




**TP BIOLOGIE DE  
SYNTHESE**

3BB 2020



# Conception et caractérisation d'un dispositif de contrôle de la production de nanofibres

## Contexte

La biologie de synthèse est basée sur l'assemblage de composants génétiques à l'exemple de l'assemblage des composants électroniques d'une tablette. Cette révolution dans la manière de concevoir et produire dans une usine vivante s'appuie sur trois piliers qui ont fait leurs preuves dans de nombreux domaines d'ingénierie : la conception assistée par ordinateur, la standardisation et l'abstraction. Elle permet de produire plus vite, plus efficacement et à moindre coût.

Pour illustrer cette approche, nous allons nous intéresser à la production de fibres amyloïdes. Ces fibres sont produites naturellement par les microorganismes. Elles protègent les cellules vivantes des agressions environnementales sans empêcher les échanges vitaux avec le milieu. Ces fils naturels sont formés de composants unitaires à l'image des perles d'un collier. Chaque composant, ou perle, est codé par une séquence d'ADN sur laquelle peuvent être greffés des implants conférant à la perle de nouvelles propriétés et fonctionnalités aux applications infinies (ex : capture de métaux ou de polluants, diagnostic sur molécules excrétées, libération de molécules soins ou protectrices).

La conception des implants et leur greffe sur les séquences d'ADN naturelles utilise la biologie de synthèse. Dans une première étape, nous allons caractériser un promoteur fort permettant de contrôler la production d'une fibre amyloïde par un simple changement de température : **le promoteur curli est en position ON à 30°C et OFF à 37°C**. Pour cela, un gène rapporteur conférant la capacité de fluorescence sera placé sous contrôle de ce promoteur en comparant deux méthodes : 1) design in silico et 2) clonage SLIC.

## Objectifs du TP

- Mettre en œuvre la démarche expérimentale pour contrôler la qualité d'un plasmide contenant une construction ADN d'intérêt commandé à un prestataire.
- Réaliser la bioamplification de l'ADN réceptionné. Analyser in silico les données de séquençage ADN fournies par le prestataire.
- Réaliser la tenue d'un cahier de laboratoire. Lors de ces travaux pratiques, votre mission sera de comparer l'option synthétique (conception in silico de la construction ADN et appel à un prestataire pour la synthétiser) à l'option « wet lab » (amplification PCR et clonage en laboratoire du produit PCR) en terme d'efficacité, pénibilité et coût.

# Agenda

## JOUR 1

### 8h-12h

- Topo introductif, visite de la plateforme Microbiologie
- Principe de la transformation des bactéries : phases de la croissance, compétence chimique vs électrocompétence, sélection des transformants
- Contrôle qualité du processus de transformation : notion de témoins (positif et négatif)
- Préparer la manipulation : établir un logigramme, liste du matériel et des appareils nécessaires, localisation et disponibilité
- Tenir son cahier de laboratoire : quelles informations ?
- Mise en culture des souches n°1 (MC4100 *ompR234*) ou n°2 (NM522) pour la transformation

### 14h-18h

- Préparation des cellules compétentes, transformation avec pCGS04 prestataire
- Analyse de la séquence ADN fournie par le prestataire. Comparaison de séquences à l'aide du logiciel Serial Cloner pour identifier et vérifier la séquence du plasmide et du gène d'intérêt. Eléments remarquables (gènes de résistances aux antibiotiques, origine de réplication...). Cartographie de restriction. Mettre en œuvre la démarche expérimentale pour le contrôle de la qualité de la séquence d'ADN fournie.
- Température et milieux de stockage de l'ADN (eau, TE)
- Méthodes d'analyse de l'ADN : séparation sur gel d'agarose (paramètres clé : concentration d'agarose, type de tampon, voltage) et préparation des échantillons à déposer (solution de dépôt)
- Paramètres clés dans la digestion de l'ADN (appariement tampon/enzyme, pipetage de solutions visqueuses, température et temps d'incubation)
- Digestions enzymatiques de contrôle (pCGS04=pSB1K3-Pcurli-RBS-GFP (KanR) à digérer par EcoRI et PstI, analyse des conditions de double digestion, contrôles simples digestions.
- Remplir le cahier de laboratoire

## JOUR 2

### 8h-12h

- Coulage d'un gel d'agarose à 0,7%
- Migration des plasmides digérés et non digérés sur gel d'agarose
- Prise en main du système d'imagerie et d'analyse Chemidoc : marqueurs de taille, estimation de la taille des fragments de restriction, quantification de la quantité d'ADN.
- Révélation de l'ADN grâce au bromure d'ethidium. Lecture au Chemidoc
- Analyse du gel (ADN superenroulé, cercle ouvert vs linéaire, nombre de fragments = nombre de site de restriction)

### 14h-18h

- Principe de la PCR
- Contrôle de la qualité de la PCR : notion de témoin positif et négatif
- Optimisation de la réaction de PCR : rôle du MgCl<sub>2</sub>, température d'hybridation, ratio matrice/amorces
- Conception (design) des amorces
- Réaction de PCR sur ADN génomique (MC4100 1μL) ou p50 (=pCSG4 ApR 1μL), contrôles
- Mise en culture des transformants issus de la transformation effectuée à J1. Notion de collections.
- Remplir le cahier de laboratoire

## JOUR 3

8h-12h

- Préparation de l'analyse sur gel de la réaction de PCR
- Principe d'extraction de l'ADN plasmidique, kits commerciaux
- Coulage gel d'agarose à la concentration appropriée pour la détection du produit de PCR.
- Coulage gel d'agarose à la concentration appropriée pour l'analyse des plasmides amplifiés in vivo
- Miniprep ADN plasmides amplifiés in vivo
- Scale-up (mini, midi, mega Prep)

14h-18h

- Digestion enzymatique de l'ADN des minipreps
- Migration des ADN digérés et non digérés sur gel d'agarose
- Révélation bromure d'éthidium et lecture Bioprofil ou Chemidoc
- Migration des produits de PCR et des contrôles
- Analyse des gels
- Remplir le cahier de laboratoire

## JOUR 4

8h-12h

- Principe de clonage, méthode SLIC
- Test fonctionnel : définir l'approche expérimentale pour tester la fonctionnalité du pCGS04 commandée au prestataire
- Clonage SLIC: détermination des quantités d'AND insert (produit de PCR) et vecteur (pIG57= pSB1K3-RBS-GFP, KanR) au Nanodrop et sur gel d'agarose, préparation du mix réactionnel. Digestion EcorI du pIG57.
- Mise en culture pour la transformation

14h-18h

- Préparation des cellules compétentes, transformation, étalement sur milieu sélectif
- La régulation de l'opéron curli

## JOUR 5

8h-12h

- Mise en culture pour test fonctionnel du promoteur d'intérêt en cinétique
- Prélèvements réguliers pour dosage GFP
- Les gènes rapporteurs GFP et leurs dérivés
- Les fusions de transcription
- Dosage GFP sur boîtes au Chemidoc
- Dosage des prélèvements effectués au cours du matin au fluorimètre Chameleon

14h-18h

- Prélèvements et dosages de l'après-midi
- Remplir le cahier de laboratoire
- Analyse de la cinétique d'expression du promoteur curli en fonction de la température (30°C ou 37°C)
- Bilan final

[http://bioenfapesp.org/bssb/images/bssb/DNA\\_Lab\\_website.jpg](http://bioenfapesp.org/bssb/images/bssb/DNA_Lab_website.jpg)



## Liste des réactifs et produits

### Bactéries et ADN

Plasmide PCGS04 portant la construction PCurli (intergénique=700bp)-GFP dans pUC57 (KanR)

Plasmide pIG57=TP57 portant la construction RBS-GFP dans pSB1K3 (KanR)

ADN génomique d'Escherichia coli productrice des nanofibres curlis

Souche n°1 d'Escherichia coli MC4100 ompR234 malT::Tn10 (TetR) = TP74

Souche n°2 d'Escherichia coli NM522 (aucune résistance) = TP60

### Réussir une digestion enzymatique

tampon de réaction 10X (frigo), enzyme de restriction Biolabs NEB (-20°C), eau ultrapure stérile (réserve)

### Réussir une PCR

tampon de réaction, MgCl<sub>2</sub>, amorces, Taq polymérase (-20°)

### Réussir une transformation

TSS (4°C), LB (réserve), boîte milieu riche avec antibiotique= GL (frigo)

### Réussir un gel d'agarose et une migration

TBE, agarose prépesé 2g (salle électrophorèse)

### Réussir une extraction d'ADN plasmidique

kit d'extraction Mascherey Nagel (4°C), TE stérile (tris 10 mM EDTA 1mM)

pH 8

### Réussir le clonage SLIC

PCR : PrimeSTAR Max DNA Polymerase

PstI

Boîtes GL Kan



# **Les recettes secrètes**

## Gel d'agarose et électrophorèse

### Principe

Ce type de gels permet de séparer différents fragments d'ADN linéaires. La séparation des fragments d'ADN se fait suivant leur taille par migration dans un gel d'agarose (à 0,7% pour des fragments de 0,5 kb à 15 kb environ). La migration se fait dans un tampon de migration à pH 8 sous un champs électrique; l'ADN étant chargé négativement à pH 8, il est attiré par l'électrode positive.

La vitesse de migration de l'ADN est déterminée par le voltage. La longueur du gel doit être choisie en fonction du pouvoir de résolution souhaité (ex : un mélange complexe de fragments de restriction doit être séparé sur gel long, un sous-clonage simple peut être vérifié sur minigel). La position des molécules d'ADN est révélée par coloration au bromure d'éthidium, qui se fixe à l'ADN et lui confère une fluorescence rose sous lumière ultra-violet. La coloration au Bet peut se faire directement dans le gel (mini gels) ou dans un bain à l'issue de la migration (grands gels). La taille des fragments est évaluée par comparaison à des ADN témoins de tailles connues.

### Electrophorèse

1- Préparer une solution d'agarose à 0,7% dans du tampon TBE dilué (1X) (90 mM Tris-Borate, 1 mM EDTA pH8). Attention: utiliser uniquement de l'agarose de haute qualité (Boehringer) pour récupérer les fragments d'ADN en vue d'un clonage (de l'agarose de mauvaise qualité peut conduire à des problèmes au cours de la ligation). NB : 15 ml ou 30 ml pour les minigels, 150 à 200 ml pour les grands gels.

2- Faire fondre l'agarose au four micro-onde en mélangeant souvent. Attention aux projections d'agar bouillant! laisser refroidir à 50-60°C (l'agarose se solidifie vers 40°C). Placer le peigne sur le support préalablement scotché. Couler le gel.

3- Lorsque le gel est solidifié (environ 15 min), retirer le peigne avec précaution. Oter le scotch, placer le gel dans la cuve d'électrophorèse et l'immerger dans le tampon TBE (1X). Le gel une fois coulé peut se conserver la nuit à quelques jours dans un film type emballage alimentaire.

4- Déposer chaque échantillon contenant 1/5 de volume de tampon de dépôt 5X (0,25% bleu de bromophenol, 0,25% xylène cyanol, 30% glycérol). Penser à déposer un marqueur de taille.

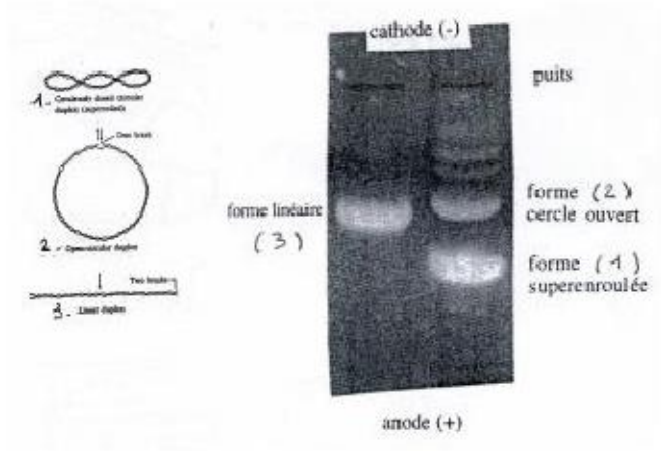
5- Démarrer la migration avec les pôles + et - correctement orientés, environ 5 Volts/cm de gel, jusqu'à ce que le bleu de bromophénol ait migré aux 2/3 du gel. Dans nos conditions, le bleu de bromophénol migre approximativement à la même vitesse que les ADNs de 300 bp, et le xylène cyanol comme les fragments de 4 kbp.

6- Si le gel ne contient pas de Bet, colorer par immersion 5 à 10 min dans un bain de bromure d'éthidium à 0,5 mg/ml, dans la boîte prévue à cet effet.

\* **Attention** : le bromure d'éthidium (Bet) est un mutagène puissant (au moins chez les bactéries), n'oubliez pas de mettre des gants et évitez d'en répandre.

La position des fragments d'ADN ayant fixés du bromure d'ethidium est révélée sous U.V.(310nm) et le gel peut être photographié avec le système BioImage

Révélation de l'ADN sous UV: utilisation du Chemidoc



**1 kb DNA Ladder**

NS232S 104120214021

**N3232S**

200 gel lanes (100 µg) Lot: 1041202 Exp: 2/14  
500 µg/ml Store at -20°C

1.5 ml Gel Loading Dye, Blue (6X) Store at 25°C

**Description:** A number of proprietary plasmids are digested to completion with appropriate restriction enzymes to yield 10 bands suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. The digested DNA includes fragments ranging from 0.5–10.0 kilobases (kb). The 3.0 kb fragment has increased intensity to serve as a reference band.

Supplied in: 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA.

**Reagents supplied:**  
6X Gel Loading Dye, Blue

**1X Gel Loading Dye, Blue:**  
2.5% Ficoll-400  
11 mM EDTA  
3.3 mM Tris-HCl (pH 8.0@25°C)  
0.017% SDS  
0.015% bromophenol blue

**Preparation:** The double-stranded DNA is digested to completion with appropriate restriction enzymes, phenol extracted and equilibrated to 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mM EDTA.

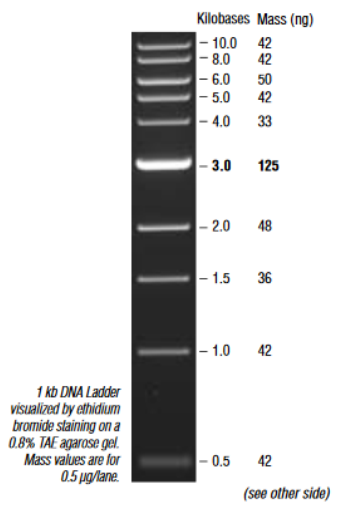
**Usage Recommendation:** The 1 kb DNA Ladder was not designed for precise quantification of DNA mass, but can be used for approximating the mass of DNA in comparably intense samples of similar size. The approximate mass of DNA in each of the bands in our 1 kb DNA Ladder is as follows (assuming a 0.5 µg loading):

Fragment	Base Pairs	DNA Mass
1	10,002	42 ng
2	8,001	42 ng
3	6,001	50 ng
4	5,001	42 ng
5	4,001	33 ng
6	<b>3,001</b>	<b>125 ng</b>
7	2,000	48 ng
8	1,500	36 ng
9	1,000	42 ng
10a	517	42 ng
10b	500	

**Notes:** All fragments have a 4-base, 5' overhangs that can be end labeled using T4 Polynucleotide Kinase (NEB #M0201) or filled-in using DNA Polymerase I, Klenow Fragment (NEB #M0210) (1). Use α-[<sup>32</sup>P] dATP or α-[<sup>32</sup>P] dTTP for the fill-in reaction.

1 kb DNA Ladder is stable for at least 3 months at 4°C.

For long term storage, store at -20°C. If samples need to be diluted, use TE or other buffer of minimal ionic strength. DNA may denature if diluted in dH<sub>2</sub>O.





## Digestions enzymatiques (selon fournisseurs)

<https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/nebuffer-performance-chart-with-restriction-enzymes>

## Préparation de cellules compétentes et transformation

### Principe

En 1970, Mandel et Higa ont observé que des bactéries traitées avec une solution de  $\text{CaCl}_2$  froid puis soumises à un bref choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  sont dans un état de compétence transitoire qui leur permet "d'ingérer" de l'ADN étranger (phage, plasmide...). Le protocole original permet d'obtenir  $10^6$  colonies transformées par  $\mu\text{g}$  d'ADN de plasmide superenroulé. Ce rendement a été amélioré jusqu'à  $10^8$ - $10^9$  colonies/ $\mu\text{g}$  en soumettant des souches améliorées d'*E.coli* à des cocktails de cations divalents, au DMSO et au chlorure d'hexamine cobalt. Le mode d'action de ces agents, tout comme le mécanisme de pénétration de l'ADN du plasmide dans la bactérie compétente restent mal compris. Quoi qu'il en soit, le traitement au  $\text{CaCl}_2$  affecte seulement l'attachement de l'ADN à la paroi extérieure. L'entrée de l'ADN dans le cytoplasme est stimulée lors du choc thermique à  $42^\circ\text{C}$  qui fluidifie la membrane cytoplasmique.

*E. coli* K12 est la souche-hôte la plus utilisée pour le clonage d'ADN. On utilise fréquemment des mutants *endA* (conduisant à l'inactivation de la principale déoxyribonucléase) qui permettent d'obtenir des préparations de plasmides de meilleures qualités.

### Préparation de bactéries compétentes

- Amener une culture bactérienne fraîchement inoculée à la  $\text{DO}_{600} = 0,3$  par une incubation à  $37^\circ\text{C}$  sous forte agitation
- Prélever 1mL de cette culture en début de phase exponentielle dans un tube Eppendorf stérile. Centrifuger 2 min à 8000 rpm.
- Eliminer complètement le surnageant et resuspendre délicatement les cellules dans 0,1mL de TSS FROID. Utiliser dans les quelques heures qui suivent.

### Transformation [(Faites un contrôle négatif (sans ADN) et positif (avec 100 ng d'un ADN connu)]

- ajouter l'ADN (plasmide, mélange de ligation) à 0,1 ml de bactéries compétentes
- incubé 10 min dans la glace
- Réaliser un choc thermique en plaçant le tube à  $42^\circ\text{C}$  pendant 50 secondes, replacer sur la glace
- ajouter 0,9 ml de BL
- incubé 1h à  $37^\circ\text{C}$
- Etaler 0,1 ml sur milieu sélectif (GL + Antibiotique + Xgal + IPTG si nécessaire)
- Centrifuger le reste, 2 min à 12000 rpm – Eliminer le surnageant – Reprendre le culot dans 150  $\mu\text{l}$  de BL –

Etaler sur milieu sélectif

- Incuber les boîtes 1 nuit à  $37^\circ\text{C}$
- rendement attendu:  $10^5$  à  $10^6$  CFU/ $\mu\text{g}$  d'ADN

### TSS (Transformation Storage Solution):

	pour 10 ml
PEG 3350 10%	1 g
MgCl <sub>2</sub> 10 mM	0,1 ml de 1M
MgSO <sub>4</sub> 10 mM	0,1 ml de 1M
DMSO 5%	0,5 ml
HCl 0,1N	environ 150 $\mu\text{l}$ pour un pH de 6,3*
BL	qsp 10 ml

\* Facultatif. L'ajustement à pH 6,3 permet d'optimiser le rendement de transformation mais n'est pas primordial.

## Q5™ Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix



M0494S 002120713071



1-800-432-7799  
info@neb.com  
www.neb.com

# M0494S



100 reactions (50 µl vol) Lot: 0021207

RECOMBINANT Store at -20°C Exp: 7/13

**Description:** The Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix features a high-fidelity, thermostable, hot start DNA polymerase with 3' → 5' exonuclease activity, fused to a processivity-enhancing *Seo7d* domain to support robust DNA amplification. The addition of an aptamer-based inhibitor allows room temperature reaction setup. With an error rate > 50-fold lower than that of *Taq* DNA Polymerase and 6-fold lower than that of *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) DNA Polymerase, Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix is ideal for cloning and can be used for long or difficult amplicons. The convenient master mix formulation is supplied at a 2X concentration. The mix contains dNTPs, Mg<sup>2+</sup> and a proprietary broad-use buffer requiring only the addition of primers and DNA template for robust amplification regardless of GC content. When used at the recommended 1X final concentration, the Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix contains 2 mM MgCl<sub>2</sub>. Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix is unlike typical, lower fidelity PCR enzymes. To determine the optimal annealing temperatures for a given set of primers, use of the **NEB T<sub>m</sub> Calculator** is highly recommended ([www.neb.com/Tmcalculator](http://www.neb.com/Tmcalculator)).

**Please Note:** A precipitate (most noticeable after the first 1–2 freeze/thaw cycles) is not uncommon. To ensure optimal performance, the master mix should be thawed and resuspended prior to use. Stability testing using up to 20 freeze/thaw cycles has shown no negative effect on master mix performance.

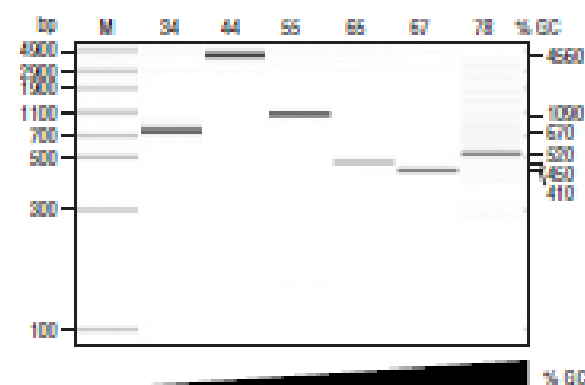
**Source:** An *E. coli* strain that carries the Q5 High-Fidelity DNA Polymerase gene.

### Applications:

- High-specificity PCR
- High-fidelity PCR
- Cloning
- Long or difficult amplification
- High-throughput PCR

**Reaction Conditions:** 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix, DNA template and 0.5 µM primers in a total reaction volume of 50 µl.

### Heat Inactivation: No



*Amplification of a variety of human genomic amplicons from *in vivo* high GC content using Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix. All reactions were set up at room temperature, conducted using 30 cycles of amplification and visualized by microfluidic LabChip® analysis.*

### Quality Control Assays

**7 kb Genomic DNA PCR:** 30 cycles of PCR amplification in a 50 µl reaction containing 20 ng genomic DNA with 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix and 0.5 µM of each primer result in the expected 7 kb product.

**20 kb Lambda DNA PCR:** 22 cycles of PCR amplification in a 50 µl reaction containing 10 ng Lambda DNA with 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix and 1.0 µM of each primer result in the expected 20 kb product.

**Hot Start-Specific Genomic DNA PCR:** 25 cycles of PCR amplification in a 25 µl reaction containing 50 ng genomic DNA with 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix in the presence of 0.5 µM of each primer result in the expected 665 bp product, free of non-specific amplification products after pre-incubation at room temperature for 1 hour.

**Note:** Product specifications for individual components in the Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix are available separately.

Oligos : Prom curli sens, Prom curli rev (1µL de primers dilués 1/10<sup>ème</sup>)

ADNg MC4100 (1 à 3 µL ou p50 1µL de plasmide dilué de 10 à 200 ng/µL)

**PCR**

Please note that protocols with Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix may differ from protocols with other polymerases. Conditions recommended below should be used for optimal performance.

**Reaction Setup:**

Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix is inhibited at room temperature, allowing flexible reaction setup (RT or ice).

All components should be mixed prior to use.

COMPONENT	25 µl REACTION	50 µl REACTION	FINAL CONCENTRATION
Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix	1.25 µl	2.5 µl	15 µL 1X
10 µM Forward Primer	1.25 µl	2.5 µl	1,5 µL du stock à 10µM
10 µM Reverse Primer	1.25 µl	2.5 µl	1,5 µL du stock à 10µM
Template DNA	variable	variable	1 µL d'ADNg
Nuclease-Free Water	to 25 µl	to 50 µl	Qsp 30µL

Notes: Gently mix the reaction. Collect all liquid to the bottom of the tube by a quick spin if necessary. Overlay the sample with mineral oil if using a PCR machine without a heated lid.

Transfer PCR tubes to a PCR machine and begin thermocycling.

Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix does not require a separate activation step. Standard Q5 cycling conditions are recommended.

**Thermocycling Conditions for a Routine PCR:**

STEP	TEMP	TIME
Initial Denaturation	98°C	30 seconds
25–35 Cycles	98°C	5–10 seconds
	*50–72°C	10–30 seconds
	72°C	20–30 seconds
Final Extension	72°C	2 minutes
Hold	4–10°C	

\*Use of the NEB T<sub>m</sub> Calculator is highly recommended.

**General Guidelines:**

1. Template:

Use of high quality, purified DNA templates greatly enhances the success of PCR. Recommended amounts of DNA template for a 50 µl reaction are as follows:

DNA	AMOUNT
Genomic	1 ng–1 µg
Plasmid or Viral	1 pg–1 ng

2. Primers:

Oligonucleotide primers are generally 20–40 nucleotides in length and ideally have a GC content of 40–60%. Computer programs such as Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>) can be used to design or analyze primers. The best results are typically seen when using each primer at a final concentration of 0.5 µM in the reaction.

3. Mg<sup>2+</sup> and additives:

The Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix contains 2.0 mM Mg<sup>2+</sup> when used at a 1X concentration. This is optimal for most PCR products generated with this master mix.

dNTPs:

The final concentration of dNTPs is 200 µM of each deoxynucleotide in the 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix. Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase cannot incorporate dUTP and is not recommended for use with uracil-containing primers or templates.

5. Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase concentration:

The concentration of Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase in the Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix has been optimized for best results under a wide range of conditions.

6. Denaturation:

Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase does not require a separate activation step.

An initial denaturation of 30 seconds at 98°C is sufficient for most amplicons from pure templates. Longer denaturation times can be used (up to 3 minutes) for templates that require it.

During thermocycling, the denaturation step should be kept to a minimum. Typically, a 5–10 second denaturation at 98°C is recommended for most templates.

7. Annealing:

Optimal annealing temperatures for Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix tend to be higher than for other PCR polymerases. The NEB T<sub>m</sub> Calculator should be used to determine the annealing temperature when using this enzyme. Typically use a 10–30 second annealing step at 3°C above the T<sub>m</sub> of the lower T<sub>m</sub> primer. A temperature gradient can also be used to optimize the annealing temperature for each primer pair.

For high  $T_m$  primer pairs, two-step cycling without a separate annealing step can be used (see note 10).

8. Extension:

The recommended extension temperature is 72°C. Extension times are generally 20–30 seconds per kb for complex, genomic samples, but can be reduced to 10 seconds per kb for simple templates (plasmid, *E. coli*, etc.) or complex templates < 1 kb. Extension time can be increased to 40 seconds per kb for cDNA or long, complex templates, if necessary.

A final extension of 2 minutes at 72°C is recommended.

9. Cycle number:

Generally, 25–35 cycles yield sufficient product.

10. 2-step PCR:

When primers with annealing temperatures  $\geq 72^\circ\text{C}$  are used, a 2-step thermocycling protocol (combining annealing and extension into one step) is possible.

11. Amplification of long products:

When amplifying products > 6 kb, it is often helpful to increase the extension time to 40–50 seconds/kb.

12. PCR product:

The PCR products generated using Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix have blunt ends. If cloning is the next step, then blunt-end cloning is recommended. If T/A-cloning is preferred, the DNA should be purified prior to A-addition, as Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase will degrade any overhangs generated.

Addition of an untemplated -dA can be done with *Taq* DNA Polymerase (NEB #M0267) or Klenow *exo-* (NEB #M0212).

**Companion Products Sold Separately:**

**Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase**

#M0493S	100 units
#M0493L	500 units

**Q5 High-Fidelity DNA Polymerase**

#M0491S	100 units
#M0491L	500 units

**Q5 High-Fidelity 2X Master Mix**

#M0492S	100 reactions
#M0492L	500 reactions

**Q5 Reaction Buffer Pack**

#B9027S	6.0 ml
---------	--------

**Deoxynucleotide Solution Set**

#N0446S	25 $\mu\text{mol}$ of each
---------	----------------------------

**Deoxynucleotide Solution Mix**

#N0447S	8 $\mu\text{mol}$ of each
#N0447L	40 $\mu\text{mol}$ of each

**Magnesium Chloride ( $\text{MgCl}_2$ ) Solution**

#B9021S	6.0 ml
---------	--------

This product is covered by one or more patents.

**Notice to Purchaser:** Nucleic acid-based aptamers for use with thermophilic DNA polymerases are licensed exclusively by New England Biolabs, Inc. from Somalogic, Inc. (See Patent Nos. 5,475,096; 5,670,637; 5,695,249; 5,874,557; and 5,693,502). New England Biolabs, Inc. gives the Buyer/User a non-exclusive license to use the aptamer-based Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix for RESEARCH PURPOSES ONLY. Commercial use of the aptamer-based Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix requires a license from New England Biolabs, Inc. Please contact [busdev@neb.com](mailto:busdev@neb.com) for more information.

This product is licensed from Bio-Rad Laboratories, Inc. under U.S. Pat. Nos. 6,627,424, 7,541,170, 7,760,808, 7,666,645 and corresponding patents in other countries for use only in: (a) standard (non-real time) PCR in the research field only, but not real-time PCR or digital PCR; (b) any *in-vitro* diagnostics application, except for applications using real-time or digital PCR; and (c) any non-PCR applications in DNA sequencing, isothermal amplification and the production of synthetic DNA.

Q5™ is a trademark of New England Biolabs, Inc.

LABCHIP™ is a registered trademark of Galper Life Sciences, Inc., part of PerkinElmer, Inc.

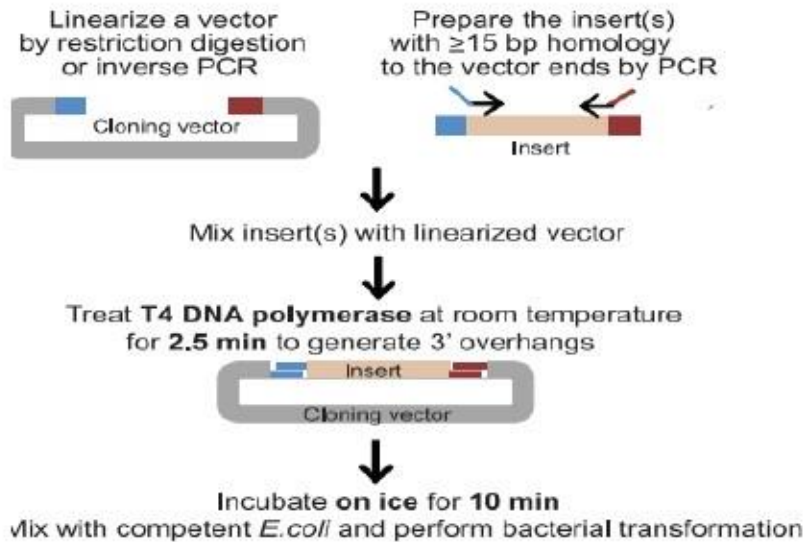


## Clonage SLIC

One-step sequence- and ligation-independent cloning (SLIC):

pIG57 digéré EcoRI (inactiver !)

Produit de PCR sur ADNg MC4100



### Procedures

1. Digest vector with restriction enzyme(s) overnight, and purify the linearized vector with a commercial PCR purification kit. Elute the DNA with elution buffer or 10 mM TrisCl, pH 8.0-8.5. Do not elute the DNA with water or TE. Measure the concentration of the vector.
2. Amplify your gene of interest by PCR using primers with  $\geq 15$  mer homology extension to the linearized vector end. We usually use 15 bp homology for single fragment cloning, and 20 bp homology for multiple fragment cloning. Purify the linearized vector with a commercial PCR purification kit. Elute the DNA with elution buffer or 10 mM TrisCl, pH 8.0-8.5. Do not elute the DNA with water or TE. Measure the concentration of the insert(s).
3. Mix the linearized vector and insert at a molar ratio of 1:2 in a 1.5 ml tube. An example is shown as follows. (Vector to insert molar ratio of 1:1 to 1:7 works well, but we usually use 1:2 for single fragment cloning, 1:2:2 for multiple fragments cloning. An example of 3 fragments cloning is shown below with vector: insert 1: insert 2 molar ratio is 1:2:2 as shown in Fig. 4A).

	Stock concentration	Volume added	Final concentration
Linearized vector (eg, 5 kb)	100 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	10 ng/ $\mu$ l
Insert 1 (PCR product, eg, 1 kb)	40 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	4 ng/ $\mu$ l
Insert 2 (PCR product, eg, 1 kb)	40 ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	4 ng/ $\mu$ l
10X BSA		1 $\mu$ l	1X
10X NEB Buffer 2		1 $\mu$ l	1X
H <sub>2</sub> O		Up to 10 $\mu$ l	

4. Add 0.2  $\mu$ l of T4 DNA polymerase (3 U/ $\mu$ l, NEB) to the mixture and incubate at

room temperature for 2.5 min. We found that 0.5  $\mu\text{l}$  (1.5 U) of T4 DNA polymerase gives the best result, but 0.2  $\mu\text{l}$  gives more than sufficient number of colonies.

5. Put the reaction mixture on ice immediately to stop the reaction and incubate on ice for 10 min.
6. Thaw chemically competent *E. coli* cells on ice for ~10 min. **Utilisez MC4100 *ompR234* « home made »**
7. For single fragment cloning, gently mix the cells with 1-2  $\mu\text{l}$  of the reaction mixture and incubate the cells on ice for 20 min. For multiple fragments cloning, mix the cells with 3-5  $\mu\text{l}$  of the reactant. **Prévoir 3 contrôles : sans ADN, plasmide sans insert, produit de PCR seul**
8. Incubate the cells on ice for 20 min.
9. Heat shock the cells at 42 °C for 45 sec.
10. Incubate the cells on ice for 2 min.
11. Add 900 (or 950)  $\mu\text{l}$  of LB broth to 100 (or 50)  $\mu\text{l}$  of the cells and transfer the cells to 15 ml round-bottom tube.
12. Incubate the cells at 37°C for 1 hr.
13. Plate the cells on agar plates containing suitable antibiotics (eg, 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin). We usually spread 10 to 20  $\mu\text{l}$  of the cells onto an agar plate to get optimal number of colonies per plate for single fragment cloning, and 100  $\mu\text{l}$  per plate for multiple fragments cloning. In case of 10-20  $\mu\text{l}$  spreading, cells needs to be further diluted with 80-90  $\mu\text{l}$  LB broth for suitable spreading.
14. Incubate the plates at 37°C for 16 hr and analyze the colonies.

## Mise en culture de bactéries (solide à liquide), suivi de croissance

Les bactéries fournies sur boîte de Petri sont mise en culture liquide en conditions de manipulation stérile en présence d'un bec Bunsen. Le milieu de culture retenu est le milieu de culture LB (Pour lysogeny broth) est le milieu standard pour la culture d'*Escherichia coli* (10g de peptone, 5 g d'extrait de levures, 10 g de NaCl/L).

La croissance bactérienne peut être estimée à partir de la mesure de la densité optique effectuée à 600 nm.

## Miniprep ADN plasmidique



— DNA/RNA  
▲ contaminants

Sample lysis, release of DNA/RNA from cells, tissue, etc.



DNA/RNA is bound to the silica membrane under high-salt conditions  
Interaction between DNA/RNA (hydrate shell is reversibly removed by chaotropic salt) and silica membrane
















Contaminants are washed away under high-salt and/or ethanolic conditions to keep the DNA/RNA bound to the membrane



DNA/RNA is eluted in low-salt buffer or water, DNA/RNA is ready to use for downstream applications

## Plasmid DNA purification Protocol-at-a-glance (Rev.08)

1	Cultivate and harvest bacterial cells	 	11,000 × g, 30 s
2	Cell lysis		250 µL Buffer A1 250 µL Buffer A2 RT, up to 5 min 300 µL Buffer A3
3	Clarification of the lysate	 	11,000 × g, 5–10 min
4	Bind DNA	 	Load supernatant 11,000 × g, 1 min
5	Wash silica membrane	 	(Optional: 500 µL Buffer AW: RT or 50 °C) 600 µL Buffer A4 11,000 × g, 1 min
6	Dry silica membrane	 	11,000 × g, 2 min
7	Elute DNA	 	50 µL Buffer AE RT, 1 min 11,000 × g, 1 min



## 5 NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) protocols

### 5.1 Isolation of high-copy plasmid DNA from *E. coli*

#### Before starting the preparation:

- Check if Wash Buffer A4 was prepared according to section 3.

#### 1 Cultivate and harvest bacterial cells

Use 1–5 mL of a saturated *E. coli* LB culture, pellet cells in a standard benchtop microcentrifuge for **30 s** at **11,000 x g**. Discard the supernatant and remove as much of the liquid as possible.



**11,000 x g,  
30 s**

*Note: For isolation of low-copy plasmids refer to section 5.2.*

#### 2 Cell lysis

Add **250 µL Buffer A1**. Resuspend the cell pellet completely by vortexing or pipetting up and down. Make sure no cell clumps remain before addition of Buffer A2!

**+ 250 µL A1**

**Resuspend**

*Attention: Check Buffer A2 for precipitated SDS prior to use. If a white precipitate is visible, warm the buffer for several minutes at 30–40 °C until precipitate is dissolved completely. Cool buffer down to room temperature (18–25 °C).*



**+ 250 µL A2**

**Mix**

**RT, 5 min**

Add **250 µL Buffer A2**. Mix gently by inverting the tube **6–8 times**. Do not vortex to avoid shearing of genomic DNA. Incubate at **room temperature** for up to 5 min or until lysate appears clear.

Add **300 µL Buffer A3**. Mix thoroughly by inverting the tube **6–8 times**. Do not vortex to avoid shearing of genomic DNA!

**+ 300 µL A3**

**Mix**

#### 3 Clarification of lysate

Centrifuge for **5 min** at **11,000 x g** at room temperature.



Repeat this step in case the supernatant is not clear!



**11,000 x g,  
5–10 min**

#### 4 Bind DNA

Place a NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column in a Collection Tube (2 mL) and decant the supernatant from step 3 or pipette a maximum of 750 µL of the supernatant onto the column. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column back into the collection tube.



**Load  
supernatant**

**11,000 x g,  
1 min**

Repeat this step to load the remaining lysate.

#### 5 Wash silica membrane

*Recommended: If plasmid DNA is prepared from host strains containing high levels of nucleases (e.g., HB101 or strains of the JM series), it is strongly recommended performing an additional washing step with 500 µL Buffer AW, optionally preheated to 50 °C, and centrifuge for 1 min at 11,000 x g before proceeding with Buffer A4. Additional washing with Buffer AW will also increase the reading length of DNA sequencing reactions and improve the performance of critical enzymatic reactions.*



**Optional:  
+ 500 µL AW**

**11,000 x g,  
1 min**

Add **600 µL Buffer A4** (supplemented with ethanol, see section 3). Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**. Discard flow-through and place the NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column back into the empty collection tube.

**+ 600 µL A4**

**11,000 x g,  
1 min**

#### 6 Dry silica membrane

Centrifuge for **2 min** at **11,000 x g** and discard the collection tube.



*Note: Residual ethanolic wash buffer might inhibit enzymatic reactions.*



**11,000 x g,  
2 min**

#### 7 Elute DNA

Place the NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid) Column in a 1.5 mL microcentrifuge tube (not provided) and add **50 µL Buffer AE**. Incubate for **1 min** at **room temperature**. Centrifuge for **1 min** at **11,000 x g**.



**+ 50 µL AE**

**RT, 1 min**

*Note: For more efficient elution procedures and alternative elution buffer (e.g., TE buffer or water) see section 2.4.*



**11,000 x g,  
1 min**

# Annexes

## Sequence Promoteur curli P<sub>curli</sub> csgBA

<http://www.ecogene.org/?q=ecodownload/sequence>

<http://www.ecogene.org/?q=gene/EG12621>

>E. coli K-12 MG1655 U00096.3 (1103197 to 1103950 = 754 bp)

```
GATGAAACCCCGCTTTTTTATTGATCGCACACCTGACAGCTGCCTCTAAAATAGAAGCACCAGAAGTACTGACA
GATGTTGCACTGCTGTGTGTAGTAATAAATCAGCCCTAAATGGGTAAAATATAAACTAATGGATTACATCTGAT
TTCAATCTAGCCATTACAAATCTTAAATCAAGTGTTAAACATGTAACCTAAATGTAACCTCGTTATATTTAAATGTT
AACCTTAAGGTTTTATTAAGTTTAGAAATGATAGAAAAGTTGTACATTTGGTTTTTATTGCACAATTTAAAAAA
TCATACAAATGGTGATAACTACTAATAATGCATATAAAAAATATTTGGGTGTAGTCCTTTGTGCATGTAAAACG
TTCTTGTTTTTTCTCCACACCTCCGTGGACAATTTTTTACTGCAAAAAGACGAGGTTTGTACGGCTTGTGCGCA
AGACATATCGCAGCAATCAGCGACGGGCAAGAAGAATGACTGTCTGGTGTCTTTTGATAGCGGAAAACGGAGATT
TAAAAGAAAACAAAATATTTTTTTCGTTAGATAACAGCGTATTTACGTGGGTTTTAATACTTTGGTATGAACTAA
AAAAGAAAATACAACGCGCGGGTGTAGTTATTTAAAAATATTTCCGCAGACATACTTTCCATCGTAACGCAGCGTT
AACAAAATACAGTTTCGTTAACACCAAGTTGAAATGATTTAATTTCTTAAATGTACGACCAGGTCCAGGGTGA
CAAC
```

## Carte pSB1K3

<http://parts.igem.org/Part:pSB1K3>


<http://parts.igem.org/cgi/partsdb/puttext.cgi>

## Registry of Standard Biological Parts

main page
design
experience
information
part tools
edit

### Part:pSB1K3

Designed by: Austin Che Group: iGEM07\_Example (2008-08-08)



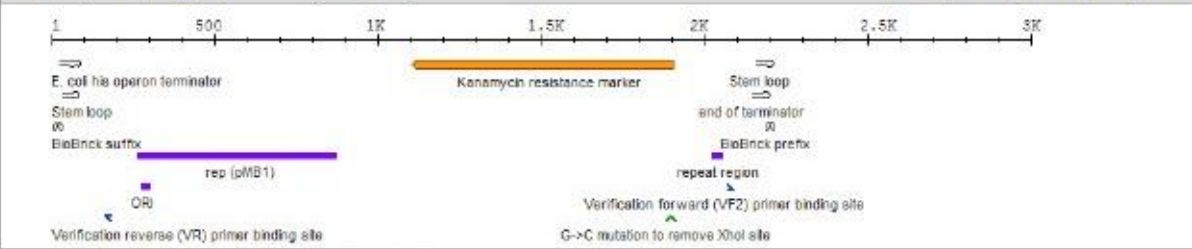
Not Released
Sample Not in stock
★ 1 Registry Star
Not Used
Get This Part

#### High copy BioBrick assembly plasmid

This is a high copy plasmid for use in assembly of BioBrick® standard biological parts.

Sequence and Features

Subparts | [Ruler](#) | [SS](#) | [DS](#)      Length: 2204 bp      [View plasmid](#) | [Get part sequence](#)



Assembly Compatibility: 10 12 21 23 25 1000

Parameters

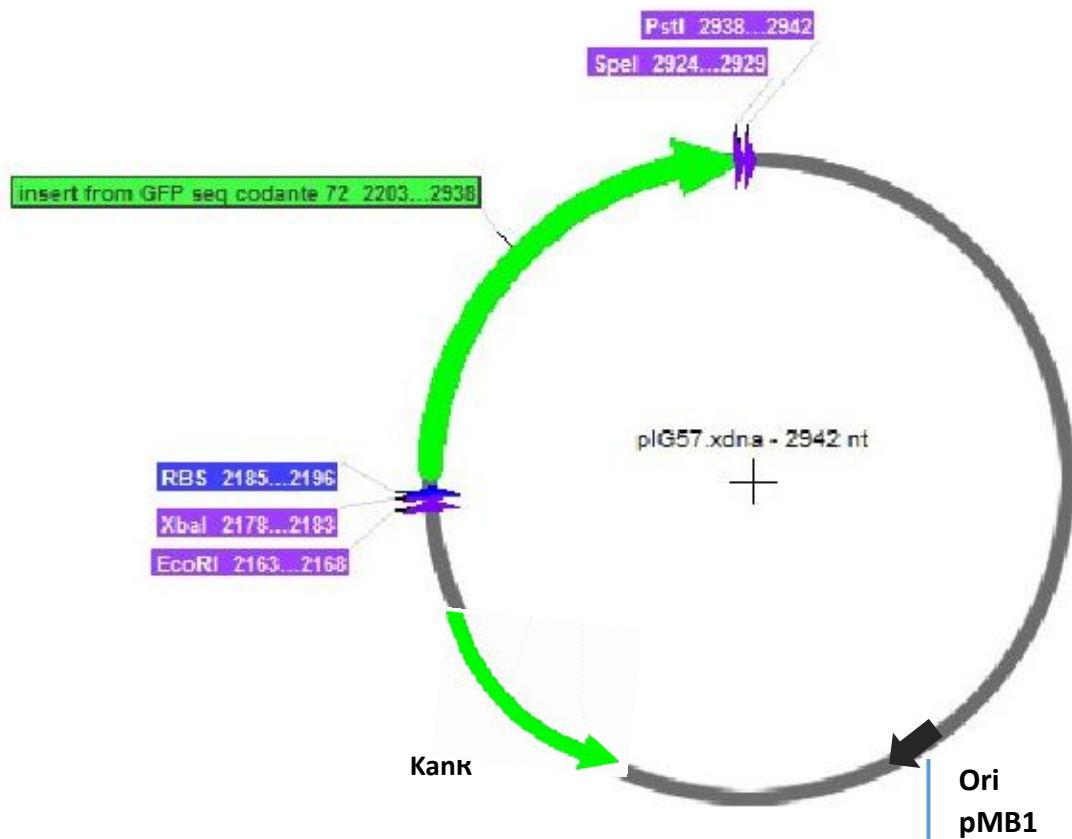
chassis	
copies	100-300
insert	None
mc	BioBrick
origin	pMB1
resistance	K

Categories

//plasmidbackbone/assembly
//plasmidbackbone/copynumber/high

[\[edit\]](#)

Restriction map of pIG57.xdna - 2942 nt  
 <Serial Cloner V2.5> -- <ven. 29 janv. 2016 10:12>



N°	Nom de l'Oligo	Séquence (5'→3')	Qté [OD]	Qté [µg]	Qté [nmol]	Concentration [pmol/µl]	Vol. pour 100pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	Taux de GC	Echelle de Synthèse
1	Prom curli sens	ctaaggatgattctggaattcGAT GAAACCCCGCTTTTTTTA TTG (46)	18.5	523	37,0	-	370	70,3	14135	37 %	0.05 µmol
2	Prom curli rev	ctagTAttctcctctttCTCTAGA GTTGTCACCCTGGACCT GGTCG (47)	24.3	742	51,9	-	519	> 75	14304	48,9 %	0.05 µmol