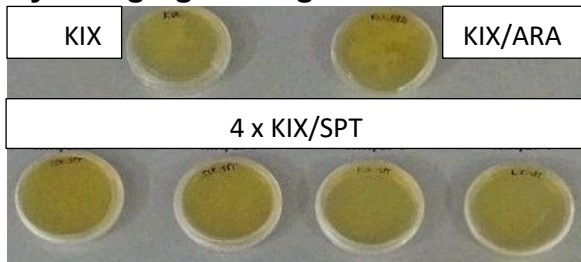


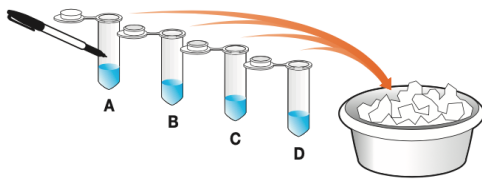
Protokol Genredigering ved CRISPR/Cas9

Dyrkning og Næringsstoffer:



1. Genredigering ved CRISPR/Cas9

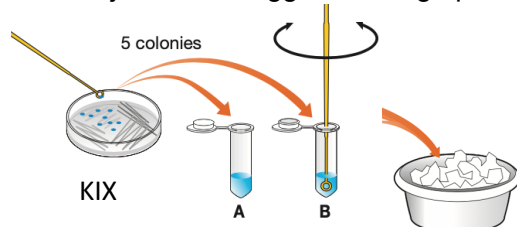
1.1 Pipetter 250 μ L iskold transformationsopløsning (TS) i hver af de 4 etiketterede rør A – D. Placér de 4 rør tilbage på is.



1.2 Med en podenålsøjle tag 5 *E. coli* kolonier fra **KIX**-starter plade.

Rør podenålsøjet i rør A indtil alle bakterier er spredt i transformationsopløsningen. Ingen bakterier skal være tilbage på podenålsøjet.

Gentag trinnet med rør B med et nyt podenålsøje. Placér begge rør tilbage på is.

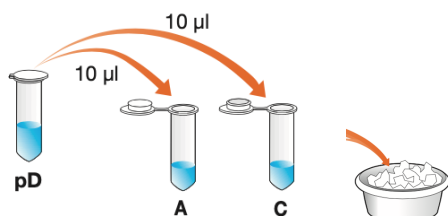


1.3 Med et podenålsøje tag 5 *E. coli* kolonier fra **KIX/Ara**-starter plade.

Rør podenålsøjet i rør C indtil alle bakterier er spredt i transformationsopløsningen. Ingen bakterier skal være tilbage på podenålsøjet.

Gentag trinnet med rør D med et nyt podenålsøje. Placér begge rør tilbage på is.

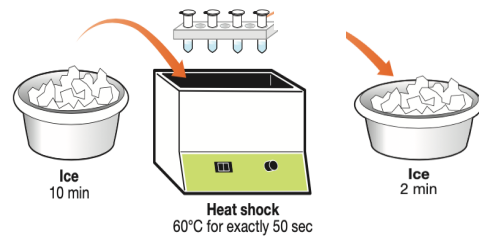
1.4 Pipetter i hvert rør A og C 10 μ L *pLZDonor Plasmid (pD)* og bland det ved at pipettere op og ned. Placér straks begge rør tilbage på is.



1.5 Pipetter i hver rør B og D 10 μ L *pLZDonor Guide Plasmid (pDG)* og bland det ved at pipettere op og ned. Placér begge rør tilbage på is.

1.6 Inkubér rør A – D i 10 minutter på is.

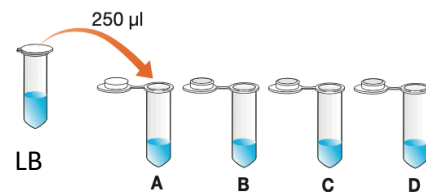
1.7 Giv de iskolde rør A - D varmekok på en flydeplade i præcis 50 sekunder i et 60 °C varmt vandbad.



1.8 Returnér straks de 4 rør på is i 2 minutter.

1.9 Pipetter i hvert af de 4 rør A – D 250 μ L LB-næringsmedium og bland det ved at knipse.

Inkubér de 4 rør i 20 minutter ved stuetemperatur.



1.10 Tæt på kanten, mærker bundene af 4 **KIX/SPT** selektionsplader med A – D og dit gruppenummer.



1.11 Genopslem bakterier i rør A ved at knipse.

1.12 Pipetter 50 μ L af rør A på plade A og spred væske jævnt med en Drigalski spatel. Rotér pladen flere gange under processen.

1.13 Gentag trin 1.11 og 1.12 med rør B, C and D og plade B, C og D.

1.14 Inkubér pladerne med bunden opad i 24 timer ved 37 °C.

Evaluering af Eksperiment

1. Tjek dine plader for farveudvikling.
2. Forklar blå og hvid farve i kolonier i de forskellige plader.