

Stock AMONIO 1M (NH_4^+ 1M) = 500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ Mw= 132.14 g/mol

1M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 132.14 g/L

500 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ = 66.07 g/L 33.035 g/500 mL

Stock POTASIO 1.3 M

Para **100 mL** finais (em H_2O):

9.8 g KCl

0.2 g KH_2PO_4

Para **50 mL** finais (em H_2O):

4.9 g KCl

0.1 g KH_2PO_4

MEIO PROLINA:

YNB w/o Aas w/o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 7.6 g/L

0.1% L-Prolina (1 g/L)

2% Glucosa (20 g/L)

Se tem agar: 2% (20 g/L)

MEIO MÍNIMO SD (Mineral): Culture Media for yeast

According to Hess et al 2006 "Ammonium toxicity and potassium limitation in yeast" and Saldanha et al 2004 "Nutritional homeostasis in batch and steady-state culture of yeast":

General (without ammonium and potassium):

Salts:

0.1-g/l calcium chloride dehydrate

0.1-g/l sodium chloride

0.5-g/l magnesium sulfate heptahydrate

5-g/l glucose

+ 1 mL/L Vit stock 1000x
+ 1 mL/L Metals stock 1000x

Vitamins (stock 1000x):

1 mg Biotin
200 mg Calcium pantothenate
1 mg Folic acid
1000 mg Inositol
200 mg Niacin (nicotinic acid)
100 mg *P*-aminobenzoic acid
200 mg Pyridoxine HCl
100 mg Riboflavin
200 mg Thiamine HCl
400 mg Zinc Sulphate

500 mL Deionized water

Trace metals (stock 1000x):

500 mg Boric acid
40 mg Copper sulfate. 5H₂O
100 mg Potassium iodide
200 mg Ferric chloride. 6H₂O
400 mg Maganese sulfata. H₂O
200 mg Sodium molybdate. 2H₂O

1 L Deionized water, q.s.

For "standard" conditions (with concentrations of ammonium and potassium commonly used):

76 mM of NH₄⁺: 5-g/l ammonium sulfate or 76 mL of stock NH₄⁺ 1M

And

13 mM K⁺: 0.98-g/l potassium chloride + 20-mg/l potassium phosphate or 10 mL stock K⁺ 1.3 M.

For low nitrogen conditions:

1 mM of NH₄⁺: 1 mL/L of stock NH₄⁺ 1M

Or

0.5 mM of NH₄⁺: 0.5 mL of stock NH₄⁺ 1M

And

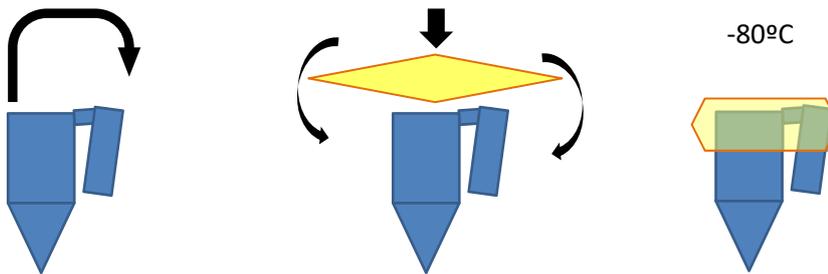
13 mM K⁺: 0.98-g/l potassium chloride + 20-mg/l potassium phosphate or 10 mL stock K⁺ 1.3 M.

The final pH of the media must be 5.7

Protocolo para recolha Leveduras:

- a) Numerar os erlenmeyer de igual forma que está escrito nas tabelas (doc. Excel anexo)
- b) Recolha nos falcon estéreis novos numerados de 50 mL (10°C, 15min, 3860-3861g)----- descartar o meio(volta para o seu erlenemeyer)
- c) Se Haber boa quantidade (pellet grande), lavagem com água autoclavada (30-40mL em cada falcon) ---- vortex-resuspender----- (10°C, 15min, 3860-3861g)-----descartar o água (para um erlenemeyer para descontaminar)
- d) Resuspender o pellet em 500mL de água autoclavada e passar para o eppendorf correspondente. Lavar falcon com 500mL adicionais de água autoclavada e transferir-los para o eppendorf também---- vortex----- e centrifugar 15min, 7000rpm, TR na microcentrifuga de bancada nova (aquela fofinha :-)
- e) Descartar o água (para erlenmeyer para descontaminar), guardar os epp. na caixa a -20°C até transferir a caixa para o -80°C antes de liofilizar (mínimo deve estar 2h à -80°C antes de liofilizar).

NOTA: Antes de levar para liofilizar, abrir os eppendorfs e por um parafilm (depois eles fazer um burquinho):



- f) Liofilizar no ICAT (falar com Cláudia Lluís, técnica responsável) ou no IO (falar com Herculana, ela conhece a pessoa que trata disso).
- g) Pesar os eppendorf (sem parafilm) na balança de precisão do lab aulas ecologia. (eu uso um tampão de plástico de frasco, está na bancada do pH-meter, o pé das caixas de pontas que tem escrito o nome de Idoia)
- h) por as caixas de cartão com os eppendorf bem fechados no dessecador do lab 29 até ser pesadas para o análise IRMS (delta 15N).