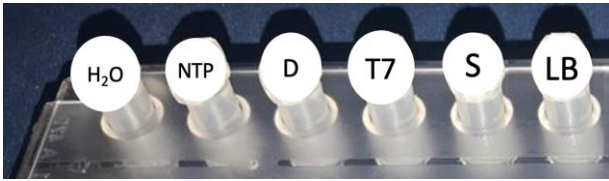


## 1. gRNA-syntese



1.1 Pipetter de følgende midler i den tomme tube, S, som skal bruges i forbindelse med gRNA-syntesen.

Tube	Content	Vol.
H <sub>2</sub> O	Nuclease free H <sub>2</sub> O	16 µL
NTP	NTP Buffer mix	10 µL
D	DNA Duplex	2 µL
T7	T7 RNA Polymerase	2 µL
<b>Total Volume (S)</b>		<b>30 µL</b>

1.2 Som kontrol i gRNA-syntesen, pipetteres 5 µL fra tube S til en ny tube, der markeres med S<sub>10</sub>. Tube S<sub>10</sub> puttes i is.

1.3 Tube S inkuberes på 37 °C i 1 time.

## 2. Gelelektroforese-tjek af det producerede gRNA.

2.1 Åben gelkassetten og fugtiggør brøndene med H<sub>2</sub>O<sub>dist</sub>.

2.2 Tør det tilbageblivende demineraliserede vand af gelkassetten med papir.

2.3 Pipetter 5 µL af gRNA syntese-tuben S i en ny tube, markeret med S<sub>11</sub> og jeres gruppenr. Put tube S i is.

2.4 Tilføj 1 µL af loading buffer (LB) til både tube S<sub>10</sub> og S<sub>11</sub>.

2.5 Pipetter 6 µL af gRNA syntesetuberne S<sub>11/1</sub> – S<sub>11/8</sub> og to gange S<sub>10</sub> i brøndene i gelen på følgende måde:

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>

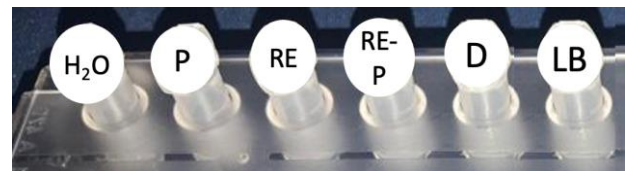


2.6 Forbind FlashGel dock til en strømforsyning og start gelelektroforesen på 180 V. Hold øje med elektroforensens forløb ved at tænde UV-lyset.

Opgave: Evaluer jeres gel vedrørende jeres gRNA syntese.

## 3. Restriktionsfragmentering for at udligne plasmid pBR322

3.1 Pipetter de restriktionsfragmenterende midler fra det følgende skema i den tomme tube D:



Tube	Content	Vol.
H <sub>2</sub> O	Nuclease free H <sub>2</sub> O	15 µL
P	pBR322 (2,5 µg)	5 µL
RE	<i>Pst</i> I (2,5 units)	2.5 µL
RE-P	10x Restriction Buffer	2.5 µL
<b>Total Volume (D)</b>		<b>25 µL</b>

3.2 Tube D inkuberes på 37 °C i 15 minutter.

## 4. Test for om restriktionsfragmenteringen har virket med en gelelektroforese

4.1 Åben gelkassetten og fugtiggør brøndene med H<sub>2</sub>O<sub>dist</sub>.

4.2 Tør det tilbageblivende demineraliserede vand af gelkassetten med papir.

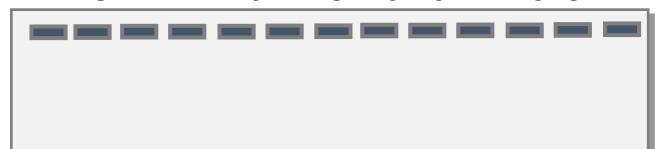
4.3 Som kontrol pipetteres 1 µL loading buffer (LB), 1 µL af ikke-fragmenteret plasmid (P) og 4 µL H<sub>2</sub>O i en ny tube C.

4.4 For at vurdere om fragmenteringen har været succesfuld, pipetteres 1 µL loading buffer (LB), 1 µL H<sub>2</sub>O and 4 µL restriktionsfragment fra tube D i en ny tube kaldet R. **Put tube D i is.**

4.5 Pipetter i overensstemmelse med det følgende pipetteringsskema i hver brønd

- 4 µL marker (M),
- 6 µL ikke-fragmenteret plasmid (C)
- 6 µL af restriktionsprøverne (R) fra hver gruppe **R1 – R8** i brøndene i gelen:

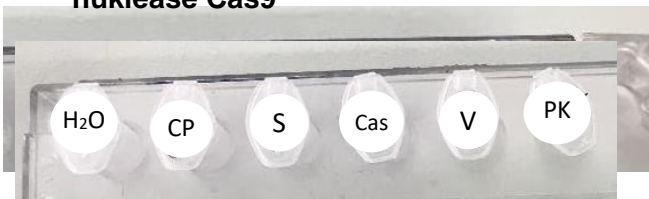
M C R1 R2 R3 R4 C R5 R6 R7 R8 C M



4.6 Forbind FlashGel dock til en strømforsyning og start gelelektroforesen på 180 V. Hold øje med elektroforensens forløb ved at tænde UV-lyset.

**Opgave:** Evaluer jeres gel vedrørende restriktionsfragmenteringen af plasmid pBR322 af PstI

## 5. Splittelse af udfoldet plasmid pBR322 af nuklease Cas9



5.1 Pipetter prøve 1-3 på følgende måde, som skemaet viser:

Prøve	1	2	3
	pBR322 <sub>lin</sub>	pBR322 <sub>lin</sub> + Cas9 (- gRNA)	pBR322 <sub>lin</sub> + Cas9 + gRNA
<b>H<sub>2</sub>O</b> (Nuklease fri)	24 µL	23 µL	22 µL
<b>CP</b> (Buffer)	3 µL	3 µL	3 µL
<b>S</b> (synteseret gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 Nuklease	0 µL	1 µL	1 µL
<b>Bland ved at ryste og inkuber dem i 10 min ved stuetemperatur</b>			
<b>D</b> (Fragmenteret plasmid)	1 µL	1 µL	1 µL
<b>H<sub>2</sub>O</b> (Nuklease fri)	2 µL	2 µL	2 µL
<b>Bland ved at ryste og inkuber dem i 10 min ved temperatur 37 °C</b>			
<b>PK</b>			

(Proteinase K)	1 µL	1 µL	1 µL
<b>Prøve Vol.</b>	<b>31 µL</b>	<b>31 µL</b>	<b>31 µL</b>
<b>Bland ved at ryste og inkuber dem i 10 min ved stuetemperatur</b>			

6. Test for om Cas9 splittelsen i det udfoldede plasmid (pBR322<sub>lin</sub>) af gelelektroforesen har været succesfuld.

6.1 Pipetter 8.5 µL af de opsplittede prøver 1-3 i 3 nye tuber and marker tuberne igen med 1, 2 og 3.

6.2 Tilføj til hver af de 3 nye tuber 1.5 µL af loading buffer (LB) og bland det ved at ryste.

6.3 Åben gelkassetten og fugtiggør brøndene med H<sub>2</sub>O<sub>dist.</sub>

6.4 Tør det tilbageblivende demineraliserede vand af gelkassetten med papir.

6.5 Pipetter i overensstemmelse med det følgende pipetteringsskema i hver brønd  
- 4 µL marker (M),  
- 10 µL af prøverne 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 Forbind FlashGel dock til en strømforsyning og start gelelektroforesen på 180 V.

Hold øje med elektroforensens forløb ved at tænde UV-lyset.

**Opgave:** Evaluer jeres gel vedrørende nuklease Cas9 splittelsen.