

1. Syntéza gRNA



1.1 Napipetujte nasledujúce činidlá do prázdnej mikroskúmavky S pre syntézu gRNA:

Mikroskúmavky	Obsah	Objem
H ₂ O	H ₂ O bez nukleázy	16 μ L
NTP	NTP zmes tlmivých roztokov	10 μ L
D	dvojzávitnicová DNA	2 μ L
T7	T7 RNA polymeráza	2 μ L
Výsledný objem (S)		30 μL

1.2 Na slepý pokus pre syntézu gRNA, napipetujte 5 μ L z vašej mikroskúmavky S do novej mikroskúmavky s označením S₀ a položte ju do ľadu.

1.3 Inkubujte vašu mikroskúmavku S pri 37 °C na 1 h.

2. Kontrola produkcie gRNA gélovou elektroforézou

2.1 Otvorte gélovú kazetu a navlhčte jamky kazety s destilovanou H₂O.

2.2 Odsajte prebytočnú vodu papierovými utierkami.

2.3 Napipetujte 5 μ L z mikroskúmavky s gRNA-syntézou (S) do novej mikroskúmavky s označením S_{t1} a vašim číslom skupiny. **Nechajte mikroskúmavku (S) v ľade.**

2.4 Do oboch mikroskúmaviek S₀ a S_{t1} napipetujte 1 μ L tlmivého roztoku (LB).

2.5 Pipetujte podľa nasledujúcej schémy 6 μ L gRNA-syntézy z mikroskúmaviek S_{t1/1} – S_{t1/8} a do dvoch jamiek S₀

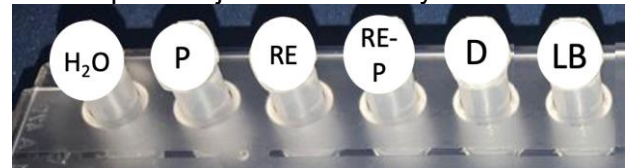


2.6 Napojte FlashGel systém do elektrickej siete a začnite elektroforézu na 180V. Pozorujte priebeh elektroforézy použitím UV lampy.

ÚLOHA: Vyhodnoťte syntézu gRNA vo vašom géli.

3. Reštrikčné štiepenie plazmidu pBR322 na lineárny plazmid

3.1 Napipetujte reaktanty pre reštrikčné štiepenie do prázdnej mikroskúmavky s označením D:



Mikroskúmavky	Obsah	Objem
H ₂ O	H ₂ O bez nukleázy	15 μ L
P	pBR322 (2,5 μ g)	5 μ L
RE	PstI (2,5 jednotky)	2.5 μ L
RE-P	10x Reštrikčný tlmič	2.5 μ L

Výsledný objem (D) 25 μ L

3.2 Inkubujte vašu mikroskúmavku D pri 37 °C, 15 min.

4. Dôkaz reštrikčného štiepenia pomocou gélovej elektroforézy

4.1 Otvorte gélovú kazetu a navlhčte jamky kazety destilovanou H₂O.

4.2 Odsajte prebytočnú vodu papierovými utierkami.

4.3 Napipetujte na slepý pokus 1 μ L tlmivého roztoku (LB), 1 μ L kruhového nerozštiepeného plazmidu (P) a 4 μ L H₂O do novej mikroskúmavky (C).

4.4 Pre potvrdenie úspešného štiepenia napipetujte: 1 μ L tlmivého roztoku (LB), 1 μ L H₂O a 4 μ L reštrikčných enzýmov z mikroskúmavky D do novej mikroskúmavky (R).

Nechajte mikroskúmavku (D) v ľade.

4.5 Pipetujte podľa nasledujúcej schémy do každej jamky:

- 4 μ L marker (M),
- 6 μ L kruhov nerozštiepený plazmid (C)
- 6 μ L rozštiepených vzoriek (R) zo všetkých 8 skupín R1 – R8 do jamiek v géli:

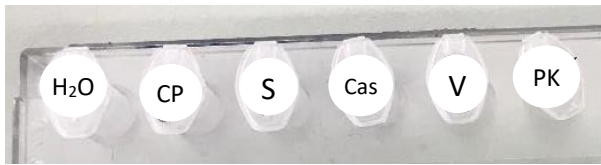
M C R1 R2 R3 R4 C R5 R6 R7 R8 C M



4.6 Napojte FlashGel systém do elektrickej siete na 180V. Pozorujte priebeh elektroforézy použitím UV lampy.

ÚLOHA: Vyhodnoťte reštrikčné štiepenie plazmidov pBR322 pomocou PstI v géli.

5. Štiepenie lineárneho plazmidu pBR322 nukleázou Cas9



5.1 Napipetujte vzorky 1 – 3 podľa nasledujúcej tabuľky:

Vzorky	1	2	3
	pBR322 _{lin}	pBR322 _{lin} + Cas9 (- gRNA)	pBR322 _{lin} + Cas9 + gRNA
H₂O (bez nukleázy)	24 µL	23 µL	22 µL
CP (pufor)	3 µL	3 µL	3 µL
S (nasyntetizovaná gRNA)	0 µL	0 µL	1 µL
Cas9 Nukleáza	0 µL	1 µL	1 µL
Premiešajte roztok v mikroskúmavke pomocou klepania a inkubujte pri izbovej teplote 10 min.			
D (rozštiepený plazmid)	1 µL	1 µL	1 µL
H₂O (bez nukleázy)	2 µL	2 µL	2 µL
Premiešajte roztok v mikroskúmavke pomocou klepania a inkubujte pri izbovej teplote 10 min.			
PK (Proteáza K)	1 µL	1 µL	1 µL
Objem vzorky	31 µL	31 µL	31 µL

Premiešajte roztok v mikroskúmavke pomocou klepania a inkubujte pri izbovej teplote 10 min.

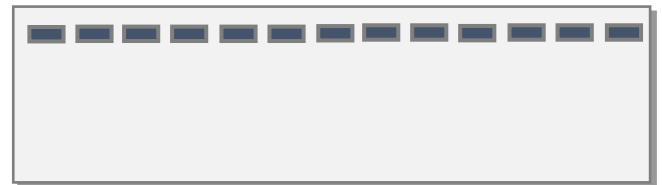
6. Dôkaz štiepenia lineárneho plazmidu (pBR322_{lin}) Cas9 pomocou gélovej elektroforézy

- Napipetujte 8.5 µL z vašich štiepených vzoriek 1 – 3 do 3 nových mikroskúmaviek a označte mikroskúmavky 1, 2 a 3.
- Do každej z nových 3 mikroskúmaviek pridajte 1.5 µL tlmivého roztoku (LB) a premiešajte.
- Otvorte gélovú kazetu a navlhčte jamky kazety s destilovanou H₂O.
- Odsajte prebytočnú vodu papierovými utierkami.
- Pipetujte podľa nasledujúcej schémy do každej jamky
 - 4 µL marker (M),
 - 10 µL z vašich vzoriek 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



- Napojte FlashGel systém do elektrickej siete na 180V. Pozorujte priebeh elektroforézy použitím UV lampy.

ÚLOHA: Vyhodnoťte štiepenie nukleázou Cas9 v géli.