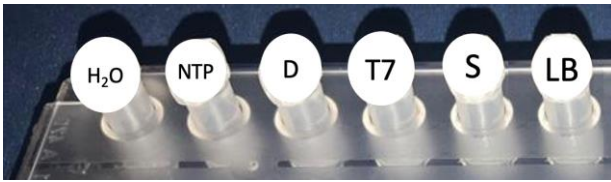


1. gRNR sintezė



1.1 Pipete įpilkite lentelėje pateiktus reagentus į mėgintuvėlį S:

Mėgintuvėlis	Turinys	Tūris
H ₂ O	Vanduo be nukleazių	16 μL
NTP	NTP buferinio tirpalo mišinys	10 μL
D	Dvigrandė DNR	2 μL
T7	T7 RNR polimerazė	2 μL
Bendras tūris (S)		30 μL

- 1.2 Kontrolei pipete iš mėgintuvėlio S įpilkite 5 μL turinio į mėgintuvėlį S₁₀ ir įdėkite į ledo vonelę.
 1.3 Mėgintuvėlį S inkubuokite 37 °C temperatūroje 1 valandą.

2. Pagamintos gRNR patikrinimas elektroforezės būdu

- 2.1 Atidarykite gelio kasetę ir sudrėkinkite šulinėlius H₂O_{dist}.
 2.2 Pašalinkite vandens perteklių popieriniu rankšluosčiu.
 2.3 Pipete įpilkite 5 μL iš savo gRNR sintezės mėgintuvėlio (S) į naują mėgintuvėlį, pažymėtą S_{t1} ir jūsų grupės numeriu.
Mėgintuvėlį S toliau laikykite lede.
 2.4 Į mėgintuvėlius S₁₀ ir S_{t1} įpilkite 1 μL mėginio suleidimo dažo (LB).
 2.5 Pagal nurodytą schemą į gelio šulinėlius pipete įpilkite po 6 μL gRNR iš savo grupės mėgintuvėlių S_{t1/1} – S_{t1/8} ir dviejų iš grupių S₁₀:

S₁₀ S_{t1/1} S_{t1/2} S_{t1/3} S_{t1/4} S_{t1/5} S_{t1/6} S_{t1/7} S_{t1/8} S₁₀



- 2.6 Prijunkite FlashGel įrenginį prie maitinimo šaltinio ir pradėkite elektroforezę 180 V įtampoje. Stebėkite elektroforezės eigą įjungę UV lempą ant įrenginio.

Užduotis: pagal elektroforezės rezultatus įvertinkite ar gRNR sintezė įvyko.

3. Plazmidės pBR322 DNR linearizavimas naudojant restrikcijos endonukleazes

3.1 Pipete įpilkite lentelėje pateiktus restrikcijos ingredientus į mėgintuvėlį D:



Mėgintuvėlis	Turinys	Tūris
H ₂ O	Vanduo be nukleazių	15 μL
P	pBR322 (2,5 μg)	5 μL
RE	PstI (2,5 vienetai)	2.5 μL
RE-P	10x restrikcijos buferinis tirpalas	2.5 μL
Bendras tūris (D)		25 μL

3.2 Mėgintuvėlį D inkubuokite 37 °C temperatūroje 15 minučių.

4. Plazmidinės DNR linearizavimo patikrinimas elektroforezės būdu

- 4.1 Atidarykite gelio kasetę ir sudrėkinkite šulinėlius H₂O_{dist}.
 4.2 Pašalinkite vandens perteklių popieriniu rankšluosčiu.
 4.3 Kontrolei į naują mėgintuvėlį (C) pipete įpilkite 1 μL mėginio suleidimo dažo (LB), 1 μL nekirptos plazmidinės DNR ir 4 μL H₂O.
 4.4 Į naują mėgintuvėlį (R) pipete įpilkite 1 μL mėginio suleidimo dažo (LB), 1 μL H₂O ir 4 μL mėgintuvėlio D turinio. **Mėgintuvėlį D toliau laikykite lede.**
 4.5 Pagal nurodytą schemą į gelio šulinėlius pipete įpilkite
 - 4 μL molekulinės masės žymens (M),
 - 6 μL nekirptos plazmidinės DNR (C),
 - 6 μL sukarpytos plazmidinės DNR (R)
 mėginius iš kiekvienos iš 8 grupių **R1 – R8**.

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



- 4.6 Prijunkite FlashGel įrenginį prie maitinimo šaltinio ir pradėkite elektroforezę 180 V įtampoje. Stebėkite elektroforezės eigą įjungę UV lempą ant įrenginio.

Užduotis: pagal elektroforezės rezultatus įvertinkite ar plazmidinė DNR buvo linearizuota.

5. Linearizuotos plazmidės pBR322 DNR perkirpimas nukleaze Cas9



5.1 Pagal pateiktą lentelę pipete supilstykite lentelėje pateiktus mėginius 1-3

Mėginys	1	2	3
	pBR322 _{lin}	pBR322 _{lin} + Cas9 (- gRNR)	pBR322 _{lin} + Cas9 + gRNR
H₂O (be nukleazių)	24 µL	23 µL	22 µL
CP (buferinis tirpalas)	3 µL	3 µL	3 µL
S (susintetinta gRNR)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 nukleazė	0 µL	1 µL	1 µL
Maišykite lengvai tapšnodami mėgintuvėlius ir inkubuokite 10 minučių kambario temperatūroje			
D (Ištiesinta plazmidinė DNR)	1 µL	1 µL	1 µL
H₂O (Be nukleazių)	2 µL	2 µL	2 µL
Maišykite lengvai tapšnodami mėgintuvėlius ir inkubuokite 10 minučių 37 °C temperatūroje			
PK (Proteazė K)	1 µL	1 µL	1 µL
Mėginių tūris	31 µL	31 µL	31 µL
Maišykite lengvai tapšnodami mėgintuvėlius ir inkubuokite 10 minučių kambario temperatūroje			

6. Linearizuotos plazmidės (pBR322_{lin}) DNR perkirpimo Cas9 nukleazėmis įrodymas elektroforezės būdu

6.1 Pipete įpilkite 8,5 µL iš mėgintuvėlių 1-3 į naujus mėgintuvėlius, kuriuos taip pat pažymėkite skaičiais 1, 2 ir 3.

6.2 Į kiekvieną iš naujų mėgintuvėlių įpilkite po 1,5 µL mėginio suleidimo dažo (LB) ir tapšnodami maišykite.

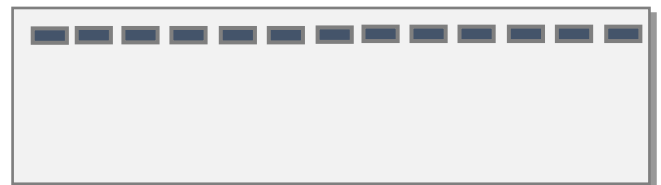
6.3 Atidarykite gelio kasetę ir sudrėkinkite šulinėlius H₂O_{dist}.

6.4 Pašalinkite vandens perteklių popieriniu rankšluosčiu.

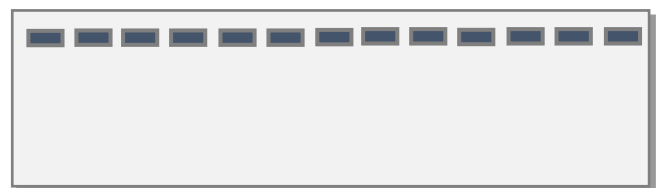
6.5 Pagal nurodytą schemą į gelio šulinėlius pipete įpilkite

- 4 µL molekulinės masės žymens (M),
- 10 µL mėginių 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 Prijunkite FlashGel įrenginį prie maitinimo šaltinio ir pradėkite elektroforezę 180 V įtampoje. Stebėkite elektroforezės eigą įjungę UV lempą ant įrenginio.

Užduotis: pagal elektroforezės rezultatus įvertinkite ar Cas9 nukleazė įvykdė plazmidinės DNR kirpimą.