

# Bevis for CRISPR/Cas9 In-Vivo-Genredigering med PCR

## 2 DNA Ekstraktion fra bakterie

2.1 Navngiv 3 skruelågsrør med S (som start plade), C, D og jeres gruppe nummer.

2.2 **Homogeniser** InstaGene-Matrix ved at knipse røret og pipettere 250 µl i hver af de 3 navngivne rør.



*Vær opmærksom på, at alle 3 rør indeholder samme mængde InstaGene-perler.*



2.3 Opsaml en blå koloni fra KIX/ARA-start pladen med et podenålsøje.

Hvirvl øjet i skruelågsrør S og bland det i 10 sekunder ved at knipse røret.

2.4 Tag en blå koloni fra pladen C med et sterilt øje.

Hvirvl øjet i skruelågsrør C og bland det i 10 sekunder ved at knipse røret.

2.5 Tag en blå koloni fra pladen D med et sterilt øje.

Hvirvl øjet i skruelågsrør D og bland det i 10 sekunder ved at knipse røret.

2.6 Inkuber 3 skruelågsrør i 15 minutter ved 56 °C. Lad rørene køle ned 2 minutter og bland det i 10 sekunder ved at knipse røret.

2.7 Inkuber 3 skruelågsrør i 8 minutter ved 95 °C. Lad rørene køle ned 2 minutter og bland det i 10 sekunder ved at knipse røret.

2.8 Centrifuger 3 rør i 2 minutter ved 12000 runder pr. minut.

## 3. Forberedelse af PCR prøver.

3.1 Navngiv 5 PCR-rør med: S, C, D, (+), (-).

3.2 Pipetter i hver PCR rør 10 µl Master Mix som indeholder frisk tilføjte primer (MMP).

3.3 Pipetter 10 µl af supernatanten fra skruelågsrørene S, C, D i de korresponderende PCR-rør.

3.4 Pipetter 10 µl af positiv-kontrol-DNA i (+)PCR rør.  
Pipetter 10 µl H<sub>2</sub>O som negativ-kontrol i (-)PCR rør.

3.5 Bland 5 PCR-rør ved at pipettere op og ned, og placer dem på is indtil start af PCR.

## 4 Procedure af PCR

4.1 Placer 5 PCR-rør i PCR-maskinen.



*Vær opmærksom på, at hvert rør er lukket ordentligt!*

4.2 Udfør PCR ved at køre den følgende temperatur/tids-program:

Step	Temp., °C	Time	Cycles
Initial denature	94	5 min	1x
Denature	94	30 sec	35x
Anneal	62	30 sec	
Extend	74	1 min	
Final extension	74	5 min	1x
Hold	12	-	1x

Efter PCR hold temperaturen af maskinen på 12°C indtil gelelektroforesen starter.

## 5 Gelelektroforesen

5.1 Forbered en 1% agarose-gele i en samlet volume af 35 ml TAE-buffer (1x).

5.2 Efter afkøling af agarose opløsningen til 45°C (tjek med bagsiden af hånden) tilføj 3 µl GelRed. Bland ved at ryste og hæld agarose opløsningen i gelelektroforese kammeret.

5.3 Efter opløsningen får fast form, fyldes gelelektroforese kammeret med 280 ml TAE-Puffer (1x) og fjern kammen.

5.4 Tilføj 5 µl loadingbuffer til alle 5 PCR-samples og bland ved at pipettere op og ned.

5.5 Pipetter 10 µl gele i brøndene som på den følgende tabel:

Brønd	Prøve
1	PCR prøve S
2	PCR prøve C
3	PCR prøve D
4	Positiv kontrol (+)
5	Negativ kontrol (-)
6	Markør (MWR)

5.6 Gelelektroforesen laves ved 130 V (Varighed på omkring 15 minutter).

## Opgave:

*Evaluer båndmønstret i gelen og estimer lacZ genets status.*