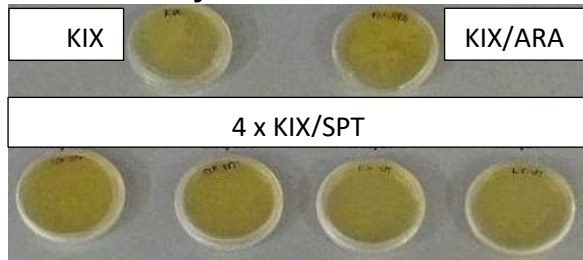


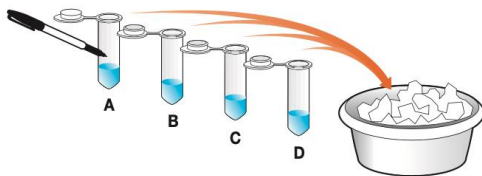
# Protokół edytowania genów z CRISPR/Cas9

## Kolonie i Pożywki:



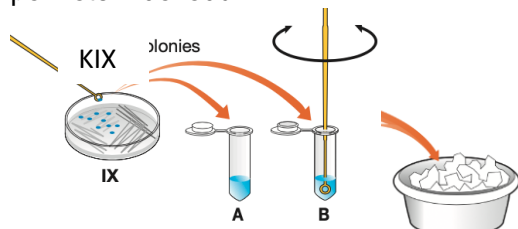
### 1. Edytowanie genów z CRISPR/Cas9

- 1.1 Przenieś pipetą 250  $\mu$ L schłodzony transformation solution (TS) do każdej z 4 oznaczonych probówek A – D. Włóż 4 probówki z powrotem do lodu.



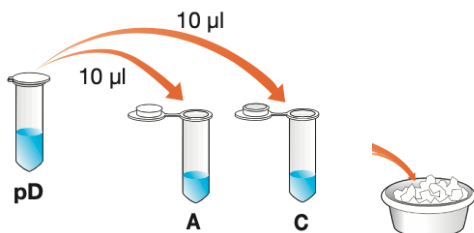
- 1.2 Weź eżą 5 kolonii *E. Coli* z szalki Petriego **KIX**.

Mieszaj eżą w probówce A aż wszystkie bakterie rozprowadzą się w transformation solution. Na ezie nie powinny zostać żadne bakterie. Powtórz proces dla probówki B używając nowej eży. Włóż obie probówki z powrotem do lodu.



- 1.3 Weź eżą 5 kolonii *E. Coli* z szalki Petriego **KIX/Ara**. Mieszaj eżą w probówce C aż wszystkie bakterie rozprowadzą się w transformation solution. Na ezie nie powinny zostać żadne bakterie. Powtórz proces dla probówki D używając nowej eży. Włóż obie probówki z powrotem do lodu.

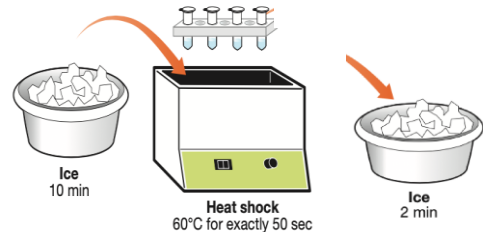
- 1.4 Przenieś pipetą do probówek A i C 10  $\mu$ L *pLZDonor Plazmid (pD)* i wymieszaj przez pipetowanie. Włóż obie probówki z powrotem do lodu.



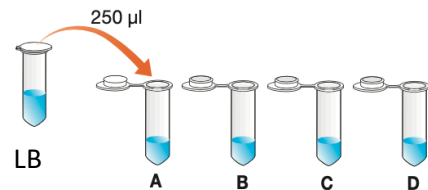
- 1.5 Przenieś pipetą do probówek B i D 10  $\mu$ L *pLZDonor Guide Plazmid (pDG)* i wymieszaj przez pipetowanie.

Natychmiast włóż obie probówki z powrotem do lodu.

- 1.6 Inkubuj probówki A – D przez 10 minut w lodzie
- 1.7 Ogrzewaj schłodzone probówki A – D w łaźni wodnej przez dokładnie 50 sekund w kąpieli wodnej o temperaturze 60°C, aby spowodować szok termiczny.



- 1.8 Natychmiast włóż 4 probówki z powrotem do lodu.
- 1.9 Przenieś pipetą do każdej z 4 probówek A – D 250  $\mu$ L LB bulion odżywczy i wymieszaj pstrykając. Inkubuj 4 probówki przez 20 minut w temperaturze pokojowej.



- 1.10 Podpisz 4 **KIX/SPT** szalki Petriego, na spodzie na brzegu literkami od A do D i numerem grupy.



- 1.11 Rozprosz bakterie w roztworze w probówce pstrykając.
- 1.12 Umieść pipetą 50  $\mu$ L zawartości probówki A na szalce A i równomiernie rozprowadź roztwór z użyciem szpatułki Drigalskiego Obracaj szalkę kilka razy podczas tego procesu.
- 1.13 Powtórz kroki 1.11 i 1.12 z probówkami B, C i D i szalkami B, C i D.
- 1.14 Inkubuj szalki do góry nogami przez 24 godziny w temperaturze 37 °C.

### Ocena eksperymentu

1. Sprawdź, czy na szalkach widać zmianę koloru
2. Wyjaśnij biały i niebieski kolor kolonii w różnych szalkach