

CRISPR/Cas9 in-vivo genetinio modifikavimo, naudojant PGR, įrodymas

2 DNR išskyrimas iš bakterijų

2.1 Pavadininkite 3 užsukamus mėgintuvėlius S, C, D ir grupės numeriu.

2.2 **Homogenizuokite** InstaGene-Matrix kirpdami ir pipete įpilkite po 250 μ l į kiekvieną mėgintuvėlį.



Atkreipkite dėmesį, kad visuose 3 mėgintuvėliuose turi būti panšus InstaGene-perls kiekis.



2.3 Inokuliacijos kilpa paimkite mėlyną koloniją iš KIX/ARA pradinės plokštelės. Pasukiokite kilpą užsukamame mėgintuvėlyje S ir maišykite 10 sekundžių.

2.4 Su sterilia kilpa paimkite mėlyną koloniją nuo C lėkštelės. Pasukiokite kilpą užsukamame mėgintuvėlyje C ir maišykite 10 sekundžių.

2.5 Su sterilia kilpa paimkite mėlyną koloniją nuo D lėkštelės. Pasukiokite kilpą užsukamame mėgintuvėlyje D ir maišykite 10 sekundžių.

2.6 Inkubuokite 3 užsukamus mėgintuvėlius 15 minučių 56 °C. Leiskite mėgintuvėliams atvėsti 2 minutes ir maišykite 10 sekundžių.

2.7 Inkubuokite 3 užsukamus mėgintuvėlius 8 minutes 95 °C. Leiskite mėgintuvėliams atvėsti 2 minutes ir maišykite 10 sekundžių.

2.8 Centrifuguokite 3 mėgintuvėlius 2 minutes 12000 rpm greičiu.

3. PGR mėginių paruošimas.

3.1 Pažymėkit 5 PGR mėgintuvėlius: S, C, D, (+), (-).

3.2 Į visus PGR mėgintuvėlius įpilkite 10 μ l „Master Mix“, turinčio naujai pridėto pradmens (MMP).

3.3 10 μ l supernatanto pipete ištraukite iš užsukamų S, C ir D mėgintuvėlių į atitinkamus PGR mėgintuvėlius.

3.4 Pipete įpilkite 10 μ l teigiamos kontrolinės DNR į (+)PGR mėgintuvėlį. Pipete įpilkite 10 μ l H₂O neigiamai kontrolei į (-)PGR mėgintuvėlį.

3.5 Sumaišykite 5 PGR mėgintuvėlius pipetuodami įtraukiant ir išleidžiant.

4 PGR procedūra

4.1 Įdėkite 5 PGR mėgintuvėlius į ciklerį.



Atkreipkite dėmesį, kad kiekvienas mėgintuvėlis teisingai užsuktas!

4.2 Atlikite PGR vykdydami šią temperatūros / laiko programą:

Stop	Temp., °C	Laikas	Ciklas
Pradinė denatūracija	94	5 min	1x
Denatūracija	94	30 sek	35x
Atskyrimas	62	30 sek	
Sintezė	74	1 min	
Galutinė sintezė	74	5 min	1x
Palaiikymas	12	-	1x

Po PGR palaikykite ciklerio temperatūrą ties 12 °C, kol prasidės gelio elektroforezė.

5 Gelio elektroforezė

5.1 Paruoškite 1 % agarozės gelį iš viso 35 ml TAE-bufferyje (1x).

5.2 Atvėsinus agarozės tirpalą iki 45 °C (patikrinti ranka) įpilkite 3 μ l GelRed. Sumaišykite kratydami ir įpilkite agarozės tirpalą į gelio elektroforezės vonelę.

5.3 Sustingus gelio elektroforezės vonelė pripildoma 280 ml TAE-buferio (1x) ir ištraukite šukas.

5.4 Į visus 5 PGR-mėginius įpilkite 5 μ l elektroforezės buferinį tirpalą ir išmaišykite pipetuodami įtraukiant ir išleidžiant.

5.5 Pipete į gelio šulinėlius įpilkite 10 μ l, kaip nurodyta šioje lentelėje:

Takelis	Mėginys
1	PGR mėginys S
2	PGR mėginys C
3	PGR mėginys D
4	Teigiamas kontrolinis (+)
5	Neigiamas kontrolinis (-)
6	Žymeklis (MWR)

5.6 Gelio elektroforezė atliekama 130 V (trukmė apie 15 minučių).

Užduotis:

Įvertinkite juostos modelį gelyje ir įvertinkite lacZ geno būseną.