**1. gRNA-syntéza**

Ein Bild, das Text enthält.

Automatisch generierte Beschreibung

1.1 Na gRNA-syntézu napipetujte do prázdné zkumavky S následující činidla:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Zkumavka** | **Obsah** | **Objem** |
| H2O | H2O bez nukleázy | 16 µL |
| NTP | NTP pufrovací mix | 10 µL |
| D | DNA duplex | 2 µL |
| T7 | T7 RNA polymeráza | 2 µL |
| ***Celkový objem (S)*** | | ***30 µL*** |

1.2 Pro slepou kontrolu gRNA-syntézy napipetujte 5 µL ze zkumavky S do nové zkumavky označené St0 a chlaďte na ledu.

1.3 Zkumavku S nechte 1 hod inkubovat při 37 °C.

**2.** **Kontrola vyprodukované gRNA pomocí gelové elektroforézy**

2.1 Otevřete gelovou kazetu a navlhčete jamky H2Odist.

2.2 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

2.3 Napipetujte 5 µL z vaší gRNA syntézy ze zkumavky S do nové zkumavky St1 označené číslem vaší skupiny. Zkumavku S nechte na ledu.

2.4 Do zkumavek St0 a St1 přidejte 1 µL nanášecího pufru (LB).

2.5 Podle následujícího schématu napipetujte do jamek 6 µL gRNA syntézy ze zkumavek St1/1 – St1/8 a na začátek a konec řady St0:

Sto St1/1 St1/2 St1/3 St1/4 St1/5 St1/6 St1/7 St1/8 St0

2.6 Připojte FlashGel stanici do zdroje elektřiny a zapněte jej na 180 V. Sledujte průběh elektoforézy zapnutím UV světla na stanici.

Úloha: Vyhodnoťte úspěšnost gRNA syntézy na základě gelové elektroforézy.

**3.** **Restrikční štěpení k linearizaci plasmidu pBR322**

3.1 Podle následující tabulky napipetujte do zkumavky D ingredience pro restrikčního štěpení:



|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Zkumavka** | **Obsah** | **Objem** |
| H2O | H2O bez nukleázy | 15 µL |
| P | pBR322 (2,5 µg) | 5 µL |
| RE | *Pst*I(2,5 jednotky) | 2.5 µL |
| RE-P | 10x Restrikční pufr | 2.5 µL |
| ***Celkový objem (D)*** | | ***25 µL*** |

3.2 Zkumavku D nechte 15 minut inkubovat při 37 °C.

**4.** **Důkaz restrikčního štěpení pomocí gelové elektroforézy**

4.1 Otevřete gelovou kazetu a navlhčete jamky H2Odist.

4.2 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

4.3 Pro slepou kontrolu napipetujte do nové zkumavky C 1 µL nanášecího pufru (LB), 1 µL plasmidu (P) a 4 µL H2O.

4.4 Na důkaz úspěšného naštěpení napipetujte 1 µL nanášecího pufru (LB), 1 µL H2O a   
4 µL restrikční endonukleázy ze zkumavky D do nové zkumavky R. Zkumavku D nechte na ledu.

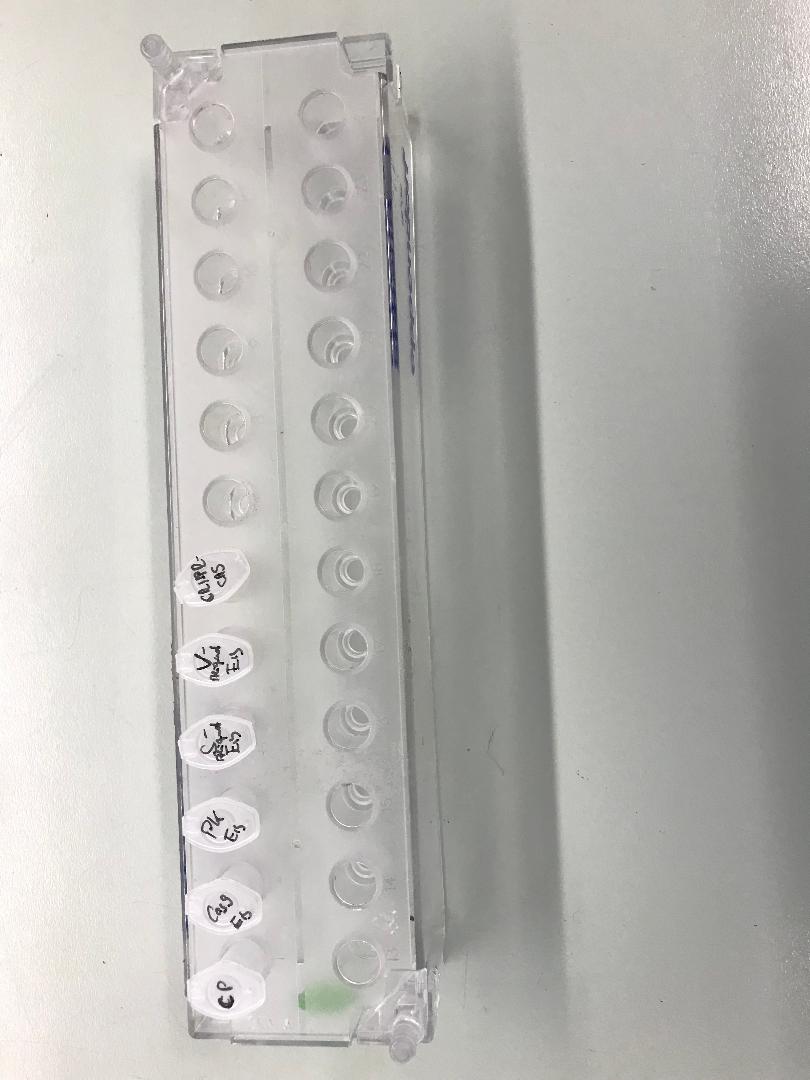
4.5 Podle následujícího schématu napipetujte do každé jamky  
- 4 µL marker (M),  
- 6 µL nenaštěpený plasmid (C)  
- 6 µL restrikčního vzorku (R)   
z každé z 8 skupin **R1 – R8** do jamek v gelu:

M C R1 R2 R3 R4 C R5 R6 R7 R8 C M

4.6 Připojte FlashGel stanici do zdroje elektřiny a zapněte jej na 180 V. Sledujte progres elektroforézy zapnutím UV světla na stanici.

Úloha: Vyhodnoťte svůj gel na základě restrikčního štěpení plazmidu pBR322 endonukleázou Pstl.

**5. Štěpení linearizovaného plasmidu pBR322 nukleázou Cas9**



5.1 **Podle následující tabulky napipetujte vzorky 1-3:**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Vzorek** | **1** | **2** | **3** |
|  | pBR322lin | pBR322lin+ Cas9 (- gRNA) | pBR322lin  + Cas9  + gRNA |
| **H2O**  (bez nukleázy) | 24 µL | 23 µL | 22 µL |
| **CP**  (Pufr) | 3 µL | 3 µL | 3 µL |
| **S**  (nasyntezované gRNA) | 0 µL | 0 µL | 1 µL |
| Cas9 nukleáza | 0 µL | 1 µL | 1 µL |
| **Zkumavky poklepáváním promíchejte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě** | | | |
| **D**  (naštěpe-ný  plasmid) | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| **H2O**  (bez nukleázy) | 2 µL | 2 µL | 2 µL |
| **Zkumavky poklepáváním promíchejte a inkubujte 10 minut při 37 °C** | | | |
| **PK**  (protein-  áza K) | 1 µL | 1 µL | 1 µL |
| **Objem vzorku** | **31 µL** | **31 µL** | **31 µL** |
| **Zkumavky poklepáváním promíchejte a inkubujte 10 minut při pokojové teplotě** | | | |

**6.**  **Důkaz naštěpení linearizovaného plasmidu (pBR322lin) nukleázou Cas 9 pomocí gelové elektroforézy.**

6.1 Napipetujte 8.5 µL z vašich naštěpených vzorků 1 – 3 do 3 nových zkumavek a znovu je označte 1, 2 a 3.

6.2 Přidejte do každé ze 3 nových zkumavek 1.5 µL nanášecího pufru (LB) a promíchejte poklepáváním.

6.3 Otevřete gelovou kazetu a navlhčete jamky H2Odist.

6.4 Přebytečnou vodu odsajte papírovou utěrkou.

6.5 Podle následujícího schématu napipetujte do jamkek

- 4 µL markeru (M),  
 - 10 µL vašich vzorků 1-3

M 1/1 1/2 1/3 2/1 2/2 2/3 3/1 3/2 3/3 4/1 4/2 4/3

M 5/1 5/2 5/3 6/1 6/2 6/3 7/1 7/2 7/3 8/1 8/2 8/3

6.6 Připojte FlashGel stanici do zdroje elektřiny a spusťte gelovou elektroforézu na 180 V. Sledujte progres elektroforézy zapnutím UV světla na stanici.

Úloha: Pomocí gelové elektroforézy vyhodnoťte úspěšnost štěpení plazmidu nukleázou Cas9