

# Důkaz pro CRISPR/Cas9 In-Vivo-Genediting metodou PCR

## 2 Extrakce DNA z bakterií

2.1 Označte 3 zkumavky se šroubovacím víčkem jako S (pro začáteční petriho misku), dále C, D a číslem vaší skupiny.



2.2 **Homogenizujte** InstaGene-Matrix a přepipetujte 250 µl do každé ze tří označených zkumavek.



*Dejte si pozor, aby všechny tři zkumavky obsahovaly stejné množství InstaGene-perel.*

2.3 Inokulační smyčkou naberte modrou kolonii z KIX/ARA-začáteční petriho misky. Vložte smyčku do zkumavky S se šroubovacím víčkem a míchejte poklepáním o hranu stolu po 10 sekund.

2.4 Sterilní smyčkou naberte modrou kolonii z petriho misky C. Vložte smyčku do zkumavky C se šroubovacím víčkem a míchejte poklepáním o hranu stolu po 10 sekund.

2.5 Sterilní smyčkou naberte bílou kolonii z petriho misky D. Vložte smyčku do zkumavky D a míchejte poklepáním o hranu stolu po 10 sekund.

2.6 Inkubujte 3 zkumavky se šroubovacím víčkem 15 minut na 56 °C. Chladte zkumavky po 2 minuty a promíchejte poklepáním o hranu stolu po 10 sekund.

2.7 Inkubujte 3 zkumavky se šroubovacím víčkem 8 minut na 95 °C. Chladte zkumavky po 2 minuty a promíchejte poklepáním o hranu stolu po 10 sekund.

2.8 Odstředte v centrifuze všechny 3 zkumavky po 2 minuty na 12000 otáček za minutu.

## 3. Příprava vzorků pro PCR.

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

3.2 Přepipetujte do každé z PCR zkumavek 10µl Master Mixu, obsahující čerstvě přidaný primer (MMP).

3.3 Přepipetujte 10 µl supernatantu (tekutiny and sedimentem) ze zkumavek se šroubovacím víčkem S, C, D do náležíčích PCR-zkumavek.

3.4 Přepipetujte 10 µl pozitivní-kontroly-DNA do (+)PCR zkumavky. Přepipetujte 10 µl H<sub>2</sub>O pro negativní-kontrolu do (-)PCR zkumavky.

3.5 Promíchejte 5 PCR-zkumavek pipetováním a nechte je na ledu dokud nezačne PCR.

## 4 Procedura PCR

4.1 Umístěte 5 PCR.- zkumavek do Cycleru (PCR inkubátoru).



*Dejte si pozor, aby každá zkumavka byla dobře uzavřena!*

4.2 Proveďte PCR spuštěním následujícího programu Conduct PCR běžícím dle následující teploty/času:

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 dokončení PCR udržte teplotu v cycleru (PCR inkubátoru) na 12°C dokud nezačne gelová elektroforéza.

## 5 Gelová elektroforéza

5.1 Připravte 1 % agarozový gel v celkovém množství 35 ml TAE-pufferu (1x).

5.2 Po ochlazení agarozy na 45°C (backhand testem) přidejte 3 µl GelRed. Promíchejte třesením a nalijte agarozový roztok do přihrádky gelové elektroforézy.

5.3 Po nalití roztoku naplňte přihrádku gelové elektroforézy 280 ml TAE-Pufferu (1x) a vložte hřeben.

5.4 Přidejte do každé z 5 PCR-vzorků 5 µl načítacího pufru a promíchejte pipetováním.

5.5 Přepipetujte do jamek v gelu 10 µl dle následující tabulky:

Jamka	Vzorek
1	PCR Vzorek S
2	PCR Vzorek C
3	PCR Vzorek D
4	Pozitivní Kontrola (+)
5	Negativní Kontrola (-)
6	Marker (MWR)

5.6 Gelová elektroforéza probíhá při 130 V (Trvá zhruba 15 minut).

**Úkol:**

*Vyhodnoťte fragmenty viditelné v gelu a odhadněte stav genu lacZ.*