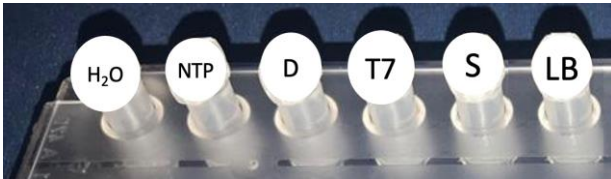


## 1. gRNA-syntéza



1.1 Na gRNA-syntézu napipetujte do prázdné zkumavky S následující činidla:

Zkumavka	Obsah	Objem
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O bez nukleázy	16 $\mu$ L
NTP	NTP puřrovací mix	10 $\mu$ L
D	DNA duplex	2 $\mu$ L
T7	T7 RNA polymeráza	2 $\mu$ L
<b>Celkový objem (S)</b>		<b>30 <math>\mu</math>L</b>

1.2 Pro slepou kontrolu gRNA-syntézy napipetujte 5  $\mu$ L ze zkumavky S do nové zkumavky označené S<sub>10</sub> a chladte na ledu.

1.3 Zkumavku S nechte 1 hod inkubovat při 37 °C.

## 2. Kontrola vyprodukované gRNA pomocí gelové elektroforézy

2.1 Otevřete gelovou kazetu a navlhčete jamky H<sub>2</sub>O<sub>dist.</sub>

2.2 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

2.3 Napipetujte 5  $\mu$ L z vaší gRNA syntézy ze zkumavky S do nové zkumavky S<sub>11</sub> označené číslem vaší skupiny. **Zkumavku S nechte na ledu.**

2.4 Do zkumavek S<sub>10</sub> a S<sub>11</sub> přidejte 1  $\mu$ L nanášecího puřru (LB).

2.5 Podle následujícího schématu napipetujte do jamek 6  $\mu$ L gRNA syntézy ze zkumavek S<sub>11/1</sub> – S<sub>11/8</sub> a na začátek a konec řady S<sub>10</sub>:

S<sub>10</sub> S<sub>11/1</sub> S<sub>11/2</sub> S<sub>11/3</sub> S<sub>11/4</sub> S<sub>11/5</sub> S<sub>11/6</sub> S<sub>11/7</sub> S<sub>11/8</sub> S<sub>10</sub>



2.6 Připojte FlashGel stanici do zdroje elektřiny a zapněte jej na 180 V. Sledujte průběh elektroforézy zapnutím UV světla na stanici.

**Úloha: Vyhodnoťte úspěšnost gRNA syntézy na základě gelové elektroforézy.**

## 3. Restrikční štěpení k linearizaci plasmidu pBR322

3.1 Podle následující tabulky napipetujte do zkumavky D ingredience pro restrikčního štěpení:



Zkumavka	Obsah	Objem
H <sub>2</sub> O	H <sub>2</sub> O bez nukleázy	15 $\mu$ L
P	pBR322 (2,5 $\mu$ g)	5 $\mu$ L
RE	<i>Pst</i> I (2,5 jednotky)	2.5 $\mu$ L
RE-P	10x Restrikční puřr	2.5 $\mu$ L
<b>Celkový objem (D)</b>		<b>25 <math>\mu</math>L</b>

3.2 Zkumavku D nechte 15 minut inkubovat při 37 °C.

## 4. Důkaz restrikčního štěpení pomocí gelové elektroforézy

4.1 Otevřete gelovou kazetu a navlhčete jamky H<sub>2</sub>O<sub>dist.</sub>

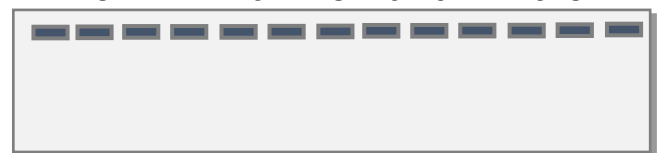
4.2 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

4.3 Pro slepou kontrolu napipetujte do nové zkumavky C 1  $\mu$ L nanášecího puřru (LB), 1  $\mu$ L plasmidu (P) a 4  $\mu$ L H<sub>2</sub>O.

4.4 Na důkaz úspěšného naštěpení napipetujte 1  $\mu$ L nanášecího puřru (LB), 1  $\mu$ L H<sub>2</sub>O a 4  $\mu$ L restrikční endonukleázy ze zkumavky D do nové zkumavky R. **Zkumavku D nechte na ledu.**

4.5 Podle následujícího schématu napipetujte do každé jamky  
 - 4  $\mu$ L marker (M),  
 - 6  $\mu$ L nenaštěpený plasmid (C)  
 - 6  $\mu$ L restrikčního vzorku (R)  
 z každé z 8 skupin **R1 – R8** do jamek v gelu:

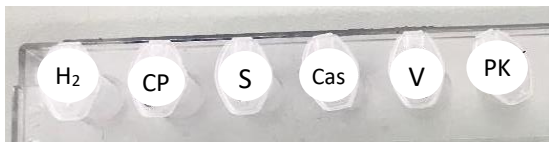
M C R1 R2 R3 R4 C R5 R6 R7 R8 C M



4.6 Připojte FlashGel stanici do zdroje elektřiny a zapněte jej na 180 V. Sledujte progres elektroforézy zapnutím UV světla na stanici.

Úloha: Vyhodnoťte svůj gel na základě restrikčního štěpení plazmidu pBR322 endonukleázou PstI.

## 5. Štěpení linearizovaného plazmidu pBR322 nukleázou Cas9



### 5.1 Podle následující tabulky napipetujte vzorky 1-3:

Vzorek	1	2	3
	pBR322 <sub>lin</sub>	pBR322 <sub>lin</sub> + Cas9 (- gRNA)	pBR322 <sub>lin</sub> + Cas9 + gRNA
H <sub>2</sub> O (bez nukleázy)	24 µL	23 µL	22 µL
CP (Pufr)	3 µL	3 µL	3 µL
S (nasytované zvané gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 nukleáza	0 µL	1 µL	1 µL
<b>Zkumavky poklepáním promíchejte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě</b>			
D (naštěpený plazmid)	1 µL	1 µL	1 µL
H <sub>2</sub> O (bez nukleázy)	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Zkumavky poklepáním promíchejte a inkubujte 10 minut při 37 °C</b>			
PK (proteináza K)	1 µL	1 µL	1 µL
Objem vzorku	31 µL	31 µL	31 µL

**Zkumavky poklepáním promíchejte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě**

## 6. Důkaz naštěpení linearizovaného plazmidu (pBR322<sub>lin</sub>) nukleázou Cas 9 pomocí gelové elektroforézy.

6.1 Napipetujte 8.5 µL z vašich naštěpených vzorků 1 – 3 do 3 nových zkumavek a znovu je označte 1, 2 a 3.

6.2 Přidejte do každé ze 3 nových zkumavek 1.5 µL nanášecího pufru (LB) a promíchejte poklepáním.

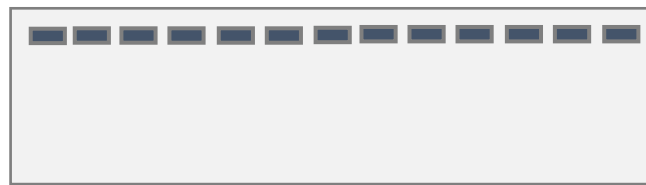
6.3 Otevřete gelovou kazetu a navlhčete jamky H<sub>2</sub>O<sub>dist.</sub>

6.4 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

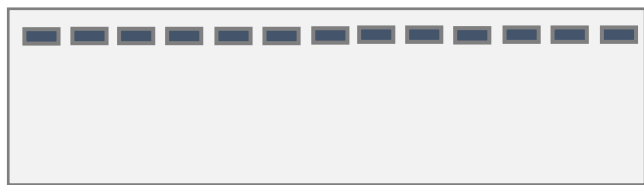
6.5 Podle následujícího schématu napipetujte do jamek

- 4 µL markeru (M),
- 10 µL vašich vzorků 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 Připojte FlashGel stanici do zdroje elektřiny a spusťte gelovou elektroforézu na 180 V. Sledujte progres elektroforézy zapnutím UV světla na stanici.

Úloha: Pomocí gelové elektroforézy vyhodnoťte úspěšnost štěpení plazmidu nukleázou Cas9