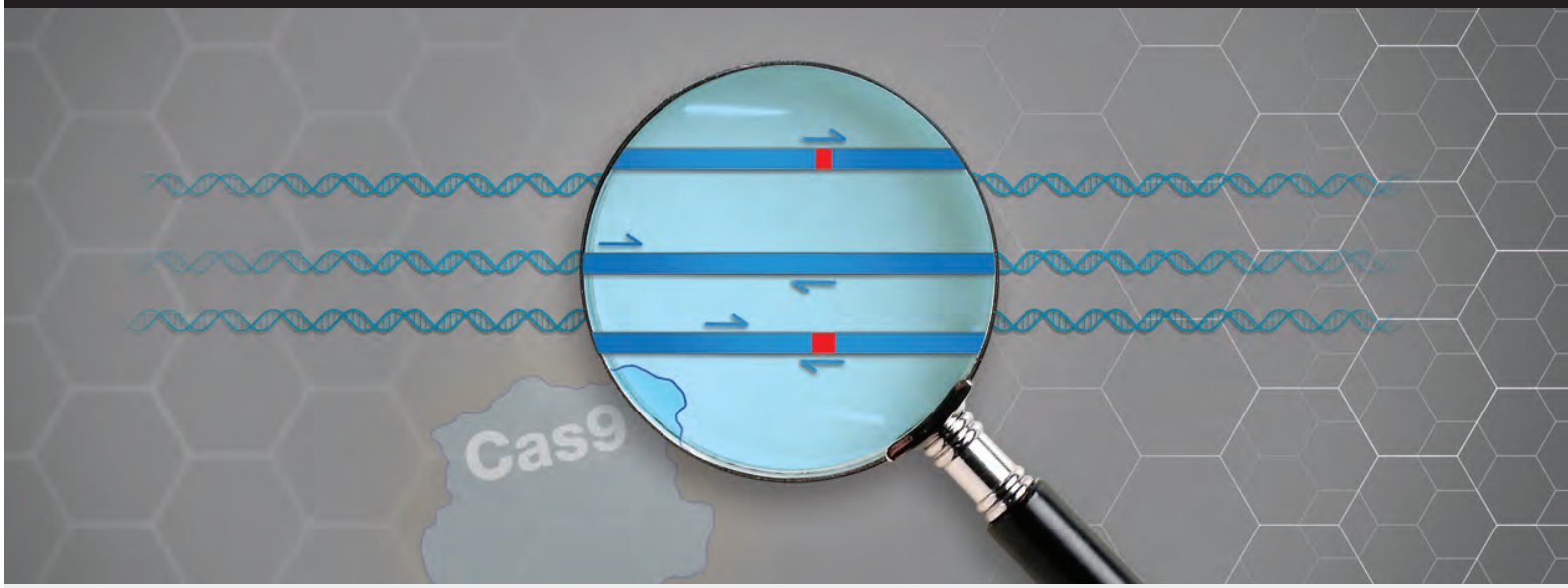
Bio-Rad would like to thank Birgit Sandermann Justeson for the translation of this document.

BIO-RAD Explorer



Out of the Blue Genotyping Extension

Kit nr.12012607EDU

Oversat 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

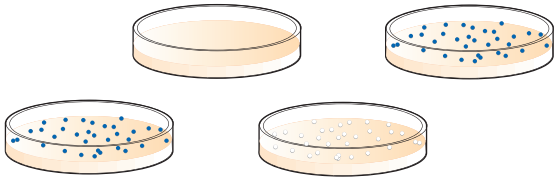
De genteknologiske forsøg må kun udføres, dersom der senest 3 uger forud for arbejdet med forsøgene (herunder forarbejdet) er sendt en indberetning til Undervisningsministeriets fagkonsulent i biologi på det indberetningsskema, der indgår som en del af aftalen
Ved indberetning **indsendes altid en udfyldt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

BIO-RAD

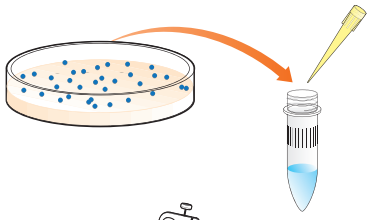
Overblik over forsøget

Del 1 Forklaring af resultaterne fra *lacZ* CRISPR Genediteringslaboratoriet



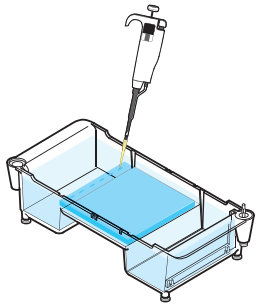
Eleverne gennemgår deres resultater fra lacZ-CRISPR - bakteriegenediteringen og giver to mulige forklaringer på resultaterne. Derefter brainstormer de om, hvilke yderligere oplysninger der kan hjælpe dem med at finde den mest sandsynlige forklaring.

Del 2 Ekstraktion af DNA fra bakteriekolonier og PCR



Ekstraktion af DNA fra bakteriekolonier på pladerne og klargøring til PCR for at se, hvorvidt *lacZ* genet er blevet modificeret eller ej i de valgte bakteriekolonier.

Del 3 Gelelektroforese og farvning



PCR-prøverne analyseres med en agarosegelelektroforese og efterfølgende visualisering med fx FastBlast eller med UView.

Del 4 Dataanalyse og fortolkning

Elektroforeseresultaterne analyseres for at bestemme bakteriernes genotype og dermed fortolke resultaterne fra genediteringen.

Opbevaring:

- Noter kittets batch-nummer
- Out of the Blue Genotyping Extension refill-pakken opbevares i fryser -20°C
- InstaGene Matrix, UView6x og Loading dye og farve (FastBlast) opbevares i køleskab
- Resten opbevares ved stuetemperatur

Sikkerhed

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.
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.
Udvis stor forsigtighed, når der arbejdes med smeltet agar og agarose.

Kittets indhold:

InstaGene Matrix	20 mL
2x PCR Master Mix	1,200 mL
Out of the Blue Primer Mix, 50x	20µL
Out of the Blue PCR Positive Control	150 µL
DNA PCR MW Ruler	200 µL
Orange G Loading Dye, 5x	1 mL
1,5 mL conical tube, O-ring screw cap,	50
sterile Microtube with cap, 1,5 mL	60
PCR tube, 0,2 mL	100
Instructor Answer Guide	1

Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack

Fast Blast DNA Stain, 500x	100 mL
Certified Molecular Biology Agarose	25g
TAE Electrophoresis Buffer, 50x	200mL

Small UView DNA Electrophoresis Pack

UView 6x Loading Dye and Stain	1mL
Certified Molecular Biology Agarose	25g
TAE Electrophoresis Buffer, 50x	200mL

Andet nødvendigt udstyr

Thermal cycler (PCR-maskine) med mindst 56 pladser	1
100–1,000 µL mikropipette med tilhørende spidser	8
20–200 µL mikropipette med tilhørende spidser	1
2–20 µL mikropipette med tilhørende spidser	8
Gelelektroforesekar med kam	4-8
Strømforsyning	1-8
Vandbad eller varmeblok på 56°C	1-2
Vandbad eller varmeblok på 95°C	1-2
Ultracentrifuge, ≥2,000 x g	1-flere
UV transilluminator (hvis der bruges UView 6x Loading Dye and Stain)	1
Gelfarvningskar (hvis der farves med Fast Blast DNA Stain)	4-8
Holdere til mikrocentrifugerør	8
Mikrobølgeovn	1
Demineraliseret vand	750 mL
Måleglas, 1 L, 200 mL, and 50 mL, til fremstilling af buffere	flere
Stor beholder eller bægerglas >2.5 L, til fremstilling af buffere	
Bægerglas 500 mL til fremstilling af Fast Blast DNA stain	
Koniske kolbe på 500 mL eller BlueCapflaske til fremstilling af agarosegeler	
Permanente mærketusch	8

Smart at have

Vortexer
PCR-rørdaptorer til centrifugen
PCR-rørholder

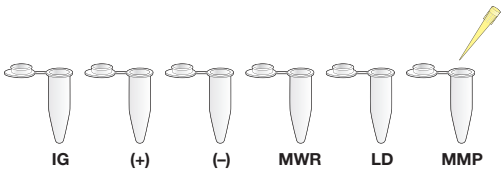
Forløbsplan
Start aktiviteten **Out of the Blue Genotyping Extension** senest to uger efter afslutning af aktivitet *2: lacZ CRISPR Bacterial Gene Editing Laboratory i Out of the Blue CRISP-kittet*.
Denne "udvidelsesaktivitet" er designet til at tage to til tre moduler á 90-minutter.

	Modul 1	Modul 2	Modul 3
I klassen	Del1 Forklar resultaterne fra *lacZ* CRISPR-genediterings-forsøget Del 2: Forsøget startes: Ekstraktion af DNA fra bakteriekolonier og gennemgang af PCR-spørgsmål	Del 2: Ekstraktionen og PCR-færdiggøres Del 3: Gelelektroforese af PCR-produkterne og farvning (visualisering)	Del 3: fortsat Del 4: Analyse og tolkning af resultaterne
Udenfor skolen	Besvare spørgsmålene, der lægger op til forsøget	PCR-produkterne sættes i køleskab, hvis der ikke fortsættes umiddelbart	Afsluttende spørgsmål og diskussion

Lærerens forberedelse:

Alle reagenser på nær PCR-master-mix og primere kan laves klar op til fire uger før forsøget.
PCR-mastermix og primere klargøres tidligst 30 minutter før forsøget

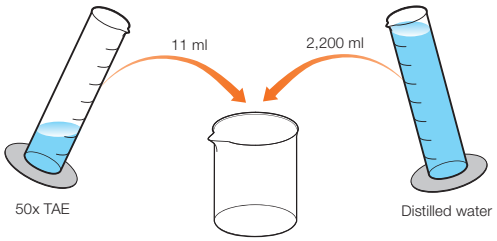
1. Lav alle reagenser og opløsninger og fordel dem i mærkede rør - se tabellen herunder. Husk at skifte pipettespids undervejs, så der ikke sker blandinger af de forskellige reagenser og opløsninger.



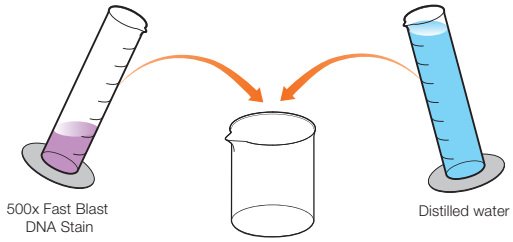
Rør og antal	Mærkning	Indhold og fremstilling
DNA ekstraktion og PCR		
8 mikrocentrifugerør med låg, 1,5 mL	**IG**	1,3 mL InstaGene Matrix **Forberedelse:** Ryst bøtten grundigt før pipettering - brug evt. en magnetomrører
8 mikrocentrifugerør med låg, 1,5 mL	**+**	15µL Out of the Blue PCR positive kontrol-DNA
8 mikrocentrifugerør med låg, 1,5 mL	**-**	15 µL demineraliseret vand
8 mikrocentrifugerør med låg, 1,5 mL	**MMP**	80 µL MasterMix og Primer-opløsning **Forberedelse:** Lige inden selve PCR-processen startes tilsættes 735 µL 2x PCR MasterMix og 15 µL Out of the Blue Primer Mix til et 1,5 mL mikrocentrifugerør. Pipetter op og ned for at blande. Fordel derefter til de 8 mikrocentrifugerør mærket **MMP**
Elektroforesen		
8 mikrocentrifugerør med låg, 1,5 mL	**LD**	40 µL loading dye
8 mikrocentrifugerør med låg, 1,5 mL	**MWR**	15 µL molekylær lineal med loading dye Forberedelse: Tilsæt 40 µL loading dye til røret mærket "PCR molecular weight ruler (MWR)" og pipettér op og ned for at blande. Fordel derefter til de 8 mikrocentrifugerør mærket MWR.

Agarosegeler, TAE-buffer og farve

2. Støb 8 agarosegeler med 8 brønde i hver. Det er vigtigt at bruge 1xTAE til gelerne - Se appendiks vedr. støbning af geler.



3. Fremstil 2,2L 0,2xTAE elektroforesebuffer ved at tilsætte 11 mL 50xTAE til 2,2L demineraliseret vand (Hurtiggel)
Bemærk: Den korrekte mængde vand er 2,189 L vand, men den lille forskel har ingen betydning



4. Hvis der farves med FastBlast gøres denne farve klar - se appendiks.

Baggrundsviden – til læreren

Efter at man har udført CRISPR i kittet Out of the Blue CRISPR er det en god ide at sikre sig, at der blev klippet det korrekte/ønskede sted og det færdige resultat blev som forventet.
I litteraturen kan man læse om eksempler på fejl i gen-editeringen.
Man kan benytte forskellige metoder til at bestemme genotypen hos det individ, der skal foretages en geneditering hos.
Ved brug af PCR og en efterfølgende elektroforese kan man detektere klipningen af *lacZ*genet.

Multiplex PCR

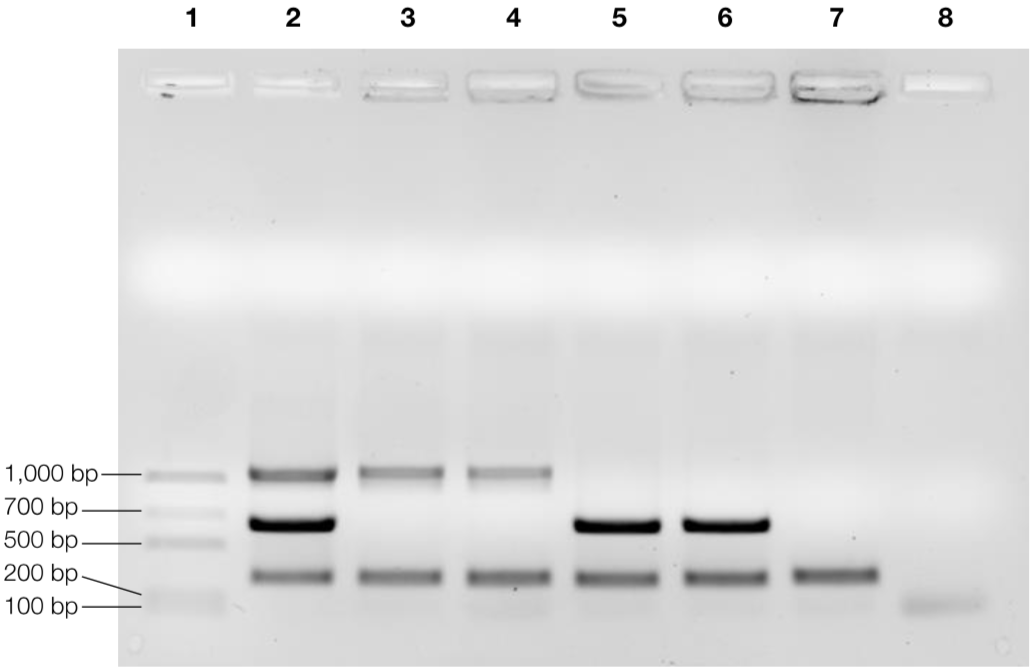
Multiplex PCR er en amplifikation, hvor man bruger flere forskellige primere i samme proces. I stedet for at køre flere individuelle reaktioner kan alle reaktionerne udføres i en enkelt prøve.
Efter en hurtig DNA-ekstraktion fra hver koloni laver eleverne en multiplex PCR for at detektere tilstedeværelsen/fraværet af den CRISPR-modificerede indsættelse; et primerpar vil generere en 1.100 bp lang nukleotidsekvens, hvis der et vildtype *lacZ*-gen, mens et anden primerpar vil generere et ca. ~ 650 bp lang nukleotidsekvens, der hvor der er foregået en redigering af *lacZ* (se elevguiden for detaljer om primernes funktioner).
I mange multiplexforsøg overlapper DNA-målsekvenserne ikke. Men i denne aktivitet er primerne bevidst designet til at overlappe hinanden på redigeringsstedet, så enten det "redigerede" primersæt eller det "uredigerede" primersæt vil generere en nukleotidsekvens, der muliggør genotypebestemmelse. Som en ekstra kontrol genererer et tredje primerpar nukleotidsekvenser på ca. ~ 350 bp, hvis kun det kromosomale DNA er blevet ekstraheret og amplificeret.
Selvom multiplex-PCR er smart, kræver det omhyggeligt design, så alle målsteder med succes forstærkes i den samme PCR-proces Nogle designovervejelser er blandt andet:

• **Størrelsen af nukleotidsekvenser** - hvis de skal analyseres ved gelelektroforese, skal de forskellige nukleotidsekvenser være så tilpas forskellige, at de kan adskilles, men omvendt må de ikke være for forskellige, fordi kortere sekvenser DNA ofte bliver hurtigere amplificerede end lange
• **Primerpar** - skal være specifikke og alle skal helst virke ved samme temperatur, og endelig må de helst ikke danne dimerer med hinanden.

Ekstraktion af DNA fra kolonier og efterfølgende PCR

Mål: At eleverne kan få mere viden om DNA og det DNA, de ekstraherer fra deres kolonier og dermed se, hvordan deres CRISPR-geneditering er gået.

	Tips og tricks
Del 1: resultatet af den udførte *lacZ*-CRISPR-geneditering	• Der kan være flere forskellige forklaringer på resultaterne af den udførte *lacZ*-CRISPR-genediteringsaktivitet, der er lavet i laboratoriet. F.eks. Kan kolonifarven blive påvirket af indførelsen af et DNA-bindende protein ved protein-protein-interaktioner, der reducerer aktiviteten af beta-galactosidasen eller der kan ske en annullering mellem de gener, der blev sat ind i bakterierne. Nogle forklaringer vil være usandsynlige i forhold til hvad vi ved om bakteriecellebiologi. De kan dog udelukkes med yderligere beviser • At bede eleverne om at tænke på og dele eksempler på eksperimentelle beviser, der ville udelukke en af to alternative forklaringer, er en mulighed for eleverne at øve sig i at formulere, hvordan beviser og eksperimenter kan understøtte en påstand • En idé: giv eleverne ideer og praj til besvarelsen af spørgsmålene. For eksempel: Cas9-sgRNA-komplekset undertrykker ekspression af vigtige gener, herunder *lacZ*, hvilket fører til celledød; HDR-maskineriet med donorskabelon-DNA forstyrrer funktionen af Cas9-sgRNA-komplekset • Prøv: At bed eleverne om at designe et eksperiment, der giver de nødvendige oplysninger så en af deres alternative forklaringer kan udelukkes.
Del 2: Ekstraktion af DNA og PCR	• DNA -ekstraktionsvejledningen inkluderer alle nødvendige opvarmnings- og centrifugeringstrin. For at nå alle trinnene i løbet af et modul, kan det være en fordel med flere vandbade/varmeblokke og centrifuger. Husk at det tager tid for eleverne at lave deres ekstraktioner. • Hvis nogle grupper har fundet en bakteriekoloni på plade B, anbefales det at udskifte prøve D3 med kolonien fra B. Bakteriel vækst på plade B er i princippet ikke forventet og kan eventuelt bruges til en videre undersøgelse. • Eleverne vil også kunne forudsige, at der i den reverse (omvendte)vildtype med forward editerede primers kan dannes en~ 1.750 bp nukleotidsekvens. PCR-amplifikationen af nukleotidsekvenser på 1.750 bp amplikon vil typisk tage længere tid og derfor blive 'undertrykt' af i PCR-programmet. • Supernatanten fra InstaGene Matrix er teknisk set en bedre negativ kontrol end vand. Dekantering af supernatanten vil dog gøre den resterende InstaGene Matrix ubrugelig, og derfor bruges der vand. • Den positive kontrol-DNA-skabelon indeholder alle tre PCR-mål, og reaktionen vil producere nukleotidsekvenser på ~ 1.100, ~ 650 og ~ 350 bp. • Formativ vurdering: Gennemgå elevernes PCR-hypoteser og kontroller, om de er forståelige. Hold øje med misforståelser om primersæt, der tilføjes separat til prøverne, og om de har forstået princippet i multiplex-PCR.
Del 3: Elektroforese og visualisering	Prøv den nye elektroforesevejledning, hvor man kører elektroforesen på 10-minutter
Del 4: Analyse og fortolkning	Eksempel på en gel:



Brønd	Prøve	Status for *lacZ*genet
1	Molecular weight ruler	N/A
2	Positiv kontrol DNA (+)	N/A
3	PCR Sample (S)	vildtype
4	PCR Sample (C)	vildtype
5	PCR Sample (D1)	ændret/editeret
6	PCR Sample (D2)	ændret/editeret
7	PCR Sample (B/D3)	???
8	Negativ kontrol (–)	N/A

• Båndene i 7 repræsenterer et sjældent resultat, der kun observeres, når bakterier reparerer et dobbeltstrenget brud forårsaget af Cas9 uden at der er brugt donor-DNA-skabelonen. Resultatet kan ses i kolonier på plade B eller D. Selvom *lacZ*-genet er blevet redigeret i disse tilfælde, mangler den ændrede/editerede *lacZ*-primersæt-bindingssekvens. Man ved ikke præcis, hvorfor man får det pågældende resultat. For de fleste vil båndene i bane 7 være identiske med båndene i 5 og 6
• Sørg for, at der ved tolkning af resultaterne både inddrages resultater fra selve *lacZ*-CRISPR-editeringen og fra multiplex-PCR.