

# Dowody na edycję genu CRISPR/Cas9 in vivo metodą PCR

## 2 Ekstrakcja DNA z bakterii

2.1 Oznacz 3 zakręcane probówki literami S (dla pierwszej szalki), C, D i numerem grupy.

2.2 Zhomogenizuj InstaGene-Matrix poprzez pobranie pipetą 250  $\mu$ l i zakroplenie każdej z 3 oznaczonych probówek.



*Zwróć uwagę, aby wszystkie 3 probówki zawierały podobną ilość InstaGene-perli.*



2.3 Za pomocą ezy, pobierz niebieską kolonię z szalki Petriego oznaczoną KIX/ARA. Zamieszaj eżą w probówce oznaczoną literą S, mieszaj przez 10 sekund, pstrykając.

2.4 Za pomocą sterylnej ezy pobierz niebieską kolonię z płytki C. Zamieszaj eżą w probówce oznaczonej literą C i mieszaj przez 10 sekund, pstrykając.

2.5 Za pomocą sterylnej ezy pobierz białą kolonię z płytki D. Zamieszaj eżą w probówce oznaczonej literą D i mieszaj przez 10 sekund, pstrykając.

2.6 Inkubuj 3 probówki z zakrętką przez 15 minut w temperaturze 56°C. Pozostaw probówki do ostygnięcia na 2 minuty i mieszaj przez 10 sekund, pstrykając.

2.7 Inkubuj 3 probówki z zakrętką przez 8 minut w temperaturze 95°C. Pozostaw probówki do ostygnięcia na 2 minuty i mieszaj przez 10 sekund, pstrykając.

2.8 Włóż do wirówki 3 probówki i pozostaw do wirowania przez 2 minuty przy 12000 obrotów na minutę.

## 3. Przygotowanie probówek PCR

3.1 Oznacz 5 probówek do PCR etykietami: S, C, D, (+), (-).

3.2 Pobierz pipetą do każdej probówki PCR 10  $\mu$ l Master Mix zawierający świeżo dodany starter (MMP).

3.3 Pobierz pipetą 10  $\mu$ l supernatantu z probówek z zakrętką S, C, D do odpowiednich probówek PCR.

3.4 Pobierz pipetą 10  $\mu$ l DNA stanowiącego kontrolę pozytywną w probówce (+)PCR. Pobierz pipetą 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O do kontroli negatywnej w probówce (-)PCR.

3.5 Wymieszaj 5 probówek PCR, pipetując w górę i w dół, i umieść je na lodzie do czasu rozpoczęcia PCR.

## 4. Procedura PCR

4.1 Umieść 5 probówek PCR w Cyklerze.



*Zwróć uwagę, aby każda probówka była prawidłowo zamknięta!*

4.2 Przeprowadź reakcję PCR, uruchamiając następujący program temperatura/czas:

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

Po PCR utrzymywać temperaturę cyklera na poziomie 12°C aż do rozpoczęcia elektroforezy żelowej.

## 5 Elektroforeza Żelowa

5.1 Przygotować 1% żelu agarozowego w całkowitej objętości 35 ml buforu TAE (1x).

5.2 Po ochłodzeniu roztworu agarozy do 45°C (test backhandowy) dodać 3  $\mu$ l GelRed. Wymieszaj przez potrząsanie i wlej roztwór agarozy do komory żelowej do elektroforezy.

5.3 Po zestaleniu żelu, komorę do elektroforezy napełnij 280 ml TAE-Puffer (1x) i wyciągnij grzebień.

5.4 Do każdych 5 próbek PCR dodać 5  $\mu$ l buforu ładującego i wymieszać, poruszając pipetą w górę i w dół.

5.5 Przenieś pipetą 10  $\mu$ l żelu do dołków, jak w poniższej tabeli:

Bodziec	Próbka
1	Próbka PCR S
2	Próbka PCR C
3	Próbka PCR D
4	Pozytywna kontrola (+)
5	Kontrola negatywna (-)
6	Znacznik (MWR)

5.6 Elektroforezę żelową przeprowadza się przy 130 V (czas trwania około 15 minut).

### Zadanie:

Oceń wzór prążków w żelu i oszacuj status genu *lac Z*.