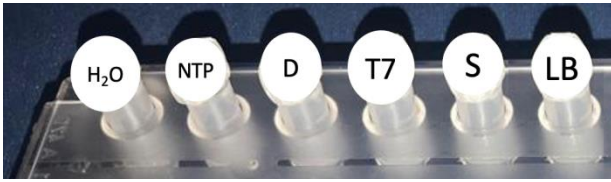


1. Σύνθεση gRNA



1.1 Χρησιμοποιώντας τη μικροπιπέτα, προσθέστε τα παρακάτω αντιδραστήρια στο κενό φιαλίδιο S για τη σύνθεση του gRNA:

Φιαλίδιο	Περιεχόμενο	Ποσότητα
H ₂ O	H ₂ O χωρίς νουκλεάσες	16 μL
NTP	διάλυμα NTP	10 μL
D	Δίκλωνο DNA	2 μL
T7	RNA Πολυμεράση T7	2 μL
Συνολική ποσότητα (S)		30 μL

- 1.2 Για το τυφλό δείγμα του gRNA, να εισάγετε 5 μL από το σωληνάριο S σε ένα νέο σωληνάριο χαρακτηρισμένο ως S₁₀ και να το τοποθετήσετε το στον πάγο.
- 1.3 Θερμάνετε το σωληνάριο S στους 37 °C για 1 ώρα.

2. Προετοιμασία συστήματος ηλεκτροφόρησης για το gRNA

2.1 Ανοίξτε τις κασέτες του τζελ και βρέξτε τα πηγαδάκια με λίγο απιονισμένο H₂O (πλύσιμο κασέτας)

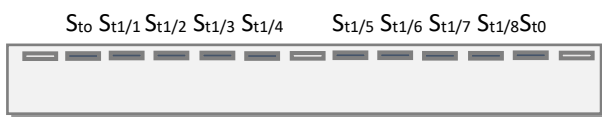
2.2 Απομακρύνετε το πλεονάζον νερό από την κασέτα, χρησιμοποιώντας χαρτί κουζίνας και προσέχοντας αυτό να μην έλθει σε επαφή με τα πηγαδάκια δειγμάτων.

2.3 Εισάγετε από 5 μL από το φιαλίδιο (S) του δείγματος gRNA σε μια σειρά από 8 νέα φιαλίδια που θα ονομάσετε S₁ - S₈, και σημειώστε στο κάθε φιαλίδιο τον αριθμό της ομάδας σας.

Διατηρήστε το σωληνάριο (S) στον πάγο.

2.4 Εισάγετε στα φιαλίδια S₁₀ και S₁₁ - S₁₈ από 1 μL διαλύματος φόρτωσης (LB)

2.5 Τοποθετήστε, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα, 6 μL από καθένα από τα φιαλίδια S₁₀ και S₁₁ - S₁₈ στα πηγαδάκια του τζελ, όπως φαίνεται στο σχήμα.



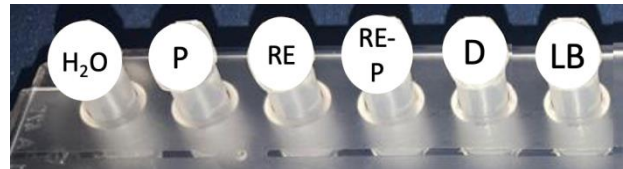
2.6 Συνδέστε την συσκευή ηλεκτροφόρησης στο ρεύμα και ξεκινήστε την ηλεκτροφόρηση του τζελ στα 180 V.

Παρακολουθήστε την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης ανοίγοντας την λάμπα UV.

Εργασία: Αξιολογήστε τη σύνθεση gRNA.

3. Πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση- δημιουργία γραμμικού πλασμιδίου pBR322

3.1 Προσθέστε τα συστατικά για την πέψη με περιοριστική ενδονουκλεάση στο κενό σωληνάριο D, σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:



Tube	Περιεχόμενο	Ποσότητα
H ₂ O	H ₂ O χωρίς νουκλεάσες	15 μL
P	pBR322 (2,5 μg)	5 μL
RE	<i>Pst</i> I (2,5 μονάδες)	2.5 μL
RE-P	Ρυθμιστικό διάλυμα 10x	2.5 μL
Συνολική ποσότητα (D)		25 μL

3.2 Θερμάνετε το σωληνάριο D στους 37 °C για 15 λεπτά.

4. Απόδειξη της πέψης από την περιοριστική ενδονουκλεάση με ηλεκτροφόρηση.

4.1 Ανοίξτε την κασέτα του τζελ και βρέξτε την με απιονισμένο H₂O

4.2 Απομακρύνετε το πλεονάζον νερό χρησιμοποιώντας χαρτί κουζίνας.

4.3 Προσθέστε σε νέο φιαλίδιο C (control), 1 μL διαλύματος φόρτωσης (LB), 1 μL αρχικού πλασμιδίου πριν την πέψη (P) και 4 μL H₂O.

4.4 Για να αποδείξετε την επιτυχή πέψη προσθέστε 1 μL διαλύματος φόρτωσης (LB), 1 μL H₂O και 4 μL από το σωληνάριο D σε ένα νέο σωληνάριο (R).

Διατηρήστε το σωληνάριο D στον πάγο.

4.5 Τοποθετήστε σε κάθε πηγαδάκι του τζέλ τα διαλύματα M, C και R, σύμφωνα με το ακόλουθο σχήμα:

- 4 μL δείκτης (M),
- 6 μL αρχικό πλασμίδιο πριν την πέψη (C)
- 6 μL δείγματα μετά από πέψη (R) για κάθε ομάδα **R1 - R8:**

M C R1 R2 R3 R4 C R5 R6 R7 R8 C M



4.6 Συνδέστε την συσκευή ηλεκτροφόρησης στο ρεύμα και ξεκινήστε την ηλεκτροφόρηση του τζελ στα 180 V.

Παρακολουθήστε την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης ανοίγοντας την λάμπα UV.

Εργασία: Αξιολογήστε το αποτέλεσμα της πέψης του πλασμιδίου ρBR322 από την *Pst*I με ηλεκτροφόρηση.

5. Διάσπαση-πέψη του γραμμικού πλασμιδίου ρBR322 από την ενδονουκλεάση Cas9



5.1 Παρασκευάστε τα δείγματα 1 – 3 σύμφωνα με τον παρακάτω πίνακα:

Δείγμα	1	2	3
	ρBR322 _{lin}	ρBR322 _{lin} + Cas9 (- gRNA)	ρBR322 _{lin} + Cas9 + gRNA
H ₂ O (Χωρίς νουκλεάσες)	24 μL	23 μL	22 μL
CP (διάλυμα Cas9)	3 μL	3 μL	3 μL
S (συντιθέμενο gRNA)	0 μL	0 μL	1 μL
Νουκλεάση Cas9	0 μL	1 μL	1 μL
Αναμείξτε χτυπώντας ελαφρά τα φιαλίδια και θερμάνετε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου			
D (πλασμίδιο μετά από πέψη)	1 μL	1 μL	1 μL
H ₂ O (χωρίς νουκλεάσες)	2 μL	2 μL	2 μL
Αναμείξτε χτυπώντας ελαφρά τα φιαλίδια και θερμάνετε για 10 λεπτά στους 37 °C			
PK (Protein-ase K)	1 μL	1 μL	1 μL
Ποσότητα μείγματος	31 μL	31 μL	31 μL
Αναμείξτε χτυπώντας τα σωληνάρια και θερμάνετε για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου			

6. Απόδειξη της πέψης του γραμμικού πλασμιδίου (ρBR322_{lin}) από την Cas9 με ηλεκτροφόρηση.

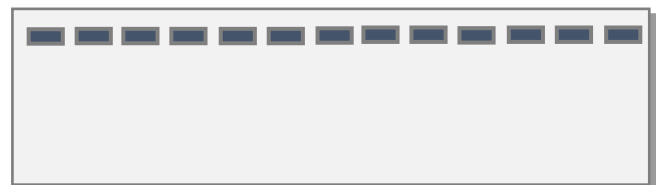
- 6.1 Πιπετάρετε 8.5 μL από τα δείγματα 1-3 (μετά την πέψη) σε τρία νέα σωληνάρια και χαρακτηρίστε τα σωληνάρια ξανά με 1,2 και 3.
- 6.2 Προσθέστε σε καθένα από τα τρία νέα σωληνάρια 1.5 μL διαλύματος φόρτωσης (LB) και αναδεύστε ελαφρά.
- 6.3 Ανοίξτε την κασέτα του τζελ σας και βρέξτε τα πηγαδάκια με απιονισμένο H₂O.
- 6.4 Απομακρύνετε το πλεονάζον νερό χρησιμοποιώντας χαρτί κουζίνας.
- 6.5 Τοποθετήστε τα δείγματα σύμφωνα με το παρακάτω σχήμα στα πηγαδάκια της κασέτας του τζέλ.

- 4 μL δείκτης (M),
- 10 μL από τα δείγματα 1 - 3

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 Συνδέστε την συσκευή ηλεκτροφόρησης στο ρεύμα και ξεκινήστε την ηλεκτροφόρηση του τζελ στα 180V. Παρακολουθήστε την πρόοδο της ηλεκτροφόρησης ανοίγοντας την λάμπα UV.

Εργασία: Αξιολογήστε το αποτέλεσμα της πέψης από τη νουκλεάση Cas9 με ηλεκτροφόρηση.