

## Out of the Blue CRISPR Kit

Kit nr. 12012608EDU

### Lærervejledning

Oversat og bearbejdet af Birgit Sandermann Justesen, Nærum gymnasium, september 2021.

Brugen af dette kit til undervisningsbrug skal varetages af en gymnasielærer, som har en biologisk uddannelsesbaggrund mindst svarende til de af VTU udstukne faglige mindstekrav i biologi og som har gennemført et af Arbejdstilsynet godkendt kompetencegivende kursus af 2 dages varighed i eksperimentel genteknologi.

Når eksperimenter, som er omfattet af aftalen, gennemføres i forbindelse med enkeltfaglig eller tværfaglig undervisning, har gymnasielæreren ansvar for at forsøgene gennemføres efter de gældende retningslinjer.

Aftalen vedrører undervisning i genteknologi i biologi, bioteknologi A, teknikfag og teknologi A i STX (det almene gymnasium), HTX og HF

De genteknologiske forsøg må kun udføres, dersom der senest 3 uger forud for arbejdet med forsøgene (herunder forarbejdet) er sendt en indberetning til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi på det indberetningsskema, der indgår som en del af aftalen

Ved indberetning **indsendes altid en udfyldt forside og mindst ét udfyldt bilag.**

Indberetningsskemaets forside skal underskrives af både den for forsøgenes udførelse ansvarlige lærer og skolens rektor/leder og sendes til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi 3 uger inden forarbejdet påbegyndes.

Link til indberetningsskemaet:

<https://www.uvm.dk/gymnasiale-uddannelser/fag-og-laereplaner/laereplaner-2017/stx-laereplaner-2017>

**Kittet anbefales til Biologi A og Bioteknologi A: Forudsætninger er grundig viden om operon-modellen, lacZ og CRISPR-teknologien**



## Sikkerhed

Kanamycin og spectinomycin er begge antibiotika, der kan forårsage allergiske reaktioner eller irritation. Begge antibiotika skal tilsættes til det LB-medium, som elever skal arbejde med. Elever, der ved, at de er allergiske over for antibiotika, bør udvise forsigtighed.

Efter afsluttende forsøg skal al materiale, der indeholder mikroorganismer destrueres enten ved autoklavering eller ved henstand i en 10% klorinopløsning i mindst 20 minutter.

Bakteriestammen *E. coli* HB101-pBRKan er non-patogen, men genetisk modificeret, så den kun kan vokse i et særligt næringsrigt medium. Standardprocedurer for arbejde med mikroorganismer skal følges.

Enzymet Cas-9 kan, ligesom restriktionsenzymmer, klippe i DNA. Cas9 er dog forskellig fra restriktionsenzymmer ved at det er programmerbart og derfor kan styres til at klippe i en særlig sekvens i DNA. I kittet Out of The Blue bruges Cas9 til at klippe i det bakterielle gen *LacZ*.

*LacZ* klippes i stykker og en del af genet erstattes med en stump DNA, der vil ødelægge genet. Cas-9 anvendes som en molekylær saks.

### Introvideo:

<https://www.youtube.com/watch?v=N8GB9HFwopl>

### Notér kittets Batch-nummer!

### Kittets dele



Out of the Blue CRISPR Kit

Der er materialer nok til 8 grupper med hver 2-4 elever.

I kittet	
<i>E. coli</i> HB101-pBRKan, lyophilized	1 vial
Donor template DNA plasmid (pLZDonor)	215 µL
Donor template DNA og guide RNA plasmid (pLZDonorGuide)	215 µL
KIX Mix	225 mg
	18 mg



Spectinomycin pulver L (+) arabinose, lyophilized LB-agar pulver LB broth kapsel til 50 mL LB broth (LB-medium) Podenåle, sterile, 10 µL Petriskåle, 60 mm, sterile Mikrocentrifugerør, natural, 2.0 mL Transformationsopløsning (50 mM CaCl <sub>2</sub> , pH 6.1), steril Easy Start Guide Instructor Answer Guide	600 mg 25 g 1 kapsel 80 60 90 15 mL 1 1
<b>Eget udstyr</b>	
100–1,000 µL mikropipette med spidser 20–200 µL mikropipetter med spidser 2–20 µL mikropipetter med spidser Vægt – skal kunne afveje med 0,01g nøjagtighed Autoklave eller en mikrobølgeovn Termometer (0–60°C) Termostatstyret varmeblok eller vandbad Skumflydere hvis der benyttes vandbad  Erlenmeyer kolbe / konisk kolbe, 500 mL Erlenmeyer kolbe, 1 L BlueCap flaske, 150–250 mL Måleglas, 500 mL Demineraliseret vand Isbad(e)  Sakse Permanent tuscher Aluminiumsfolie 10% klorinblanding Malertape	
<b>Andet udstyr der kan være praktisk at have</b>	
Varmeskab Vortexer Holder til mikrocentrifugerørerne	
<b>Bestillingsnumre hos BioRad</b>	
Se den engelske manual	

## Laboratorieteknik

Bemærk, at levende bakterier, der indeholder genteknologisk fremstillede plasmider ikke må slippes ud i naturen. Følgende sikkerhedsforskrifter SKAL derfor overholdes: Arbejd kun på pladser med dækpapir

- Bær kittel
- Opsaml alt affald

- Al affald skal destrueres efter forskrifterne
- Rapporter straks ved eventuelt uheld
- Arbejd stille og roligt
- Mad og drikkevarer må ikke indtages i laboratoriet
- Vask hænder, når laboratoriet forlades

### Før du går i gang - planlægning

#### Forløbsplan

Aktiviteterne i kittet er designet til hver at tage 90 minutter eller lidt længere tid – se tabel 1. Har man kortere moduler kan man i tabel 2 ses en plan for, hvordan aktiviteterne kan afvikles.

**Tabel 1: 90 minutters moduler**

	Modul 1	Modul 2	Modul 3
I klassen	Oplæg og introduktion Aktivitet 1: Introduktion til CRISPR-Cas-9 gen-editeringsteknologi – del 1-4	Aktivitet 2: <i>LacZ</i> CRISPR gen-editering lab, del 2. Styr gen-editeringen	Capstone aktivitet - start
Udenfor laboratoriet/ Hjemmearbejde/planlægning	Afslut aktivitet 1  Aktivitet 2: <i>LacZ</i> CRISPR gen-editering: Besvar spørgsmålene	Eleverne kigger på deres plader efter inkubationen og analyserer resultatet. Aktivitet 2 – del 3: Besvar spørgsmålene	Afslut Capstone aktiviteten

**Tabel 2: 50 minutters moduler**

	Modul 1	Modul 2	Modul 3	Modul 4	Modul 5
I klassen	Oplæg og introduktion Aktivitet 1: Introduktion til CRISPR-Cas-9 gen-editeringsteknologi	Start aktivitet 2: <i>LacZ</i> CRISPR gen-editering lab, del 2. Styr gen-editeringen	Fortsæt aktivitet 2, - del 2	Afslut aktivitet 2, del 2  Start aktivitet 2, del 3 Besvar arbejds-spørgsmålene	Capstone aktivitet - start
Udenfor laboratoriet/Hjemmearbejde/planlægning	Afslut aktivitet 1  Aktivitet 2: <i>LacZ</i> CRISPR gen-editering			Afslut aktivitet 2, del 3 Besvar arbejds-spørgsmålene	Afslut Capstone aktiviteten

Teoretisk baggrund – 'curriculum fit':

**Følgende viden forudsættes bekendt før forsøgene startes**

- DNA, RNA og proteins opbygning og funktion
- Baseparringsregler
- Det centrale dogme: DNA → RNA → Protein
- Operonmodellen og *lacZ*
- CRISPR teknologien
- Simpel sandsynlighedsberegning
- Hvordan en transformation fungerer inkl. viden om plasmider og deres funktion, samt hvordan antibiotikaresistens anvendes som selektionsmarkør
- Hvordan bakterier kan vokse på et medie
- Hvordan man bruger mikropipetter

**Anden nyttig viden og kunnen:**

- DNA, RNA og proteinstruktur og funktion - Cas9 er et protein og en nuklease, der klipper i DNA som anvist af guiden RNA. Det er vigtigt at forstå strukturerne af disse tre komponenter i CRISPR-Cas9-systemet; protein, DNA og RNA.
- Det centrale dogme - eleverne ændrer i *lacZ*-genet (DNA), som koder (via mRNA) for beta-galactosidase (protein), et enzym, der gør det muligt for *E. coli* at hydrolysere lactose. Efterfølgende kan der observeres en synlig ændring i bakteriernes fænotype (der sker en farveændring).
- Bakteriel transformation - laboratorieaktiviteten involverer transformation af bakterier med plasmider, der koder for CRISPR-Cas9 komponenter. Processen med bakteriel transformation bruger bakteriecellevæggenes kemiske egenskaber og DNA til at introducere genetisk information i en organisme (*E. coli*).
- Genteknologi eller manipulation af genomer for at fremkalde en bestemt fænotype er det underliggende mål for genteknologi. Bakteriel transformation og CRISPR-genredigering er to teknikker inden for genteknologien.
- Bioinformatik - eleverne vil øve sig i at bruge BLAST til at bestemme de relative risici ved geneditering i potentielle Cas9-målområder og lære hvordan man kan evaluere sikkerheden ved CRISPR-baseret genterapi ved at bruge BLAST.
- Etiske, juridiske og sociale spørgsmål - mange større spørgsmål er forbundet med anvendelsen af CRISPR-teknologi, fordi det med metoden er relativt nemt at lave genetiske ændringer.

## Lærerens forberedelser

Hvad?	Hvor lang tid tager det?	Hvornår?
Støbe LB-agarplader	1-2 timer plus 2 dage til tørring	3-14 dage før forsøgsstart
Rehydrering af <i>E. coli</i>	5 minutter plus 8-24 timers inkubation	2 dage før forsøgsstart
Udstryge på start-pladerne	20 minutter plus 24-36 timer	24-36 timer før forsøgsstart
Fordele opløsninger mm	1 time	Op til 3 dage før forsøgsstart

### Tips:

De rehydrerede *E. coli* skal inkuberes ved 37 grader for at opnå det bedste resultat. Hvis pladerne tørrer ved stuetemperatur, bør de stå i 72 timer – fx over en weekend.

### Fremstilling af LB-agarplader - 3-7 dage før forsøgsstart

1. Mærk en 500 mL BlueCap flaske **KIX** og en 1L BlueCap flaske **KIX/SPT**.

2. Tilsæt 3,0 mL demineraliseret vand til det lille glas med arabinose.

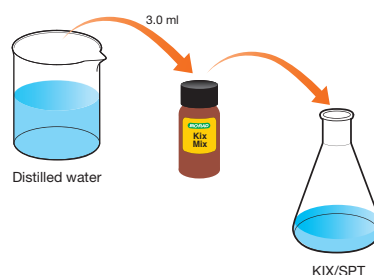
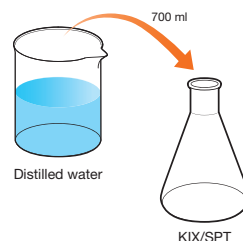
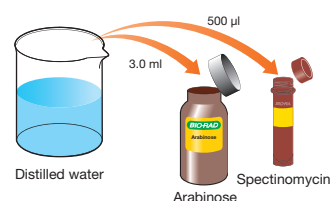
Ryst og brug evt. en vortexer for at blande godt. Det kan tage op til 10 minutter at få arabinosen opløst.

3. Tilsæt 500 µL demineraliseret vand til det lille glas med spektinomycin. Bland godt for at få det opløst.

4. Tilsæt 700 mL demineraliseret vand til flasken mærket **KIX/SPT**.

5. Tilsæt 3 mL demineraliseret vand til det lille KIX/MIX rør, luk røret og ryst i 5 sekunder. Hæld blandingen i **KIX/SPT**-flasken.

**Vigtigt!** KIX Mix indeholder kanamycin, IPTG og X-gal som kan være farlig at indånde. Det er derfor vigtigt at tilsætte vand før pulveret hældes over i flasken.



**Bemærk:** KIX Mix'en vil ikke opløses helt og blandingen vil derfor se grynet ud.

6. Gentag punkt 5 mindst to gange mere for at være sikker på, at alt pulveret er kommet med over i flasken.

7. Hvirvl flasken rundt i 20 sekunder eller indtil det uopløselige pulver er jævnt fordelt. Hæld derefter straks 200mL over i flasken, der er mærket KIX.

8. Tilsæt 7g agarpulver KIX-flasken . Tilsæt det resterende agar til KIX/SPTflasken.

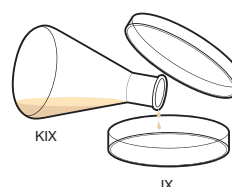
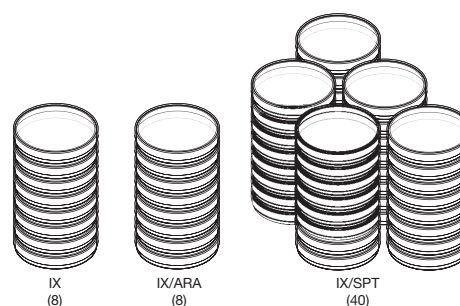
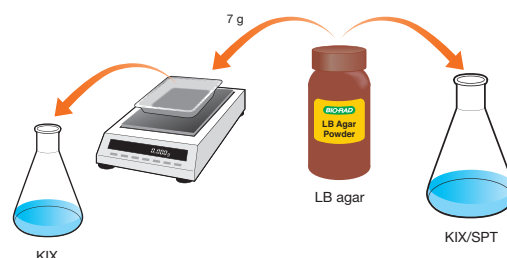
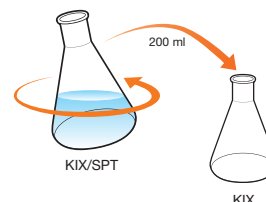
9. Autoklaver begge flasker i 30 minutter - eller lad det koge op tre gange i en mikrobølgeovn - pas på at det ikke koger over!

**Bemærk:** Hvis der vælges at autoklavere, kig da først på punkt 16, hvor det fremgår, at det også anbefales at autoklavere LB-mediet. Man kan autoklavere det hele samtidig.

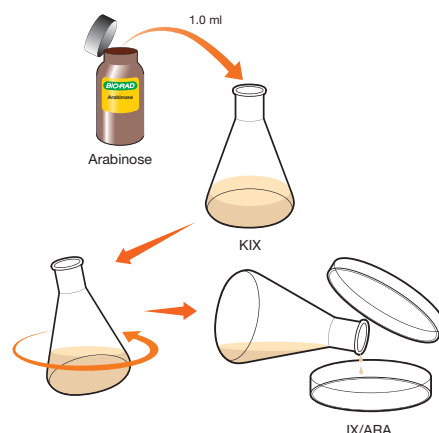
10. Mærk 8 petriskåle **IX**, 8 petriskåle **IX/ARA** og mærk 40 petriskåle **IX/SPT**.

**Vigtigt:** KIX Mix indeholder antibiotikaet kanamycin (K), som tilsættes for at selekttere for *E. coli* HB101-pBRKan. Alle agarplader i denne aktivitet indeholder kanamycin. For ikke at forvirre begreberne udelades K'et i elevvejledningerne og derfor betegnes pladerne med **IX** i stedet for KIX.

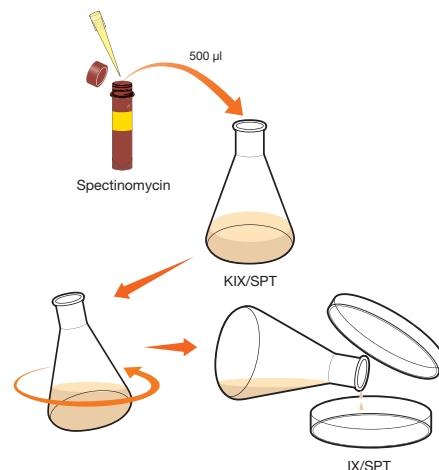
11. Fyld hurtigt ca. 10mL **KIX**-LB-agar i de 8 petriskåle mærket **IX**.



12. Tilsæt 1,0 mL opløst arabinose til den resterende smeltede **KIX**-LB-agar. Hvirvl rundt for at blande og fyld ca. 10 mL i hver af de 8 petriskåle mærket **IX/ARA**.



13. Når der kan holdes om flasken med **KIX/SPT** er agarens temperatur ca. 50°C og der tilsættes nu 500 µL opløst spektinomycin. Hvirvl rundt for at blande og fyld mindst 40 **IX/SPT**-petriskåle med ca. 10 mL smeltet agar. Det er fint at have ekstra **IX/SPT**-petriskåle.



**Bemærk:** Temperaturer over 60°C vil ødelægge spektinomycinen. Derfor er det vigtigt at vente til agaren er tilpas afkølet. Stil evt. flasken i et 50°C vandbad - derved afkøles agaren ikke for hurtigt.



14. Når agaren er stivnet stilles pladerne ved stuetemperatur i 2 dage. De skal stå mørkt, men ikke pakkes ind, da de derved ikke tørrer.

**Bemærk:** Stofferne i **KIX** Mix er lyssensitive! Stil dem derfor i et mørkt rum.



15. Når pladerne er tørre pakkes stakken af plader i aluminiumsfolie for at beskytte dem fra lys. Derefter pakkes de i plastik eller i den oprindelige plasticpose petriskålene var i. Stil den indpakkede stak med bunden i vejret i køleskab. Pladerne kan opbevares i op til 2 uger.



**Bakterierne gøres klar og podes 2 dage før forsøget i aktivitet 2.**

Hvis du vil inkubere start-pladerne ved stuetemperatur, skal der podes 4 dage før forsøget

16. Tilsæt 50 mL demineraliseret vand og LB-Broth-kapslen (LB-medium) til en 250 mL flaske eller kolbe.

**Luk den løst** og autoklaver (eller lad den koge op tre gange i en mikrobølgeovn). Lad den afkøle til stuetemperatur

**Bemærk:** Autoklaver evt. sammen med agaren fra punkt 9.

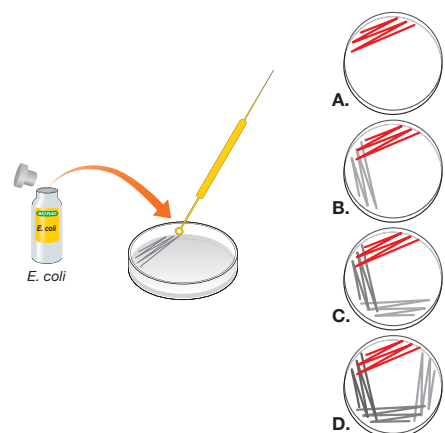
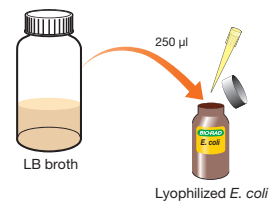
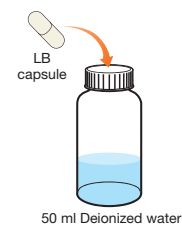
17. Med en steril pipettespids overføres 250 µL. stuetemperatursvarmt LB-medium til det lille glas med *E. coli* HB101-pBRKan. Luk det lille glas og ryst forsigtigt indtil bakterierne er resuspenderet. Lad glasset inkubere i 8-24 timer 37°C.

18. For at sikre mod kontaminering koges den resterende mængde LB-medium i mikrobølgeovnen - HUSK at løsne låget. Luk derefter og stil flasken i køleskab. ved 4°C.

**Fremstilling af start-plader 24 timer før forsøget i aktivitet 2**

19. Med en steril podenål udstryges der 15 µL *E. coli* HB101-pBRKan på 8 IX og 8 IX/ARA plader.

**Vigtigt:** Følg udstrygningsmønsteret som ses i trin A-D på billedet. Start i en kvadrant og drej derefter pladen og stryg i næste kvadrat osv.



20. Inkubér de 16 startplader i varmeskab ved 37°C i 24 timer.

Alternativt kan start-pladerne inkuberes i 72 timer ved stuetemperatur. Det er vigtigt at pladerne står i mørke!

### Klargøring til aktivitet 2 - stilles i køleskab

For at undgå kontaminering, er det vigtigt at **LB-medium, der skal fordeles til grupperne tidligst klargøres 3 dage for forsøget.**

21. Til hver gruppe mærkes fire 2mL mikrocentrifugerør med hhv. **TS**, **LB**, **pD** og **DG**. Der kan være 8 grupper i alt.

22. Overfør 1,2 mL transformationsopløsning til hvert af de 8 rør mærket **TS**.

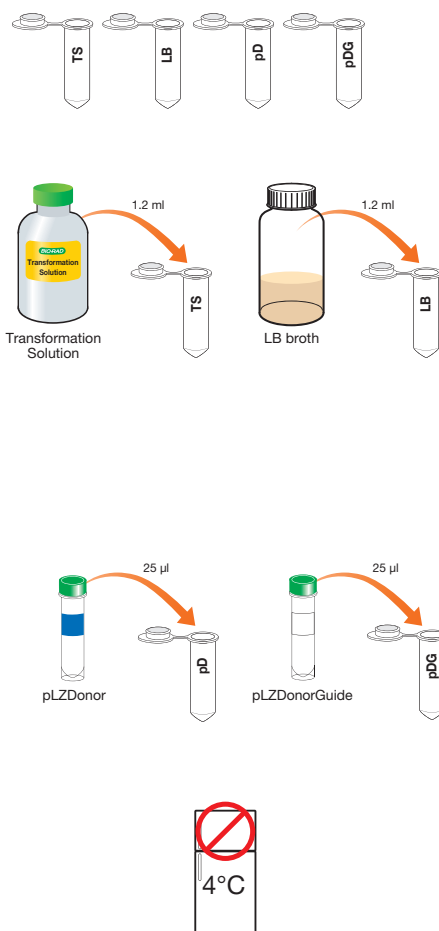
23. Overfør 1,2 mL steril LB-medium til de 8 rør, der er mærket **LB**.

24. Puls-centrifuger (kort centrifugering) de to rør med pLZDonor og pLZDonorGuide for at få indholdet samlet i bunden.

25. Overfør 25 µL pLZDonor plasmid til de 8 rør, der er mærket **pD**.

26. Overfør 25 µL pLZDonorGuide plasmid til de 8 rør mærket **pDG**.

27. Alle rørene opbevares i køleskab ved 4°C til de skal bruges. Alle reagenserne på nær transformationsopløsningen (**TS**) bør have opnået stuetemperatur, når de benyttes.



## Gør materialerne til aktivitet 2 klar:

### Til hver gruppe:

Frisk <i>E. coli</i> IPTG/X-gal ( <b>IX</b> ) LB startplade	1
Frisk <i>E. coli</i> IPTG/X-gal/ARA ( <b>IX/ARA</b> ) LB startplade	1
IPTG/X-gal/spectinomycin ( <b>IX/SPT</b> ) LB-plader	4
LB-medie ( <b>LB</b> )	1,2 mL
Transformation solution ( <b>TS</b> ) på is	1,5 mL
pLZDonor plasmid ( <b>pD</b> ), 80 ng/μL	40 μL
pLZDonorGuide plasmid ( <b>pDG</b> ), 80 ng/μL	40 μL
100–1,000 μL mikropipette med spidser	1
20–200 μL mikropipette med tilhørende spidser	1
2–20 μL mikropipette med tilhørende spidser	1
Mikrocentrifugerør, 2,0 mL	4
Gule Podenåle	8
Isbad med knus is	1
Tusch til mærkning	1
Skumflydere (hvis der benyttes vandbad)	1
Holder til mikrocentrifugerørerne	1
Bøtte til affald med autoklavepose	1

### Fælles:

Vandbad eller varmeblok 60°C

Varmeskab 37°C

Tape (malertape)

## Baggrundsviden

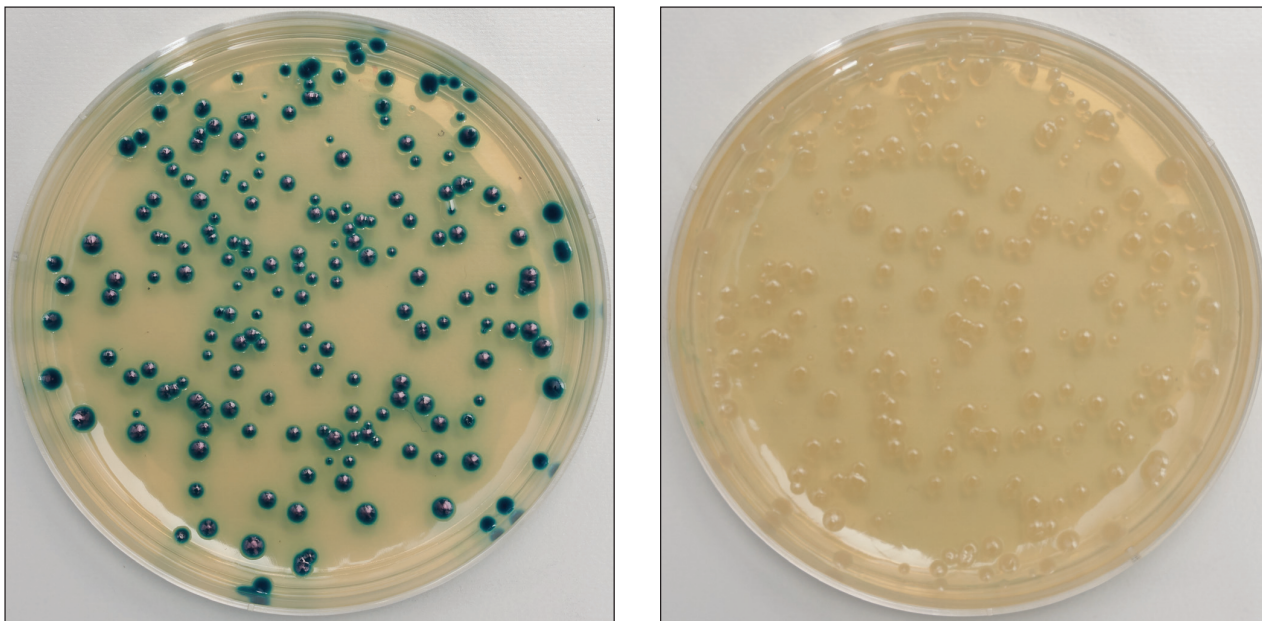
Om Out of the Blue CRISPR-Cas9 System

### *E. coli* HB101-pBRKan

Bakterierne i dette kit er modificerede til at udtrykke Cas9-enzymet. Ligesom mange laboriestammer af *E. coli* mangler de et endogent reparationssystem, der er nødvendigt for at rette dobbeltstrengede brud i DNA. Imidlertid bærer de et plasmid, der indeholder gener til homologirettet reparation (HDR) under kontrol af en arabinose-inducerbar promotor. Plasmidet bærer også et kanamycin-resistensgen som er en selektionsmarkør.

### *lacZ* genet og blå-hvid screening

I dette forsøg vil eleverne bruge CRISPR-Cas9-teknologi til at ødelægge det *lacZ*-gen, som naturligt forekommer i kromosomet hos bakterien *E. coli* HB101-pBRKan. Et gen i det bakterielle lac-operon, *lacZ*, der koder for enzymet beta-galactosidase ( $\beta$ -gal), hvilket gør det muligt for *E. coli* at hydrolysere lactose.  $\beta$ -gal kan også hydrolysere en farveløs lactoseanalog, X-gal, hvilket fører til dannelsen af et blå pigment. Tilstedeværelsen af blå eller hvide kolonier er en visuel indikation på en vellykket *lacZ*-genredigering; bakterier med funktionel *lacZ* bliver blå, når de dyrkes på medier med X-gal; dem med et ikke-funktionelt *lacZ*-gen forbliver hvide (figur 1).



Figur 1 *E.coli* udpladede på medie indeholdende X-gal

### DNA-reparation ved homologirettet reparation (HDR)

Når Cas9 har klippet i et kromosom, skal det repareres på en eller anden måde, ellers dør bakterierne. De bakterier, der benyttes i dette forsøg, mangler evnen til at lave DNA-reparationsaktiviteten, men er konstrueret til at udtrykke enzymerne til HDR. De gener, der koder for HDR, er under kontrol af en arabinose-inducerbar promotor. For at reparere et DNA-brud kræver HDR donor-skabelon-DNA med homologi til sekvenserne, der flankerer klipningsstedet. Donor-skabelon-DNA er indsat i de plasmider, der benyttes i kittet (se nedenfor).

### sgRNA(single-guideRNA) og donor-skabelonen DNA

I forsøget transformeres *E. coli* HB101-pBRKan med et af følgende to plasmider, som hver indeholder et spektinomycinresistensgen:

- pLZDonor-(kontrol) inkluderer en donorskabelon-DNA-sekvens, der vil blive brugt af HDR-systemet til at reparere dobbeltstrengt DNA, der er gået i stykker. Donorsekvensen inkluderer et stopkodon, der, når den indsættes, vil forringe *lacZ*-funktionen.
- pLZDonorGuide - inkluderer både donorskabelon-DNA -sekvensen fra pLZDonor og en sekvens, der koder for single-guide RNA (sgRNA). Når det er transskriberet, vil sgRNA guide Cas9 -proteinet hen til sekvensen, hvor *lacZ* skal klippes.

Donors skabelonsekvens indeholder et stopkodon, der vil stoppe translationen af *lacZ*-genet. Bakterier, der har gennemgået denne genredigering vil ikke længere lave en funktionel beta-gal, men vil fortsætte med at vokse. Bakterier med et dobbeltstrengt DNA-brud i deres kromosom, men uden en aktiv mekanisme til at reparere bruddet, vil dø.

### Hvad sker der?

I disse aktiviteter bruges forskellige additiver til at skabe de forskellige eksperimentelle resultater (tabel 1).

- Alle plader indeholder antibiotika kanamycin som selektionsmarkør for *E. coli* HB101-pBRKan

- Alle plader indeholder IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside) og X-gal (5-brom-4-chloroindol-3-yl- $\beta$ -D-galactopyranosid) til blåhvid screening. IPTG er en ikke-metaboliserbar analog af galactose, der inducerer ekspression af lac-operon, herunder *lacZ*, som koder for  $\beta$ -gal.
- Arabinose inducerer ekspression af HDR-enzymerne. Eleverne kan være forvirrede over, hvorfor de eksperimentelle plader (IX/SPT) ikke indeholder arabinose. Men eftersom hele genediteringsprocessen, inklusiv HDR, er afsluttet, før eleverne poder deres bakterier på pladerne, er det ikke nødvendigt for forsøgspladerne at indeholde arabinose.
- Plader indeholdende spectinomycin selekterer for bakterier transformeret med pLZDonor eller pLZDonorGuide

**Tabel 1 Indhold i pladerne**

Pladens navn	Kanamycin selektionsmarkør	IPTG Indicerer ekspressionen af beta-gal	X-gal Hydrolyseres af beta-gal, hvorved der dannes blåt pigment	Arabinose Inducerer ekspressionen af HDR-systemet	Spectinomycin Selektionsmarkør for pLZDonor og pLZDonorGuide
IX	X	X	X		
IX/ARA	X	X	X	X	
IX/SPT	X	X	X		X

\* **Vigtigt!** Alle plader, der benyttes i denne aktivitet, indeholder antibiotika kanamycin (K), som bruges til at selektere til bakteriestammen. For at gøre aktiviteten enkel, udelades "K" og kanamycin fra tekst og etiketter i alle elevers undervisningsmateriale. Hvis du foretrækker at diskutere kanamycins rolle med dine elever, skal du udskifte IX-etiketter med KIX og forklare dens formål for dine elever.

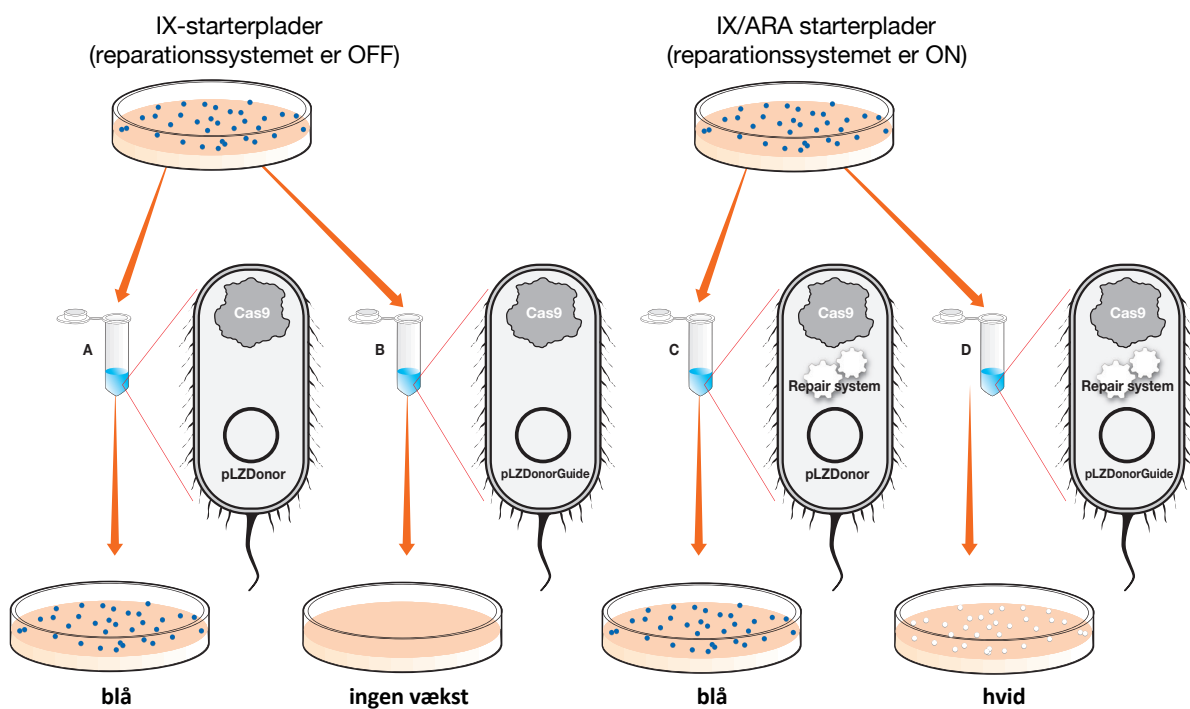
Eleverne starter aktiviteten med to forskellige startplader (hhv. IX og IX/ARA), hvorpå der gror bakterier:

- Alle bakterier udtrykker Cas9
- Bakterierne, der er dyrket på **IX** plader, udtrykker ikke det enzym, der er nødvendigt for HDR (repair system OFF)
- Bakterier dyrket på **IX/ARA** plader udtrykker det enzym, der er nødvendigt for HDR (repair system ON)

Bakterier fra såvel **IX**- som **IX/ARA**-plader vil blive transformeret med både pLZDonor og pLZDonorGuide (se figur 2)

- Bakterier der er transformeret med pLZDonor vil ikke have sgRNA som er nødvendigt for at guide Cas9 til at klippe i *lacZ*. Derfor vil der ikke ses nogen gen-redigering, og transformanterne vil blive blå uanset om repair-systemet er ON eller OFF.
- Bakterier, der er transformeret med pLZDonorGuide vil have både sgRNA og donor-skabelon-DNA.

- Hvis HDR-systemet ikke udtrykkes (når der *ikke er* arabinose), vil der ske en Cas9-styret klipning, men der vil ikke ske en DNA-reparation og cellerne vil dø.
- Hvis HDR-systemet udtrykkes (der *er* arabinose til stede), vil der ske en Cas9-styret klipning og HDR-maskineriet vil bruge donor-skabelon-DNA fra pLZDonorGuiden til at klippe korrekt og indsætte en stopcodon i *lacZ*genet. Transformanterne vil blive hvide.
- Straks efter transformationen vil den Cas9-medierede klipning og reparationsprocessen begynde. Processerne vil som regel være færdige, før man spreder på **IX/SPT**-pladerne.
- Spectinomycin i **IX/SPT**-agarpladerne selekterer for bakterier, der er transformerede med succes.





## Aktivitet 1

### Introduktion til CRISPR-Cas9-genediteringsteknologien

Aktiviteterne i dette kit fokuserer på CRISPR-Cas9-genediteringsteknologi for sammenlagt at give eleverne en grundlæggende forståelse af det bakterielle adaptive immunsystem, som CRISPR-Cas9 kommer fra. På BioRads hjemmeside ligger der en instruktionsvideo, men ellers er der mange muligheder for yderligere materialer - se bl.a. referencelisten i den engelske manuals appendikser.

**Mål: At eleverne forstår trinene i en Cas9-medierede DNAklip og kan forudsige placeringen af klipningen, når de kender en sgRNA-sekvens.**

**At eleverne kan bruge matematiske modeller til at forklare den relative specificitet af restriktionsenzymernes og Cas9's klipping af DNA.**

Lærerens tips og tricks	
Del 1: Simulering af den molekylære mekanisme ved DNA-spaltning med Cas9	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Denne aktivitet er hovedsageligt designet til at være elevdrevet</li> <li>• Eleverne skal bruge sgRNA 1 og DNA Strimmel 1</li> <li>• DNA -sekvensen i aktiviteten er en del af det kromosomale <i>lacZ</i> -gen i <i>E. coli</i>.</li> <li>• Formativ vurderingsmulighed: tjek de steder, som eleverne regner med, er klipningssteder, om de er nøjagtige/korrekte og ret de fejl du opdager</li> <li>• En idé: Lav en længere DNA -sekvens fra et særligt gen og en sgRNA-sekvens. Få derefter eleverne til at forudsige klipningsstedet</li> </ul>
Del 2: Design af guiding-regionen i sgRNA	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eleverne skal bruge sgRNA 2 og DNA-strimmel2</li> <li>• Formativ vurderingsmulighed: Kontroller elevernes sgRNA-sekvensers nøjagtighed og ret eventuelle misforståelser/fejl. Se svarguiden.</li> <li>• En idé: Lav en længere DNA -sekvens fra et bemærkelsesværdigt gen og få eleverne til at skrive en sgRNA-sekvens, der kan skære inden for den pågældende DNA-sekvens</li> </ul>
Del 3: Sammenligning af de forskellige DNA-klipningsværktøjer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• I denne del beder man eleverne om at antage, at det menneskelige genom er en tilfældig sekvens af A, T, C og G. I virkeligheden gentages mange nukleotidsekvenser i det menneskelige genom</li> <li>• Diskuter den potentielle indvirkning af sekvensrepetitioner, f.eks. paraloger, ortologer og Alu-gentagelser, for specificiteten af CRISPR-Cas9-teknologien.</li> <li>• Formativ vurderingsmulighed: tjek elevberegninger og fortolkninger. Se svarguiden.</li> </ul>
Del 4: Design af Donor-skabelon-DNA til reparation af DNA	<p>Det er vigtigt overfor eleverne at understrege forskellen på genreparation, fiksering af sekvenserne af et gen ift. funktion og DNA-reparation og reparation af molekylære brud i DNA.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• En idé: få eleverne til at vise deres donorskabelon DNA-strenger, før de tapes fast til de afskårne DNA-strimler. Bed eleverne om at forklare deres model overfor hinanden.</li> <li>• En mulighed: få eleverne til at finde den fulde <i>lacZ</i>-gensekvens ved hjælp af NCBI-databasen og foreslå en sgRNA-målsekvens og donorskabelon-DNA-sekvens for at indsætte en in-frame stop-codon.</li> </ul>

## Aktivitet 2

### LacZ CRISPR-Cas9-genediteringsforsøg

**Mål: Eleverne udfører en kromosomal genredigering og forstår de forventede resultater fra CRISPR-Cas9 eksperimentet.**

Lærerens tips og tricks	
Del1: Indledende spørgsmål besvares	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alle plader i forsøget indeholder kanamycin som selektionsmarkør for bakteriestammen, der bruges i dette kit. For nemheds skyld udelades "K" og kanamycin fra tekst og etiketter i alle undervisningsmaterialerne til eleverne. Hvis du foretrækker at diskutere kanamycins rolle med dine elever, skal IX-etiketter udskiftes med KIX-etiketter under forberedelsen.</li> <li>• Genediteringen i denne aktivitet er kromosomal og har for det meste fundet sted, inden eleverne udplader og inkuberer deres prøver. Efter udpladning og inkubering kan der ses tydelig kolonidannelse og dermed bliver fænotypen synlig.</li> <li>• Eleverne kan være forvirrede over, hvorfor arabinose ikke er nødvendig i selve forsøgspladerne. Arabinose er påkrævet til DNA-reparation, som begynder umiddelbart efter transformation. Når snittet i bakteriekromosomet er blevet repareret, er reparationsmaskineriet ikke længere nødvendigt. Alle datterceller, der genereres under kolonidannelse, vil have den kromosomale editering, som ikke klippes yderligere af Cas9.</li> <li>• Formativ vurderingsmulighed: Inden eleverne går videre til del 2, bør deres svar i Elevvejledningens tabel 3 og 4 gennemgås for at kontrollere for misforståelser.</li> </ul>
Del 2: Selve forsøget udføres	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Det er meget vigtigt, at eleverne til enhver tid opbevarer deres prøver på is, medmindre de aktivt overfører opløsninger og er i gang med varmechok-behandlingen.</li> <li>• Hvis du vil fortsætte med 'Out of the Blue Genotyping Extension', skal eleverne beholde deres bakterieplader. Se nærmere om Out Of The Blue Extension på BioRads hjemmeside</li> <li>• Hvis eleverne ikke skal analysere deres plader umiddelbart efter inkubationen, kan de opbevares på køl (4 °C) i op til to uger indtil der arbejdes videre.</li> </ul>
Del 3: Efterbehandling af resultaterne og forsøget	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Der bør ikke vokse kolonier på plade B, idet bakterierne har aktivt Cas9 med guide-RNA, men mangler ekspressionen af det konstruerede DNA-reparationssystem, da de er blevet dyrket på medie uden arabinose. I sjældne tilfælde kan eleverne observere et par hvide kolonier, der vokser på plade B. Disse bakterier har sandsynligvis gennemgået en sjælden sletning, hvor en del af <i>lacZ</i>-genet er blevet slettet, og det kromosomale DNA derfor er blevet efterladt intakt.</li> <li>• CRISPR-Cas9 genediteringssystemet i dette kit er yderst effektivt, men det er ikke 100% effektivt. Nogle elever vil finde blå kolonier på plade D, som stammer fra bakterier med <i>lacZ</i>-gener, der ikke er blevet modificerede.</li> <li>• Mulighed: Hvis eleverne fortsætter med 'Out of the Blue Genotyping Extension', kan man eventuelt analysere genotypen for en koloni, hvor der er sket en sletningshændelse.</li> <li>• Formativ vurderingsmulighed: Bed eleverne om at forklare IPTG, X-gal og spectinomycins roller i forsøget.</li> <li>• Formativ vurderingsmulighed: Få eleverne til at forudsige forventet bakteriekolonifarve, hvis de subkultiverede en prøve på plader, der indeholdt IPTG og X-gal, men ingen spectinomycin.</li> </ul>

## Aktivitet 3

### Identifikation og bioinformatisk analyse af Cas9-målsteder

**Mål:** Eleverne undersøger medicinske anvendelsesmuligheder af CRISPR og udforsker faktorer, der kan påvirke risikoen for off-target effekter ved brug af CRISPR. Eleverne bliver bedre til at bruge BLAST og analyserer forskellige grundlæggende krav til CRISPR-eksperimenter.

#### Introduktion

Potentialet for effekter af off-target er vigtig i etiske diskussioner, der involverer CRISPR-medieret genediteringsteknologi. Valget af målsekvens sted og den nødvendige guide-RNA-sekvens er afgørende for at man får reduceret risikoen for effekter uden for målesekvensen.

Elever, der lærer om CRISPR-teknologien, ser ikke umiddelbart disse begrænsninger eller nødvendigheden af risikovurdering ved design og udvikling af genterapi generelt.

Ved at bruge BLAST kan man undersøge de forskellige risici for at Cas9 ikke klipper korrekt.

Ideen med aktiviteten er at guide eleverne til at stille passende spørgsmål, ikke svar, om de reelle risici, der er forbundet med CRISPR-applikationer.

Dette er en aktivitet, hvor der ikke er korrekte svar, kun velbegrundede argumenter. Det giver plads til eleverne til at udforske, prøve, fejle og gentage mod et defineret mål.

#### Om metodens design og begrænsninger

Det er komplekst at vurdere effekterne af guide-RNA-sekvenser på off-target. Der er mange gratis online værktøjer tilgængelige, som kan hjælpe forskere med at finde og rangere forskellige mulige RNA-sekvenser, men deres algoritmer og scoringskriterier er komplekse.

I denne aktivitet bruger eleverne BLAST, ikke kun til at øve sig i at bruge et så vigtigt værktøj, men også fordi virkeligheden af mulige off-target sekvenser dermed gøres tydelig. Selvom denne aktivitet således ikke er den arbejdsgang, forskere typisk bruger, hjælper den eleverne med at overveje nogle grundlæggende designelementer.

- BLAST har begrænsninger ved håndtering af korte sekvenser og prioriterer sekvenser med sekventiel nukleotidjustering frem for sekvenser med intermitterende uoverensstemmelser eller justeringsudfald. Som følge heraf kan BLAST overse nogle sekvenser, som kan være uheldige og udenfor målsekvensen.
- BLAST kan ikke anvende et wildcard-nukleotid, N, i korte nukleotidsøgninger. I stedet ignorerer algoritmen alle nukleotider nedstrøms for N, som i dette tilfælde inkluderer PAM -sekvensen.
- En omfattende off-target-søgning bør omfatte protospacersekvensen med hver af de fire PAM-kombinationer (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG og 5'-GGG) fordi BLAST ikke er i stand til at håndtere N i en enkelt søgning.

Det er nødvendigt med en BLAST-søgning for hver af de fire PAM-sekvenskombinationer for rigtigt at kunne evaluere off-target potentialet for en kandidats målsekvens. For at passe ind i et modul i undervisningen er aktiviteten forenklet, og eleverne bruger kun én sekvens i søgningen.

- Human Reference Gene Database, som eleverne bruger i denne aktivitet, omfatter kun gensekvenser. Derfor vil alle forespørgselsresultater komme fra gensekvenser, hvilket hjælper med at understrege den potentielle biologiske virkning af et off-target cut for eleverne. Off-mål uden for gener vil ikke blive fundet, og resultaterne vil være meget lettere for eleverne at tolke.

- Som en yderligere udvidelse af aktiviteten skal eleverne udvikle en liste over designkrav til en softwareudvikler, der skal udvikle et sgRNA-designværktøj.

Lærerens tips og tricks	
Del1: Identifikation og navngivning af målområder (target sequences)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Giv hver elevgruppe et informationsark om en sygdoms (koronararteriesygdom, seglcelleanæmi eller cystisk fibrose)</li> <li>• De leverede gensekvenser er begrænsede i længden for at reducere antallet af mulige målsteder</li> <li>• Alle målstederne skal være 23 nukleotider lange (protospacersekvens plus en PAM ved 3' ende) og skrevet som en enkeltstrengs sekvens 5' til 3'</li> <li>• Mind eleverne om, at den vejledende sekvens af sgRNA er komplementær til en målsekvens. Ved valg af et målsted er sgRNA-sekvensen også specificeret. Derfor er "design" af det styrende målområde af et sgRNA i det store og hele det samme som at vælge et specifikt målsted.</li> </ul>
Del 2: Udfør BLAST-søgning efter off-target-sekvenser	<ul style="list-style-type: none"> <li>• BLAST-sekvenser skal skrives 5' til 3', men kan være fra såvel den ene som den anden DNA-streng</li> <li>• Eleverne bruger BLAST til at finde off-target DNA-sekvenser, der matcher eller delvist matcher deres kandidat-DNA-sekvens. De søger ikke efter RNA-sekvenser.</li> <li>• Valgmulighed: hvis der er flere elever i en gruppe, skal hver elev deres sekvenser med en af de fire PAM-sekvensindstillinger (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG og 5'-GGG). Se noter om aktivitetsdesign og begrænsninger ovenfor</li> </ul>
Del 3: Vurdering af de fundne målområder	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Undgå at bruge meget lange sekvenser, der indeholder flere uafhængige gener, som hver har sit eget identifikationsnummer, fordi de kan fordobles i databasen og kan indeholde flere forskellige gener, som ikke skal vurderes. Eksempel: NG_000007.3 er et langt DNA -fragment indeholdende fem globin-gener inklusive HBB, som er separat indeholdt i NG_059281.1</li> <li>• Når eleverne udvikler kriterier, kan de overveje: <ul style="list-style-type: none"> <li>- om en potentiel off-målsekvens støder op til en PAM -sekvens i den korrekte retning</li> <li>- hvor mange potentielle off-målsekvenser, der fuldstændigt matcher målsekvensen</li> <li>- hvor mange potentielle off-målsekvenser, der matcher mindst 80% af målsekvensen (eller en anden procentdel)</li> <li>- placeringen og mønsteret af uoverensstemmelser mellem et potentielt off-target og målsekvenser (langt eller tæt på PAM)</li> </ul> </li> <li>• Elevernes kriterier bør omhandle to aspekter af risikoen for off-goals: risikoniveauet, der a bestemt off site kan blive reduceret, og mængden af risikable off-mål, der er for et individuelt target-site.</li> </ul>

