DATE: 4/31/58 REF: 1412

Plate counts:

Plate recombination controls:

	0.1	0.05
A_1-A	3	0
A_2-A	0	0
A_1-B	4	3
A_2-B	0	0
A_1-C	42	14
A_2-C	0	0

0.1 1 colony
0.02 0 "

Conclusions:

- glycerol necessary.
Probably use of frozen pairs is OK, but only about 40-50% survival.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 29/4/58 REF: 1412/2

FROZEN PARENTS

3060 broth cultures; 4 cult: 1 ml + 9 ml fresh broth, rotated. After 1 h, spun, concentrated 30 x in broth-glycerol * frozen in dry ice + acetone in 0.1 ml amounts.

* 100 gms glycerol + 100 ml Penassay 2 x strength

3064 : 2 saturated broth cultures used.

3060 } collected in 0.7 ml per tube.
3064 }

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

1412

B1

B2 and C

C

May 1 19 58

REF:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	GAL	LAC	T1	GAL	LAC	T1	GAL	LAC	T1	
1	−	−	+	all −	−	+	−	−	+	
2	−	−	+		−	−	−	−	−	
3	−	−	+		−	+	−	−	+	
4	−	+	−		−	−	−	−	−	
5	−	−	+		−	+	−	−	±	
6	−	−	+		−	+	−	−	−	
7	−	−	+		−	+	−	−	+	
8	−	−	+		− ↑.05	+	−	−	+	
9	−	−	−		− .1	+	−	−	+	
0	−	−	−		− ↓	+	−	+	+	
1	−	−	−		−	−	−	−	+	
2	−	−	+		−	−	−	−	+	
3	−	−	+		−	+	−	−	−	
4	−	− ↑.05	+		−	+	−	−	−	
5	−	− .1 ↓	+		−	+	−	−	+	
6	−	−	+		−	−	−	−	−	
7	−	−	+		−	−	−	−	+	
8	−	−	+		−	−	−	−	−	
9	−	−	+		−	+	−	−	+	
0	−	−	+		−	+	+	+	+	
1	−	−	+		−	−	−	−	+	
2	−	−	−		−	+	−	−	+	
3	−	−	−		−	−	−	−	+	
4	−	−	−		+	−	−	−	−	
5	−	−	−		−	+	−	−	−	
6	−	−	−		−	−	−	−	−	
7	−	−	−		−	+	−	−	−	
8	−	−	−		−	+	−	−	−	
9	−	+	−		−	−	−	−	+	
0	−	−	+		−	+	−	−	−	
1	−	−	±		−	−	−	−	+	
2	−	−	+		−	+	−	−	+	
3	−	−	+		−	−	−	−	−	
4	−	−	−		−	+	−	−	+	
5	−	−	+		−	−	−	−	+	
6	−	−	−		+	−	−	−	+	
7	−	−	−		− ↑.05	+	−	−	−	
8	−	+	−		− .1 ↓	+	−	−	+	
9	−	−	+		−	+	−	w	+	
0	−	−	−		−	−	−	−	+	
1	−	−	+		−	−	−	−	+	
2	−	−	+		−	+	−	−	−	
3	−/w	−	+		−	−				
4	−	−	+		−	−				
5	−	−	+		−	+				
6	−	−	+		−	+				
7	−	−	±		−	−				
8	−	−			−	+				
9					−	+				
0					−	−				

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

D E E

1412

May 1 1958

REF:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Gal	LAC	Li	GAL	LAC	T1	GAL	LAC	T1	
1	all −	−	−				−	−	−	
2		−	+				− (w)	−	+	
3		−	+	+	+	-.105	−	−	−	
4		−	−	w	−	- ↓	+	+	−	
5		−	−	+	+	−	−	−	+	
6		−	−	−	+	−	−	−	+	
7		−	−	−	−	−	−	−	+	
8		−	−	−	−	−	+	+	−	
9		−	−	−	+	−	−	+	−	
0		−	−	−	+	−	−	−	+	
1		−	+				−	−	+	
2		−	+				−	−	−	
3		−	+				−	−	−	
4		−	−				−	−	+	
5		−	+				−	−	−	
6		W .05	−				−	+	−	
7		− .1 ↓	−				−	−	−	
8		−	−				−	−	+	
9		−	+				−	−	+	
0		−	−				−	−	−	
1		−	−				−	−	−	
2		−	−				−	+	−	
3		−	−				−	+	−	
4		−	−				−	−	−	
5		−	−				−	−	−	
6		−	+				−	−	−	
7		−	+				−	−	−	
8		−	+				−	+	−	
9		−	+				−	+	−	
0		−	+				−	+	−	
1		−	−				−	−	−	
2		−	+				+/−	−	+	
3		−	+				− (w)	−	−	
4		−	−				−	+ .05	−	
5		−	+				−	− .1 ↓	−	
6		−	±				−	−	−	
7		−	+				−	−	−	
8		−	−				−	+	−	
9		−	−				−	+	−	
0	↓	−	+				−	+	−	
1							+	+	−	
2							+	+	−	
3							−	+	−	
4							+	+	−	
5							−	−	−	
6							−	−	+	
7							-(w)	−	+	
8							−	−	−	
9							−	−	+	
0							−	+	−	

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

1412

E a

E b

F a

May 1 1958

REF:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	GAL	LAC	TI	GAL	LAC	TI	GAL	LAC	TI	
1	−	−	+	−	+	−	+	+	−	
2	−	−	+	−	−	−	−	−	+	
3	+	+	−	−	−	+	−	−	+	
4	−	+	−	−	−	+	−	−	+	
5	+/−	−(tw?)	−	−	−	−	−	−	−	
6	−	−	−	−	+	−	−	−	+	
7	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
8	−	−	+	−	−	+	−	−	−	
9	−	−	−	−	+	−	−	−	−	
0	−	−	+	−	+	−	−	−	−	
1	−	−	−	−	−	−	−	+	+	
2	−	−	−	−	+	−	−	−	+	
3	−	+	−	−	−	+	−	−	+	
4	−	+	−	+	+	−	−	+	−	
5	−	−	+	−	−	+	−	−	+	
6	−	+	−				−	−	+	
7	−	+	−				−	−	−	
8	−	−	−				−	+	−	
9	−	−	+				−	−	−	
0	−	−	+				−	−	−	
1	W(−?)	−	+				−	+	−	
2	−	−	−				−	−	+	
3	−	−	−				−	−	+	
4	−	−	−				−	−	+	
5	−	−	−				−	−	−	
6	−	−	−				−	−	+	
7	−	−	−				−	−	+	
8	−	−	−				−	+	−	
9	−	−					−	−	−	
0	−	−	+				−	−	−	
1	−	−	+				+/−	+/−	−	
2	+/−	+	+				−	−	−	
3	−	−	+				−	−	+	
4	−	−	−				+	+	−	
5	−	+	−				−	+	−	
6	−	−	+				−	−	−	
7	−	−	+				−	−	−	
8	−	w	−				−	+	−	
9	−	−	+				−	+	−	
0	+	+	−				−	+	−	
1	+	+	−				−	−	+	
2	−	−	−				−	−	−	
3	−	−	+				−	+	−	
4	−	−	+				−	−	+	
5	+	+	−				−	−	+	
6	−	−	+				−	+	−	
7	−	−	+				−	+	−	
8	−	−	+				−(w)	−	−	
9	−	−	−				+	+	−	
0	+	+	−				−	−	−	

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

1412

F+ F-

May 1 1958

REF:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	GAL	LAC	TI	GAL	LAC	TI				
1	−	−	−	−	−	−				
2	−	−	+	−	+	−				
3	+	+	−	+	+	−				
4	−	−	+	−	−	−				
5	−	−	+	−	+	−				
6	−	−	+	−	−	−				
7	−	−	+	−	−	+				
8	−	+	−	−	−	−				
9	+	+	−	+	+	−				
0	−	+	−	−	−	−				
1	−	−	+	−	−	−				
2	−	+	−	−	−	+				
3	−	−	−	−	−	+				
4	−	−	+	−	+	−				
5	−	+	−	+	+	−				
6	−	+	−	−	−	+				
7	−	−	−	−	−	−				
8	−	−	+	−	+(w)	+				
9	−	−	−							
0	−	−	−							
1	−	−	+							
2	−	+	−							
3	−	−	+							
4	−	−	−							
5	−	−	+							
6	- or w	−	−							
7	−	+	−							
8	−	−	+							
9	−	−	−							
0	−	+	−							
1	−	−	−							
2	−	−	−							
3	−	−	−							
4	−	−	−							
5	−	−	−							
6	−	+	−							
7	w	−	−							
8	−	−	−							
9	+	+	+							
0	−	+	−							
1	−	−	−							
2	−	+	−							
3	−	−	+							
4	−	−	+							
5	−	+	−							
6	−	−	+							
7	−	+	−							
8	−	−	+							
9	−	+	−							
0	+	+	−							

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

1412

A1 B and A1 C

A1 C0.1

May 3 1958

REF:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	GAL	LAC	T1			GAL	LAC	T1		
A1B 0.05	1 —	—	+			—	—	+		
	2 —	—	—			—	—	—		
	3 —	—	+			+	+	—		
.1	4 —	—	—			—	+	—		
	5 —	—	+			—	—	—		
	6 —	—	—			—	—	—		
	7 —	—	+			—	+	—		
	8					+	+	—		
	9					—	+	—		
	0					+	+	—		
A1C .05	1 —	+	—			—	+	—		
	2 —	+	—			—	+/-	—		
	3 —	—	+			+	+	—		
	4 —	+	—			—	+	+		
	5 +	+	—			—	w	—		
	6 +	+	+			—	—	—		
	7 —	+	—			+	+	—		
	8 —	—	—			—	+	—		
	9 —	—(w)	+							
	0 —	—	+							
	1 —	+	—							
	2 —	—	+							
	3 —	—	+							
	4 —	—	+							
	5 —	—	—							
.1	6 —	—(w)	+							
	7 +	+	+							
	8 —	—	—							
	9 —	+	—							
	0 +	+	—							
	1 w	—	+							
	2 —	-/+	+							
	3 —	—	—							
	4 +	+	+							
	5 —	—	+							
	6 —	+	+							
	7 —	+	—							
	8 —	—	+							
	9 —	—	+							
	0 +	+	—							
	1 +	+	—							
	2 +	+	—							
	3 w	w								
	4 —	+	+							
	5 —	+	—							
	6 —	-/+	—							
	7 +	+	+							
	8 —	-/+	—							
	9 —	+	—							
	0 —	—	+							

Note: most of the Lac +'s may be weaks.

BLE-BLE-BLE-BLENDING -
ING-ING-

DATE: 4/26/58. REF: 1413/1 ING

Saturated cultures of 3060, 3068 – Mixed in equal amounts. warm cultures

A) Blended 30" at once after mixing – incubated 30', plated.

B) 5' waterbath, blending, 5' waterbath, blending until 30' → plated. 5' waterbath, blending

C) Incubated 30', plated.

Plating: 0.05 from ~~undil.~~ undil, 1/100, ~~1/1000~~ 1/10.000 on min St B1

Counts;

	undil	1/100	1/10.000
A	∞	N1000	12
B	∞*	45	0
C	∞	N1000	17

* >4000. Probably many plate recombinants.

From B 1/100: 1 gal+? /50
8 lac+ /51
24 T1+ /50

DATE: 4/26/58 REF: 1413/2

TWO STAGE TRANSFER

3060 3 x conc x 2735 30 x conc. 0.2 + 0.2, 1 minute pulse.

↓

1 minute pulse in water bath

↓

dilute 1/500

↓

Incubate 15'

↓

Blend 30"

↓

2 ml + 2 ml 3064 10^9/ml.

↓

45' incubation

↓

Plate 0.05 undil, 1/10, 1/100, 1/1000 on B lac/m

	undil	~~1/10~~	1/10	1/100	1/1000
Lac+	many		78	6	2
Lac-	∞		∞	∞	~ 10^4

40 Lac+ streaked, Lac+ isolated, tested and replicated on ~~B lac~~, B gal
Thin B_1, min B_1 TL, min B_1 T, min B_1 L, ~~min~~ Penassay T_1.

		T_1 1	0	
Growth on B_1	+	17	3	20
	-	7	14	21
		24	17	41

All Lac+ were Gal+

F-type

Differential Recruitment.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

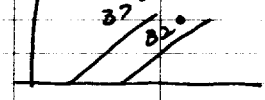
1413 D
-4

2 May 1958 REF:

Each tube received .05 ml H_2O (or DNP M/200), .05 ml W3060, .20 ml W3064, all precilled, innocated at 40x from [ORC → 1 hour $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{10}$ in phenassay]. Resuspended in BBA* after elapsed time (10, 60 mins.) ~~add 10 ml warm BBA~~ dilute 1:100, 1:100 in warm BBA and incubate 30 minutes longer before plating. D Thom.

		1	2	
A	Melting ice 0°	10 minutes,	60 m.	1:100 BBA
B	running water 12°			
C	water bath 25°			1:100 BBA inc. 37°
D	water bath 37°			
F	water bath 37° + DNP M/200	10 minutes,	60 m.	for 30 minutes & plate.
E	after dilutions 37°.			

Purpose: do zygotes form at lower temperatures or in presence of DNP? (in absence of progressive injections). Hagen finding of parallel 32° curve suggests that only time of density is changed, not rate of recruitment.)



Results: no recruitment at 0°. Same plate

	.005 10'	60'	
A	13	18	
B	7	19	
C	23	36	
D	183	~350	
E	8,7	---	= plate recombinants plus dilute recruitment
F	1	0	

DATE: 4/30/58 REF: 1413/3

Exhaustion of Hfr activity

3060, 4 exponential cultures of 1 hr: 2 ml + 7.5 ml Penassay, stated.
3064, 0.8 + 7.5 ml Penassay, 10 cultures as before.
Spun, resuspended in "optimal medium" *, 0,2 ml per tube (about 40-45 × conc.) - Optical density identical for 3060, 3064.

Mixture, in 150 ml flask prewarmed, of 0.07 ml 3060 & 1.4 ml 3064
Keep at 37°.
Take 0.1 ml samples, dilute in 10 ml prewarmed "optimal m.", then again 1/100 in O.M., ~~plate~~ at the following times:
1', 2½', 5', 10', 15', 20', 25', 30', 40', 50', 60'.

After dilution Keep at 37° until completion of 1 hr since mixing.

Platings: From 10^{-4} → 0.05 min St B_1
↓ 1/10 → { 0.05 min St B_1
{ 0.05 min.

Plate recombination controls (0'):
Parents diluted 1/10.000 → 0.025 of ~~3064~~ } on min St B_1
→ 0.025 of 3060 }
↓
1/10 → 0.05 on { Bloc min (3060).
→ 0.025

* OPTIMAL MEDIUM. Called BGA later.

4 g	NaCl
0.2 g	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
1 g	Na_2HPO_4
9 g	KH_2PO_4
0.2 g	asparagine

dissolve in 93 ml of water and autoclave

Also: glucose 20% autoclaved separately.

MIX: { 1 ml glucose sol.
10 ml salt solution
90 ml water.

DATE: REF: 1413/3

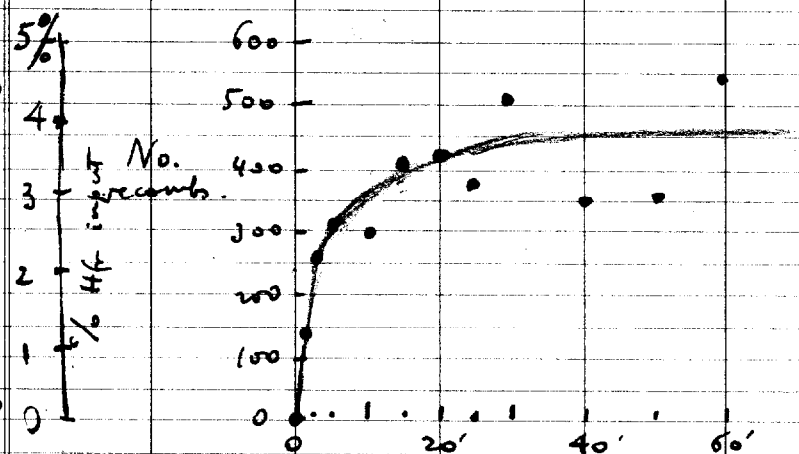
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Plate counts									
	#3060		10^{-5}	0.05 ml	B Lac:	1187 col.				
	3				min		4 col.!			
10	#3064			11		about 2000 col.				
20										
30										
40										
50										

DATE: May 1ST 1958 REF: 1443/3

Plate counts

Time	min S_1 St 1/1	min S_1 St 1/10	min 1/10	
0'	0,0,0		28	
1'	139	8	26	
2 1/2'	259	29	22	
5'	307	35	30	
10'	290	33	21	
15'	~~402~~ 2	52	32	
20'	417	46	34	
25'	372	43	6	?
30'	510	53	37	
40'	345	55	5	!
50'	356	53	not done	
60'	540	43	"	

Note: 0' is not an accurate definition as it merely measures plate recombinants. A better 0' would have been 60' incubation of parents diluted 1/10.000 and mixed.



Conclusions.

t_{37} about 5'; to have 95% mated 15' are necessary. this time is too long.* In order to reduce it to about 1/3 try:

1. temperature decrease
2. DNP.

* as confronted with rate of entry of chromosomes. It is desired to have this time 1/

smaller than the difference, in time of entry, between T1 and last which is about 8'.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19

REF: 14/3/3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1										
2										
3										
4			Gal+	Lac+	T_1'					
5										
6										
7		1'	7/100	30/102	55/100					
8										
9										
0		60'	0/100	13/100	53/100					
1										
2		Why is the 60' experiment interrupted?								
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
0										
1										
2										
3										
4										
5										
6										
7										
8										
9										
0										

DATE: May 1st, 1958 REF: 1413/4

RECRUITMENT RATE

ORC W 3060, W 3064 —

Exponential culture: 2 ml + 7.5 ml Pen 3060 : 6 cultures.

0.8 " " 3064 : 10 "

1h rotation. Spin, resuspend in 0.2 ml BGA* per tube.

Chill parental suspension and prepare:

4 tubes with .05 ml conc 3060 + .05 ml water (A–D)

1 " + .05 ml Dinitrophenol M/100 (F)

Add .2 ml conc. 3064 to each tube, and transfer to following temperatures

A: 0° (melting ice)

B: 18° (running tap water)

C: 25° (waterbath)

D, F: 37° (water bath)

After 10' and 60' take 0.1 ml/sample, dilute 1/100 in water and then 1/100 in warmed BGA, keep 10^{-4} dilution at 37° for 30' plate 0.05 and 0.01 as usual B, —

(E): 3060 dil. 1/20.000 in BGA 0.5 ml
3064 " 1/10.000 in BGA 1.0 ml
} for 30' at 37°, plate 0.05 and 0.01 —

(A) Kept at 0° for a total of 20 hrs. dilute 1/100 in water → 1/100 in warmed BGA. Plate 0.05 at once, and after 30' incubation at 37°.
↓ A3 ↓ A4

* BGA = "optimal medium.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

1413/4

	10′		60′	
	0.05	0.01	0.05	0.01
A	13	0	18	5
B	7	1	19	1
C	23	1	36	4
D	183	44	~350	100
E	8,7	1		
F	1	0	0	0

→ Control of recombination at 10^{-4} 60′.

3060 B Lac 10^{-6} 0.05 : 172, 216.
min 114 delayed

3064 B Lac 10^{-6} 0.01 626

Initial conc 4×10^9 /ml ♂
12×10^9 / ml ♀

A_3 : 0,2 ml
A_4 39,14 ml.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 May 6th, 1958. REF. 1413/5

~~4~~ cult of W3060 2 ml + 7.5 ml Pen rotated 2½ hrs.
10 " of W945 & 3064 1 ml + 7.5 ml Pen.

Resuspended after spinning in 0.1 ml of BGA per tube.

Mix W3060, W945 in proportion .05 + 1.00 in 37° waterbath for 15', -25'.

A. At 15': .1 sample taken, diluted 1/100, BGA blend; addition to .2 ml of .2 ml 3064 incubate in water bath.

Take samples of 0.1 after 10', 20', 40'. Dilute 1/10 ml chilled water, and further dil 1/100, 1/1000 (.1 + 9.9)^2.

From each dilution plate on .05 | Gal Sm (B) Lac Sm (B) min B, St.

B. at 25'. same.

C. 3060 conc. susp. ~~0.05 + 10~~ 1/2000, 0.2 ml ~~0.2 ml + total~~ water; ~~take~~ blend, take .05 ml sample, add + .2 ml 3064. Incubate samples of 0.1 after 10', 20', 40'. Dilute and plate as above:

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 May 7th 1958 REF: 1413/5

Plate count on min/+B, :

		A	B	C
10	1/1	0	0	19
	1/10	0	0	0
	1/100	0	0	0
20	1/1	0	0	18
	1/10	0	0	1
	1/100	0	0	0
40	1/1	0	4	10
	1/10	0	0	0
	1/100	0	0	0

B lac/+, B gal/+ : no positive colonies.

Conclusion : 3060 has reverted to F+.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 May 7, 1957. REF: 1413/6

Testing W3870 (Hfr_2 $B_1^?$ $4p^h$)
for mating to 3064 in B Lac fm, B Gal fm.

0.5 W3870 o.n.c + 1.0 W3064 o.n.c.
1 hr at 37°. water bath.
dilute 1/100, 1/10.000, plate on B Lac fm B Gal fm

Same 3870 culture stored in frig to inoculate fresh cultures on the next day—

40 hrs readings:

	B Gal fm	B Lac fm	
1/100	9 *	6 *	Gal+ colonies
1/10.000	0	0	—

*: all $TL^r B_1^-$ Ara- Gal+ Lac+

Most likely explanation: 3870 reverted to F+ and other Hfr's than Hfr_2 are giving Tl- recombinants. Possibility that 3870 is behaving differently from 3050 should also be kept in mind.

5/12/58

1413/7

B - Lac - Sm		B - Gal - Sm	
A 1/10	~ 300 +	A 1/10	~ 200 +
	lawn -		> 1000 -
A ?	~ 400 +	A ?	~ 400 +
	lawn -		lawn -
A 1/100	55 +	A 1/100	6 +
	~ 1000 -		~ 700 -
A 1/100	9 +	A 1/100	64 +
	~ 400 -		~ 1000 -

Single colonies from streaks were stroked on Gal or Lac; to be tested for:

May 12

1413 / 7 (More interested in Galt's) [3000 x 3004]

Pick, streak, check for : Lac, Hal, etc.

Pick more of 2323 x 945's

1306 M Lac, V_1^r V_6^r

streaked on B lac ⇒ Lac +!! (all +)

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 May 9th, 1958 REF 1413/7

Control of efficiency of Gal+ and Lac+ selection.

3060, 3064 suspensions 80× conc. from exp. 1415/3 — Pulsed at high conc. for 15' then diluted 1/100, incubated for 45'. Plate on Gal and B Lac fm: 0.05 from

(A) → undil., 1/10, 1/100, 1/1000.

Also: Dilute parents kept meanwhile at high conc (for 1 hr) (= 1/100) (= 1/1000) (= 10⁻⁴) 1/100, plate .025 of each parent undil, 1/10, 1/100, ~~1/1000~~ on B Gal fm. (Plate recombination control)

(B) → and B Lac fm

		B Lac fm	B Gal fm
A	1/1	~10³ Lac+	~10³ Gal+ (& not blue) (very small)
	1/10	~200 Lac+	~100 Gal+ (")
	1/100	16 Lac+	10 Gal+ (")
	1/1000	5 Lac+	0
B	1/1	0 Lac+	0 Gal+
	1/10	0	0
	1/100	0	0

After another 40 hrs more Gal+ and Lac+ in the A series. None in the B series.

19 May 9th 1958. REF: 1413/8

Reconstruction experiment.

10^3 cells 2323, alone and with 10^8 3064
on B lac fuc, B gal fuc.

No evidence of suppression by 3064 of 2323
in these conditions.

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 5/13/1958 REF: 1413/9

REBLENDING REPEATED

Cultures of W3050, W3064 kept in frig 1 ml + 7.5 ml Pen. & 0.5 ml + 7.5 ml Pen. respectively. Rotated 3 hrs.

Mixed in water both in equal amounts (1.5 ml + 1.5 ml) in 2 tubes A, B. Also, parental suspensions incubated similarly for plate recombination control C.

A. Blended every 6' for 30" each time.
B. Left undisturbed

After 42', dilution of A, B, and parents 1/6, → 1/36 → 1/216 → 1/1296. Plate 0.05 of each dilution for A, .05 of last dilution for B, and .025* of either parent at each dilution for C (Plate recombination control) - All on minST B1

* By mistake, 0.05.

All plates prepared same day (6 days old).

C repeated on plates of 5 days with right amount

Dilution	A	B	C	C 5 days old
1	38	-	80	-
2	1	-	9	-
3	0	-	0	0
4	0	14	0	0

U.W.
MICROBIAL
GENETICS

19 May 14, 1958 REF: 1413/10

TWO STAGE TRANSFER.

W3060, culture in the frig. - 2 ml + 7.5 ml Pen 1 tube
W3064, W445 - 1 ml + 7.5 ml Pen 3 & 2 tubes -
Rotated 1 hr 15' -

Spun, resuspended in Penassay: W3060 1x, 0.05 ml
W3064, W445 } 30x } 0.3 ml.

A. 0.1 W3060 + 0.1 W445, 20' incubation, then 0.1 ml from this mixture + 0.2 ml W3064 - incubated 8', then 2 ml broth added, chilled + blended, reincubated, samples for plating 10', 20', 30' after reincubation.

B. 0.1 W3060 + 0.1 W445, 5' pulse, then 0.1 + 10 ml broth for 15' - From mixture, 0.1 ml + 0.2 W3064, 8' incubation, then 2 ml broth added, chilled + blended, reincubated, sampled for plating 10', 20', 30'

C 0.1 W3060 + 0.2 W3064, incub 8', 2 ml broth added, chilled + blended, reincubated and sampled at 10', 24', 30' -

D. 0.1 W3060 + 10 ml broth, from mixture, 0.1 + 0.2 W3064 incubated 8', 2 ml broth added, chilled + blended, sampled after 10', 24', 30'.

All times plating of 0.05 on B Gal Sm, (Sm B,) - Not enough B Gal Sm plating for C 20, D 20.