

# Nachweis der in-vivo-Gen Editierung durch CRISPR mittels PCR

## 2 DNA Extraktion aus Bakterien

2.1 Beschriften Sie 3 Schraubtubes mit S (für Starterplatte), C, D und Ihrer Gruppennummer.



2.2 Pipettieren Sie jeweils 250 µl **homogenisierte** InstaGene-Matrix aus Ihrem Vorratstube (IG) in die beschrifteten 3 Tubes.



*Beachten Sie, dass alle 3 Tubes in etwa die gleiche Menge an InstaGene-Perlen enthalten.*

2.3 Picken Sie mittels Impföse eine blaue Kolonie von der KIX/ARA-Starterplatte. Überführen Sie die Kolonie in Ihr Schraubtube S und durchmischen Sie 10 Sek. durch Anschnippen.

2.4 Picken Sie mittels steriler Impföse eine blaue Kolonie von der Platte C. Überführen Sie die Kolonie in Ihr Schraubtube C und durchmischen Sie 10 Sek. durch Anschnippen.

2.5 Picken Sie mittels steriler Impföse eine weiße Kolonie von der Platte D. Überführen Sie diese in Ihr Schraubtube D, und durchmischen Sie 10 Sek. durch Anschnippen.

2.6 Inkubieren Sie Ihre 3 Schraubtubes für 15 Min. bei 56 °C. Lassen Sie die Tubes etwas abkühlen und durchmischen Sie diese jeweils 10 Sek. durch Anschnippen.

2.7 Inkubieren Sie Ihre 3 Schraubtubes für 8 Min. bei 95 °C. Durchmischen Sie die Tubes für 10 Sek. durch Anschnippen.

2.8 Zentrifugieren Sie Ihre Tubes für 2 Min. bei 12000 g.

## 3 Vorbereiten der PCR-Ansätze

3.1 Beschriften Sie 5 PCR-Tubes mit: S, C, D, (+), (-).

3.2 Pipettieren Sie jeweils 10 µl Master Mix mit Primern (MMP) in Ihre 5 PCR-Tubes.

3.3 Pipettieren Sie jeweils 10 µl des Überstandes aus Ihren 3 Schraubtubes in die entsprechenden PCR-Tubes.

3.4 Pipettieren Sie 10 µl der Positiv-Kontroll-DNA in Ihr (+)PCR Tube. Pipettieren Sie 10 µl H<sub>2</sub>O als Negativ-Kontrolle in Ihr (-)PCR Tube.

3.5 Durchmischen Sie Ihre PCR-Tubes durch Auf- und Abpipettieren und kühlen Sie diese bis zum Beginn der PCR im Eis.

## 4 Durchführung der PCR

4.1 Überführen Sie Ihre 5 PCR-Tubes in den Cycler.



*Beachten Sie, dass Ihre Tubes korrekt verschlossen sind.*

4.2 Führen Sie die PCR entsprechend dem folgenden Temperaturprogramm durch:

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

Bewahren Sie Ihre Proben bis zum Beginn der Elektrophorese bei 4 °C auf.

## 5 Gel-Elektrophorese

5.1 Stellen Sie ein 1 %-iges Agarose-Gel mit einem Volumen von 35 ml her.

5.2 Geben Sie 3 µl GelRed in Ihre auf etwa 45 °C abgekühlte Agarose-Lösung, Durchmischen Sie durch Umschwenken und gießen Sie das Gel.

5.3 Nach dem Erstarren des Gels befüllen Sie Ihre Kammer mit 280 ml TAE-Puffer (1x) und ziehen den Kamm.

5.4 Geben Sie zu jeder Ihrer 5 PCR-Proben jeweils 5 µl Ladepuffer und durchmischen Sie durch Auf- und Abpipettieren.

5.5 Beladen Sie die Taschen des Gels jeweils mit 10 µl wie folgt:

Spur	Probe
1	PCR Probe S
2	PCR Probe C
3	PCR Probe D
4	Positiv Kontrolle (+)
5	Negativ Kontrolle (-)
6	Marker (MWR)

5.6 Die Gel-Elektrophorese wird bei 130 V durchgeführt (Dauer ca. 10 Minuten).

### Aufgabe:

*Werten Sie Ihr Gel aus und bestimmen Sie den lacZ Genstatus.*