



Εκτίμηση της In-Vivo-Γονιδιακής Επεξεργασίας από CRISPR/Cas9 με PCR

2 Εκχύλιση του DNA από τα Βακτήρια

- 2.1 Σημαίνουμε 3 σωληνάκια με S (για το τρυβλίο εκκίνησης), C, D και γράφουμε το όνομα της ομάδας.
- 2.2 **Ομογενοποιούμε** το InstaGene-Matrix τριβοντάς το και τοποθετώντας 250 ml σε κάθε ένα από τα σωληνάκια
**Προσοχή! Και τα 3 σωληνάκια πρέπει να περιέχουν παρόμοια ποσότητα InstaGene-perls.**

- 2.3 Παίρνουμε με τον κρίκο εμβολιασμού μία μπλε αποικία KIX/ARA-τρυβλίο εκκίνησης. Περιστρέφουμε τον κρίκο στο καπάκι S και το αναμειγνύουμε για 10 δευτερά τρίβοντας το.
- 2.4 Παίρνουμε με έναν αποστειρωμένο κρίκο μία μπλε αποικία από το τρυβλίο C. Περιστρέφουμε τον κρίκο στο καπάκι C και το αναμειγνύουμε για 10 δευτερόλεπτα τρίβοντας το.
- 2.5 Παίρνουμε με έναν αποστειρωμένο κρίκο μία λευκή αποικία από το τρυβλίο D. Περιστρέφουμε τον κρίκο στο καπάκι D και το αναμειγνύουμε για 10 δευτερά τρίβοντας τα.
- 2.6 Επωάζουμε τα 3 σωληνάκια για 15 λεπτά στους 56 °C. Αφήνουμε τα σωληνάκια να κρυώσουν για 2 λεπτά και αναμειγνύουμε για 10 δεύτερα τρίβοντας τα.
- 2.7 Επωάζουμε τα 3 σωληνάκια για 8 λεπτά στους 95 °C. Αφήνουμε τα σωληνάκια να κρυώσουν για 2 λεπτά και αναμειγνύουμε για 10 δεύτερα τρίβοντας τα.
- 2.8 Φυγοκεντρούμε τα 3 σωληνάκια για 2 λεπτά στις 12000 στροφές το λεπτό.

3. Προετοιμασία των δειγμάτων PCR.

- 3.1 Ονομάζουμε 5 σωληνάκια PCR με: S, C, D, (+), (-).
- 3.2 Βάζουμε στα σωληνάκια PCR 10 μl Master Mix που περιέχουν φρέσκα προστετημένους εκκινητές (MMP).
- 3.3 Βάζουμε 10 μl από το υπερκείμενο στα σωληνάκια S, C, D στα αντίστοιχα σωληνάκια PCR.
- 3.4 Βάζουμε 10 μl θετικό μάρτυρα DNA στο (+) σωληνάκι PCR. Βάζουμε 10 μl H₂O στον αρνητικό μάρτυρα στο (-) σωληνάκι PCR.
- 3.5 Αναμειγνύουμε 5 σωληνάκια PCR πιπετάροντας πάνω κάτω και τοποθετώντας τα σε πάγο μέχρι την αρχή της PCR.

4 Διαδικασία PCR

- 4.1 Τοποθετούμε 5 σωληνάκια PCR στον κυκλοποιητή.



Προσοχή κάθε σωληνάκι να είναι καλά κλεισμένο!

- 4.2 Εκτέλεση της PCR χρησιμοποιώντας το ακόλουθο πρόγραμμα θερμοκρασίας/χρόνου:

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

Μετά την PCR διατηρούμε την θερμοκρασία του κυκλοποιητή στους 12 °C μέχρι να αρχίσει η ηλεκτροφόρηση γέλης.

5 Ηλεκτροφόρηση γέλης

- 5.1 Προετοιμαζουμε 1 % γέλη αгарόζης σε συνολικό όγκο 35 ml TAE-buffer (1x).
- 5.2 Αφού φτάσει το διάλυμα αгарόζης στους 45 °C (έλεγχος με το χέρι) προσθέτουμε 3 μl GelRed. Αναμειγνύουμε κουνώντας το και προσθέτουμε το διάλυμα της αгарόζης στο θάλαμο της ηλεκτοφόρησης γέλης.
- 5.3 Ύστερα αφού γίνει στερεό, γεμίζουμε το θάλαμο ηλεκτροφόρησης με 280 ml AE-Puffer (1x) και προσθέτουμε το χτενάκι
- 5.4 Βάζουμε στο κάθε δείγμα PCR 5 μl από το διάλυμα φόρτωσης and αναμειγνύουμε πιπεταρώντας πάνω και κάτω.
- 5.5 Πιπετάρουμε στα κοιλώματα της γέλης 10 μl όπως στο παρακάτω σχεδιάγραμμα::

Θέση	Δείγμα
1	PCR Probe S
2	PCR Probe C
3	PCR Probe D
4	Θετικός μάρτυρας (+)
5	Αρνητικός μάρτυρας (-)
6	Δείγμα ελέγχου (MWR)

- 5.6 Η ηλεκτροφόρηση της γέλης γίνεται στα 130V (διαρκεί περίπου 15 λεπτά).

Αποτελέσματα:

Αξιολόγηση του προτύπου ζωνών στη γέλη και εκτίμηση του προφίλ του *lacZ* γονιδίου.