе сеел от GFP-Tetr promoter or негиро dsna
кобуна в 5ml LB + Che

24.09.17

Stock Tet:

~~1000 tetra~~ ~~1000~~ ~~1000~~ ~~1000~~ ~~1000~~
1000 ~~1000~~ ~~1000~~ ~~1000~~ ~~1000~~

12 mg / ml на е коту. на Tet

— От Tet вземаме 1 μ l и го добавяме в 1 ml d.H₂O \rightarrow така го разреждаме 1000 пъти.
От разрежения Tet вземаме 10 μ l и ги добавяме към 10 ml клетки (които са 100 μ l от метките overnight + 10 ml LB)

PCR с Pfu

1. 3 μ l d.H₂O
2. 40 μ l 5x Phusion HF Polymerase Buffer
3. 1 μ l d.NTPs (10mM)
4. 2,5 μ l VR (10 μ M)
5. 2,5 μ l VF2 (10 μ M)
6. 2 μ l ~~Phusion HF Polymerase (2U/ μ l)~~ Pfu polymerase
7. 1 μ l DNA (от overnight⁹ на една колонка)

95°C - 1 min

95°C - 0,30 min

60°C - 30 sec

72°C - 3,5 min

72°C - 5 min

8°C - ∞

} 35x

REC

25.09.17

- miniprep на pSB1A3
сгушване с 50µl

- фрагмента CRISPR gRNA vector разгответване 1:10
(1µl от H₂O + 9 H₂O)

- пра̀имерите BioBrick_Suffix-R и BioBrick_Prefix-F
сггво и разгответване 1:10 (5µl пр. + 45 H₂O) до
10µl

PCR с Phusion:

1. 10µl Phusion 5x HF Buffer
2. 1µl 10mM dNTPs Mix
3. Primer Suffix-R 2,5µl (10µM)
4. Primer Prefix-F 2,5µl (10µM)
5. Phusion Polymerase (2U/µl) 0,5µl
6. 32,5 µl d.H₂O
7. 1µl Matrix (~~pSB1A3 miniprep~~ CRISPR gRNA vector)

98°C - 30s

98°C - 10s

58°C - 20s

72°C - 30s

72°C - 5 min

8°C - ∞

} 25x

- 1% en: 2µl - 2µl homemade mix
3µl PCR prod + 2µl H₂O + 1µl TB

2 μ l - homemade ^{30ng/ μ l} marker - ~~2~~ 2 μ l
 3 μ l - DNA size standard ~~5~~ 5 μ l
 4 μ l - pSB1A3 - 5 μ l + 1 μ l Φ
 5 μ l - CRISPR gRNA - 5 μ l + 1 μ l Φ

60 - 134
 V - 123, 89
 T - 114

$$V_{\text{marker}} = \frac{123 \cdot 60}{134} = 55,15 = 11 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$V_{\text{pSB1A3}} = \frac{89 \cdot 60}{134} = 39,15 = 7,9 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

$$T = \frac{114 \cdot 60}{134} = 51,15 = 10 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

Лигаза р-на:

3 μ l от pSB1A3 (25ng/ μ l) - опашкава канарка
 4 μ l T (CRISPR gRNA)
 4 μ l Ligase Buffer
 0,5 μ l T4 Ligase
 8,5 μ l d.H₂O
 - 30 min на 42 $^{\circ}$

→ трансформираме в DH5 α (100 μ l ca)

како след като ги избацим компетентните КР
от фризера, ест+ 10 min на 42 $^{\circ}$

- DH5 α + 10 μ l лугасна р-уs
- DH5 α + 5 μ l J23110 promoter

- сеен на LB + Amp по 75 μ l и на 37°C

27. 09.17

- mini-prep на dCas9 (векторс ^(HUKO кониен) каталично мортвета Cas9), елчурале с 35 μ l, а центрифугирането на кл. с overnight е 2 x 2 ml.
- компетентни кл. Cas9 (gib тип), сеен 50 ml на 25 μ l che (говито по малка конц. che!) аликооти по 100 μ l и на -80°C (100 μ l)

2 петрица LB + Amp (1 μ l/ml) + IPTG (15 μ l на 100 ml петри) и X-gal (15 μ l на 100 ml петри).

- В DH5 α - трансф. с T-вектор на (с Amp) и 8 μ l р-уs с 705 or P5/L1 or 2017 диспердицианта (на che e)

- на трансформантите по 500 μ l SOC и сел трансформиранис T-вектор на 2 петрица с Amp, IPTG и X-gal по 75 μ l трансформант, а ~~7~~ P5/L1 на che, също 75 μ l и на 37°C

↓
Supernova

28.09.18

Трайни култури:

- със също митсе (се вземат 300 μ е ^(глицерин) глицерол (* като преди това митсето се ренне на бърха защото е много вискозен) + 700 μ е културална течност. Ресуспендира се бавно няколко пъти, защото глицеролът е много вискозен и тежък и пара на самото. Запразват се шоково направо на -80°C (ако има тежък азот, се слагат в него и после на -80°C)

- миниър на р5В1К3:

- центрофуг. на 10000xg за 2min. 2x 2ml кл. култура
 - елираже = 50 μ е

- от погрешката от веза от 27.09. с Amp + X-pal + IPTG
 вземаме 4 бели колонии (успешни трансформанти)
 и ги сеем на 5ml LB + 5 μ е Amp (общо 4 колонии) на
 плочка на 37 $^{\circ}\text{C}$

29.09.17.

- mini prep та 1 и 2 от overnight-a

- рестрикция та 1, 2 и pSB1K3: по 2 побор-
реша са босо (по 20 μe)

20 μe р-и

1. 7 μe бекс / фрагмент
2. 2 μe 0-buffer
3. 1 μe PstI
4. 1 μe EcoRI
5. 9 μe dH₂O

- също 6^{-та} р-и за 1h та 37°C

1^{та} р-и: 1^{ст} - 5 μe маркер
(полеми ст.)

2^{ст} - 40 μe п-а pSB1K3 + 8 μe ПБ

3^{ст} - 40 μe п-а 1 + 8 μe ПБ

4^{та} - 40 μe п-а 2 + 8 μe ПБ

~~Визуализация~~

- от 1 → 2 р-и по 20 μe, 14 μe плазма
mini prep 20 μe р-и (x2)

1. 14 μe плазма
2. 2 μe 0-buffer
3. 1 μe PstI
4. 1 μe EcoRI
5. 2 μe dH₂O

cell → transformation от cell → novo 1/1 cell →

1) master - 2 μ l om home made marker

2) master 5 μ l Vgel K 1 μ l Duryumo
5 μ l gRNA insert + 1 μ l buffer Duryumo
cut

30.09.17

- mini prep на 1 (в 2 еденици по 2 ml като първо центрифугиране на културата в 2 порции), емфазе с 50 μ

- рестрикция в 6 x 20 μ l рич

1-та 20 μ l рича

1. 14 μ l плазма
2. 1 μ l PstI
3. 1 μ l EcoRI
4. 2 μ l O-buffer
5. 2 μ l d.H₂O

и 1h на 37°C

- 2 x 2 ml шеваме и стават 3 рича с по 40 μ l

1 % gel с племни стартове:

2 ст - маркер 5 μ l

3 ст - инсерта (карман) 40 μ l + 8 μ l ПБ

4 ст - - - -

5 ст - - - -

- решен от гел:

- от щитите и дайте колонии с Г-вектора и с
5 колони с даи колонии на LB+Amp

01.10.17

PCR за културите от веза (5^{-10}) с Phusion polymerase.

1. 4 μ l Phusion HF Buffer

2. 0,4 μ l dNTPs Mix

3. 1 μ l M13R

4. 1 μ l M13F

5. 1 μ l маркера (култура)

6. 0,2 μ l Phusion polymerase

7. 12,4 μ l d.H₂O

- 5 energy + 1 mix

98°C - 30s

98°C - 10s

72°C - 30s

57°C - 30s

72°C - 5min

8°C - ∞

} 30x

- 2% гел: 2a - 2,5 μ l маркер

3a - проба 1 (5 μ l) + 1 ПБ

4a - проба 2 - || -

5a - проба 3 - || -

6a - проба 4 - || -

7a - проба 5 - || -

8a - проба 6 - || -

- няма фиксация!

- мини-преп на ~~1, 2, 3, 4~~

- повтаряме PCR-а с програмата:

98°C - 30s

98°C - 10s

72°C - 30s

50°C - 30s

72°C - 5min

8°C - ∞

} 30x

на 2% гел 2 ст 25ме маркер

3 ст - 1 проба - 1

4 ст - 2 - 11

5 ст - 3 - 1

6 ст - 4

7 ст - 5

8 ст - K

- няма фиксация!

мини-преп от 1 до 4 на електрически нагревател: 2x2те/
елуциран с 50%
/

02.10.17

PCR с Phusion:

- | | |
|--|--------|
| | x6 |
| 1. 4 μ l Phusion HF Buffer | ✓ 24 |
| 2. 0,4 μ l dNTPs | ✓ 2,4 |
| 3. 1 μ l M13R | ✓ 6 |
| 4. 1 μ l M13F | ✓ 6 |
| 5. 1 μ l mixture (от минипрепа на 1, 2, 3 и 4) | - |
| 6. 0,2 μ l Phusion Polymerase | 1, 2 |
| 7. 12,4 μ l d. H ₂ O | ✓ 74,4 |

Контрола: T вектор (mini prep) - 15 μ g колони е (15 μ l 1915 баса)

98°C - 30s

98°C - 10s

72°C - 30s

50°C - 30s

72°C - 5min

8°C - ∞

} 30x

- ка 2% гел:
- 2 ст. - 2,5 μ l маркер
 - 3 ст. - проба 1 (15 μ l) + T6 (1 μ l)
 - 4 ст. - проба 2 - 11 -
 - 5 ст. - проба 3 - 11 -
 - 6 ст. - проба 4 - 11 -
 - 7 ст. - K (T вектор от mini prep)

ММ не... не са тези абаци, колко ни пробват

PCR с ~~Tag~~ Tag

2 p-uu no 50 μ l с Tag polymerase :

настройка - 2 μ l от разрешения gRNA

Colony:

PCR на gRNA с Tag

50 μ l p-uu (2 p-uu)

1. 5 μ l Tag Buffer (10x)
2. 5 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
3. 1 μ l dNTPs (10 mM) Mix
4. 1 μ l Prefix F (10 μ M)
5. 1 μ l Suffix R (10 μ M)
6. 0,2 μ l Tag polymerase (5U/ μ l)
7. ~~0,2~~ μ l d.H₂O = ~~0,2~~ 34,8
8. 2 μ l настройка CRISPR gRNA (разрешения)

		за 10 μ l:
Mix:	1,2 Tag Buffer	1
(за 120 μl)	1,2 $MgCl_2$	1
	2,4 dNTPs Mix	0,2
	2,4 μ l Prefix	0,2
	2,4 μ l Suffix	0,2
	0,48 μ l Tag polymerase	0,04
64,32	0,2 d.H ₂ O	5,36
	настройка 2 μ l	2

95°C - 4min	95 - 1min
9	95 - 30s
	60 - 30s } 25x
	72 - 1min
	72 - 5min
	8 - ∞

Разрешаване на фрагмента CRISPR gRNA!

9 μl d.H₂O + 1 μl CRISPR gRNA (250ng)

и се използва 25ng фрагм.

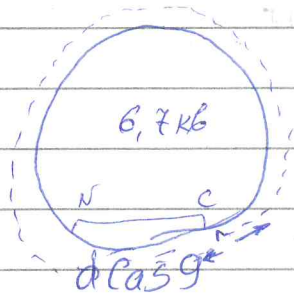
- 2 1/2 реа: 1ст - 2,5 μl маркер
2ст - 5 μl прота + LITB

- мн. става убива

- overnight PCR: пак с Tag и gRNA, 3x50 μl; KO програмата е?

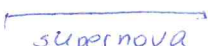
5 μl Tag Buffer	95 - 1min
5 μl MgCl ₂	95 - 30s
2,5 Preffix	60 - 30s } 30x
2,5 Suffix	72°C - 1min
0,2 Tag Polymerase	72 - 5min
3x2,5 d.H ₂ O	8 - ∞
2 μl маркера	

04.10.17.



линеализиран вектор с overhangs (~20bp)



+  - генератор свободни радикали при 60°C в дне

в DMSO

- overnight PCR на 1% ген: 2 старт - 2,5 μl маркер
3 старт - 5 μl продукт и т.б

40 - 28

x = 104

x = 148/5 = ≈ 30 pp/μl

- ^(Supernova) на overnight и ^(dCas9) върнатите параметри по 1 μl
(са Supernova DpnI и на 37°C за 1h

- компетентни DMSO



- производство вектора и инсерта, сее регулирането с DmT , елиране с $35 \mu l$

- на 0,8 % гел: 2 старт - $20 \mu l$ от homemade mixture
3 старт - $5 \mu l V + 1 \mu l I$
4 старт - $5 \mu l I$

60 - 4d

V - 56

I - 111

d Cas9 $V = 16 ng/\mu l$

Supernova $I = 31 ng/\mu l$

Aqua cloning

5 μl V

1 μl I

4 μl H_2O

1h на $37^\circ C$
10 μl лигаста plus

- трансф. в $DH5\alpha$ и сее $35 \mu l$ (2 петриета)
с Che

4 μ е: као РЦ⁹ са SuperNova с VR и VF2
 4 μ е DpnI коу рк-9 и 30-40 мин према
 базе с кит и ретен Φ Xba и pSTI¹; пре
 реобаве с колотка и опрегеноме холта гел

Pter промотора (премаст и гласан) \rightarrow с
 хеои мурган Nova!

- 80-90ng pTet
- 70-80ng Supernova
- 4 μ е Lipase buffer
- 0,5 μ е T4 lipase
- 20 μ е dH₂O

45 min на 37°C

- с 10 μ е трансф. в DMSO \rightarrow нежна с CHE и
 м губаване вбб фолно и на 37°C

05.10.17

PCR са SuperNova:

1. 2,5 μ е VR
2. 2,5 μ е VF2
3. 4 μ е dNTPS dNTPS
4. Phusion HF Buffer - 10 μ е
5. Phusion Polymerase - 0,5 μ е
6. Supernova - 1 μ е
7. H₂O - 30,5 μ е

98 - 30"

98 - 10"

60 - 30"

72 - (3.30)

72 - 5'

8 - ∞

} 35x

пресекта това време е било за
фрагмент ~ 6x6, а таму си сега е КВС

- Третураме с DpnI за ^{40 min} ~~1h~~ на 37°C (1 μl DpnI към 50 μl-вата р-из)
- пречистваме с кит, елуираме с 3.5
- ренем с Xba и PstI за 1h

Деструкция с Xba и PstI (30 μl)

8 μl плазма
1 μl Xba
2 μl Pst
3 μl Tango Buffer
16 μl d.H₂O

→ 1h на 37°C

← пречистваме с кит

→ на 0.8% гел: 25 μl маркер
3 μl - 5 μl Superna + 1 μl EtB

- ceeu overnight or aqua monobere 6 16 dnacota
no 2 me left 2 me the (8 dnac. sa egora nepu u
8 sa egora)

40 - 204
x - 194

x = 8 ng/μl - na 0,75 kb

06.10.17.

Разрешаваме прамерите с TE буфер
Prefix и Suffix

PCR с Phusion на g-RNA (50 μl)

- 1 10 μl Phusion HF Buffer
- 2 1 μl dNTPs Mix
- 3 2,5 μl Prefix
- 4 2,5 μl Suffix
- 5 0,5 μl Phusion Polymerase
- 6 32,5 μl d-H₂O
- 7 1 μl Matrix g-RNA

98°C - 30s
 98°C - 10s }
 62°C - 30s } 30x
 72°C - 30s }
 72°C - 5min
 8°C - ∞

- 1% гел: 1 старт - каркер
 2 старт - проба

Colony PCR с Tag и cAMP, праџк
 PCR с Tag на 16^{-те} overnighta от Agua
 клетките

15 μl plus (за 20 пробu) - 300 μl M1x

- ✓ 1. 30 μl Tag Buffer
- ✓ 2. 30 μl M1x
- ✓ 3. 6 μl dNTPs
- ✓ 4. 15 μl ~~the~~ dCas9-C-F (2,5 μl за 50 μl plus)
- ✓ 5. 15 μl SuperNova R
- 6. 1,8 μl Tag Polymerase (започвам на 2 μl)
- ✓ 7. 18 μl, 2 μl dH₂O
- 0. 1,5 μl Matrix (M1x/30)

95°C - 1min
 95 - 30s }
 60 - 30s } 30x
 72 - 1min }
 72 - 5min
 8 - ∞

- на 0,8% тер пускане презистенция gRNA и вектора pSB1K3 (Restructured)

2a - 2,5 μ l моркер

3a - gRNA - 2,5 μ l

4a - pSB1K3 - 8 ng/ μ l

PCR с Cloning Prefix и suffix (overnight)

50 μ l (2x)

- 1. 2,5 μ l Cloning Prefix
- 2. 2,5 μ l Cloning Suffix
- 3. 1 μ l dNTP
- 4. 10 μ l Phusion HF Buffer
- 5. 0,5 μ l Phusion Poly
- 6. 3 μ l, 5 - d.H₂O
- 7. 1 μ l Matrix - Killer Orange

98 - 30 сек

Mini SOC

98 - 10 сек

60 - 30 сек } 30x

72°C - 30 сек

72 - 15 min

8° - ∞

07-10-17

- 1 % rel : 2 craps - 2,5 µl marker
- 3 craps - 5 µl Killer Orange
- 4 craps - Mini soc

PCR c Pfu

50 µl

- 1. 5 µl Pfu Buffer
- 2. 1 µl dNTPs
- 3. 2,5 µl Colony ~~Pfu~~ dCas9
- 4. 2,5 µl Colony Supernova
- 5. 2 µl Pfu poly
- 6. dH₂O - 32 µl
- + 5 µl Matrix

20 µl
x 20

350 µl
mix

→ x 7 = 35 µl Pfu Buffer
 7 µl dNTPs
 17,5 µl Colony dCas9
 15,5 µl Colony Supernova
 14 µl Pfu poly
 224 µl d.H₂O
 - 5 µl Matrix na bocka ot 10⁻⁷ + 1
 K (cano Mix)

95 + 1min

95 - 30s

58 - 30s

72 - 2min

72 - 5min

8 - ∞

} 30x

Разгетраме 10x на праимерите
5-Colony-SuperNova-R и на
5-Colony-d.las9-C-F
45μl H₂O + 5μl праиме

Дугазка fus: pSB1K3 и SuperNova

Сметки

70-80ng вектор (2KB вектор)

3:1 в колорно отношение

орна-2006

2006-pSB1K3

SuperNova-7006

4μl T4 ligase buffer

0,5μl T4 ligase

7,5 ~~μl~~ μl pSB1K3 вектор (80ng) - 2006

8μl SuperNova - 8ng (μl)

⚡

Мисазка 7 и 8 (2)
с pSB1K3 и gRNA

2000B ^{pSB1K3} V = 10 μ l (80ng)

200B ^{gRNA} T = 1 μ l (15ng μ l e)

4 μ l - 14 lip Buffer

0,5 - 14 μ gase

4,5 μ l - d. H₂O

- и 2-те мисазки ричи та ст. 1^o за 1b

- 0,8% и та керо от PCR-а 2, 9 и 14 проба
от pfu PCR-а (вижте останали са се употребили...)

2 ст - проба 2

3 ст - проба 9

4 ст - проба 14

5 ст - K(-)

- ендоф е сунепл

- Трансформи мисазките ричи в DH5 α , с 50ng SOC

- Overnight PCR с Cloning праймери

та Killer Orange и

Mini SOC

~~1-20-16~~
20-16

50 μ e p-us:

1. 10 μ e Phusion HF Buffer
2. 1 μ e dNTPs Mix
3. 2,5 μ e Cloning prefix
4. 2,5 μ e Cloning suffix
5. 0,5 μ e Phusion Polymerase
6. 32,5 μ e d-H₂O
7. 1 μ e Matrix - Killer Orange
Mini SOC

98 - 30s

98 - 10s

62 - 30s } 30x

72 - 30

72 - 5

8 - ∞

type SuperNova για σε μικρά c Tet
προμοτορ!

κλωθρε οτ Aqua κλωνοπατηρο
κα dcas9 u SuperNova.

- 3^{te} κλωθα οτ γηος : 2, 9 u 14 μ e σετ κα Tetra
LB + Che overnight

- pSB1C3 κα Che - 20 μ e οτ κεν
α pRNA SuperNova κα 75 μ e κα KA u ψ κα 37°C

08.10.17

PCR на Killer, Mini и SuperNova,

- после на преустановка и електропроводност;
те Killer и Mini

Killer Orange - 23 ng/μl
Mini SOC - 27.5 ~~ng~~ ng/μl

Aqua domine

5 μl Vector dCas9 - PCR amplified
1,5 μl Killer O
3,5 μl H₂O

5 μl Vector dCas9 - PCR amplified
1 μl MiniSOC
4 μl H₂O

09.10.17

Deu

- 1% ren: 1 cr - 2,5 μl наркер
2 cr - 2 проба до №
3 cr - 2 up до №

- 4 - ηροδα 3
- 5 - ηροδα 4
- 6 - i - 5
- 7 - ii - 6
- 8 - οτ κοιδετс, 1 NO (2-19 κοιδετс)
- 9 - οτ κοιδετс, N=2 (9-19 κοιδετс)
- 10 - οτ κοιδετс, N=3 (14-19)

- ηΙΣΝη ΗΜΚΟ Α

- miniprep ηα 1, 2, 3 η 4 (κοιτοβε ηα psb1k3
te RNA)
 - εγχεραμε с 50 με

PCR с Phusion

2 ηυη ηο 50 με (οδωο 10,00 ηαηηηηα)	ηη
1. 10 με Phusion Buffer	20
2. 1 με dNTPs	2
3. 2,5 με RNA Colony	5
4. 2,5 με VR	5
5. 0,5 με Phusion poly	1
6. 3,5 με d.H2O	65
7. —	—

ηηηη ηα 5 x 19 με οτ ηηηη-η η 6 ~~18~~ οτ
 ηηηη ηο 1 με ηαηηηηηη (οτ 1, 2, 3 η 4)
 + 5 ηηηη ηη

98°C - 30s
 98°C - 10s
 58°C - 30s } 30x
 72°C - 30s
 72°C - 5min
 8°C - 0

- 1, 2, 3 & се истарчили, останиле са само 4 и K

- 1% гел, 2 ст - 2,5 маркер
 3 ст - проба # 4
 4 ст - проба # K
~~5 ст - проба 3~~
~~6 ст - проба 4~~
~~7 ст - K~~

- постои иша ивица (мислам!))

- повтораме PCR-a

Олег Николаев PCR
с Phusion

тези от минипрепа по-рано

- по 1 мк плазмид + 4 мк H₂O, за да
разредат пробите и от разрежданата
извазват 1 мк како матрица

~~- и K се рSBIK3 (разреден, како
портите)~~

PCR за pSB1K3 + gRNA (за 4 клона)
100µl p-ua (Mix) за 5 пробе по 20µl:

- 1 20 µl Phusion HF Buffer
- 2 2 µl dNTPs
- 3 5 µl Colony gRNA
- 4 5 µl VR ()
- 5 1 µl Phusion Polymerase
- 6 65 µl d. H₂O ()
- 7 1 µl магниця

~~0.5 µl of~~ pSB1K3 (25ng/µl) като кот-
трона (с зелена капачка), също разреждан 1µl с
4 µl d. H₂O и от разреденото 1µl като магниця за K+

98°C - 30s

98 - 10s

58° - 30s } 30x

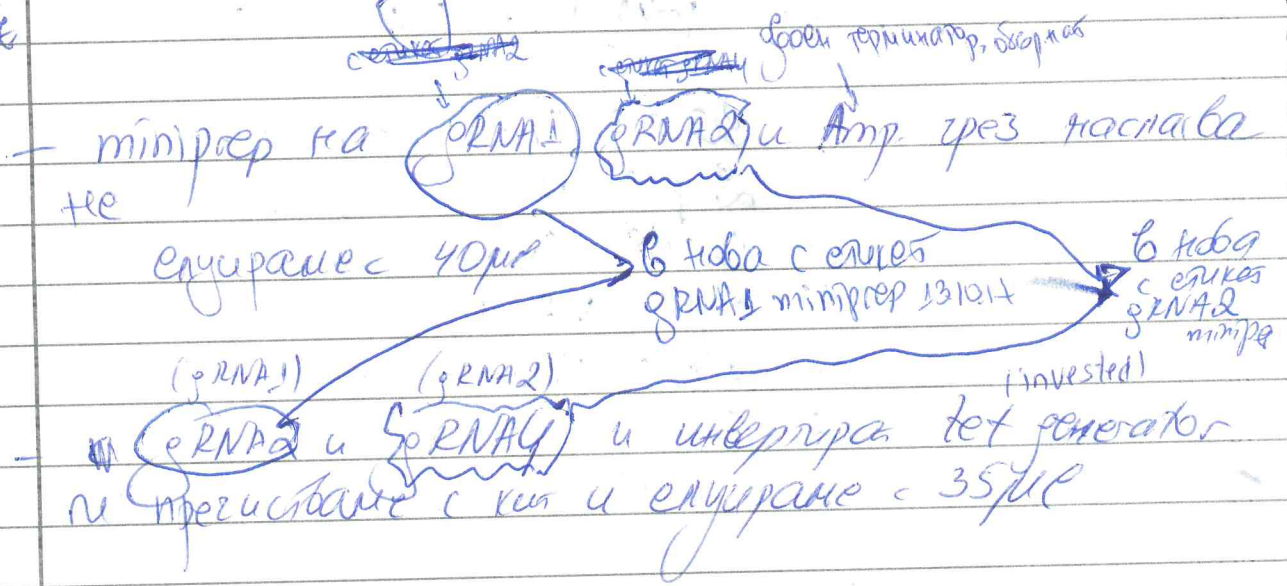
72 - 30s

72 - 5 min

8°C - ∞

RNA

11.10.12



Рестрикуция

~~Spe I и Pst I - pSB1A2 double T~~
~~Xba I и Pst I - invested tet Generator~~

- 10µl pRNA 2 и 4
- 7µl DABCO
- 20µl Green Buffer (10x)
- 1µl Eco 31I

- 37°C 3a 1h

Restriction

30 μ l:

SpeI - 1 μ l

PstI - 2 μ l

3 μ l - Tango Buffer

(pSB1A2 doublet) Amp. vector (or mini-prep extract) - 20 μ l
4 μ l d.H₂O

XbaI - 1 μ l

PstI - 2 μ l

Tango Buffer - 3 μ l

(perucensis) Tet inverted generator - 15 μ l
d.H₂O - 9 μ l

~~1h~~
- за 1h на 37°

след това (на 50 min) към това със SpeI и PstI
слагам 1 μ l алкална фосфатаза и за
40 min на 37°C (ТБ вкупно ми: fast AP)

- преизобавяне рестрикциите със SpeI и PstI и XbaI + PstI с клет, елиминация с 30 μ l
- 1% тел:

~~преизобавяне на XbaI и SpeI, елиминация с 30 μ l
клет - 2, 4 по 10 μ l; не елиминация 2, 4 + напрежда
и SpeI и XbaI по 5 μ l~~

- 2 старт - 2,5 μ е матрица
- 3 старт - miniprep gRNA 2 (5 μ е) + 1 ПБ
- 4 старт - miniprep gRNA 4 (5 μ е) + 1 ПБ
- 5 старт - gRNA 2 (+ Eco31I (10 μ е)
- 6 старт - gRNA 4 (+ Eco31I (10 μ е)
- 7 старт - pSB1A2 gaddT + Spe + β t (5 μ е) + 1 ПБ
- 8 старт - Tet invert... + Xba + Pst (5 μ е) + 1 ПБ

Посевание на ^{1 и 2} gRNA в 5 ml LB + 5 μ е КА
на 37°C на клеточка.

12.10.17

- 7 старт - проба 31 ng / μ е
- 8 старт - проба 34 ng / μ е

— то 10 μ е d.tad + колония и в бремен 2 μ е
како матрица за Colony PCR с Pfu (25 коло-
нии на пробу како X score \rightarrow Mini SOC (LB + Che)

da 50µe p-usi

550
da 520 µe
x 11

- | | |
|---------------------------|------|
| 1. 5 µe Pfu Buffer | 55 |
| 2. 1 µe dNTPs | 11 |
| 3. 2,5 µe Colony mini SOC | 27,5 |
| 4. 2,5 µe dCas9 | 27,5 |
| 5. 2 µe Pfu polymerase | 22 |
| 6. - | |
| 7. - | |
- 2 µe Matrix

Colony PCR Pfu

95 - 1min
 95 - 30s
 54 - 30s } 30x
 72 - 2
 72 5, 8-∞

3920 µe

- | | |
|--|---------|
| 1. Pfu Buffer - 2 µe | ✓ 52 |
| 2. 2,5 1 µe Colony mini SOC | ✓ 26 |
| 3. 1 µe dCas9 | ✓ 26 |
| 4. dNTPs - 0,4 | ✓ 10,4 |
| 5. Pfu Poly - 0,4 | ✓ 10,4 |
| 6. dH2O - 12,2 | ✓ 317,2 |
| 7. 2 µe (Mampunya) | ✓ 2 |



Микастка φ-из

Ветеринарне V и I
(70-80ng: 70-80ng = V : I)

1. 2,5 μl (31 ng/μl) pS B1A2 double T + Spe + PstI
2. 2,5 μl (34 ng/μl) Tet insert + Xba + PstI
3. 4 μl T4 ligase buffer
4. 0,5 μl T4 ligase
5. 11,5 μl H₂O

- на ст. T за 45 min

- трансформираме 10 μl от микастката plus в DH5α

- селек на LB + Amp.

PCR-a на 2 гена по 1 in с по 15 старта

1 ст: 1 ст - 2,5 μl микастка

2 ст: 2 ст - 1 проба

3 ст: 2 ст - 1 ст

4 ст: 3 проба

5 ст: 4 проба

6 ст: 5 проба

7 ст: 6 проба

8 ст: 7 проба

9 ст: 8 проба

10 ст - 9 прода
11 ст - 10 прода
12 ст - 11 прода
13 ст - 12 прода
14 ст - 13 прода
15 ст - 14 прода
16 ст - 15 прода

2 сен, 1 ст - ~~16 прода~~ маркер

2 ст - ~~17~~ 16 прода

3 ст - 18 прода

4 ст - 19 прода

5 ст - 20 прода

6 ст - 21 прода

7 ст - 22 прода

8 ст - 23 прода

9 ст - 24 прода

10 ст - 25 прода

11 ст - 26 прода

12 ст - К

13.10.17

PCR с Pfu на Killer Orange

- 1/6 сек полем и напки стартове

1 старт: 2,5 мс маркер

2 старт: прода 1

3 старт: прода 2

4 старт: прода 4

5 старт - проба 6
6 старт - проба 7
7 старт - проба 10 ~~8~~ → покатителт 9
8 старт - проба 11
9 старт - проба 12
10 старт - проба 25
11 старт - проба K

- Рестрикуция 50 μ е гуса на gRNA1

30 μ е gRNA1 miniprep

5 μ е Fast Digest Buffer

3 μ е Eco3AT

12 μ е d-H₂O

- на 37°C за 1,30h.

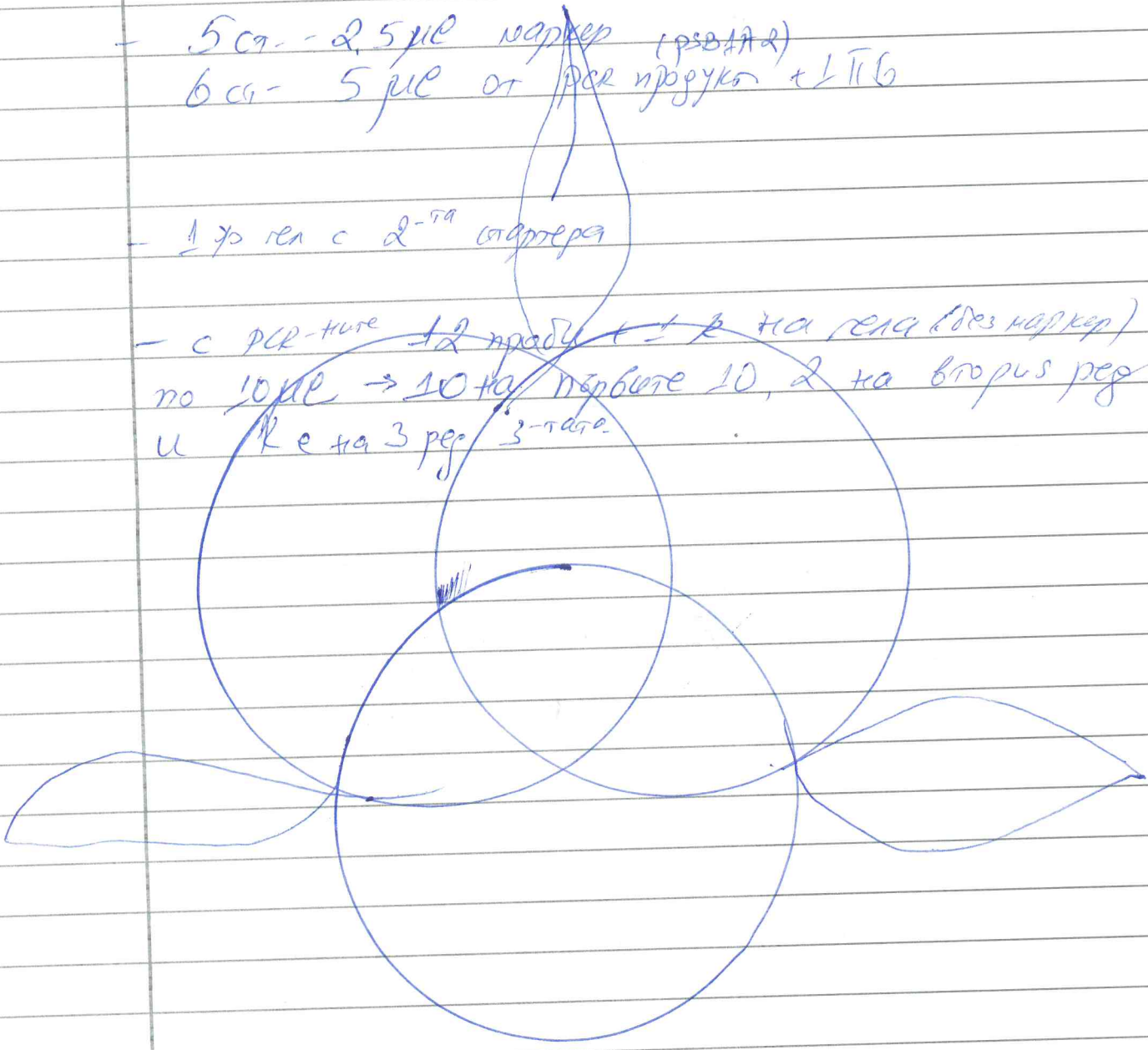
- преципитация с мет, етиран с 50 μ е

17.10.17.

- 5 ca - 2.5 μ е маркер (psbA1A2)
6 ca - 5 μ е от PCR продукт + \downarrow ПГБ

- 1 μ о реа с 2^{-та} степеня

- с PCR-тире 12 пради + 1 μ о на реа (без маркер)
по 10 μ е \rightarrow 10 μ о първите 10, 2 μ о втори пер
и 1 μ о на 3 пер 3-тага.



18.10.17

- сепи на ~~реформа~~ с Kan FtsZ gRNA - 3 и 4
цупа (3 е кода gRNA1, а 4 е gRNA2)
- съдържание в lnc pSB1C3, gRNA 6 Kan и още 1
в lnc

19.10.17

- miniprep на pSB1C3⁺ dCas9 Killer Droplet (+)
колонија, FtsZ gRNA1 и FtsZ gRNA2 (супраи
с 50 μ e) ↓
трайта 60 ↓
трайта 61
- леву пуска удубител PCR! 5 (1000 проба)

- 2 x 1% леву с гласо старто. На ренис за пускен
и на левуи gRNA (3 μ e - 2 μ e от home made маркера)

20.10.17

- PCR
- 1% леву с малки стартове за 2^{-т} PCR
проба.

Killer Orange - 95 μ e, прегригване с кит,
Mini SOC - 95 μ e / елициране с 50 μ e

В PSB1C3 трябва да се клокира ⁴ тип
Умаме miniпрер на PSB1C3.

overnight PCR

За UTR:

- ① 2x inverte Tet/R generator е на overnight PCR-a: събираме (в б 1, 5 μ e на ген с маркер 2, 5 μ e и тарсим убива 700-800 bases (uly 1000 и 700-800 - елицирана част убива!))
- ② - преработваме към сместа 2 μ e fast Digest DpnI и на 37°C за 45 min.
- ③ - прегригваме го с 1 колонка елициране с 150 μ e, тапиства се с good и се замръзва на гърбевата статив
~~Умаме Tet промотор - с GFP и Tet пром.~~
~~и mRFP - 18x да се тапиства с~~
~~за да се редиректази~~

21.10.17.

PCR с Tag на g.RNA

① PCR с рекомбланта Tag на колонии от 3^{-та} пет-рифта с g.RNA (3, 5 и 13). От всяко вземаме по 12 колонии и всяка разредяме в 10 μ е d.H₂O.

15 μ е р-и → Използваме матрица 0,75 μ е.

За 50 μ е р-и:

1. 1 μ е dNTPs Mix

2. 2,5 μ е primer VR

3. 2,5 μ е primer VF (за съответната гводейка)

4. 10 μ е Tag buffer

5. 0,25 μ е Tag polymerase

6. 33 μ е d.H₂O

7. 0,75 μ е матрица

30x

94°C - 30s

94°C - 20s

53°C - 30s

68 - 1,20

68 - 5

8 - ∞

② overnight PCR-a на Tet R generator (2x 5 μ е PCR-ки). Смесваме PCR-ките в 1. И от сместа пускामе на 1/10 пел пускаме 5 μ е проба + TTB и 2,5 μ е маркер

2 start-маркер

3 start-проба

Снимка на кимо на съответната флуорес.

Към сместа добавяме 2 μ е Fast Digest DpnI и на 37°C за 45 min.

Според 10 μ е кимо от маркера →

40 - 37

x - 130

7506.

x = 28 ng / μ е

③ Минипреп на psB1C3 ретчен:

Рестрикуция (20 μ e p-us)

PCR-ките Mini SOC и Killer Orange
само не ретчен:

4 р-ии за вектора
по 2 реакции (общо 4 на фрагмент)

psB1C3	Mini. SOC	Killer Orange
7 μ e вектор	10 μ e фрагмент	10 μ e фрагмент
2 μ e O Buffer	2 μ e O Buffer	2 μ e O Buffer
1 μ e PstI	1 μ e PstI	1 μ e PstI
1 μ e EcoRI	1 μ e EcoRI	1 μ e EcoRI
9 μ e d.H ₂ O	6 μ e d.H ₂ O	6 μ e d.H ₂ O

Слагаме 8-те р-ии на 37°C за 1h.

Проба 2 гела по 0,8%. Ериция с полени
стартове, ериция с малки.

Рестрикуцията не смесваме: 2x2 и така имам
2 проби на V (psB1C3) и 1 проба Mini SOC, 1 проба
Killer Orange. Всяка по 40 μ e беле

- Рестрикциите на вектора и пуцкан на големите
 стартове. (50 min. геле)
 1 старт - 2,5 μ e маркер
 3 старт - едната рестрикция (40 μ e) +
 8 μ e ПБ
 5 старт - другата рестрикция (40 μ e) +
 8 μ e ПБ.

- Рестрикциите на фрагментите и ~~пуцкан~~ ^{презистван}
~~ка малките стартове~~ с кит (еуциран с 50 μ e) и пуцкан
 на гела с малките стартове (50 min. геле)
 2 старт - 2,5 μ e маркер
 3 старт - 5 μ e kit + 50c + 1 μ e ПБ
 4 старт - 5 μ e kit + Orange + 1 μ e ПБ

Векторите и презистван от гел и определени ко-
 личеството на 1 го гел.

② Tet R generator сеп срззвателно също го пре-
 зистван с кит (еуциран с 50 μ e) и го срззвателно

③ Презистван вектора от гел:
 Добавяме бучер L3 към гела в отношение
 3:1 (бучер: гел) (гелът е 0,07 μ e. Добавяме им по 210 μ e L3
 Термодлока на 50°C.

слатане им ~~ка~~ за 10 min на термодлока
 после към всяко добавяме по 70 μ e изопропанол (1 volume
 isopropanol : 1 volume gel)

Смедван и прехвърлям в/у колонка. Цетрофун-
рещи за 1 min на $\rho = 14000 \times$. И т.к. то протокол...
случаи с 50 μe

⑦ Семи от трайна култура номер 86400 в
5 ml LB + Tet и на 37°C

⑧ Семи от трайна култура в кондис

№ 38 - на Che + LB

№ 40 - на LB + Che

№ 63 на LB + Kan

№ 64 на LB + Kan

} на 37°C

! 64 всъщност е 62!

③ Според плана, рестрицираните MiniSOC и Killer
Orange определено количества:

40 - 124

K - 186

M - 156

Mini SOC е ~~10~~ ~~ng/ml~~ 10 ng/ml

Killer Orange е ~~ng/ml~~ 11,5 ng/ml, ~7000

Пускам векторите на 1/5 реа с homemade маркер,
(карто и хипотезите проди от PCR-а с Tag

1 реа - 1 старт маркер (2, 5 μ el)

2 старт - pSB1K3 (през от реа) 5 μ el + 1 ПБ

3 старт - pSB1K3 (през от реа) 5 μ el + 1 ПБ

4 ст. го 10 + 6th полени - проди от перлу 3 (поизкозда ек)
(по 10 μ el след с ПБ)

4

2 реа - 1 са. маркер - 2,5 μ el

2 ст. го 13 - проди от перлу 5, 14 старт - K

3 реа - по солу⁸ тазит като 2 реа, но с перлу 13

(11) Банасаме overnight PCR с Phusion polymerase
(2x 50 μ el):

1 μ el dNTPs

VF - 2,5 μ el

VFR - 2,5

~~32~~ 32,5 dH₂O

10 HF Phusion Buffer

0,5 Phusion poly

1 μ el pSB1K3 + pRNA1 (os 8.10.14)

98 - 30s

98 - 10s

60 - 30s

72 - 1 min

72 - 5 min

8 - ∞

} 35x

3) Кон определение на вектора (структура # 21101 final vectors)

$$\begin{aligned} & \# 40 - 150 \\ & v_1 = 97 \\ & v_2 = 109 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} v_1 &= 5n_0 / \mu e \\ v_2 &= 5n_0 / \mu e \end{aligned}$$

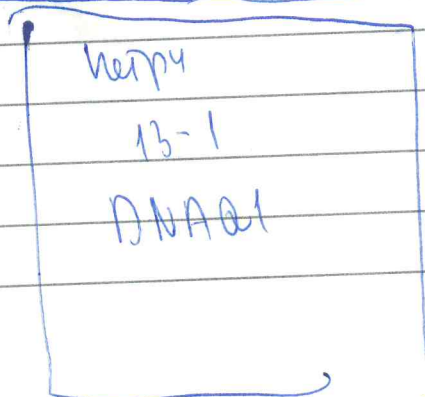
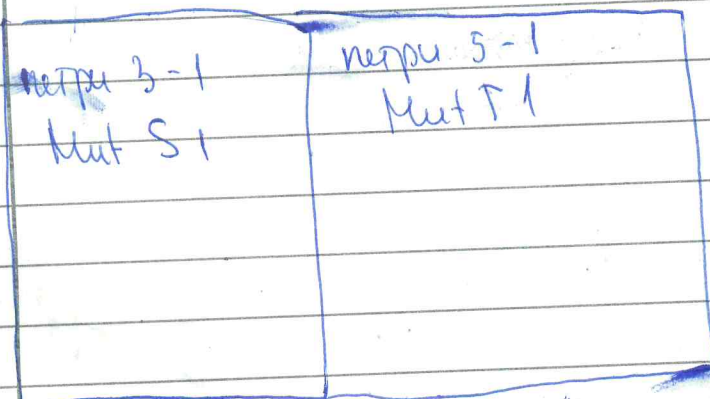
Тезни кутурпу: (с кон)

1, 4 → 3-1 (непр) т.е. от непр 3, пресбаане колонки 2 и 4

2, 3 → т.е. от непр 5 пресбаане колонки 2 и 3

3 и 5 → т.е. от непр 13 пресбаане колонки 3 и 5

На сликата от 21.10.17 final



22.10.14

Липазта р-иа с Killer Orange (20 μg)
V(pSB1(3)) ~ 20000, 50 ng в реакция, V:I=1:3

~~5. 10. 3 =~~
~~2 1~~

0,5 μg T4 Lipase
4 μg Lipase Buffer
5 μg I^U Killer Orange (11,5 ng/μg, 70000)
10 μg V (pSB1(3), 5 ng/μg, 20000)
0,5 d H₂O

Липазта р-иа Mini SOC :
V(pSB1(3)) ~ 20000 — 10 μg (5 ng, 20000)
2,5 μg I^U Mini SOC (10 ng/μg, 30000)
0,5 μg Lipase
4 μg Buffer
3 μg d-H₂O

Троби култури от : петри 3, колония 2 (66 №)
петри 3, колония 4 (67 №)
петри 5, колония 2 (68 №)
петри 5, колония 3 (69 №)
петри 13, колония 3 (64 №)
петри 13, колония 5 (65 №)

(64, 65, 66, 67, 68 и 69)

Минипреп та кунуруне от петрута 3, 5 и 13
и та BFP и RFP с Tet
↓ ↓
40 38

Минипреп и та 62 и 63

- лигазиата пул трансф. в ДН5α
и сеем 75 μl на петру с Che

- сеем на LB+Tet от Трансфата та белус ставб.

23.10.17.

- петрута с Che и Kan.

Kan ~~1:1~~ = 1:1 LB

Che = 20 μl che / 3 ml LB

т.е. за 100 ml среда = $100 \cdot \frac{2}{3}$

- разпределение 64, 65, 66 - 69 минипрепите (в 10 μl
H₂O ставаме 1 μl от минипреп)

- Трансформирание от тях 1,5 μl в ДН5α

24.10.17.

↑
срззан с XbaI и SpeI
- преврштвам inverted tet generator с кот, енурпам с 50 μ е

- на PCR-^{HSV} продукт - 1 μ е Fast Digest DpnI и на 32° за 45 min

- преврштвам от рел psb1c3 (срззан с XbaI и SpeI, премурпам с алкална фосфатаза). У 10 нукаме на 1% рел

2 ст - homemade maprep - 3 μ е (30 ng/ μ е)

3 ст - psb1c3 (срззан с XbaI и SpeI)

4 ст - T tet generator (срззан с XbaI и SpeI)

psb1c3 = 15 ng/ μ е, Inv. tet gen = 10 ng/ μ е

- PCR-^{HSV} продукт, ^{10%} слез Dpn-I 10 преврштвам с кут (енурпам с 50 μ е)

11.03.17. p-09

4 μ е V' срззан psb1c3

6 μ е I (срззан inverted tet generator)

4 μ е T4 buffer

5,5 μ е atso

0,5 μ е Lipase

- на 37° за 45 min

- парамб 6 DMSO

26.10.17

Miniprep

5 - Mini SOC - CA

19 - gRNA1 + pSB1C3

20 - gRNA + pSB1C3

11 - mini soc + CA

18 - Killer Orange + CA

21 - Killer Orange + CA

1 - Cas9

27.10.17

PCR C Phusion (tet inducible)

50 µl plus:	x 4
1. 2.5 µl VR	10
2. 2.5 µl Taq polymerase	10
3. 4 µl dNTPs	4
4. 10 µl HF Buffer	40
5. 2.5 µl Phusion Poly	2
6. 32.5 µl dH ₂ O	130
7. 0.5 µl matrix	-

распределением 6 12 проб по 15 мс и по 0,5
матрица

98°C - 30"
98 - 10" } 30x
60 - 30" }
72 - 30"
92 - 2'

- на 1/2 ден с 2-на серия

- на 3 мс пробен дублер и по 10 мс по серия

1а - д. 5 мс маркер

2а - проба 1

3а - проба 2

4а - -11-3

5а - -11-4

6а - -11-5

7а - -11-6

8а - -11-7

9а - -11-8

10а - -11-9

11а - -11-10

12а - -11-11

13а - -11-12

Справка 26.10.173

28.10.17

- beskroem PCR

29.10.17

- miniprep 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78
79, 80, 81, 82, 83, 84, 85

71 - J1(2)

72 - #J1(3)

73 - J-2

74 - #J2(2)

75 - opp(2)

76 - Mut 2

77 - Mut

78 - opp3

79 -

80 -

81 -

82 -

83 -

84 -

85 -

! Ha 73 crouter 2x 250 µl lysis solution!

29.10.17

Деструкция

10 реакции

V

①
FtsZ + pRNA1
SpeI - 1 μ e
PstI - 2 μ e
Tango Buffer - 3 μ e
плазмид - 15 μ e
H₂O - 9

②
FtsZ + pRNA2
SpeI - 1 μ e
PstI - 2 μ e
Tango Buffer - 3 μ e
плазмид - 15 μ e
H₂O - 9 μ e

T

③
pSB1C3
XbaI - 1 μ e
PstI - 2 μ e
Tango Buffer - 3 μ e
матрица - 10 μ e
H₂O - 14 μ e

④
pSB1C3
XbaI - 1 μ e
PstI - 2 μ e
Tango Buffer - 3 μ e
матрица - 10 μ e
H₂O - 14 μ e

V

⑤
плазмид 79 (J23102 promoter)
SpeI - 1 μ e
PstI - 2 μ e
Tango Buffer - 3 μ e
плазмид - 15 μ e
H₂O - 9 μ e

⑥
плазмид 79 (J23102 promoter)
SpeI - 1 μ e
PstI - 2 μ e
Tango Buffer - 3 μ e
плазмид - 15 μ e
H₂O - 9 μ e

7

(7)

71 (9J23(1) клон 2)
 XBaT - 1 μe
 PstT - 2 μe
 Tango Buffer - 3 μe
 матрица - 10 μe
 H₂O - 14 μe

(8)

72 (9J23(1) клон 3)
 XBaT - 1 μe
 PstT - 2 μe
 Tango Buffer - 3 μe
 матрица - 10 μe
 H₂O - 14 μe

(9)

73 (9J23(2) клон 1)
 XBaT - 1 μe
 PstT - 2 μe
 Tango Buffer - 3 μe
 матрица - 10 μe
 H₂O - 14 μe

(10)

74 (9J23(2) клон 2)
 XBaT - 1 μe
 PstT - 2 μe
 Tango Buffer - 3 μe
 матрица - 10 μe
 H₂O - 14 μe

- температура за 1h и 10¹¹ рестрикции

- трехкратные 4 в 3 и 6 в 5.

~~- при работе не использовать 20 μe~~

- проверка по 200 μe H₂O
 т.е. в 1, 2, 7, 8, 9 и 10 по 140 μe H₂O
 в 3 и 5 по 140 μe H₂O

- присутствие всех 8^{ти} проб: (с кодами клон
 с матрица матрица матрица матрица Thermo Scientific)

- энзимы с 20 μe

Ha 1 % rep:

1 cr - 5 μ e naprep
2 cr - 2,5 μ e nroda 1 + 2,5 μ e 20 + 1 μ B
3 cr - 2,5 μ e nroda 2 - 11 -
4 cr - - 11 - 3 - 11 -
5 cr - - 11 - 5 - 11 -
6 cr - - 11 - 7 - 11 -
7 cr - - 11 - 8 - 11 -
8 cr - - 11 - 9 - 11 -
9 cr - - 11 - 10 - 11 -
~~10 cr - - 11 -~~

сано та 2, 3, 4, 5 и 9 cr. УМ

80 - 59

2 cr FtsZ1 - 54

3 cr FtsZ2 - 62

4 cr pSB1C3 - 111 (снова убивал)

~~5 cr pSB1C3 - 111~~

~~6 cr - 111~~

9 cr pJ23/2/m.2 - 52

Результате са:

FtsZ + gRNA 1 = 29 ng/ μ e

FtsZ + gRNA 2 = 34 ng/ μ e

pSB1C3 = 60 ng/ μ e

pJ23/2/m.2 = 28 ng/ μ e

Lucifera p-uo-

①

V FtsZ + pRNA1 - 75ng - 2,5 μ l

T pSB103 (amplificator) + PCR u. capsid + xba u. pst I - 1 μ l

T4 ligase buffer - 4 μ l

T4 ligase - 0,5 μ l

12 μ l H₂O

②

V FtsZ + pRNA 2 - 75ng - 2,5 μ l

T pSB103 (amplificator) + PCR u. capsid + xba u. pst I - 1 μ l

T4 ligase buffer - 4 μ l

T4 ligase - 0,5 μ l

12 μ l H₂O