

23 de agosto 2007

Se comenzó la elaboración de la bitácora

Medio LB Broth, Billar (Luria-Bertani)

25gr/litro

Se preparó 500 mililitros agregando 12.5 gramos

Se diluyó y esterilizó por autoclave

Medio LB agar Blend S-Gal

15gramos/litro 0.5

Se prepare 300 mililitros mas 9.4575 gramos

Se diluyó y esterilizó por autoclave

Se esterizaron también los tubos para sembrar en la autoclave del taller de hongos.

29 de agosto del 07

1. Recuperar biobricks. (Protocolo iGEM)

- I. 15microlitros de agua esteril, perforar el pozo y diluir.
- II. Se tomaron 2 microlitros para la primera transformación.

$15-2=13/2=6.5$ microlitros stock a  $-70^{\circ}\text{C}$ , el resto se guardó a  $4^{\circ}\text{C}$ .

29/agosto/2007.

-Agregamos 15microlitros de agua inyectable, haciendo una punción sbre la cubierta de cada pozo. El contenido se recupera después de pipetearlo varias veces y se almacena en un tubo eppendorf.

2.- Transformación de células competentes.

- En tubos eppendorf limpios y estériles para cada plásmido separamos 2 microlitros del stock.\*
- Centrifugamos para bajar cualquier gota que se haya adherido a la pared del tubo approx. 15 segundos a 70rpm.
- Descongelamos las celulas competentes ( 50microlitros por ensayo; 9 tubos en total) aproximadamente 10 min en hielo.
- Mientras tanto, apartamos una fracción de medio LB estéril sin agitar con la pipeta.
- Incubamos con agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  y a 150rpm durante 90 min.

\*Los stocks se guardan a  $4^{\circ}\text{C}$  en el refrigerador.

3 Septiembre 07

1. Resultados de la transformación: A cada caja se les agregaron 100microlitros de las células recuperadas.

521A : Toda la caja tapizada de bacterias transformantes, brillan con luz UV. Fluorescencia verde. (Colonias no se separaron, muchas células)

522 : Toda la caja tapizada de bacterias, unas transformantes brillaron con luz UV.  
Fluorescencia verde.

450 : Toda la caja tapizada de bacterias transformantes, Las colonias no se separaron. Si hay fluorescencia verde.

Control: Todo lleno de bacterias.

104 : Todo lleno de bacterias.

430 : Todo lleno de bacterias.

521b : Se hizo duplicado.

526: Todo lleno de bacterias.

Segunda transformación:

1. En esta ocasión se tomaron 4microlitros del stock de DNA / iGEM para cada plásmido.
2. 50microlitros de células competentes + 4 microlitros de cada plásmido.

104 : Se deshidrató el DNA; se agregaron 3.5microlitros de agua destilada.

Control 1A3

521a

521b

450

430 : Se rehidrató el DNA; se agregaron 3microlitros de agua destilada.

526b : Se hidrató DNA; se agregaron 6.5microlitros de agua destilada.

522

3. Mezcla de bacterias + DNA 20 min en hielo.

3 sep 07

Concentración de Ampicilina deseada en el medio 100miligramos/litro.

Concentración de Ampicilina en solución inyectable 500miligramos/2mililitros.

$2/5 = 0.4$

Necesito 0.4 ml de Ampicilina en solución inyectable por cada litro de medio.

Tomar 100microlitros de Ampicilina cuya concentración es 500mg/2ml.

Pentrexyl Bristol-Myers Squibb.

Ampicilina 500mg/2ml.

4 Septiembre 07

Resultados transformación:

Control 143 25 microlitros: 11 colonias.

430 (GFP) 25 microlitros : 1 colonia.

430 (GFP) 15 microlitros: 1 colonia.

526 (RFP) 25microlitros: 0 colonias.

104 (GFP) 25 microlitros: 0 colonias.

521 b (RFP) 25 microlitros: 0 colonias.

450 (RFP) 25 microlitros: 20 colonias.

521 a (RFP) 15microlitros: 1 colonia.  
522 (GFP) 5 microlitros: 1 colonia.  
522 (GFP) 25 microlitros: 4 colonias.  
450 (RFP) 10 microlitros: 7 colonias.  
521 a ( RFP) 25 microlitrs: 2 colonias.

Se guardaron a 4°C

13 Septiembre 07

Transformación

Biopartes: resuspender en 15 microlitros de agua.

Rtet	Kitplate1	5c – Amp
RluxR	Kp1	7a – Amp
PluxR	Kp1	9g – Amp
AAHL	Kitplate 1	5o – Amp
APai	Kitplate 2	7i – Kan
PLasR	Kitplate 1	19n – Amp
RLasR	Kitplate 2	7k – Kan



\*Se tomaron 4 microlitros de 15 microlitros + 50microlitros de células competentes a 4°C por 20 minutos.

Se siguió el protocolo de los días anteriores (células competentes de promega / pGEM-T and pGEM-T easy vector systems).

Nota:

El medio LB estaba contaminado y se suspendió el experimento: se recuperaron las células (centrifugación a 13,000rpm x 2 min) y se platearon en cajas con LB/Amp. Incubación a 37°C o/n 50 microlitros por caja.

14 Septiembre 07

Resultados: Recuperación del experimento perdido el día anterior.

Rtet: -----

RluxR: 87 colonias.

PluxR: -----

AAHL -----

PLasR: 83 colonias.

13 Septiembre 07

Se hizo un gel de azarosa 0.7% (0.204g +30ml).

Muestras:

- 1.  $\lambda$  1 microlitro + 1 microlitro de colorante 1 microlitro = 25ng de DNA
- 2. 521b
- 3. 522b
- 4.- 522a
- 5. 430
- 6. 450b
- 7. 450a
- 8.521a

Corrida a 100V urante 30 minutos.

Resultados.

- 1.  $\lambda$  : 25ng
- 2. 521b: 10ng
- 3. 522b: 10ng
- 4.- 522a: 23ng
- 5. 430: 23ng
- 6. 450b: 15ng
- 7. 450a: 15ng
- 8.521a: 15ng

17 Septiembre 07

Transformación.

Biopartes:	Plate	Antibiótico
Rtet	Kp1 5c	Amp
PLuxR	Kp1 9g	Amp
RLuxR	Kp1 7a	Amp
AAHL	Kp1 5o	Amp
Apai	Kp2 7i	Kanam
PLasR	Kp1 19n	Amp
RLasR	Kp2 7k	Kanam

- 1. Se tomaron 5 microlitros de cada una + 100 microlitros de células competentes (Mayo 2005). Incubación a 4°C durante 20 minutos

Nota: Las células competentes fueron preparadas en 2005. no se sabe cual es la eficiencia.

- 2. Choque térmico a 42°C durante 50 segundos. Agregar 900 microlitros de medio LB. Antes incubar 2 min a 4°C. Incubar en agitación 150rpm a 37°C durante 1.5 minutos
- 3. Para platear previamente se preparan cajas con medio LB-Agar + Kanamicina: concentración 50microgramos/ml de medio.

Kanamicina Bristol  
Kantrex sol. Inyectable

1g/3ml  
1 microgramo / 3 microlitros

La ampolleta contiene sulfato de Kanamicina.

4. Centrifugar 1 minuto los tubos con células transformadas, quitar 900 microlitros de medio, resuspender lento y tomar 50 microlitros y platear. Incubación a 37°C o/n

18 Septiembre 07

Resultados de la transformación:

- En todas la cajas plateadas no crecieron colonias.
- Se prepararon células competentes.

Se crecieron clonas para purificar DNA:

RLuxR  
PLasR

10ml medio LB + una colonia + Amplicilina [50 microgramos / ml].  
Incubación a 37°C o/n en agitación a 150rpm.

19 Septiembre 07.

1. Se purificó DNA utilizando el Kit.  
Clonas RLuxR y PLasR  
Cada una se resuspendió en 60 microlitros de agua.

24 Septiembre 07

Para purificar DNA se sembraron las clonas

- (1 tubo) JM109 para preparar células competentes.  
(1 tubo) RtetR Bioparte/Amplicilina.  
(2 tubos) Control IA3 plásmido/Amplicilina.  
Amp: 250miligramos/ 100 microlitros.

1. 10 ml de medio LB estéril + 4microlitros Amp  
100mg – 1000 ml  
1mg – 10ml  
1000 microgramos – 1000 microlitros

50 -100 microgramos/ml

250mg – 100 microlitros  
10mg - x = 4 microlitros x 3 =12 microlitros

2. Sembrar clona con asa estéril.
3. Incubación o/n a 150 rpm/37°C

Para resembrar clonas:

100 microgramos Amp/ml LB  
 1000 micogramos - 10ml  
 1mg – 10ml  
 4mg – 40 ml  
 Stock 250 mg/100 microlitros  
 4 microgramos = 1.6 microlitros

28 Septiembre 2007

500ml LB + Agar for plates

500ml ddH2O  
 12.5g LB broth Miller

Una vez disuelto agregar 7.5 g de Bacto-Agar  
 Disolver en microondas y autoclavear  
 Dejar enfriar y agregar antibiótico

10:30am

3 Octubre 2007

Precipitar - Concentrar DNA

Añadir 1/10 de NaOAc 3M  
 Agregar 2.5 vol. De EtOH abs.  
 Dejar reposar 10 min. en hielo  
 Precipitar 30 min. centrifugando a 13000 rpm  
 Remover el sobrenadante sin llevarse el pellet  
 Añadir 50 microlitros de EtOH 70% - 75%  
 Pipetear suavemente 3 veces sin despegar el pellet  
 Remover el EtOH  
 Secar 10 minutos  
 Resuspender en 10 microlitros de ddH2O

Bioparte	Volumen inicial (microlitros)	NaOAc (microlitros)	EtOH abs. (microlitros)
Plásmido control 1A3	374	37.4	1028.5
430	87	8.7	239.25
522	173	17.3	475.75
450	238	23.8	654.5
521	166	16.6	456.5
PLuxR	60	6	165

PLasR	60	6	165
-------	----	---	-----

- Centrifugar el precipitado 30 min. a 13000 rpm
- Remover el sobrenadante sin llevarse el pellet
- Lavar con 50 microlitros de EtOH al 70% frío
- Remover el etanol y dejar secar destapado 10 min.
- Resuspender en 10 microlitros el pellet con ddH<sub>2</sub>O
- Guardar a -20°C

Sol. Stock NaOAc 3M (PM 20.5)  
24.6 g n 6 ml pH 5.2      Autoclave

17 Octubre 2007

Para precipitar DNA  
Por clona: 120 microlitros

120 microlitros + 12 microlitros NaOAc 3M = Vol. Total 132 microlitros  
132 microlitros + 330 microlitros de EtOH

10 min. en hielo 4°C  
Centrifugar 30 min. a 13000 rpm  
Secar a temperatura ambiente 10 min.  
Lavar 50 microlitros EtOH frío al 75% (2x)  
Secar a temperatura ambiente 6 min.  
Resuspender en 10 microlitros de ddH<sub>2</sub>O

17 Octubre 2007

- 1.- Gel de agarosa 0.7%
- 2.- Corrida 100 volts durante 40 min.

1 microlitro de muestra + 1 microlitros de colorante

1. Ladder
2. PLuxR
3. PLasR
4. Control 1B
5. 450b
6. 522b
7. 430
8. 521<sup>a</sup>

18 Octubre 2007

Se hicieron stocks de AK3, AC3, AT3 y GA3.

Se purificó DNA con el kit de esos cuatro cultivos.

Se precipitó el DNA de los mismos cuatro cultivos.

Medición de plásmidos

PLuxR	11 ng/ml -
PLasR	21 ng/ml +
450b	77 ng/ml +
522b	65 ng/ml +
430	37 ng/ml -
521 <sup>a</sup>	21 ng/ml -

Notas: Se calibró con 3 microlitros de DNA del plásmido control 1B (iGEM) en 1ml de low range solution  
Control 1B – 39 ng/ml

19 Octubre 2007

1. Gel de agarosa 0.7% + TBE 1x
2. Corrida de gel 100 volts durante 45 min.

- 1.4A3 1 microlitro
- 2.AC3 1 microlitro
3. AK3 1 microlitro
4. AT3 1 microlitro
5.  $\lambda$ HindIII 2 microlitros

No salió

Transformación para comprobar eficiencia de células transformantes preparadas el día 3 de Octubre 07

Transformación  
Control 1B  
Plásmido 2K3 [Kanamicina]

1. 2 tubos de células por muestra + 3 microlitros de DNA
2. Se usó el mismo protocolo
3. Para platear se quitaron 850 microlitros de medio y en el restose resuspendieron las células y sembraron en cajas con medio LB Agar + 100 microgramos/ml de Amp
4. Incubación 3 días a temperatura ambiente.

22 Octubre 2007

Cultivo de clonas 450, 522, 430, 521 y JM109 para hacer ensayo.  
5ml LB + stock

Stock Amp  
250 mg – 100 microlitros  
2.5 mg - x = 1 microlitro



1 mg – x = 0.4 microlitros

100 microgramos – 25 ml  
2500 microgramos – 25 ml  
2.5 mg – 25 ml  
1000 microgramos - 10 ml  
1 mg – 10 ml

