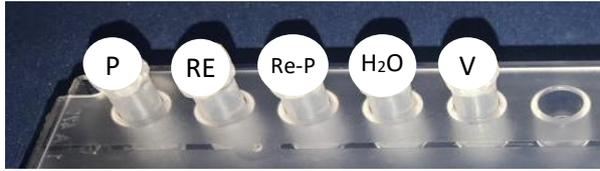


# Ablaufplan CRISPR/Cas9

## 1. Restriktionsverdau zur Linearisierung des Plasmids pBR322



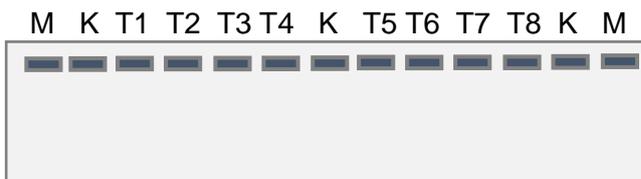
1.1 Pipettieren Sie den Restriktionsverdau gemäß folgendem Pipettierschema in das Eppi (V):

Eppi	Inhalt	Vol.
P	pBR322 (2,5 µg)	5 µL
RE	<i>Pst</i> I (2,5 units)	2,5 µL
RE-P	10x Restriktionspuffer	2,5 µL
H <sub>2</sub> O	nucleasefreies H <sub>2</sub> O	15 µL
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>25 µL</b>

1.2 Inkubieren Sie den Restriktionsverdau (V) bei 37 °C für 15 Minuten.

## 2. Überprüfen des Restriktionsverdaus mittels Gel-Elektrophorese

- 2.1 Öffnen Sie die Gelkassette und benetzen Sie die Taschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- 2.2 Überschüssiges Wasser wird mit Saugpapier abgesaugt.
- 2.3 Pipettieren Sie als Kontrolle 1 µL Ladepuffer (LP), 1 µL des ungeschnittenen Plasmids (P) und 4 µL H<sub>2</sub>O in das Eppi (K).
- 2.4 Pipettieren Sie als Test für den Verdau 1 µL Ladepuffer (LP), 4 µL Ihres Verdauansatzes (V) und 1 µL H<sub>2</sub>O in das Eppi (T). **Stellen Sie (V) auf Eis.**
- 2.5 Pipettieren Sie gemäß dem folgenden Pipettierschema jeweils
  - 4 µL des Markers (M),
  - 6 µL der Kontrolle (K)
  - und 6 µL der verdauten Proben (T) aus 2.4 der 8 Arbeitsgruppen T1 – T8 in die Taschen des Gels:



2.6 Schließen Sie den Gelträger an das Power Supply an und starten Sie die Elektrophorese bei 180 V.

**Aufgabe: Werten Sie Ihr Gel bezüglich des Restriktionsverdaus aus.**

## 3. gRNA-Synthese



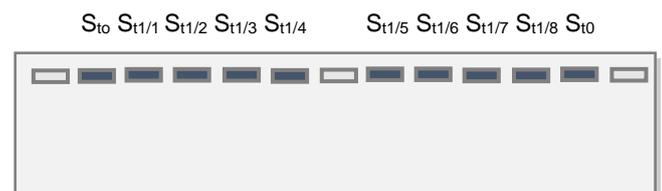
3.1 Pipettieren Sie folgende Reagenzien in Ihr Eppi (S):

Eppi	Inhalt	Vol.
H <sub>2</sub> O	nucleasefreies H <sub>2</sub> O	16 µL
NTP	NTP Puffermix	10 µL
D	DNA Duplex	2 µL
T7	T7 RNA Polymerase	2 µL
<b>Gesamtvolumen</b>		<b>30 µL</b>

- 3.2 Pipettieren Sie als Kontrolle zu Beginn der gRNA-Synthese 5 µL Ihres Ansatzes (S) in ein mit S<sub>10</sub> und Ihrer Gruppennummer beschriftetes Eppi. **Stellen Sie (S<sub>10</sub>) auf Eis.**
- 3.3 Inkubieren Sie Ihren Ansatz (S) bei 37 °C für 1 Stunde.

## 4. Überprüfen der synthetisierten gRNA durch Gel-Elektrophorese

- 4.1 Öffnen Sie die Gelkassette und benetzen Sie die Taschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- 4.2 Überschüssiges Wasser wird mit Saugpapier abgesaugt.
- 4.3 Pipettieren Sie am Ende der Inkubation 5 µL des gRNA Syntheseansatzes (S) in ein mit S<sub>11</sub> und Ihrer Gruppennummer beschriftetes Eppi. **Stellen Sie (S) auf Eis.**
- 4.4 Pipettieren Sie zu S<sub>10</sub> und S<sub>11</sub> jeweils 1 µL Ladepuffer (LP).
- 4.5 Pipettieren Sie gemäß dem folgenden Pipettierschema je 6 µL der gRNA-Syntheseansätze (S<sub>11/1</sub> – S<sub>11/8</sub>) der verschiedenen Arbeitsgruppen und zweimal (S<sub>10</sub>) in die Taschen des Gels:

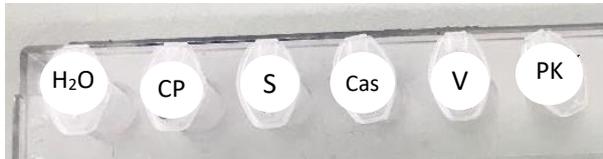


4.6 Schließen Sie den Gelträger an das Power Supply an und starten Sie die Elektrophorese bei 180 V.

**Aufgabe: Werten Sie Ihr Gel bezüglich der gRNA-Synthese aus.**

# Ablaufplan CRISPR/Cas9

## 5. Schneiden des linearisierten Plasmids pBR322 mit der Nuclease Cas9



5.1 Pipettieren Sie folgende Reagenzien gemäß dem folgenden Pipettierschema in die Ansätze 1 - 3:

Ansatz	1	2	3
	pBR322 linearisiert	pBR322 <sub>lin</sub> + Cas9 - gRNA	pBR322 <sub>lin</sub> + Cas9 + gRNA
<b>H<sub>2</sub>O</b> (nuclease-frei)	24 µL	23 µL	22 µL
<b>CP</b> (Puffer)	3 µL	3 µL	3 µL
<b>S</b> (gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
<b>Cas9-Nuclease</b>	0 µL	1 µL	1 µL
<b>Mischen, zentrifugieren und inkubieren Sie für 10 Minuten bei 20 °C</b>			
<b>V</b> (verdautes Plasmid)	1 µL	1 µL	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b> (nuclease-frei)	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Mischen, zentrifugieren und inkubieren Sie für 15 Minuten bei 37 °C</b>			
<b>PK</b> (Proteinase K)	1 µL	1 µL	1 µL
<b>Gesamt Vol.</b>	<b>31 µL</b>	<b>31 µL</b>	<b>31 µL</b>
<b>Mischen, zentrifugieren und inkubieren Sie für 10 Minuten bei 20 °C</b>			

## 6. Überprüfen des Cas9-Schnittes im linearisierten Plasmid mittels Gel-Elektrophorese

- 6.1 Pipettieren Sie aus den Ansätzen 1 – 3 jeweils 8,5 µL in 3 Eppis und beschriften Sie diese mit 1, 2 und 3 und Ihrer Gruppennummer.
- 6.2 Geben Sie in jedes der mit 1 – 3 und Ihrer Gruppennummer beschrifteten Eppis 1,5 µL Ladepuffer (LP) hinzu und mischen Sie durch Auf- und Abpipettieren.
- 6.3 Öffnen Sie die Gelkassette und besetzen Sie die Taschen mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub>
- 6.4 Überschüssiges Wasser wird mit Saugpapier abgesaugt.
- 6.5 Pipettieren Sie 4 µL Marker (**M**) und jeweils 10 µL Ihrer Proben **1 - 3** in die Gel-taschen gemäß dem folgenden Pipettierschema:

M 1/1 1/2 1/3 2/1 2/2 2/3 3/1 3/2 3/3 4/1 4/2 4/3



M 5/1 5/2 5/3 6/1 6/2 6/3 7/1 7/2 7/3 8/1 8/2 8/3



- 6.6 Schließen Sie den Gelträger an das Power Supply an und starten Sie die Gel-Elektrophorese bei 180 V.

**Aufgabe: Werten Sie Ihr Gel bezüglich des Nuclease Cas9-Schnittes aus.**