

Dôkaz genetickej modifikácie CRISPR/Cas9 *in vivo* PCR testom

2. DNA extrakcia z baktérií

2.1 Označte 3 skúmavky so šrubovacím uzáverom písmenami S (pre počiatočnú Petriho misku), C, D a číslom vašej skupiny.



2.2 **Homogenizujte** InstaGene-Matrix jemným klepaním a napipetujte po 250 µl do každej z troch označených skúmaviek.



Dajte pozor, všetky 3 skúmavky by mali obsahovať podobné množstvo InstaGene-perls.

2.3 Inokulačnou kľučkou naberte modrú kolóniu z KIX/ARA-počiatočnej Petriho misky. Potočte inokulačnou kľučkou v skúmavke S a miešajte 10 sekúnd klepaním.

2.4 Naberte sterilnou inokulačnou kľučkou modrú kolóniu z Petriho misky C. Potočte inokulačnou kľučkou v šrubovacej skúmavke C a miešajte 10 sekúnd klepaním.

2.5 Zoberte sterilnou kľučkou bielu kolóniu z Petriho misky D. Potočte inokulačnou kľučkou v šrubovacej skúmavke D a miešajte 10 sekúnd klepaním.

2.6 Inkubujte všetky 3 šrubovacie skúmavky 15 minút pri 56 °C. Nechajte skúmavky 2 minúty vychladnúť a miešajte 10 sekúnd klepaním.

2.7 Inkubujte všetky 3 šrubovacie skúmavky 8 minút pri 95 °C. Nechajte skúmavky 2 minúty vychladnúť a miešajte 10 sekúnd klepaním.

2.8 Centrifugujte 3 skúmavky 2 minúty na 12000 otáčkach za minútu.

3. Príprava PCR vzoriek

3.1 Označte 5 PCR skúmaviek: S, C, D, (+), (-).

3.2 Do každej skúmavky napipetujte 10 µl Master Mix obsahujúci čerstvo pridaný primer (MMP).

3.3 Napipetujte 10 µl supernatantu zo šrubovacích skúmaviek S, C, D do korešpondujúcich PCR-skúmaviek.

3.4 Napipetujte 10 µl pozitívnej kontroly DNA do (+)PCR skúmavky. Napipetujte 10 µl H₂O pre negatívnu kontrolu do (-)PCR skúmavky.

3.5 Zmiešajte 5 PCR-skúmaviek pipetovaním tam a späť a umiestnite ich do ľadu až do začiatku PCR.

4. Postup PCR

4.1 Umiestnite 5 PCR-skúmaviek do termocykléra.



Dajte pozor, aby každá skúmavka bola správne uzavretá!

4.2 Spustite PCR s nasledujúcim tepelno-časovým programom:

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 prevedení PCR udržiavajte teplotu termocykléra na 12°C pokiaľ nezačnete realizovať gélovú elektroforézu.

5. Gélová elektroforéza

5.1 Pripravte 1% agarózový gél v celkovom objeme 35ml TAE-buffer (1x).

5.2 Po vychladnutí agarózového roztoku na 45°C (test na chrbte ruky) pridajte 3 µl GelRed. Zmiešajte trasením a nalejte agarózový roztok do elektroforéznej kazety.

5.3 Po stuhnutí gélu naplňte elektroforéznu kyvetu 280 ml TAE-Puffer (1x) s následným vybratím hrebeňa z gélu.

5.4 Do všetkých 5 PCR vzoriek pridajte 5 µl tlmivého roztoku a premiešajte pipetovaním tam a späť.

5.5 Napipetujte do jamiek v géli po 10 µl podľa nasledujúcej tabuľky:

jamka	vzorka
1	PCR vzorka S
2	PCR vzorka C
3	PCR vzorka D
4	Pozitívna kontrola (+)
5	Negatívna kontrola (-)
6	Marker (MWR)

5.6 Preved'ite gélovú elektroforézu pri 130 V (trvanie približne 15 minút).

Úloha:

Vyhodnoťte výsledok elektroforézy v géli a odhadnite veľkosť lacZ génu.