



Evidence for CRISPR/Cas9 In-Vivo-Genediting by PCR

2 EXTRACTION DE L'ADN DE BACTERIE



2.1 Marquer 3 tubes eppendorf avec un S (gélose de départ), C, D et votre numéro de groupe.

2.2 **Homogénéiser** "InstaGene-Matrix" en remuant (tourner le tube sur lui-même dans votre main) et pipeter 250µl dans chacun des 3 tubes.

faites attention que les tubes contiennent la même quantité de InstaGene-perls.

2.3 Prélever avec une hanse d'inoculation une colonie bleue de la gélose de départ de KIX/ARA.

Faites tourner la hanse dans le tube avec bouchon à vis S et mélangez-la pendant 10 secondes en la tournant sur elle-même.

2.4 Prélever avec une hanse stérile une colonie bleue de la gélose C.

2.5 Faites tourner la hanse dans le tube C et mélanger en la tournant sur elle-même pendant 10 secondes.

2.6 Prélever avec une hanse stérile une colonie bleue de la gélose C.
Faites tourner la hanse dans le tube C et mélanger en la tournant sur elle-même pendant 10 secondes.

2.7 Incuber les 3 tubes eppendorf pendant 15min a 56°C.
Laisser les tubes refroidir 2 minutes et mélanger 10 secondes en les faisant tourner sur eux-mêmes.

2.8 Incuber les 3 tubes eppendorf pendant 8 minutes à 95°C.
Laisser les tubes refroidir 2 minutes et mélanger pendant 10 secondes en les faisant tourner sur eux-mêmes.

2.9 Centrifuger les 3 tubes pendant 2 min à 12000 tours par minute.

3. Préparation des échantillons de la PCR.

3.1 Marquer les 5 tubes de PCR avec S, C, D, (+), (-).

3.2 Pipeter dans chaque tube de PCR 10µl de "Master Mix" contenant les amorces mises juste avant.

3.3 Pipeter 10µl de surnageant depuis les tubes S, C, D dans les tubes de PCR correspondants.

3.4 Pipeter 10µl de l'ADN-contrôle-positif (+) dans un tube de PCR annoté PCR +.
Pipeter 10µl d'eau pour le contrôle-négatif dans le tube de PCR annoté PCR -.



3.5 Mélanger les 5 tubes de PCR avec la pipette (prélever et éjecter) et les placer dans la glace avant le lancement de la PCR.

4 Procédure pour la PCR

4.1 Placer les 5 tubes PCR dans la centrifugeuse.

Faites attention que chaque tube soit correctement fermé !

4.2 Conduire la PCR aux paramètres suivants (températures et temps).

Step	Temp., °C	Time	Cycles
<i>Initial denature</i>	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

Après la PCR maintenir la température du thermocycleur à 12°C avant le démarrage de l'électrophorèse.

5 Gel d'électrophorèse

5.1 Préparer une gélose a 1% d'agar avec un total de 35mL de tampon TAE (1X).

5.2 Après avoir laissé reposer la gélose a 45°C, ajouter 3µl de GelRed. Mélanger en remuant et verser la solution d'agar dans les puits du gel d'électrophorèse.

5.3 Après solidification du gel d'électrophorèse mettre 280 mL de tampon TAE dans la cuve d'électrophorèse et retirer le peigne des puits.

5.4 Ajouter 5 µl de tampon de charge à chacun des 5 échantillons PCR et mélanger avec la pipette (prélever et éjecter).

5.5 Pipeter 10 µl dans chaque puits du gel selon le tableau ci-dessous :

Spur	Probe
1	PCR échantillon S
2	PCR échantillon C
3	PCR échantillon D
4	Contrôle positif (+)
5	Contrôle négatif (-)
6	marqueur (MWR)

5.6 Lancer l'électrophorèse à 130 V (durée approximative 15 minutes).

Tâche : analyser la distribution des bandes sur le gel et évaluer l'expression du gène lacZ dans chaque cas.