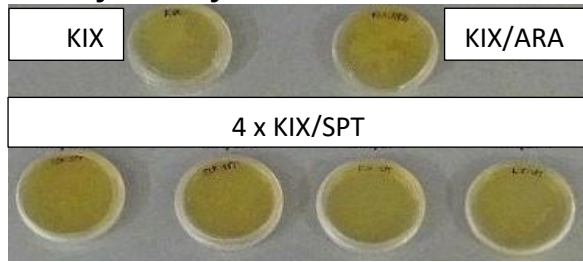


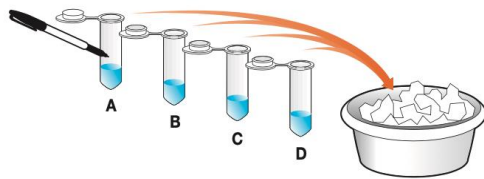
Protokol genetickej modifikácie metódou CRISPR/Cas9

Kultúry a živiny:

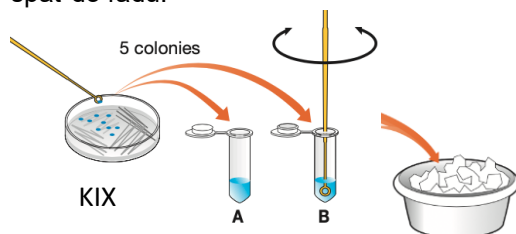


1. Genetická modifikácia CRISPR/Cas9

1.1 Napipetujte 250µL studeného transformačného roztoku (TS) do všetkých 4 skúmaviek označených A-D. Premiestnite ich následne späť do ľadu.

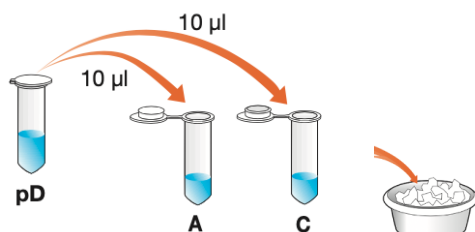


1.2 Inokulačnou kľučkou naberte 5 kolónií *E. coli* z **KIX**-počiatočnej Petriho misky. Premiešajte baktérie v skúmavke A, kým nebudú všetky rovnomerne rozptýlené v transformačnom roztoku. Na inokulačnej kľučke nesmú ostať žiadne baktérie. Zopakujte krok pre skúmavku B s novou inokulačnou kľučkou. Dajte obe skúmavky späť do ľadu.



1.3 Inokulačnou kľučkou premiesnaberte 5 kolónií *E. coli* z **KIX/Ara**-počiatočnej misky. Rozmiešajte baktérie v skúmavke C, kým nebudú všetky rovnomerne rozptýlené v transformačnom roztoku. Na inokulačnej kľučke nesmú ostať žiadne baktérie. Zopakujte krok pre skúmavku D s novou inokulačnou kľučkou. Dajte obe skúmavky späť do ľadu.

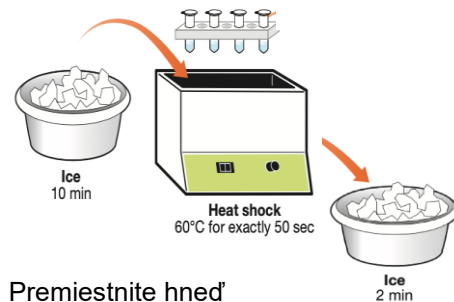
1.4 Napipetujte do skúmavky A a C 10 µL *pLZDonor Plasmid (pD)* a premiešajte pipetovaním hore a dole. Premiestnite ich hneď späť do ľadu.



1.5 Napipetujte do skúmavky B a D 10 µL *pLZDonor Guide Plasmid (pDG)* a premiešajte pipetovaním hore a dole. Uložte obe skúmavky späť do ľadu.

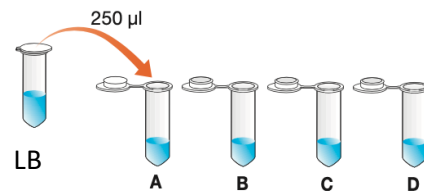
1.6 Skúmavky A-D inkubujte 10 minút v ľade.

1.7 Skúmavky A-D umiestnite do plaváka a na 50 sekúnd ich zahrejte v 60°C horúcom vodnom kúpeli (tepelný šok).



1.8 Premiestnite hneď všetky skúmavky na 2 minúty do ľadu.

1.9 Napipetujte do každej skúmavky A-D 250µL LB výživného roztoku a premiešajte ťukaním o stôl. Všetky 4 skúmavky inkubujte 20 minút pri izbovej teplote.



1.10 V blízkosti okrajov označte A-D a číslom vašej skupiny spodné strany KIX/SPT selekčných misiek.



1.11 Rozptýľte baktérie v skúmavke A ťukaním o stôl.

1.12 Napipetujte 50 µL zo skúmavky A do misky A a rovnomerne rozotrite tekutinu Drigalského špachtľou. Počas procesu viackrát otočte misku.

1.13 Zopakujte kroky 1.11 a 1.12 so skúmavkami B, C a D a miskami B, C a D.

1.14 Inkubujte misky 24 hodín dnom nahor pri 37°C

Vyhodnotenie experimentu

1. Skontrolujte sfarbenie kolónií v miskách.
2. Vysvetlite modré a biele sfarbenie kolónií v rozdielnych miskách.