

# Laboratorijski dnevnik rada

---

dr. sc. Mateja Jagić

Metodologija znanstveno-istraživačko rada u biologiji, 2024/2025

# Laboratorijski dnevnik rada

Tko?

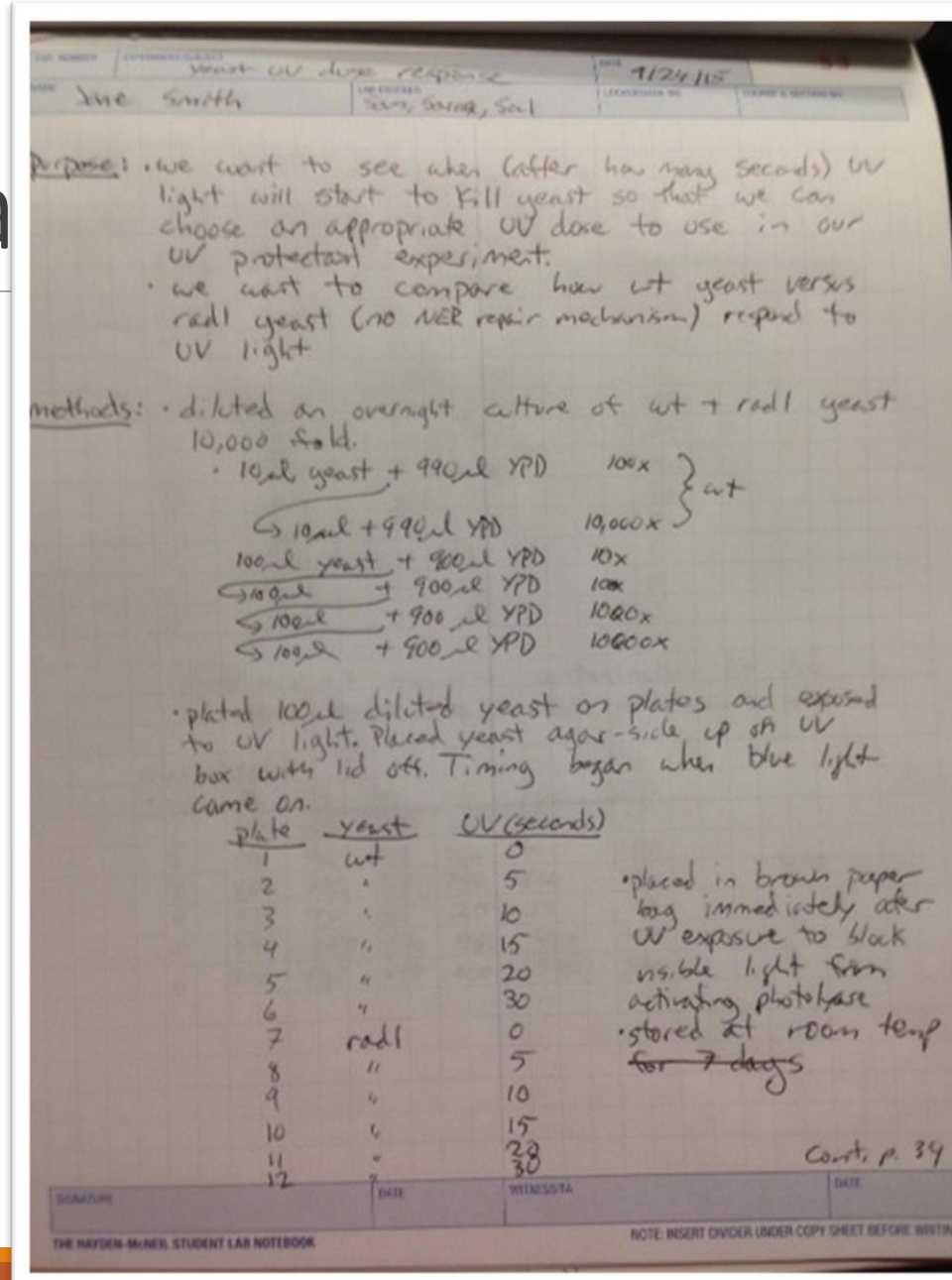
- Svaki istraživač, laboratorijski djelatnik, znanstvenik

Što?

- Bilježnica koja služi za dokumentiranje obavljenog eksperimenta

Zašto?

- Ponovljivost eksperimenata
- Provjera valjanosti istraživanja



# Kad voditi laboratorijski dnevnik?

Uvijek kad radite eksperimente – **prilikom** provođenja eksperimenata!

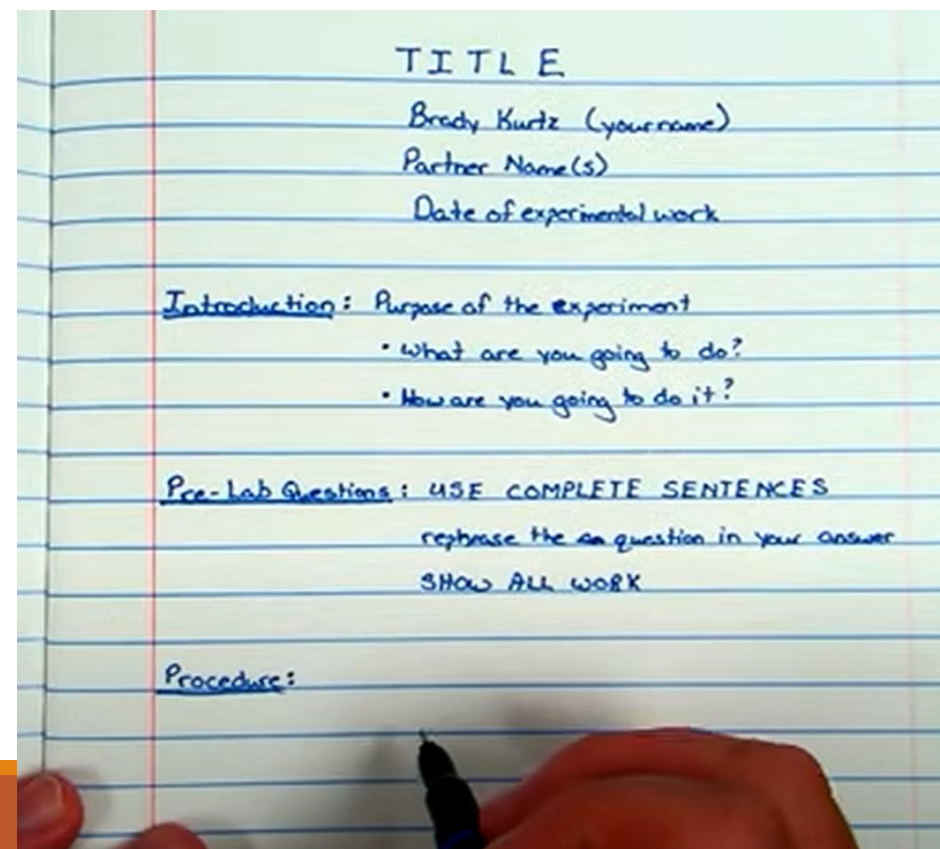
I kad radite u laboratoriju i kad provodite analize na računalu



# Kako voditi laboratorijski dnevnik?

---

- Na licu mjesta (u laboratoriju)
- Upisivati podatke izravno u dnevnik rada (ne na priručne papire i papiriće pa naknadno prepisivati)
- Pisati kemijskom olovkom
- Pisati na desnu stranu
- Lijeva strana je za slike i komentare



# Što sve dnevnik rada treba sadržavati?

---

- Datum istraživanja
- Naziv istraživanja
- Kratak uvod i ciljeve istraživanja
- Korištene materijale i popisane instrumente
- Metode i točan protokol, upisano korak po korak prilikom rada kako je rađeno, uključujući svaku izmjenu od protokola i svaku grešku, što više informacija
- Točne brojeve, mjerenja, rezultate, slike (fotografije, gelovi, grafovi, tablice...)
  - svi podaci trebaju biti upisani neovisno o uspjehu eksperimenta i upotrebljivosti dobivenih podataka
- Interpretaciju dobivenih rezultata i zaključke izvedene iz rezultata



# Što se NE smije raditi s dnevnikom rada?

---

- Pisati tek na kraju dana (kad je eksperiment završen) ili neki drugi dan
- Prepisivati s papirića u dnevnik rada (uvijek upisivati direktno u dnevnik)
- Trgati stranice, brisati upisane podatke (ako ste pogrešno upisali, prekrižite i unesite ispravljeno)
- Falsificirati rezultate
- Laboratorijski dnevnik ne smije napustiti laboratorij!



*And then he said:  
I don't need to write this in  
the lab notebook, I will  
remember everything.*

# Posljedice lošeg vođenja laboratorijskog dnevnika?

---

- Tufts University immunologist Thereza Imanishi-Kari admitted that her poor-record keeping led to misconduct allegations regarding falsification and fabrication of data in her 1986 paper in *Cell* with co-author Nobel Laureate David Baltimore (1)
- December 2011, a paper about Sleep Apnea was retracted from the New England Journal of Medicine due to the authors' inability to locate original data (2)
- A survey of 90 major research institutions' Research Integrity Officers showed that 38% of 553 misconduct cases involves some degree of poor record keeping (3)
- In a 2007 NIH survey of 1,479 researchers, 27.5% admitted to inadequate record keeping (4)

(1) Kaiser, J.; Marshal, E., 1996, *Imanishi-Kari Ruling Slams ORI*. *Science*, 272, 1864-1866

(2) Retraction Watch (<http://retractionwatch.com/2013/10/30/nejm-paper-on-sleep-apnea-retracted-when-original-data-cant-be-found/>)

(3) Wilson, K.; et. al. 2007, *Research Records and the Resolution of Misconduct Allegations at Research Universities*. *Accountability in Research*, 14, 57-71

(4) Shamoo, A.E.; Resnik, D.B., 2009, *Responsible Conduct of Research (2<sup>nd</sup> Ed.)*. Oxford University Press



# Generalne upute za vođenje laboratorijskog dnevnika

---

[https://research.columbia.edu/sites/default/files/content/RCT%20content/ReaDI%20Program/tutorial\\_LabNotebook\\_V9.pdf](https://research.columbia.edu/sites/default/files/content/RCT%20content/ReaDI%20Program/tutorial_LabNotebook_V9.pdf)

## Good Laboratory Notebook Practices



A tutorial on notebook best practices for maintaining organization of data and research integrity during the conduct of research

Created by Office of Research Compliance and Training  
As part of ReaDI Program

Supported by Columbia University Standing Committee on the Conduct of Research



Ocijenite dnevnike rada ocjenama od 0 do 10 (0 = najlošiji, 10 = najbolji)

---



G

8.10.2011.

11 bobice na cvatu cd v 8mm promjer (grozdju)

### STERILIZACIJA

20min ispirano po mlazem vode, EtOH 1min

15min 5% I2osan

5 x 5 min ispiranje s H<sub>2</sub>O

→ steriliziran cvati u komadu

### KULTURA POČETNOG EKSPLOANTATA (4 tipa eksplantata)

• Nerazvijeni plodovi (veličina do 2mm promjer.)  
(np) - ovačka

• merokarp - dobiven nakon guljenja košice:

1. Iznosimo određenu bobicu s  
peteljkom



2. skalpelom zareza košicu (egzokarp)  
kao kod guljenja u ronce

3. guljenje pinčeta

4. <sup>redukovano</sup> prečeno ~~poprečno~~ po sredini  
i izradene sjemenke

⇒ nakon toga 3 tipa eksplantata

(m) - merokarp (meso)

(s) - sjemenke

(p) peteljka  
(skalpelom poslužen gornji  
sloj)

pos jedo elsp

- cvahne stabilizirane

razina na ~ 0,8 cm digne



elsp i kolle  
kolle osušena

F

23. 02. 2020

MiniPrep, izolacija plazmidne DNA (pGBT9)

- 2µl suspenzije (2x) u epici od 2ml
- centrifuga 10min, max (f. 14000g) → malnuti medij
- (+) 250µl Cell Resuspension Solution, resuspension
- (+) 250µl Cell lysis Solution (inkubiraj 4x)
- (+) 10µl Al. ~~solvent~~, inkubiraj 6x, inkub. 5min
- (-) 350µl Neutralization Solution 14x solvent temp.
- 10min, 14000g inkubirati
- ući koloniju dekontrirati supernatant
- 1min 14000g malnuti helix
- (+) 450µl Wash Solution 1min 14000g, malnuti helix
- (+) 250µl Wash Solution 2min 14000g helix
- spin column prebaciti u epici od 1,5ml
- 15' min inkubacija na 37°C 1min 14000g

čistoća:  $\frac{260}{280} = 1,92$   
 $\frac{260}{230} = 1,95$   
 $\rho = 143,5 \text{ mg } \mu\text{l}$

$\frac{260}{280} = 1,94$   
 $\frac{260}{230} = 1,97$   
 $\rho = 164,9 \text{ mg } \mu\text{l}$

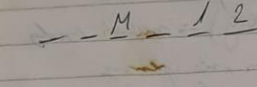
Restrikcija:

2µl pufer	+	+
1µl BamHI		
1µg plazmid	+	+
voda	+	+

→ 50 min na 37°C 1µl 1µl

205 50 85

Gel elektroforeza i pozivnje  
 masa epice 0,984g → 984mg (pGBT9 na ton)  
 → za pozivnju iz gela

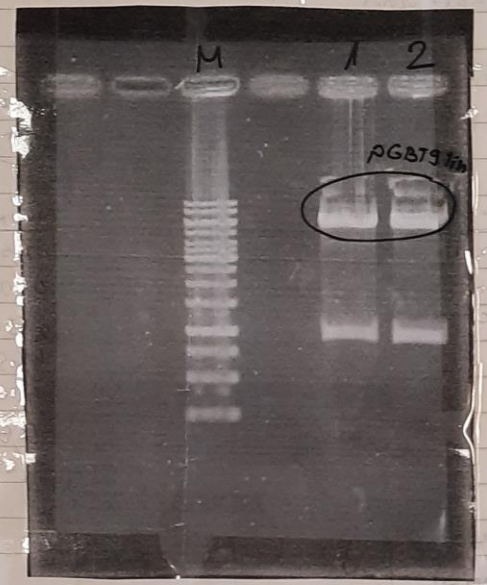


gel epice = 1157 mg  
 masa gela = 173 mg

Pozivnje iz ogoranog gela

- 1) dodati 340µl NT1 pufera → inkubacija 10 min na 50°C uz vertikalno svake 2 min
- 2) 700µl uzorka na koloru, i 30s
- 3) (+) 700µl NT3 pufer → centrifuga 30s, 14000g
- 4) susenje → 1min, 11000g
- 5) 5min na 70°C inkubacija za uklopjereni negativni kontrolni
- 6) dodati NE pufer 15µl → inkub. 70°C, 5min → 1min, 11000g (2x)

čistoća:  $\frac{260}{280} = 1,91$   
 $\frac{260}{230} = 1,26$   
 $\rho = 25 \text{ mg } \mu\text{l}$





D

27.3.2013

Preprava gube za E2  
= završio → u digestor napravljeno u 75°C vod.  
→ u laminarnu filtrir - sterilizacija (0,22)

Izolacija RNA → protokol od 4.3.2013

- uzorci: NK 3 } uzorkovanje → 2 pipete u abt. hlad. pa opaliti (1 podložak, druga za rad)
- NK 6 } komadić tkiva u epian i u tek. dušik
- NK 10 } one krajiv kuhase u parafinskim ometati parafinom
- NK 11 }

- uzorci NK 10 i NK 11 → su obrađeni prvi da dodatke

Tris-HCl, Ponestalo mi tipseva, tako možda da zbog sporosti (odlaska po nove tipseve) + zaboravila staviti 5 min na mixer → lisi/kvini rezultati

- uzorci NK 3 i NK 6 bi trebali biti u redu.

- Ua je rađena s 2x 50 μL zbog veće količine uzoraka

RT-PCR

→ pripremljen master-mix RT1

- 10 μL dH<sub>2</sub>O
  - 1 μL oligo (dT)<sub>18</sub>
  - 1 μL dNTP-Mix
- 5 min na 65°C

brzina kao ostali u PCR-u koji nije spustio temp. na 4°C

RT2 - Master mix

- 4 μL Rnased. Aid Buffer
  - 1 μL Rnase out (Rnase lock)
  - 1 μL Rnased Aid-M-MuLVRT
  - 2 μL dH<sub>2</sub>O
- x4

PCR 45 min 42°C  
15 min 70°C  
∞ 4°C

PCR

- mastermix 60 5.3.2013

x10

→ uzorci

3-2 → NK 3, 2 μL

3-4 → NK 3, 4 μL

6-2 → NK 6, 2 μL

6-4 → NK 6, 4 μL

10-2 → NK 10, 2 μL

10-4 → NK 10, 4 μL

11-2 → NK 11, 2 μL

11-4 → NK 11, 4 μL

P → PH3, gDNA, 0,5 μL

N → neg. kontrola

PCR - 3PM

Elektroforeza uzoraka PCR-a od 27.3.2013

2.4.2013

10 μL uzorak:

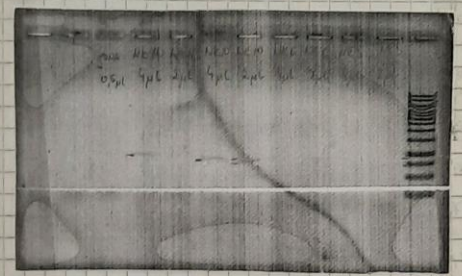
3-2, 3-4, 6-2, 6-4, 10-2, 10-4, 11-2, 11-4, P, N

4,5 μL marker DNA (GeneRuler DNA Ladder)

- 25V → 100V

↓  
dok više boga ↑

- bojanje u EtBr



1. Za uzorak NK 10 dobiveni su bandovi i za 2 μL i za 4 μL
2. Za uzorak NK 11 dobiven je band na 4 μL cDNA.
3. Nema rezultata za NK 3 i NK 6, no nema niči genomike DNA → greška pri radu ili u PCR-u?

Slijedeće:

- naći dNTP mix
  - ponoviti PCR s 70 6 μL cDNA
  - genomika?
- Total RNA



C

DAN 4

21.3.2023.

Prisprema kemijski kompetentni stanica Rosetta.

• u 50 mL LB medija dodano je 0,5 mL prethodno kulture pojedinačnih kolonija (označa LB+chl  
20.3.2023  
Mg 2/3)

- filtrirane su oznake s oznakama:

Mg3 → sadrži LB+chl + Rosetta prethodnu kulture iz epruvete LB+chl  
20.3.2023  
Mg3

JU2 → -/-

iz epruvete LB+chl  
20.3.2023  
Mg2

Inkubirati na 37°C i 180 rpm dok OD<sub>600</sub> ne dosegne 0,35-0,4

- priprema 50 mM CaCl<sub>2</sub>:

$$M(\text{CaCl}_2) = 147,01 \text{ g/mol}$$
$$V = 50 \text{ mL} = 50 \cdot 10^{-3} \text{ dm}^3$$
$$c = 50 \cdot 10^{-3} \text{ mol/dm}^3$$

$$m = c \cdot V = 0,2975 \text{ g}$$

↓  
izvagati ovu masu CaCl<sub>2</sub>, otopiti u 50 mL ml. Q vode i filter-sterilizirati u laminarnu

→ u laboru kod Boće

• mjerenje OD<sub>600</sub>:

bluul - LB medij

OD<sub>600</sub> = 0,17 nakon 90 min za Mg3

OD<sub>600</sub> = 0,17 nakon 90 min za JU2

- potrebno je još čekati

OD<sub>600</sub> = 0,45 za Mg3

OD<sub>600</sub> = 0,43 za JU2

- bakterije su premeštene na led i prebačene u sterilne falconke. **DRŽATI BAKTERIJE NA LEDU.**  
↳ izvagati falconke s bakterijama da budu 2 težina za centrifugu

- oznake falconica:

LB + chl Rosetta  
21.3.2023  
Mg3

LB + chl Rosetta  
21.3.2023  
JU2

- centrifuga 5000 rpm, 5 min, 4°C u laboru za proteom

↳ falconka JU2 se razletila u centrifugi

↳ kontinuirano ORIGINALNE I NEOTVORENE falconke uladuju

→ odbrati supernatant

→ resuspendirati teku u 20 mL ledeno-hladnog CaCl<sub>2</sub> (50 mM) i inkubirati na ledu 20 min

- centrifuga 5000 rpm, 5 min, 4°C

- odbrati supernatant

- dodati teku 2,5 mL ledeno-hladnog CaCl<sub>2</sub> (50 mM) s 10% glicerolom

Prisprema:

300 mL glicerol

2700 mL CaCl<sub>2</sub> (50 mM)

- raspipetrirati u eprice u dilucijama od 100 μL

→ oznake

- oznaka za diluotivne bakterije: R

- diluotivne bakterije smrzavate su u N<sub>2</sub> i pohranite na -80°C

DAN 5

23.3.2023

Transformacija E coli

Materijali:

- 1 diluot (100 μL) kemijski kompetentni stanica E. coli soja Rosetta (DE3). Ovaј soј već je transformiran plazmidom pRL koji sadrži sekvence gena za eukariotske molekule tRNA i gen za rezistenciju na kloramfenicol (chl)
- 1 diluot plazmidnog konstruktа pGAD424 (ampicilinska rezistencija)
- 1 diluot SOC medija (500 μL) → stoji u frižideru kod mikrolabe
- 1 ~~pl~~ ploča s LB medijem i dodatnim antibiotikima: chl (37 μg/ml) + Amp (100 μg/ml)
- plamenič, stabilni stopić 96% - tui ETOH



B

26.02.78.

SDS-PAGE

extracelular. prob.

12500' giprocenul  
M<sub>2</sub>

PP (Ap) 15% gel

— M<sub>2</sub> M<sub>2</sub> ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ M<sub>2</sub> M<sub>2</sub> —  
15 10 70 70 70 70 70 70 70 70 70 70 10 15

SP (Ap) 12% gel

— M<sub>2</sub> M<sub>2</sub> ① ② ③ ④ ⑤ ⑥ ⑦ ⑧ ⑨ ⑩ M<sub>2</sub> M<sub>2</sub> —  
15 10 70 70 70 70 70 70 70 70 10 15

numeri:

- ① = 1A
- ② = 1a
- ③ = 1S
- ④ = 1s
- ⑤ = 1c
- ⑥ = 2A
- ⑦ = 2a
- ⑧ = 2S
- ⑨ = 2s
- ⑩ = 2c

Amplasari 1x rezonantni

START:	10 <sup>04</sup>	80V	61 mA
	10 <sup>45</sup>	180V	108 mA
STOP:	13 <sup>28</sup>	180V	65 mA

PROCE SU SE LITETILE! GELOVI TOKI DANI!

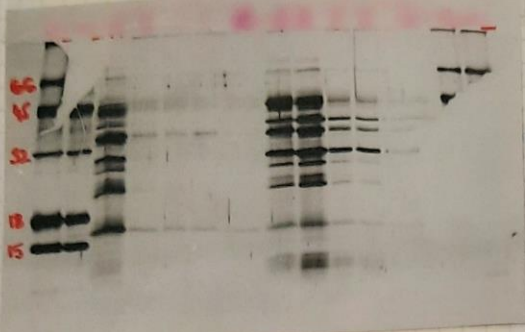
PROCE PRATI POSEBNIOM SPREZIVOM, 4

POSEBNO KADICI, JA XIE DODJE 4

DODIR SA SILANJOM!!! :TATJUS

magrac prot. u (1A), (2A), (2c) / questo u 2S, 2s, 2c(?)

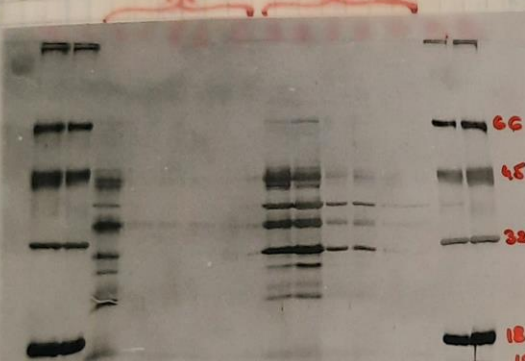
- Precipitacija acetonom → najbolje  
- primo najbrže vrate, prvoj acetonom (1/2) i ekstrah (1/2)



PP (15% SDS-PAGE)

- više prot. kod acetom  
- bolji silovanje, posebno kod septedex

- niske suspenzije rastli izm. 1M i 1M ekstra cel  
prot. u veeup →  
**pozivati!**



SP (12% SDS-PAGE)

SDS-PAGE - gelovi: (accepting)

	15% gel 20 ml	12% gel 20 ml
H <sub>2</sub> O	5 ml	7 ml
Tms(8,8)	5 ml	5 ml
AA	10 ml	8 ml
10% SDS	0,2 ml	0,2 ml
APS	0,2 ml	0,2 ml
TETED	8 gel	8 gel



A

rad je pravi slobodno prebrsk UV-lampe  
oprave objasnio obratkom

12.07.96.

OKAZIVANJE OKTOPINA U TRANSFORMIRANOM  
TIKUU SEC. REFE (SGS3)

- da isprobamo (predstavu) u srednjem do 1000 Hz  
i 2 mgl. Gly strogim hrv. →

2 H → H (boje a gasu uga stredno u medij)  
2 Hrvca → Or (ista a isti. gasu)  
2 Hrvca → T<sub>1</sub>  
T<sub>2</sub>

2 Hrvca → L (bit misao iskušnjak je ga gye  
bilo u vrtu)

Uspostaviti sec. repr u kulturi!

15.07.96.

- izvorle kao zapalo:

T<sub>1</sub> m = 0,150 p  
T<sub>2</sub> m = 0,160 p  
L m = 0,100 p  
H m = 0,150 p  
Or m = 0,160 p  
TN m = 0,145 p (u HSC + Hg + Gly)  
L (u uspravn) = 0,100 p → najnovi uspravnici  
u standardu pomjereni 3ul + 3ul stand.

↓ uspravnici  
12000 Hz  
10 min

(Vla malo suknatante (poko mite) kao kida  
H, Or (misao))

Bilo bi dobro isupervizirati u nekakvom  
prijem! → gledati literaturu (stavot?)

↓  
najbolje rasle (po 6 ul)

↑ 9 8 7 6 5 4 3 2 1 ↑  
st. TN T<sub>2</sub> L T<sub>1</sub> H Or stand. Hrvca

1 - mehanika modika  
2 - standard u st. elektriku  
3 - Or  
4 - H  
5 - T<sub>1</sub>  
6 - L  
7 - T<sub>2</sub>  
8 - TN  
9 - standard

napeti  
- elektrifikacija:

SET TO: U = 2400 V strano: U = 940 V  
I = 100 uA I = 12 uA  
P = 12 W P = 12 W

START: 14<sup>20</sup>  
napon padp do 880 V pr. opt. posle rastu  
14<sup>30</sup> ⇒ U = 910 V  
I = 13 uA  
P = 12 W

STOP: 14<sup>55</sup> [35 min]

DOBIVANI REZULTAT:

standard u  
st. elektriku  
do odredno do  
li ga mite u  
elektriku rasle  
je otvore krah-  
zye!

RESULTAT: 15.07.96.

↑ 9 8 7 6 5 4 3 2 1 ↑  
st. TN T<sub>2</sub> L T<sub>1</sub> H Or stand. Hrvca

15.07.96.

napredci:

- standard se pogotovo okada sa raslo u st. elektriku  
ta ga je mite sicut legu u strogim hrvca

- a H; Or se najbolje spjal a ne bi beao!

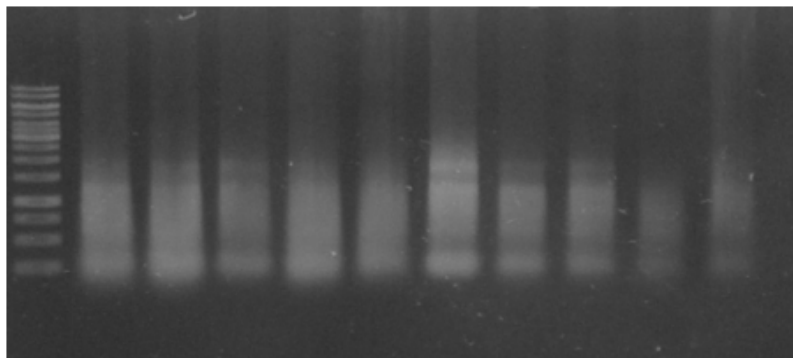
- T<sub>1</sub>; T<sub>2</sub> imajo spjal ok ⇒ je nekakvo spjal  
bise gye u najnovijem rasle (2 koru)

- hrv je u rasle (TN)

## 16.4.19.

## qPCR (ami6x-bpm i cul3hyp-bpm1)

nakon DNAznog tretmana, koncentracije su bile jako niske, pa sam provjerila originalne RNA na gelu, i čini se da unutra nema genomske. Tako da sam odustala od dnaznog tretmana i nastavila dalje s tom RNA



## 18.4.19.

## Anti-DMS3 eksperiment

Izvadila ploče u komoru

## qPCR (ami6x-bpm i cul3hyp-bpm1)

RT-PCR

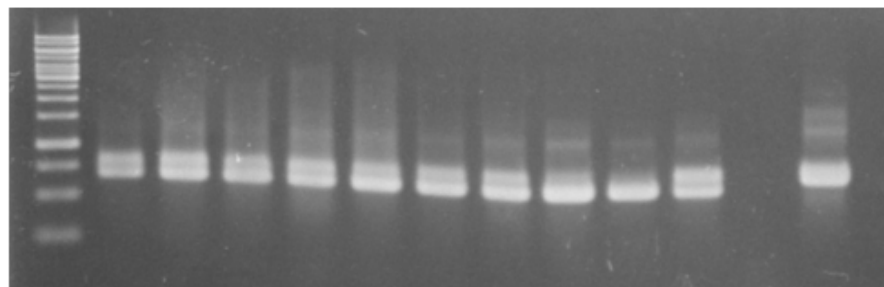
uzorak	konc RNA (ng/ul)	faktor razrj.	volumen	količina RNA	koncentracija nakon RT-PCR-a	koncentracija nakon razrjeđivanja
Col 1	157,8	1,828505214	5,5	863	86,3	28,77
Col 2	180,1	2,086906141	4,8	863	86,3	28,77
8-4-1	86,3	1	10,0	863	86,3	28,77
8-4-2	137,6	1,594438007	6,3	863	86,3	28,77
7-5-1	89,3	1,034762457	9,7	863	86,3	28,77
7-5-2	116,5	1,349942063	7,4	863	86,3	28,77
2-4-1	121	1,402085747	7,1	863	86,3	28,77
2-4-2	172,3	1,996523754	5,0	863	86,3	28,77
cb1	121	1,402085747	7,1	863	86,3	28,77
cb2	183	2,120509849	4,7	863	86,3	28,77

određivanje volumena RT-PCR  
komponenti

RT MIX 1	ukupni volumen reakcije	RNA	oligo dT	dNTP mix	DEPC H <sub>2</sub> O	RT MIX 2	DEPC H <sub>2</sub> O	RT-PCR buffer	RNase inhibitor	RT RevertAid H minus
μL			1	1	do 10	μL	2	4	0,5	1
Col 1	10	5,47	1	1	4,53		2	4	0,5	1
Col 2	10	4,79	1	1	5,21		2	4	0,5	1
8-4-1	10	10,00	1	1	0,00		2	4	0,5	1
8-4-2	10	6,27	1	1	3,73		2	4	0,5	1
7-5-1	10	9,66	1	1	0,34		2	4	0,5	1
7-5-2	10	7,41	1	1	2,59		2	4	0,5	1
2-4-1	10	7,13	1	1	2,87		2	4	0,5	1
2-4-2	10	5,01	1	1	4,99		2	4	0,5	1
cb1	10	7,13	1	1	2,87		2	4	0,5	1
cb2	10	4,72	1	1	5,28		2	4	0,5	1
dodatna reakcija			1	1			2	4	0,5	1
ukupno			11	11			22	44	5,5	11
UPLUTE			2 μL u svaku epicu				8 μL u svaku epicu			

Nakon RT-PCR-a, napravila sam PCR s primerima za aktin. Svi su uzorci kontaminirani genomskom ☹

|



Opcije:

1. ponoviti DNAzni tretman na većoj količini RNA uzorka i produžiti vrijeme precipitacije preko noći
2. napraviti qPCR svejedno, ako su PCR produkti dobiveni na temelju umnažanja genomske DNA dovoljno veliki da ih ograničim vremenom amplifikacije

~~05.01.2018.~~

FLOWHOOD – work mode I; sleep mode 'bed'

Sterilization and plating of *Arabidopsis thaliana* Col oeBPM1+GFP (p35S) seeds

**GOAL: test for transgene (GFP)** → four different lines containing oeBPM1+GFP (p35S) to be tested (first to check GFP under microscope later to check germination)

**Seed designations:** "1LM104"; "2LM104"; "3LM104"; "4LM104"

➤ **Preparation of selective medium MS0 + GLA (Glufosinate ammonium selection)**

GLA stock is 10 mg/mL (x1000) \*act like its x500 .... In 70 mL of medium add 140 µL of GLA

\*\*medium is prepared (find: in closet in flowhood room) – melt in microwave – wait until it cools down add GLA (GLA is in the -20 °C fridge in flowhood room)

*Glufosinate ammonium, an herbicide that is sold under a variety of trade names including Basta and Finale. Resistance to glufosinate ammonium is conferred by the bacterial bialaphos resistance gene (BAR) encoding the enzyme phosphinotricin acetyl transferase (PAT).*

➤ **Sterilization of seeds**

- 1 min in 70 % EtOH [1 mL for 1.5 mL Eppend.]
- 10 min in 1 % izosan-G + 0.1 % mucasol [1 mL for 1.5 mL Eppend.]

*Mucosole – universal detergent*

*Izosan-G (Pliva) – troklozen natrija (granulat za opću sanitaciju I za dezinfekciju vode); germicidni učinak*

→ 2 mL: 20 mg of izosan and 2 µL of mucasol

→ prepared for 14 mL: 140 mg izosan and 14 µL of mucasol – fill with water until 14 mL

3. 13 000 g (not necessary)
4. Wash in water 5 x [1 mL for 1.5 mL Eppend.]
5. Plate on MS0+GLA plates (small ones) using 1000 mL tips

Keep 2 days at 4 °C to synchronize the seeds.

Later move to 24 °C for 7-8 days.

~~08.01.2018.~~

- Plates with oeBPM1+GFP (p35S) seeds ("1LM104"; "2LM104"; "3LM104"; "4LM104") moved to light room (24 °C, 16 hours, long day) for +6 days (until they germinate)

\*later before microscoping put at 37 °C for 6 h (to stabilize BPM1)

**LATER OBSERVATION: all germinated except "1LM104" – probably loss of germination ability of the seeds; rest grew on selection plate (GLA) – means transgene is still present**

- "1LM104" was trashed

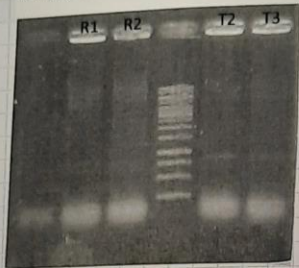


E

Elektroforeza (Colony PCR), 14.7.2017.



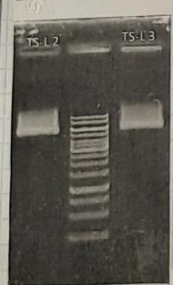
Ponovljena elektroforeza (Colony PCR), 17.7.2017.



Elektroforeza nakon restrikcije (EcoR1), 17.7.2017.

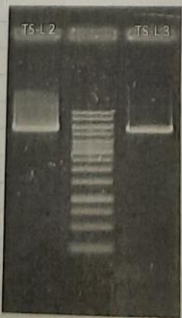


Elektroforeza (restrikcija EcoR1), 18.7.2017.



prazan plazmid?

Elektroforeza (restrikcija BamH1), 18.7.2017.



prazan vektor! Religacija plazmida bez ugradnje inserta.

Navrsto svih 5 prenosnih kultura:

14.7.2017.

Colony PCR

- ↳ 100 µL pro. kultura na 55°C, pa 2 µL za PCR
- ↳ ko i prije

← Elektroforeza

- ↳ ponoviti sa cijelim volumenom

Rezimenc: preostali volumen transformiranih bakterija.  
↳ Andreja će ih sutra u jutro izvesti iz inkubatora

19.7.2017.

Ponovljena elektroforeza (n 20 µL uzorka)

- ↳ miniprep T2 i T3 (Promega 3 na 1 µL)

Restrikcija EcoR1 (Fast Digest)

	T2	T3	
enzim	1	1	} 37°C, 15 min } sve na gel
pufer	2	2	
dH <sub>2</sub> O	14	14	
DNA	3	3	
	20 µL	20 µL	} 80°C, 5 min } v

← elektroforeza!

Preparacija bakterije (preostali ligac. transformanti) u 3 ml LB+AMP

- ↳ 3 klonove sa Roche T4 liganom i 2 sa TS T4 liganom.
- ↳ prenosne inkubacije na 37°C

18.7.2017.

Restrikcija EcoR1

- ↳ ponovljena ali > manje DNA (2 µL) i dužom inkubacijom (1h na 37°C)

← elektroforeza

Colony PCR prebranih kultura (ko i prije) > nema inserta!

Restrikcija BamH1 (Fast Digest)

	T2 i T3	
enzim	1 µL	} 40 min na 37°C
pufer	2 µL	
dH <sub>2</sub> O	15 µL	
DNA	2 µL	
	20 µL	} elektroforeza

13.1.2016

Uzela sam 3 mL prekonocne kulture i prenijela u 75mL YPD medija (OD600 = 0,254), to sam uzgajala 4 sata na 30°C, 230 o/min (OD600=0,542)

Centrifugirala 1000 g, 5 min. Bacila supernatant

Dodala milq H2O Na talog (40 mL) i resuspendirala.

Centrifugirala 1000 g, 5 min. Bacila supernatant

Talog sam otopila u 3 mL 1xTE/LiAc .

Oznacila sam 22 epice i u njih dodala po 10 uL carrier DNA (salmon sperme, sonicirana i denaturirana 5 min na 95 °C) prema tablici sam na carrier DNA dodala plazmidne DNA za transformaciju

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
pGAD4240 242,3 ng/ul	pGBKT70 282,8	pGBT9 BPM1.1 246,0	pGBKT7 BPM1.2 463,0	pGBKT7 BPM2 466,0	pGBKT7 BPM3 74,5	pGBKT7 BPM4 470,1	pGBKT7 BPM5 447,3	pGBKT7 BPM6 492,6	pGBKT7 B9 76,2	pGBKT7 BPM3b 118,21	pGBT9 DMS3 382,2
1 ul	1 ul	1 ul	0,5 ul	0,5 ul	4 ul	0,5 ul	0,55 ul	0,5 ul	4 ul	2,5 ul	0,8 ul

	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
pGAD424 DMS3 416,7 ng/ul	pGBKT70 282,8	pGBT9 BPM1.1 246,0	pGBKT7 BPM1.2 463,0	pGBKT7 BPM2 466,0	pGBKT7 BPM3 74,5	pGBKT7 BPM4 470,1	pGBKT7 BPM5 447,3	pGBKT7 BPM6 492,6	pGBKT7 B9 76,2	pGBKT7 BPM3b 118,21	pGBT9 DMS3 382,2
0,6 ul	1 ul	1 ul	0,5 ul	0,5 ul	4 ul	0,5 ul	0,55 ul	0,5 ul	4 ul	2,5 ul	0,8 ul

Na miks takvih DNA sam dodala po 100 uL suspenzije kvasca, vorteksirala sam.

Dodala sam 600 uL friško pripremljene PEG/LiAc otopine (16 mL 50% PEG, 2 mL 10xTE, 2 mL 10x LiAc)

Vorteksirala sam i inkubirala 40 min na 30°C u termomikseru uz mixanje 400 o/min.

U svaku transformacijsku otopinu sam dodala 70 uL DMSO (filter steriliziran), lagano promjesala .

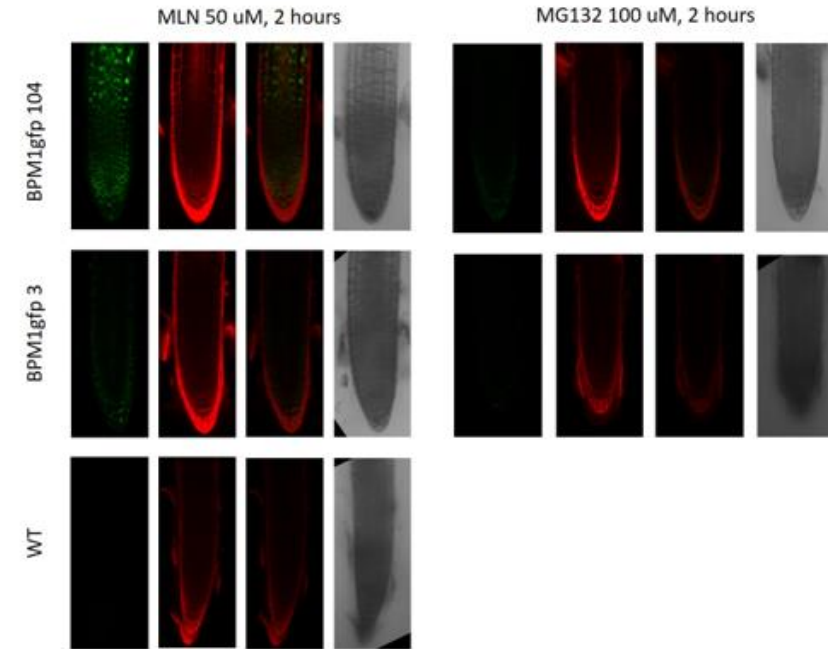
Kvacce sam toplinski šokirala 17 min na 42°C. Ohladila na ledu 2 min.

Centrifugirala sam 1 min na 14000 g, bacila supernatant i talog resuspendirala u 200 uL 1xTE.

Sve sam prenijela na SD-Leu-Trp ploču, na to dodala staklene kuglice (koje sam maknula kad se suspenzija ravnomjerno razmazala i upila u ploce. Ploce sam omotala parafilmom i uzgajam ih na 30°C (naopacke).

Tretirala sam klijance arabidopsisa sa 100 uM MG132 i 50 uM MLN. Nakon 5 minutne infiltracije u vakumu klijanci su stajali 2 sata na tretmanu (u MES puferu 5,7 i u MES 5,7 + DMSO) i onda sam ih stavila u friško pripremljenu otopinu Propidij jodida (stock: 5 mg otopljeno u 1 mL vode; otopina za bojanje: 30 uL stock otopine + 1970 uL vode) i odmah mikroskopirala. Slikala sam vršak korijena.

Ispale su fenomenalne slike!



Dosli su primeri za kloniranje DMS3 gena u pENTR 3C. Otopila sam ih u miliq H2O – stoje preko noci na +4°C.

14.1.2016.

Tu je neki kongres **Epigenetic & Chromatin Regulation of Plant Traits Conference**, pa letim na sve strane ☺

PCR: Thermo Scientific Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (F531L)

Pfw: DMS3fwBamHI 5'-GACTAGGGATCCATGTATCCGACTGGTCAACAG-3'

Prev: DMS3revXhoI 5'-gatatCTCGAGTCATCTGGGTGTGTTCAATTGGC-3'

Template: pGAD424DMS3

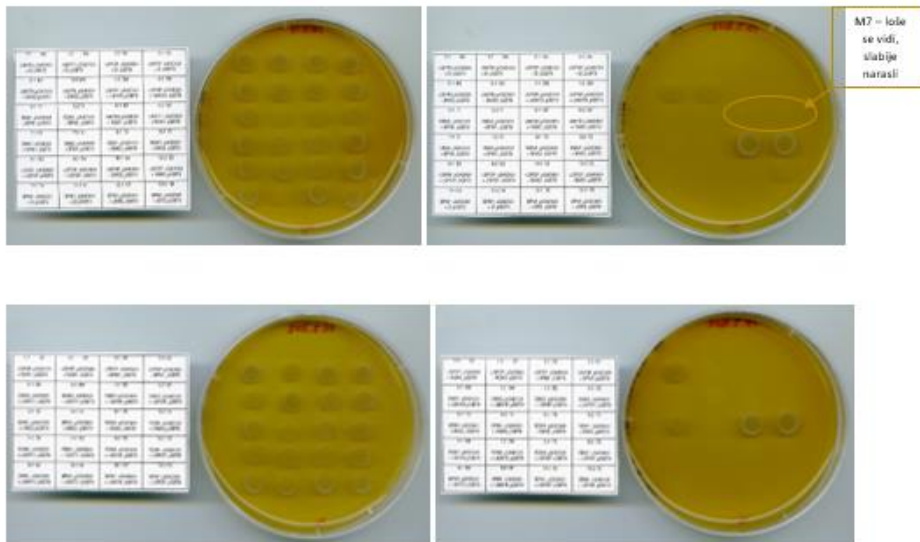
25 uL mix; 1 uL Pfw; 1 uL Prev; 1 uL pGAD424 DMS3; 22 uL H2O



### His prototrofija – rezultati, X-gal stock otopina i $\beta$ -gal test

#### His prototrofija - rezultati

Gotovo svi kvasci lijepo narasli na "master" pločama, jedino su druga replika transformanata 71 i 10, te S7 i 13 narasli slabo. Na Leu<sup>-</sup> Trp<sup>-</sup> His<sup>+</sup> (+ 3AT) ploči 1 narasli su kvasci M3 ( $\Delta$ MATH-AD + DMS3-BD), S3 ( $\Delta$ SPOP-AD + DMS3-BD) i M7 ( $\Delta$ MATH-AD + RDM1-BD – slabo), a na ploči 2 su narasli S7 ( $\Delta$ SPOP-AD + RDM1-BD) i 13 (BPM1-AD + DMS3-BD). Na obje ploče narasla je pozitivna kontrola: 73 (RDM1-AD + DMS3-BD). Po jedna "master plate" korištena je za test  $\beta$  galaktozidaze.



#### X-gal stock otopina

Napravljena nova X-gal stock otopina, 20 mg/mL u DMF (dimetilformamid – posuđen iz sobe 222). X-gal je osjetljiv na povišenu temperaturu i svjetlost (falconica omotana aluminijskom folijom).

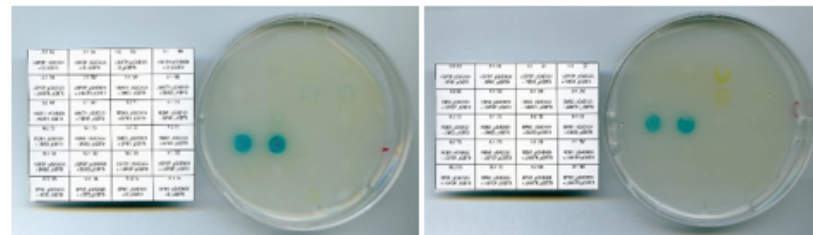
#### $\beta$ -gal test

Sve se radi za dvije ploče paralelno:

1. Priprema agaroze
  - 0,07 g agaroze doda se u Falconicu od 50 mL u kojoj je 10 mL Z-pufera
  - Falconica se postavi u čašu s vodom i sve zajedno se zagrijava u mikrovalnoj malo po malo dok se agarozu u potpunosti ne otopi
2. Pripremanje filter papira
  - pincetom se izvadi filter iz plastične kutijice i izreže mali trokutić na rubu (vidi sliku)
  - filter se položi na kvasce na jednoj od "master" ploča tako da trokutić sjedne na donji rub na ploču se položi staklena čaša (600 mL) (3 min)
  - makne se valjak i drugom pincetom (sa svijanim rubom) dodatno se utisne svaka kolonija u filter



- pincetom se polako odlijepi filter s ploče i uroni nekoliko puta u kontejner s tekućim dušikom
  - filter se postavi u otvorenu Petrijevu ploču tako da stanice gledaju prema gore. Filter će se sam opustiti, no može se ga dodatno izravnati pincetom. Kolonije su sad u zrcalnom položaju u odnosu na originalnu ploču. Paziti da ne ostanu mjehurići nakon izlijevanja agaroze.
3. Bojanje (OBAVEZNE RUKAVICE)
    - u ohlađenu agarozu doda se 165  $\mu$ L X-gal (dodala 161  $\mu$ L) i 27  $\mu$ L  $\beta$ -merkaptetanola, promiješa se i izlije na filter.
    - ne pomicati ploču dok se agarozu ne skrutne. Zatim se ploča zatvori parafilmom.
    - Vrijeme za pojavu plavog obojenja je max 5 h.
  4. Rezultati
    - Nakon pola sata uočeno je plavo obojenje kontrolnih kolonija (73 = RDM1-AD + DMS3-BD)
    - Nakon 3 sata vidljivo je vrlo slabo obojenje kolonija M7 i M3.



Utorak, 19.09.2017.

#### Određivanje reduciranog glutationa *in situ* i Mjerenje intenziteta fluorescencije (MCB)

#### Određivanje reduciranog glutationa *in situ*

Sjemenke stavljene na klijanje u ponedjeljak, ABA slabije proklijala pa odlučeno da se pokus danas radi samo za MES, a sutra za ABU. Nataša će raditi DHE, ja radim MCB.

Boja **monoklorbiamin (MCB)**. MCB formira fluorescentni adukt s GSH u reakciji koju katalizira glutation-S-transferaza.

Bojano po protokolu:

- Boja je osjetljiva na svjetlost, kisik i temperaturu. Sve raditi u mraku!
- Inkubacija sjemenki (20-tak) **1 h u 100  $\mu$ L** otopine boje (50  $\mu$ M), dok stoji pokriti pokrovnicom (kisik!). Radi se na dugačkoj pokrovnici voskom zalijepljenoj na metalni nosač.
- Sjemenke nakon inkubacije 3 x isprati s po 200  $\mu$ L destilirane vode. Dodati 200  $\mu$ L destilirane vode i prekriti okruglom pokrovnicom.
- Mikroskopiranje na povećanju 20 x
- Ekscitacija UV, emisija PLAVO
- Gleda se i snima/slika radikula



# Klasični ili digitalni dnevnik?

## KLASIČNI LABORATORIJSKI DNEVNIK RADA

## DIGITALNI LABORATORIJSKI DNEVNIK RADA

	KLASIČNI LABORATORIJSKI DNEVNIK RADA	DIGITALNI LABORATORIJSKI DNEVNIK RADA
prednosti	<p>Pisanje izravno u laboratoriju tijekom rada (više potankosti)</p> <p>Lakoća upisivanja</p>	<p>Lako pretraživanje dnevnika (ctrl + F)</p> <p>Čitko – digitalni rukopis je svima čitljiv</p>
mane	<ul style="list-style-type: none"><li>• Teže pretraživanje i snalaženje (listanje)</li><li>• Rukopis</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Prepisivanje s papira</li><li>• Upisivanje s odgodom</li><li>• Računalo možda nije u laboratoriju</li></ul>

Najbolje od oba svijeta:  
Digitalne bilježnice (E Ink writing tablet)

My PI taking a look at my lab notebook trying to figure out what the hell I've been doing the past couple of years

