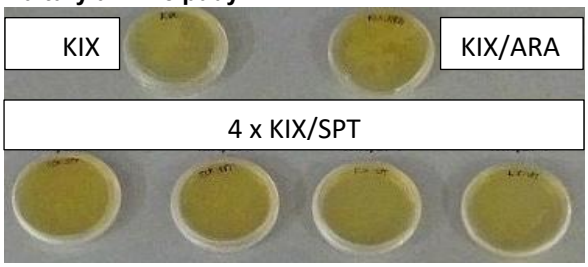
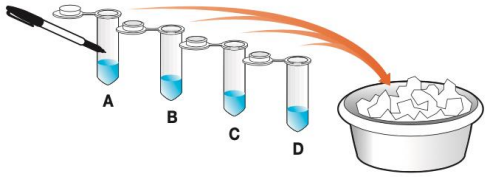
Protokol k modifikaci DNA pomocí metody CRISPR/Cas9

Kultury a živné půdy:

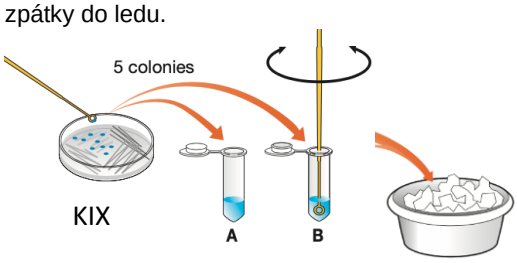


1. Modifikace pomocí CRISPR/Cas9

1.1 Napipetujte 250 µL ledově studeného transformačního roztoku (TS) do všech 4 zkumavek označených písmeny A – D. Poté umístěte všechny 4 zkumavky zpět do ledu.

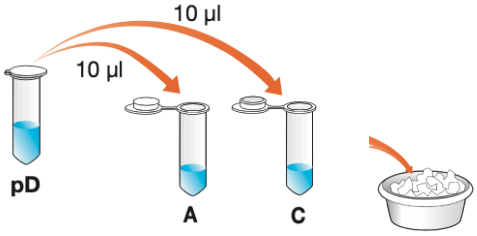


1.2 Inokulační smyčkou naberte 5 kolonií *E. coli* z KIX- petriho misky. Míchejte smyčkou ve zkumavce A dokud nebudou všechny bakterie v transformačním roztoku. Žádná bakterie by na smyčce neměla zůstat.
Tento krok zopakujte s novou inokulační smyčkou ve zkumavce B. Obě zkumavky uložte zpátky do ledu.



1.3 Inokulační smyčkou naberte 5 kolonií *E. coli* z KIX/Ara - petriho misky.
Míchejte smyčkou ve zkumavce C dokud nebudou všechny bakterie v transformačním roztoku. Žádná bakterie by na smyčce neměla zůstat.
Tento krok zopakujte s novou inokulační smyčkou ve zkumavce D. Obě zkumavky uložte zpátky do ledu.

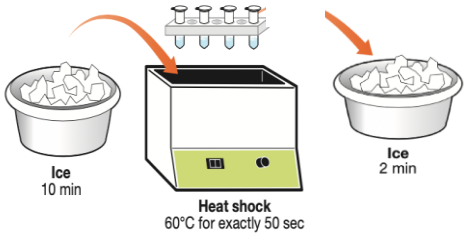
1.4 Napipetujte do zkumavek A a C 10 µL *pLZDonor plasmidu (**pD**) a* promíchejte je pipetováním nahoru a dolů. Okamžitě umístěte obě zkumavky zpět do ledu.



1.5 Napipetujte do zkumavek B a D 10 µL *pLZDonor guide plasmidu (**pDG**) a* promíchejte je pipetováním nahoru a dolů. Okamžitě umístěte obě zkumavky zpět do ledu.

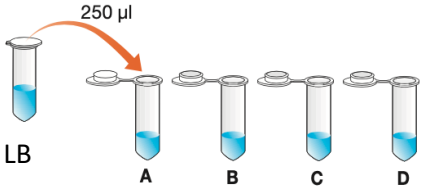
1.6 Ponechejte zkumavky A–D v ledu po dobu 10 minut.

1.7 Provedeme tepelný šok studených zkumavek A–D umístěním do vodní lázně na 50 sekund při teplotě 60 °C.

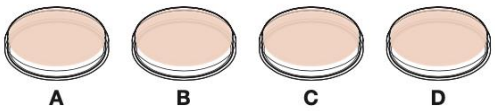


1.8 Okamžitě umístěte všechny 4 zkumavky do ledu na 2 minuty.

1.9 Napipetujte do všech 4 zkumavek A–D 250 µL LB živného média a promíchejte lehkým cvrnkáním do zkumavky. Dejte inkubovat tyto 4 zkumavky na 20 minut při pokojové teplotě.



1.10 Poblíž okrajů označte spodky 4 **KIX/SPT** selekčních ploten písmeny A–D a číslem vaší skupiny.



1.11 Resuspendujte (znovu rozpusťte) bakterie ve zkumavce A lehkým poťukáváním o hranu stolu.

1.12 Napipetujte 50 µL ze zkumavky A na misku A a rovnoměrně rozprostřete tekutinu pomocí Drigalského špachtle. V průběhu misku několikrát otočte.

1.13 Zopakujte kroky 1.11 a 1.12 se zkumavkami B, C a D a miskami B, C a D.

1.14 Dejte inkubovat misky otočené vzhůru nohama na 24 hodin na 37°C.

Vyhodnocení experimentu

1. Zkontrolujte, jak se vaše misky zbarvily.
2. Vysvětlete modrou a bílou barvu kolonií na různých miskách.