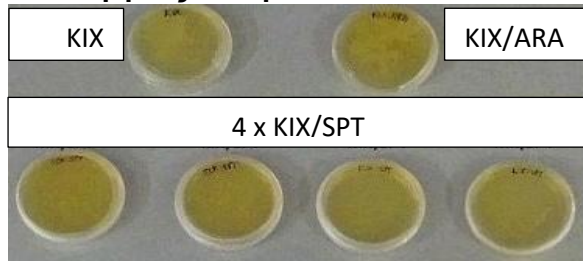


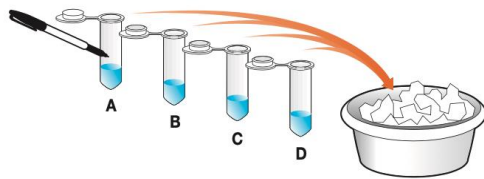
Πρωτόκολλο γονιδιακής επεξεργασίας μέσω CRISPR/Cas9

Καλλιέργειες και θρεπτικά υλικά:

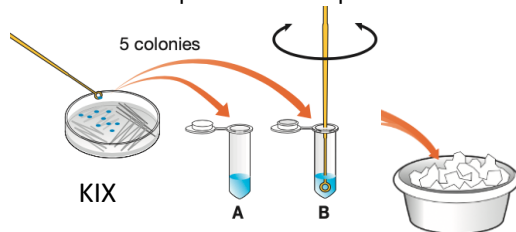


1. Γονιδιακή επεξεργασία με CRISPR/Cas9

1.1 Τοποθετούμε 250 μ L από το διάλυμα μετασχηματισμού που είναι στον πάγο (TS) σε καθένα από τα 4 σωληνάκια με ετικέτα A – D. Τοποθετούμε τα 4 σωληνάκια στον πάγο.

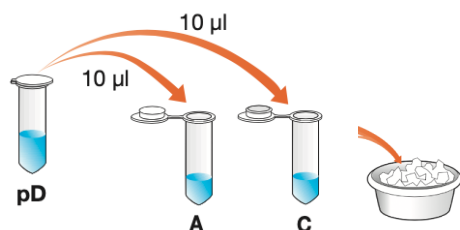


1.2 Με τον κρίκο εμβολιασμού επιλέγουμε 5 αποικίες από την *E. coli* από το **KIX**-τροβλίο εκκίνησης. Περιστρέφουμε τον κρίκο στο σωληνάκι A μέχρι να αιωρούνται όλα τα βακτήρια στο διάλυμα μετασχηματισμού. Κανένα βακτήριο δεν πρέπει να παραμείνει στον κρίκο εμβολιασμού. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία στο σωληνάκι B με έναν νέο κρίκο εμβολιασμού. Τοποθετούμε και τα δύο σωληνάκια στον πάγο.



1.3 Με έναν κρίκο εμβολιασμού επιλέγουμε 5 αποικίες από την *E. coli* από το **KIX/Ara**-τροβλίο εκκίνησης. Περιστρέφουμε τον κρίκο στο σωληνάκι C μέχρι να αιωρούνται όλα τα βακτήρια στο διάλυμα μετασχηματισμού. Κανένα βακτήριο δεν πρέπει να παραμείνει στον κρίκο εμβολιασμού. Επαναλαμβάνουμε την διαδικασία αυτή στο σωληνάκι D με έναν νέο κρίκο εμβολιασμού. Τοποθετούμε και τα δύο σωληνάκια στον πάγο.

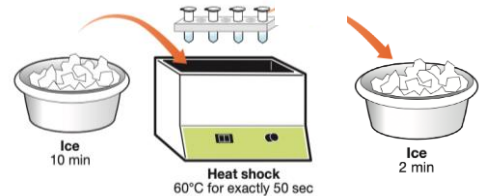
1.4 Τοποθετούμε 10 μ L από το *pLZDonor* Πλασμίδιο (**pD**) στα σωληνάκια A και C και τα αναμειγνύουμε πιπετάροντας πάνω-κάτω. Τοποθετούμε αμέσως και τα δύο σωληνάκια στον πάγο.



1.5 Τοποθετούμε 10 μ L από το *pLZDonor* Πλασμίδιο Οδηγό (**pDG**) σε καθένα από τα σωληνάκια B και D και τα αναμειγνύουμε πιπετάροντας πάνω-κάτω. Τοποθετούμε αμέσως και τα δύο σωληνάκια πίσω στον πάγο.

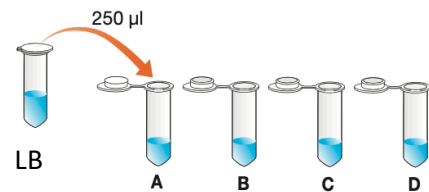
1.6 Επωάζουμε τα σωληνάκια A – D για 10 λεπτά στον πάγο.

1.7 Θερμική επεξεργασία των παγωμένων σωληνακίων A - D για ακριβώς 50 δευτερόλεπτα στους 60 °C σε ζεστό λουτρό νερού.



1.8 Επιστρέφουμε αμέσως τα 4 σωληνάκια στον πάγο για 2 λεπτά.

1.9 Τοποθετούμε σε καθένα από τα 4 σωληνάκια A – D 250 μ L LB θρεπτικό υλικό και τα αναμειγνύουμε τρίβοντάς τα. Επωάζουμε τα 4 σωληνάκια για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.



1.10 Ονομάζουμε το κάτω μέρος από τα 4 KIX/SPT τρυβλία επιλογής με A – D και τον αριθμό της ομάδας μας κοντά στις άκρες.



1.11 Επαναιωρούμε τα βακτήρια στο σωληνάκι A τρίβοντάς το.

1.12 Τοποθετούμε 50 μ L από το σωληνάκι A στο τρυβλίο A και απλώνουμε το υγρό εξίσου με την Drigalski σπάτουλα. Κατά την διαδικασία περιστρέφουμε το τρυβλίο αρκετές φορές.

1.13 Επαναλαμβάνουμε τα βήματα 1.11 και 1.12 με τα σωληνάκια B, C και D και με τα τρυβλία B, C και D.

1.14 Επωάζουμε τα τρυβλία αναποδугυρίζοντάς τα για 24 ώρες στους 37 °C.

Αξιολόγηση του πειράματος

1. Ελέγχουμε τα τρυβλία για ανάπτυξη χρώματος.
2. Εξηγούμε την παρουσία μπλε και άσπρων αποικιών στα διαφορετικά τρυβλία.