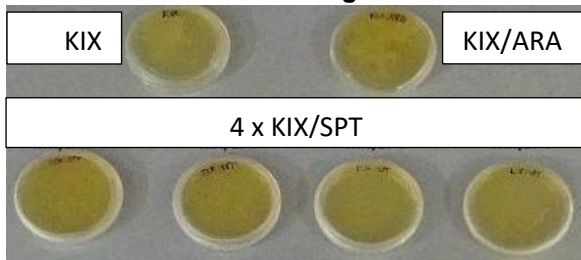


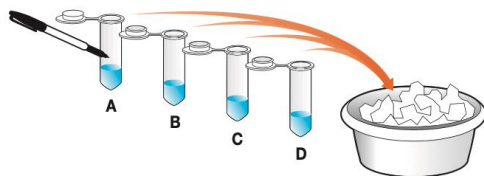
Genų modifikavimo su CRISPR/Cas9 protokolas

Kultūros ir maisto medžiagos:

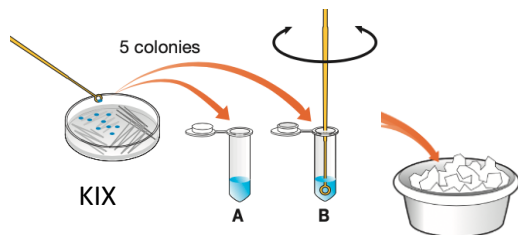


1. Genų apdorojimas su CRISPR/Cas9

1.1 Pipete įpilkite 250 μ l ledo šaltumo transformacijos tirpalo (TS) į kiekvieną iš 4 pažymėtų mėgintuvėlių A – D. Padėkite 4 mėgintuvėlius atgal ant ledo.

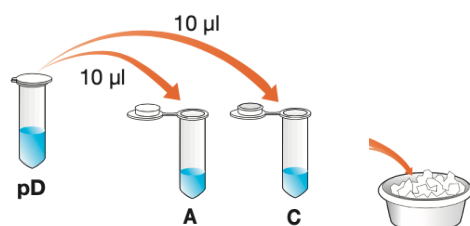


1.2 Inokuliacijos kilpa iš KIX pradinės plokštelės paimkite 5 E. coli kolonijas. Sukiokite kilpą mėgintuvėlyje A, kol visos bakterijos pasiskirstys transformacijos tirpale. Ant kilpos neturėtų likti bakterijų. Pakartokite žingsnį su mėgintuvėliu B su nauja kilpa. Padėkite abu mėgintuvėlius atgal ant ledo.



1.3 Inokuliacijos kilpa iš KIX/Ara-starterio plokštelės paimkite 5 E. coli kolonijas. Sukiokite kilpą mėgintuvėlyje C, kol visos bakterijos pasiskirstys transformacijos tirpale. Ant kilpos neturėtų likti bakterijų. Pakartokite veiksmą su nauja kilpa D mėgintuvėlyje. Padėkite abu mėgintuvėlius atgal ant ledo.

1.4 Į mėgintuvėlius A ir C pipete įpilkite 10 μ L pLZDonor Plazmidės (pD) ir maišykite pipete braukdami aukštyn ir žemyn. Nedelsdami padėkite abu vamzdelius atgal ant ledo.

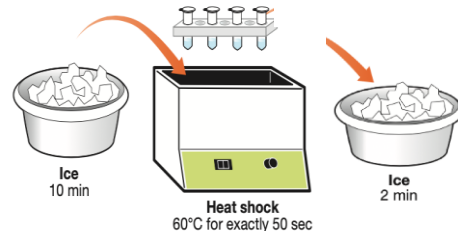


1.5 Į mėgintuvėlius B ir D pipete įpilkite 10 μ L pLZDonor Guide Plasmid (pDG) ir maišykite

pipete aukštyn ir žemyn. Padėkite abu vamzdelius atgal ant ledo.

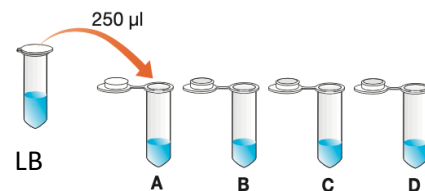
1.6 Inkubuokite mėgintuvėlius A – D 10 minučių ant ledo.

1.7 Sukrėskite karščiu ledo šaltumo mėgintuvėlius A - D ant plaukiko lygiai 50 sekundžių, 60 °C karšto vandens vonelėje.



1.8 Nedelsdami grąžinkite 4 mėgintuvėlius ant ledo 2 minutėms.

1.9 Pipete į 4 mėgintuvėlius A–D įpilkite 250 μ L LB maistinių medžiagų sultinio ir išmaišykite. Inkubuokite 4 mėgintuvėlius 20 minučių kambario temperatūroje.



1.10 Netoli kraštų pažymėkite 4 KIX/SPT atrankos plokštelių dugnus simboliais A – D ir savo grupės numeriu.



1.11 Pakartotinai suspenduokite bakterijas mėgintuvėlyje A, nukirpdami.

1.12 Į lėkštelę A pipete įpilkite 50 μ L mėgintuvėlio A ir Drigalskio mentele tolygiai paskleiskite skystį. Proceso metu plokštę keletą kartų pasukite.

1.13 Pakartokite žingsnius 1.11 ir 1.12 su mėgintuvėliais B, C ir D bei lėkštelėmis B, C ir D.

1.14 Inkubuokite lėkšteles apverstas 24 valandas 37 °C temperatūroje.

Eksperimento įvertinimas

1. Patikrinkite, ar lėkštetėse atsirado spalva.
2. Paaiškinkite mėlyną ir baltą kolonijų spalvą skirtingose lėkštelėse.