

Out of the Blue Genotyping Extension

12012607EDU

Elevvejledning

Oversat af Birgit Sandermann Justesen, Nærum Gymnasium, september 2021

BIO RAD

Del 1:

Tolkning og forklaring af resultaterne fra *lacZ*-CRISPR-genediteringen

Inden der går i gang med dette forsøg, skal resultatet fra *lacZ*-CRISPR-geneditering gennemgås en gang til.

Tag pladerne frem og skriv kort ned, hvordan I kom frem til jeres resultat. Hvad skete der i de enkelte trin?

Undersøg om de forskellige grupper i klassen har andre opfattelser af, hvad der er sket.

Jeres tolkning af resultater er baseret på, hvordan de kolonier, der kommer frem, ser ud, hvilket er en indirekte måde at tolke på, hvorvidt der reelt set har fundet en geneditering sted.

Bakteriekolonierne giver med andre ord kun et indirekte svar på, hvad der er sket med *lacZ*-genet. Hvordan vil man kunne underbyggen viden om, hvad der reelt set er sket med *lacZ*-genet?

Del 2:

Ekstraktion af DNA fra bakteriekolonier og PCR

Når der er foretaget en gen-editering med CRISPR, er det vigtigt at kunne verificere, at den pågældende editering har fundet sted. Selv efter at Cas9 har skåret i DNA er det muligt for cellens reparationsmekanismer at reparere den skårede sekvens. Til denne verificering bruges PCR.

Multiplex PCR

En standard PCR-reaktion amplificerer en bestemt nukleid-sekvens (en amplikon) ved brug af et sæt primere. I multiplex PCR amplificeres flere nukleotidsekvenser samtidig, ved at man benytter en unik primer til hver nukleotidsekvens, som hver især er rettet mod en specifik DNA-sekvens. Ved en efterfølgende gelektroforese adskilles de forskellige nukleotidsekvenser efter størrelse:

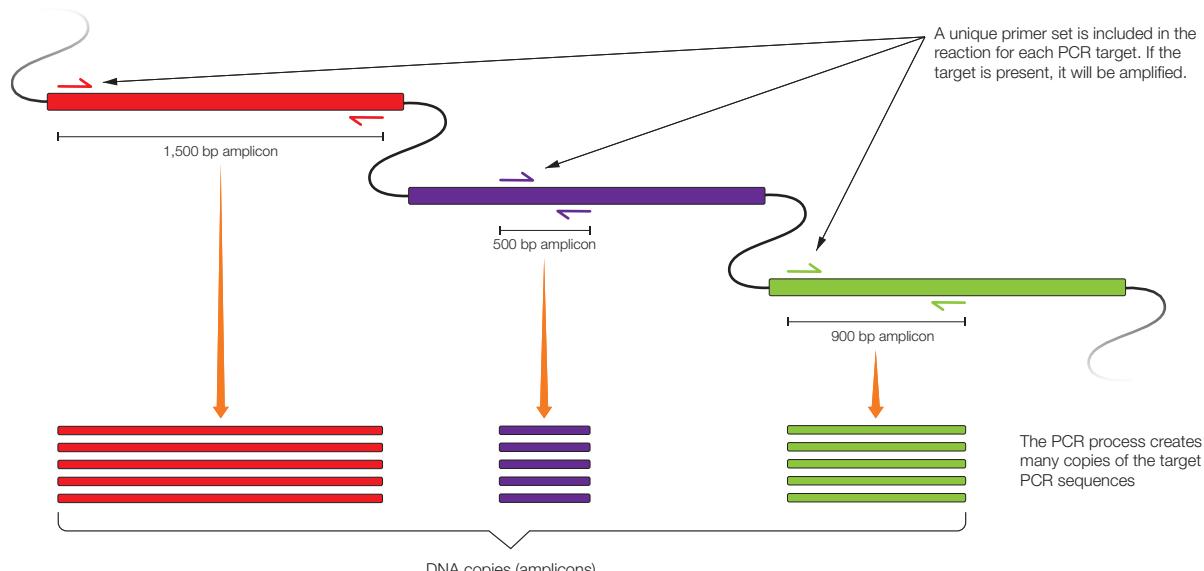


Fig.1: Flere amplikoner, nukleotidsekvenser, dannet ved en multiplex PCR: Her har tre primer-par amplificeret nukleotidsekvenser på hhv. 1500, 500 og 900 bp.

Det er meget vigtigt at designe primerne korrekt således, at der opstår tydeligt adskilbare nukleotidsekvenser. Blandt andet er det vigtigt at alle de primersæt, der benyttes, kan binde til DNA ved samme temperatur.

Multiplex PCR som redskab til at undersøge en genediterings resultat.

Efter *lacZ*-CRISPR-genediteringen har man et sæt agarplader med hvide eller blå kolonier. Farven på kolonierne er en visuel måde, der viser om *lacZ*genet er funktionelt eller ej. Multiplex PCR bruges til at verificere de visuelle resultater på DNA-niveau.

Det første primersæt er designet til at finde *lacZ*, der ikke er modiceret. Den ene primer i primersættet vil binde direkte til Cas9-klipningsområdet. Hvis klipningsområdet er blevet ændret, vil primeren ikke binde. Hvis der IKKE har fundet en klipning sted, vil primersættet danne nukleotidsekvenser på ca. 1100 bp.

Det andet primersæt er designet, så det finder det modificerede *lacZ*. Den ene primer vil binde til den indsatte donor-skabelon-DNA: Hvis området var blevet korrekt repareret med donorDNA-skabelonen, vil primersættet danne nukleotidsekvenser, der er ca. 650bp lange.

Det tredje primersæt opformerer et ikke-relateret område længere væk fra *lacZ*-genet som en kontrol for at verificere, at der er kromosomalt DNA til stede i prøven. Hvis det kromosomal DNA er blevet succesfuldt ekstraheret og PCR var vellykket, uanset om *lacZ* er modiceret eller ej, vil dette primersæt give en ca. 350 bp lang nukleotidsekvens.

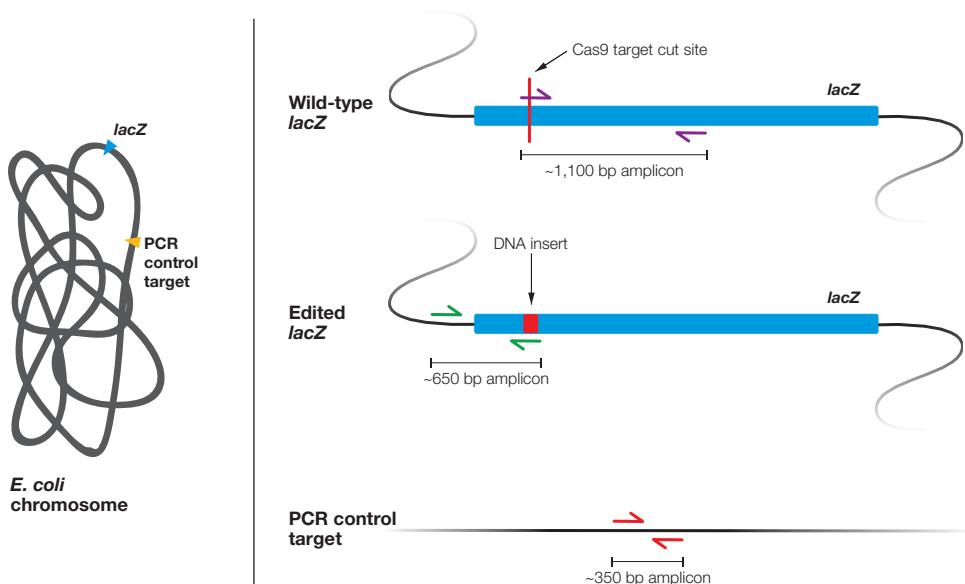


Fig.2: Multiplex targets

Startspørgsmål:

Udfyld tabel 1 med jeres resultater fra genediteringen og med jeres forventninger om, hvorvidt I vil se de pågældende amplikoner fra PCR.

Plade	Kolonier (farve)	lacZ-genstatus (tolkning)	Amplikoner bp (forventede)		
			1100	650	350
IX/ARA					
Plade C					
Plade D					

Tabel 1: Opsummering af resultater fra editeringen og forventede amplikoner.

- Brug figur 2 til at skrive de resultater, I forventer.
- Forklar hvorfor det er utænkeligt at der både dannes 1100bp og 650bp lange nukleotidsekvenser i én enkelt reaktion i denne multiplex PCR?
- Hvad kan der konkluderes om *lacZ*genet, hvis der kun dannes nukleotidsekvenser på 350 bp?
- Forklar, hvad der kan være årsag til, at der mangler nukleotidsekvenser på 350 bp.

Materiale

Pr. gruppe

Starter plate IX/ARA from the <i>lacZ</i> CRISPR Gene Editing Activity	1
Bacterial plate C from the <i>lacZ</i> CRISPR Gene Editing Activity	1
Bacteria plate D from the <i>lacZ</i> CRISPR Gene Editing Activity	1
InstaGene Matrix (IG)	1,3 mL
Master mix plus primers (MMP)	80 µL
Positiv PCRkontrol DNA (+), med alle PCR targets	15 µL
Negativ PCRkontrol (-), demineraliseret vand	15 µL
PCR rør, 0,2 mL	7
1,5 mL koniske mikrocentrifugerør med skruelåg	5
2–20 µL mikropipetter med spidser	1
100–1,000 µL mikropipetter med spidser	1
Holder til PCR rør	1
Mikrocentrifugerørholder	1
Vortexer (hvis muligt)	
Mærkningstuscher	1

Fælles

PCR-maskine med mindst 56 brønde	1
Varmeblok eller vandbad 56°C	
Varmeblok eller vandbad 95°C	
Ultracentrifuge (med adaptorer til PCR-rør)	
Flyder til PCR-rør	

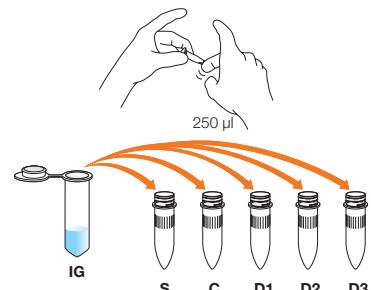
Fremgangsmåde

Ekstraktion af DNA

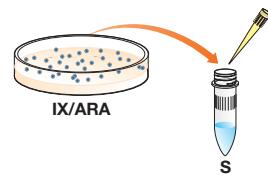
1. Mærk 5 skruelågsmikrocentrifugerør med **S**, **C**, **D1**, **D2** og **D3**.



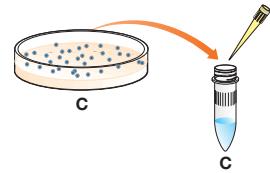
2. Knips på røret med InstaGeneMix således at alt er godt blandet.
Tilsæt 250 µL InstaGeneMix til hvert rør.



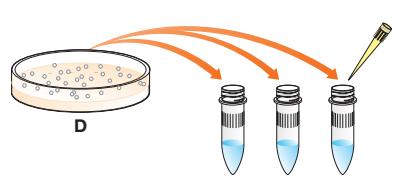
3. Med en pipettespids tages én blå koloni fra **IX/ARA**pladen.
Sno spidsen rundt i **S**-røret indtil alle bakterier er i suspensionen.



4. Tag en ny pipettespids og tag én blå koloni fra **C**-pladen.
Sno spidsen rundt i **C**-røret indtil alle bakterier er i suspensionen.



5. Tag en ny pipettespids og tag én hvid koloni fra **D**-pladen.
Sno spidsen rundt i **D1**-røret indtil alle bakterier er i suspensionen.

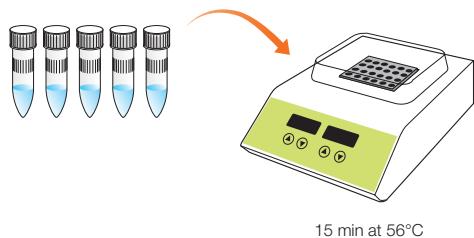


6. Gentag trin 5 og overfør med en ny pipettespids én hvid koloni til **D2** og en hvid koloni til **D3**.

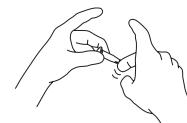


7. Sørg for at alle rør er helt lukkede og knips eller vortex rørene i mindst 10 sekunder for at sikre at alt er blandet godt.

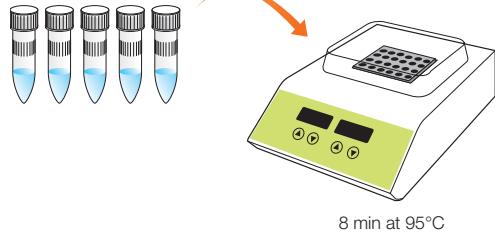
8. Inkubér rørene i 15 minutter ved 56°C



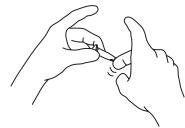
9. Lad rørene køle let. Knips eller vortex rørene i mindst 10 sekunder for at blande.



10. Inkubér rørene i 8 minutter ved 95°C



11. Lad rørene køle let. Knips eller vortex rørene i mindst 10 sekunder for at blande.



Stoppunkt:

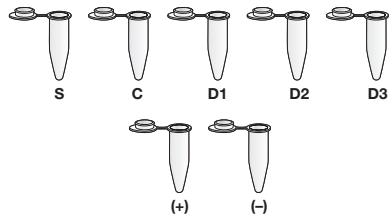
Der kan stoppes her og prøverne kan stilles i køleskab til der fortsættes næste dag

12. Centrifuger rørene ved 12000rpm i 2 minutter eller ved 6000 rpm i 5 minutter.

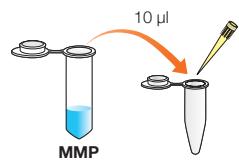


PCR

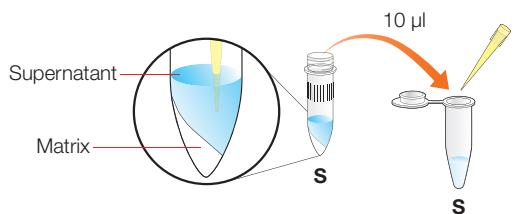
13. Mærk 7 PCR-rør med **S, C, D1, D2; D3, (+) og (-)** samt initialer.



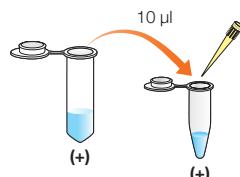
14. Tilsæt $10 \mu\text{L}$ MasterMix plus primere (MMP) til hvert rør.



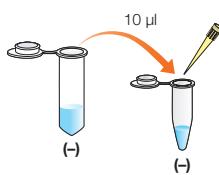
15. Idet der bruges en ny pipettespids til hvert rør overføres $10 \mu\text{L}$ supernatant fra hvert af de 5 skruelags-mikrocentrifugerør til det tilsvarende mærkede PCR-rør. Der må IKKE overføres MasterMixperler (Matrix) - perlerne i matrix vil stoppe PCR-processen.



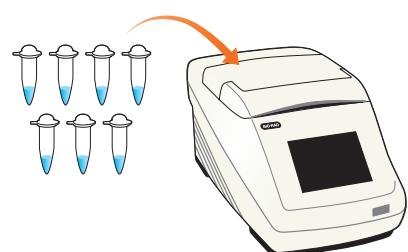
16. Med en ny pipettespids overføres $10 \mu\text{L}$ positiv PCRkontrol DNA (+) til PCRrøret mærket (+).



17. Med en ny pipettespids overføres $10 \mu\text{L}$ negativ PCRkontrol DNA (-) til PCRrøret mærket (-)



18. Sørg for at alle rør er lukkede og placer dem i PCR-maskinen.



19. Når alle holds prøver klar startes PCR-reaktionen:

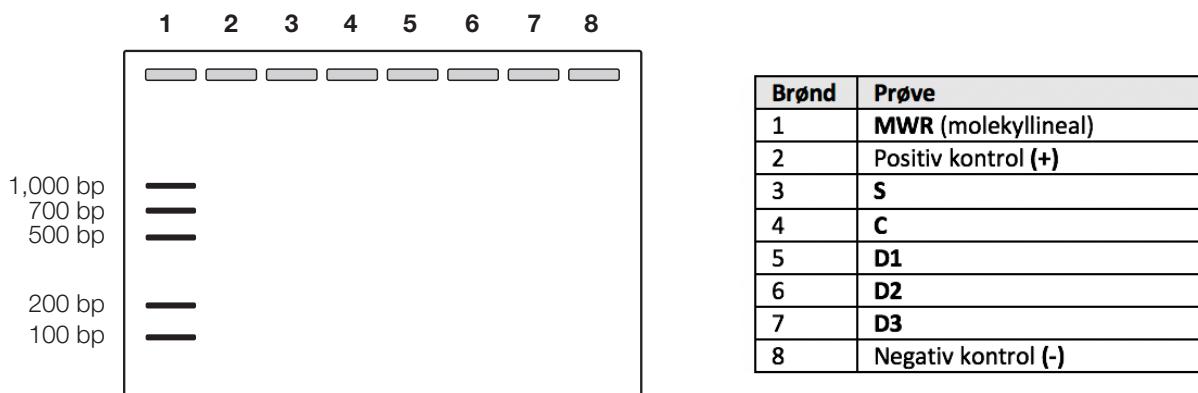
Step	Temp., °C	Time	Cycles
<i>Initial denature</i>	94	5 min	1x
<i>Denature</i>	94	30 sec	35x
<i>Anneal</i>	62	30 sec	
<i>Extend</i>	74	1 min	
<i>Final extension</i>	74	5 min	1x
<i>Hold</i>	12	-	1x

Del 3: Gelelektroforese og visualisering

Når PCR--processen er færdig, adskilles produkterne ved hjælp af gelelektroforese og efterfølgende farvning for at visualisere resultatet.

Indledende spørgsmål:

- A. Med udgangspunkt i jeres svar i tabel 1 skitseres det forventede resultat på tegningen af en gel herunder:



- B. Hvordan kan I se, at PCR-processen er forløbet godt?
- C. Hvordan kan I bruge PCR-resultatet til at se, at I har ekstraheret DNA?
- D. Forklar hver kontrolprøves formål.

Fremgangsmåde:

Materialer

pr. gruppe

PCR prøver (S, C, D1, D2, D3, (+), (-)	7
Molecular weight ruler (MWR)	15 µL
Loading dye (LD)	40 µL
1% agarosegel med 8 brønde	1
0,25x TAE elektroforesebuffer	300 mL
Evt. Fast Blast 100x	50 mL
Vandret gelelektoforesekar	1
Powersupply	1
2–20 µL mikropipette med spidser	1
Gelfarvekar	1

Fælles

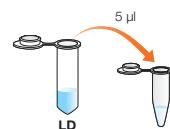
Ultracentrifuge
UView eller Loading Dye og Fast Blast

Prøverne sættes på gelen

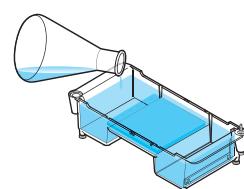
1. Centrifugér prøverne kortvarigt for at sikre, at indholdet er samlet i bunden. Man kan også banke røret i bordet.



2. Idet der skiftes pipettespids ved hver nyt rør tilsættes 5 µL loading dye (LD) til hvert rør. Pipetter forsigtigt op og ned for at blande.

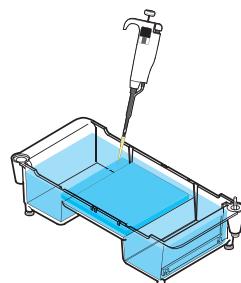


3. Placer en 1% TAE-gel i elektroforesekaret. Husk at brøndene skal være i den negative ende.



4. Fyld karret med TAE-buffer, så gelen er dækket med 2mm buffer.

5. Sæt prøverne på - husk at tage en ny pipettespids for hver prøve.



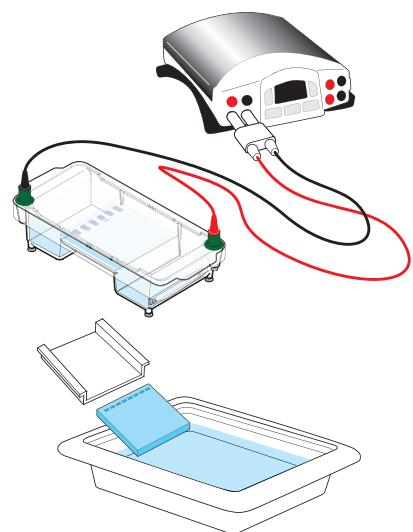
Brønd	Prøve	Volumen µL
1	MWR (molekyllineal)	20
2	Positiv kontrol (+)	15
3	S	15
4	C	15
5	D1	15
6	D2	15
7	D3	15
8	Negativ kontrol (-)	15

6. Sæt kablerne korrekt i strømforsyningen (rød til rød og sort til sort).

7. Tænd for elektroforesen og kør det antal minutter læreren siger.

8. Flyt forsigtigt gelen over i farvekarret.

9. Folv og affolv.



Del 4:

Fortolkning af resultaterne