

Out of the Blue CRISPR Kit

Katalog-Nr. 12012608EDU

Hinweise für Kursleitende

Hinweis: Die Vervielfältigung von Teilen dieses Dokuments ist nur für nicht-kommerzielle Lehrzwecke gestattet. Die kommerzielle Nutzung von urheberrechtlich geschützten Inhalten, einschließlich der Verwendung in entgeltlichen Lehrmaterialien, bedarf der ausdrücklichen Genehmigung von Bio-Rad™ Laboratories, Inc. Weitere Informationen erhalten Sie von explorer@bio-rad.com.

Dieses Produkt ist nicht für die Selbstanwendung bestimmt.

Wenn Sie technische Unterstützung benötigen, setzen Sie sich telefonisch mit der Niederlassung von Bio-Rad in Ihrer Nähe oder in den USA unter **1-800-4BIORAD** (1-800-424-6723) Option 2 in Verbindung.

BIO-RAD

Sehr geehrte Kursleitende,

rasante Entdeckungen in den Biowissenschaften und menschlicher Einfallsreichtum verändern Tag für Tag das Leben und die Zukunft Ihrer Kursteilnehmenden. Mittlerweile macht man sich in der Wissenschaft auch die angeborene Fähigkeit einer Zelle zu Nutzen, ihre DNA zu reparieren, um ein Genom zu verändern. Es wurden mehrere Ansätze zur Genom-Editierung entwickelt, darunter das CRISPR (Clustered Regular Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9-System, das sich durch Genauigkeit, Anwendungsfreundlichkeit und geringe Kosten auszeichnet. Ursprünglich als eine Form der prokaryotischen Immunität entdeckt, revolutioniert es nun die wissenschaftliche Forschung, die Landwirtschaft und die Medizin.

Mit dem Out of the Blue CRISPR Kit erhalten Ihre Kursteilnehmenden die richtigen Werkzeuge, um eine echte Geneditierung im Klassenzimmer durchzuführen. Dieses Lernmaterial ist das erste seiner Art und wird Ihre Kursteilnehmenden begeistern: „Wow! Ich habe CRISPR angewendet!“ Mithilfe vertrauter – und sicherer – Reagenzien, Techniken und Organismen werden die Kursteilnehmenden die CRISPR-Cas9-Geneditierung anwenden, um das *lacZ*-Gen in *E. coli* zu inaktivieren. Der resultierende Phänotyp lässt sich leicht durch Blau-Weiß-Screening sichtbar machen, und die Kursteilnehmenden können die Veränderungen auf Chromosomenebene mithilfe des optionalen Out of the Blue Genotyping Extension Kits mittels PCR bestätigen. Ihre Kursteilnehmenden werden ihre Kenntnisse über die besonderen Fähigkeiten und Grenzen der CRISPR-Cas9-Technologie vertiefen und dadurch besser in der Lage sein, an Diskussionen über das Potenzial, die Risiken und ethische Aspekte der Geneditierung teilzuhaben.

Die in diesem Kit vorgesehenen Anwendungen wurden in Zusammenarbeit mit Sherry Annee, ehemaliger Präsidentin der National Association of Biology Teachers und Biotechnologielehrerin an der Brebeuf Preparatory Academy in Indianapolis, IN, USA, und Thomas Tubon Jr., Professor und Direktor des Stem Cell Program am Madison Area Technical College in Madison in Wisconsin entwickelt.

Es ist uns ein Anliegen, unser Lehrmaterial und unsere Produkte kontinuierlich zu verbessern, daher ist uns auch Ihr Beitrag sehr wichtig. Wir freuen uns über Ihre Geschichten, Kommentare und Vorschläge.

Teilen Sie die Erfolge Ihrer Kursteilnehmenden in den sozialen Medien unter @bioradeducation.

Bio-Rad Explorer Team
Bio-Rad Laboratories
6000 James Watson Drive, Hercules, CA 94547
explorer@bio-rad.com

Inhaltsverzeichnis

Bevor Sie beginnen

Aufbewahrung des Kits.....	1
Sicherheitshinweise	1
Bestandteile des Kits	2
Bestellinformationen	3
Überblick über die Anwendung des Kits	4
Zeitplanung	5
Eingliederung in den Lehrplan.....	6

Vorbereitung der Kursleitenden

Hinweise zur Vorbereitung	7
Hintergrundinformationen für Kursleitende	12

Hinweise für Kursleitende

Lerneinheit 1 Einführung in die CRISPR-Cas9-Geneditierungstechnologie	15
Lerneinheit 2 <i>lacZ</i> -CRISPR-Geneditierungslabor.....	16
Capstone-Lerneinheit: Identifizierung und Analyse von Cas9-Zielsequenzen mittels Bioinformatik.....	17

Anhang A: Strukturierte Debatte der Kursteilnehmenden über CRISPR-Geneditierung

Anhang B: CRISPR-Cas9 als mikrobielles Immunsystem

Anhang C: Hinweise zur Herstellung von LB-Agarplatten mit einer kleinen Mikrowelle.....

Ressourcen

Rechtliche Hinweise.....

Aufbewahrung des Kits

Gehen Sie nach Erhalt des Out of the Blue CRISPR Gene Editing Kits folgenderweise vor:

- 1 Lesen Sie die Angaben auf den Produktetiketten zur Aufbewahrung und zu den Chargennummern.
- 2 Lagern Sie den Beutel mit den Reagenzien aus dem **Out of the Blue CRISPR Kit Reagent** in der Gefriertruhe (-20 °C).
- 3 Lagern Sie das **LB-Nährstoffagarpulver** und die **LB-Nährbouillonkapseln** bei Raumtemperatur (~20 °C).
- 4 Besuchen Sie bio-rad.com/outoftheblue, um aktuelle Hinweise für Kursleitende und Kursteilnehmende herunterzuladen.



Technische Unterstützung erhalten Sie von support@bio-rad.com oder unter 1-800-4BIORAD, Option 2.

Sicherheitshinweise

Das Out of the Blue CRISPR Kit und die Nachfüllpackung enthalten sowohl Kanamycin als auch Spectinomycin, die allergische Reaktionen oder Reizungen hervorrufen können. Beide Antibiotika werden dem LB-Agarmedium zugesetzt, mit dem die Kursteilnehmenden arbeiten werden. Personen mit einer Allergie gegen diese oder ähnliche Antibiotika sollten vor der Handhabung von Materialien und Reagenzien des Kits ihre Ärztin/ihren Arzt konsultieren. Legen Sie nach Abschluss der Arbeitsschritte im Labor alle Bakterienplatten und alle Materialien, die mit Bakterien in Kontakt gekommen sind, für mindestens 20 Minuten in eine 10%ige Bleichmittellösung, um sie zu dekontaminieren. Bezüglich der Entsorgung sind außerdem die vor Ort geltenden Vorschriften zu befolgen.

Der in diesem Kit enthaltene Bakterienstamm *E. coli* HB101-pBRKan ist nicht pathogen und wurde genetisch so verändert, dass nur auf einem angereicherten Medium wachsen kann. Es sollten jedoch mikrobiologische Standardpraktiken angewendet werden.

Wie Restriktionsenzyme schneidet auch Cas9 DNA, aber im Gegensatz zu Restriktionsenzymen ist Cas9 programmierbar, sodass es nur eine bestimmte DNA-Sequenz schneidet. Bei der Laboraktivität mit dem Out of the Blue CRISPR Kit wird Cas9 verwendet, um ein bestimmtes bakterielles Gen, *lacZ*, zu schneiden, das nur in Bakterien vorkommt. Die Kursteilnehmenden werden das *lacZ*-Gen aufschneiden und einen Teil der Sequenz durch ein DNA-Stück ersetzen, sodass das Gen nicht mehr funktionsfähig ist. Die Inaktivierung von *lacZ* in Bakterien wird zu Lehrzwecken und auch in Forschungslaboren gleichermaßen häufig durchgeführt. Der bei dieser Laboraktivität verfolgte Ansatz baut auf diesen bewährten sicheren wissenschaftlichen Praktiken auf und verwendet Cas9 als eine neue molekulare Schere.

Es sind die grundlegenden Richtlinien für die Sicherheit im Labor zu befolgen, insbesondere das Tragen von Handschuhen und Schutzbrille.

Zusammensetzung des Kits

Jedes Kit enthält Material für 8 Arbeitsplätze für Kursteilnehmende.

Inhalt	Menge/ Stückzahl
<i>E. coli</i> HB101-pBRKan, lyophilisiert	1 Fläschchen
Plasmid mit der Donor-DNA-Matrize (pLZDonor)	215 µl
Plasmid mit der Donor-DNA-Matrize und Guide-RNA (pLZDonorGuide)	215 µl
KIX Mix	263 mg
Spectinomycin als Pulver	18 mg
L(+)-Arabinose, lyophilisiert	600 mg
LB-Nährstoffagar als Pulver	25 g
LB-Nährbouillonkapsel, ergibt 50 ml LB-Nährbouillon	1 Kapsel
Impföse, steril 10 µl	80
Petrischale, 60 mm, steril	60
Mikrozentrifugenröhrchen, ungefärbt, 2,0 ml	90
Transformationslösung (50 mM CaCl ₂ , pH 6,1), steril	15 ml
Easy Start Guide	1
Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen	1

Zusätzlich erforderliches Material (nicht in diesem Kit enthalten)	Menge/ Stückzahl
Verstellbare Mikropipette (100–1.000 µl) und geeignete Spitzen	1–8
Verstellbare Mikropipette (20–200 µl) und geeignete Spitzen	4–8
Verstellbare Mikropipette (2–20 µl) und geeignete Spitzen	4–8
Waage (1 bis 10 g)	1
Autoklav oder Mikrowelle	1
Thermometer (0–60 °C)	1
Trockenbad oder Wasserbad mit Temperaturregelung	1
Schwimmständer aus Schaumstoff bei Verwendung eines Wasserbads	8
Erlenmeyer-Kolben oder autoklavierbare Flasche mit Deckel, 500 ml	1*
Erlenmeyer-Kolben oder autoklavierbare Flasche mit Deckel, 1 l	1*
Autoklavierbare Flasche mit Deckel, 150–250 ml	1
Messzylinder, 500 ml	1
Vollentsalztes oder destilliertes Wasser	750 ml
Zerstoßenes Eis und Behälter (z. B. Eiskübel oder Styroporbecher)	8
Schere	8
Permanentmarker	8
Aluminiumfolie	
Haushaltsbleiche, 10%ige Lösung	
Laborklebeband	

Empfohlene Materialien (nicht in diesem Kit enthalten)	Menge
Inkubationssofen oder Schüttelinkubator mit Ablage	1
Pipettierhilfe und sterile serologische Pipetten	1
Vortexmischer	1
Röhrchenständer	8

* Wenn Ihre Mikrowelle für einen 1 l-Kolben zu klein ist, finden Sie in Anhang C entsprechend angepasste Hinweise zur Vorbereitung von LB-Agarplatten. Sie benötigen zwei zusätzliche 500 ml-Kolben.



Out of the Blue CRISPR Kit

Bestellinformationen

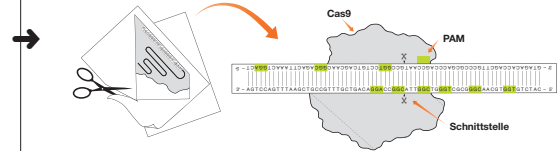
Katalog-Nr.	Beschreibung
Kits und Nachfüllpackungen	
12012608EDU	Out of the Blue CRISPR Kit
12012620EDU	Out of the Blue CRISPR Kit Refill Pack
12012607EDU	Out of the Blue Genotyping Extension
12012708EDU	Out of the Blue Genotyping Extension Refill Pack
17006070EDU	Out of the Blue Genotyping Extension with Small Fast Blast Electrophoresis Pack
17006284EDU	Out of the Blue Genotyping Extension with Small UView Electrophoresis Pack
17006081EDU	Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits
17006285EDU	Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small UView DNA Electrophoresis Pack
17006286EDU	Out of the Blue CRISPR and Genotyping Extension kits plus Small Fast Blast DNA Electrophoresis Pack
Verbrauchsmaterial	
1660472EDU	LB Nutrient Agar, 500 g
1660412EDU	LB Broth Capsule, ergibt 50 ml LB-Nährbouillon
1660421EDU	LB Nutrient Broth, 10 ml
1660470EDU	Petri Dishes, 500
2239430EDU	2 ml EZ Micro Test Tubes, 500
1660471EDU	Inoculation Loops, 80
Geräte und Laborzubehör	
1660501EDU	Mini Incubation Oven, 120 V
17002944EDU	Benchtop Shaking Incubator Starter Set, 120 V
17002946EDU	Benchtop Shaking Incubator Starter Set, 230 V für Europa und das UK
12005504EDU	Petri Dish Shelf for Shaking Incubator
12011919EDU	Mini Centrifuge, 100–240 V
1660610EDU	BR-2000 Vortexer, 120 V
1660611EDU	BR-2000 Vortexer, 220 V für die EU
1660621EDU	BR-2000 Vortexer, 220 V für das UK
1660490EDU	Professional Pipet Controller
1660481EDU	Green Racks, je 5 St.

Überblick über die Anwendung des Kits

Lerneinheit 1

Einführung in die CRISPR-Cas9-Geneditierungstechnologie

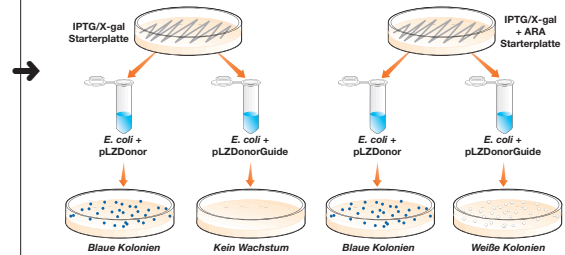
Die Kursteilnehmenden lesen zuerst eine kurze Erläuterung und verwenden dann ein Papiermodell, um die Schritte der CRISPR-Cas9-DNA-Spaltung und der homologiegesteuerten Reparatur durchzugehen. Ein mathematisches Modell veranschaulicht ihnen anschließend die weitaus höhere Präzision der CRISPR-Cas9-Technologie gegenüber Restriktionsenzymen.



Lerneinheit 2

lacZ CRISPR-Geneditierungslabor

Die Kursteilnehmenden editieren das chromosomale *lacZ*-Gen in *E. coli*, indem sie die Bakterien mit plasmidbasierten Expressionssystemen mit der Donor-DNA-Matrize und Guide-RNA transformieren. Mithilfe von Blau-Weiß-Screening berechnen sie die Effizienz der Geneditierung und formulieren schließlich wissenschaftliche Erklärungen für ihre Beobachtungen.



Capstone-Lerneinheit

Identifizierung und Analyse von Cas9-Zielsequenzen mittels Bioinformatik

Die Kursteilnehmenden wenden ihr Wissen an, um mögliche Cas9-Zielsequenzen innerhalb von Genen zu identifizieren, die mit Krankheitszuständen verbunden sind. Anhand der BLAST-Ergebnisse als Evidenzdaten ordnen die Kursteilnehmenden dann ihre vorgeschlagenen Zielsequenzen basierend auf dem Risiko für eine nicht zielgerichtete (Off-Target) Editierung ein.



Zeitplanung

Die Lerneinheiten in diesem Kit sind für drei Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von mindestens 90 Minuten ausgelegt (siehe Tabelle 1). Tabelle 2 enthält einen alternativen Zeitplan mit 50-minütigen Unterrichtseinheiten.

Tabelle 1: Empfohlener Zeitplan mit Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von mindestens 90 Minuten ein- oder zweimal pro Woche.

	Unterrichtseinheit 1	Unterrichtseinheit 2	Unterrichtseinheit 3
Praktische Arbeit	Einführende Informationen oder sonstige direkte Anweisungen Start von Lerneinheit 1 Einführung in die CRISPR-Cas9-Geneditierungstechnologie, Teil 1 bis 4	Lerneinheit 2 <i>lacZ</i> -CRISPR-Geneditierungslabor, Teil 2. Geneditierung durchführen	Capstone-Lerneinheit starten
Außerhalb des Unterrichts durchzuführen	Beendigung von Lerneinheit 1 Lerneinheit 2 <i>lacZ</i> -CRISPR-Geneditierungslabor, Teil 1. Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Die Kursteilnehmenden holen ihre Platten aus dem Inkubator und werten die Ergebnisse aus Lerneinheit 2, Teil 3. Besprechung der zur Aufbereitung der Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Capstone-Lerneinheit beenden

Tabelle 2: Alternativer Zeitplan mit täglichen Unterrichtseinheiten mit einer Dauer von ca. 50 Minuten.

	Unterrichtseinheit 1	Unterrichtseinheit 2	Unterrichtseinheit 3	Unterrichtseinheit 4	Unterrichtseinheit 5
Praktische Arbeit	Einführende Informationen oder sonstige direkte Anweisungen Start von Lerneinheit 1 Einführung in die CRISPR-Cas9-Geneditierungstechnologie	Start von Lerneinheit 2 <i>lacZ</i> -CRISPR-Geneditierungslabor, Teil 2. Geneditierung durchführen	Weiter mit Lerneinheit 2, Teil 2	Beendigung von Lerneinheit 2, Teil 2. Start von Lerneinheit 2, Teil 3. Besprechung der zur Aufbereitung der Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Capstone-Lerneinheit starten
Außerhalb des Unterrichts durchzuführen	Beendigung von Lerneinheit 1 Start von Lerneinheit 2, Teil 1. Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen			Beendigung von Lerneinheit 2, Teil 3. Besprechung der zur Aufbereitung der Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	Capstone-Lerneinheit beenden

Eingliederung in den Lehrplan

Erforderliche Vorkenntnisse

- Grundlagen des Aufbaus und der Funktion von DNA, RNA und Proteinen
- Nukleotid-Basenpaarung (wie man einen komplementären DNA- oder RNA-Strang schreibt)
- Zentrales Dogma (DNA → RNA → Protein → Merkmal)
- Einfache Wahrscheinlichkeitsberechnungen
- Wichtigste Schritte der bakteriellen Transformation, einschließlich Plasmidstruktur und -funktion, Selektionsmarker für Antibiotikaresistenz und Hitzeschock
- Vorgehensweise zum Anlegen von Bakterienkulturen auf Agarmedium
- Benutzung einer Mikropipette

Konzepte, Themenbereiche und Kompetenzen

- **Aufbau und Funktion von DNA, RNA und Proteinen** – Cas9 ist ein Protein und eine Nuklease, die DNA gemäß den Anweisungen der Guide- RNA schneidet. Die Strukturen dieser drei Komponenten des CRISPR-Cas9-Systems – Protein, DNA und RNA – sind integraler Bestandteil seiner Funktion
- **Zentrales Dogma** – Die Kursteilnehmenden inaktivieren das *lacZ*-Gen (DNA), das (über die mRNA) β -Galactosidase (Protein), ein Enzym, codiert. Dieses ermöglicht *E. coli*, Lactose, einen Milchzucker, zu hydrolysieren (Merkmal). Die Kursteilnehmenden editieren das *lacZ*-Gen und stellen eine sichtbare Veränderung des Phänotyps fest
- **Transformation der Bakterien** – Diese Laboraktivität beinhaltet die Transformation von Bakterien mit Plasmiden, die CRISPR-Cas9-Komponenten codieren. Beim Prozess der bakteriellen Transformation macht man sich die chemischen Eigenschaften von Bakterienzellwänden und DNA zu Nutze, um genetische Informationen in einen Organismus einzuführen
- **Gentechnik** – Das grundlegende Ziel der Gentechnik ist die Veränderung von Genomen hin zu einem bestimmten Phänotyp. Bakterielle Transformation und CRISPR-Geneditierung sind zwei Techniken aus diesem übergeordneten Technologiefeld
- **Bioinformatik** – Die Kursteilnehmenden üben die Verwendung des Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), um die relativen Risiken einer Geneditierung außerhalb der Zielsequenz (Off-Target) für potenzielle Cas9-Zielsequenzen festzustellen und die Sicherheit der Verwendung dieser Zielsequenzen in der CRISPR-basierten Gentherapie zu beurteilen
- **Ethische, rechtliche und soziale Fragen** – Die Anwendung der CRISPR-Technologie wirft viele allgemeinere Fragen auf, da relativ einfach vererbte genetische Veränderungen vorgenommen werden können

Hinweise zur Vorbereitung

Vorbereitungsschritt	Zeitaufwand	Zeitpunkt der Durchführung
Vorbereitung der LB-Agar-Platten	1–2 Stunden plus zwei Tage zum Trocknen der Platten	3–14 Tage vor der Lerneinheit
<i>E. coli</i> rehydratisieren	5 Min. plus 8–24 Std. Inkubation	2 Tage vor der Lerneinheit
Ausstreichen der Starterplatten	20 min plus 24 Std. Inkubation	24 Std. vor der Lerneinheit
Verteilen der Lösungen	1 Std.	Bis zu 3 Tage vor der Lerneinheit

Spitzen

- Um optimale Ergebnisse zu erzielen, müssen rehydratisierte *E. coli* bei 37 °C inkubiert werden
- Wenn Sie Starterplatten bei Raumtemperatur (20–25 °C) inkubieren, sollte die Inkubationsdauer 72 Stunden betragen. Wenn Sie Starterplatten über ein Wochenende vorbereiten, sollten sie 72 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert werden

3 bis 7 Tage vor Lerneinheit 2 LB-Agarplatten vorbereiten

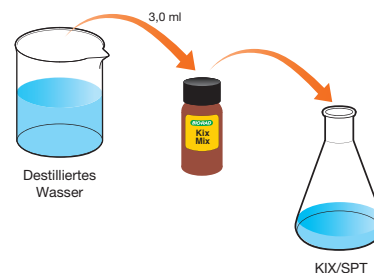
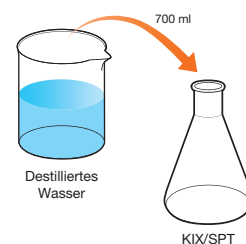
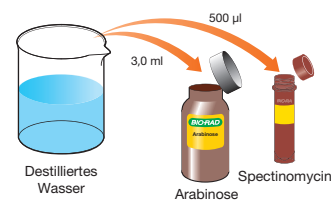
Wenn Ihre Mikrowelle für einen 1 l-Kolben zu klein ist, finden Sie in Anhang C entsprechend angepasste Hinweise zum Gießen von Platten.

- Beschriften Sie einen 500 ml-Kolben mit **KIX** und einen 1 l-Kolben mit **KIX/SPT**.
- Geben Sie 3,0 ml destilliertes oder entsalztes Wasser in das Fläschchen mit Arabinose. Mischen Sie die Flüssigkeit etwa 30 Sekunden lang auf dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren, damit sich die Arabinose leichter löst. Wiederholen Sie das Mischen auf dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren alle paar Minuten, bis die Arabinose vollständig gelöst ist (kann mehr als 10 Minuten dauern).
- Geben Sie 500 µl destilliertes oder entsalztes Wasser in das Fläschchen mit Spectinomycin. Mischen Sie die Flüssigkeit auf dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren, bis sich das Spectinomycin gelöst hat.
- Geben Sie 700 ml destilliertes oder entsalztes Wasser in den mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben.
- Geben Sie 3,0 ml destilliertes oder entsalztes Wasser in das mit KIX Mix beschriftete Fläschchen, verschließen Sie es mit dem Deckel und schütteln Sie es 5 Sekunden, um den Inhalt zu mischen. Gießen Sie die Aufschlämmung von KIX Mix in den mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben.

Sicherheit! Der KIX Mix enthält Kanamycin, IPTG und X-Gal, die bei Einatmen gesundheitsschädigend sind. Entnehmen Sie das trockene KIX Mix-Pulver erst nach Zugabe von Wasser aus dem Fläschchen.

Hinweis: Der KIX Mix löst sich nicht vollständig auf und kann klumpig aussehen.

- Wiederholen Sie Schritt 5 mindestens zweimal, um das KIX Mix-Fläschchen gründlich zu spülen.



7. Schwenken Sie die Lösung für 20 Sekunden oder solange, bis das unlösliche weiße Pulver gleichmäßig suspendiert ist. Geben Sie sofort 200 ml in den 500 ml-**KIX**-Kolben.

8. Geben Sie 7 g LB-Agar-Pulver in den mit **KIX** beschrifteten Kolben. Geben Sie das restliche LB-Agar-Pulver in den mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben.

9. Autoklavieren Sie beide Kolben für 30 Minuten (Flüssigkeitszyklus) oder bringen sie den Inhalt in der Mikrowelle jeweils dreimal zum Sieden. Darauf achten, dass der Inhalt nicht überkocht.

Hinweis: Beachten Sie bei Verwendung eines Autoklaven Schritt 16, bevor Sie Schritt 9 durchführen.

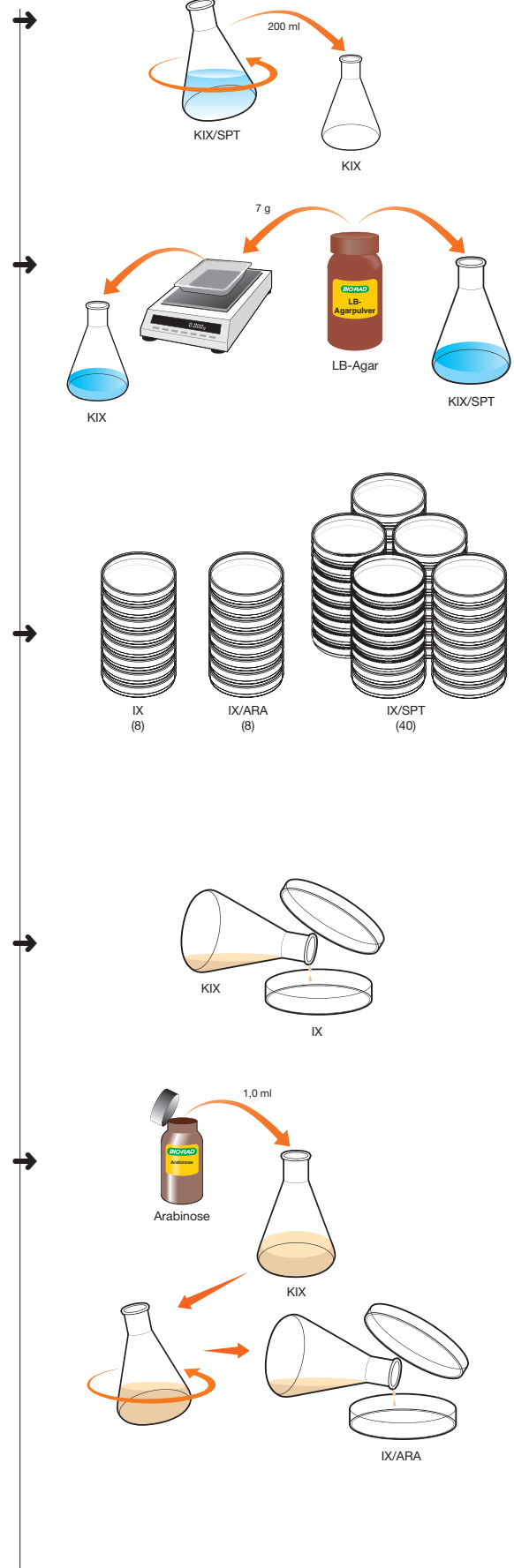
10. Beschriften Sie acht Platten mit **IX** und acht Platten mit **IX/ARA**. Beschriften Sie 40 Platten mit **IX/SPT**.

Wichtiger Hinweis! KIX Mix enthält das Antibiotikum Kanamycin (K) zur Selektion auf *E. coli* HB101-pBRKan. Alle LB-Agar-Platten in dieser Lerneinheit enthalten Kanamycin. Der Einfachheit halber wurden „K“ und Kanamycin im Text und in den Beschriftungen in allen Lehrmaterialien für Kursteilnehmende weggelassen. Wenn Sie die Funktion von Kanamycin mit Ihren Kursteilnehmenden besprechen möchten, verwenden Sie die Beschriftung **KIX** anstelle von **IX**.

11. Befüllen Sie schnell acht **IX**-Platten zu einem Drittel bis zur Hälfte (~10 ml) mit geschmolzenem **KIX** LB-Agar.

12. Geben Sie 1,0 ml rehydratisierte Arabinose zu dem restlichen geschmolzenen **KIX** LB-Agar. Schwenken Sie den Behälter, um seinen Inhalt zu mischen, und befüllen Sie acht **IX/ARA**-Platten ungefähr zu einem Drittel bis zur Hälfte (~10 ml) mit dem geschmolzenen Agar.

Hinweis: Spülen Sie den KIX-Kolben sofort aus, um zu verhindern, dass erstarrter Agar am Boden haften bleibt.



13. Sobald der **KIX/SPT**-Kolben so weit abgekühlt ist, dass man ihn in der Hand halten kann (etwa 50 °C), geben Sie 500 µl rehydratisiertes Spectinomycin dazu. Schwenken Sie den Kolben, um seinen Inhalt zu mischen, und befüllen Sie mindestens 40 **IX/SPT**-Platten zu ungefähr einem Drittel bis zur Hälfte (~10 ml) mit dem geschmolzenen Agar. Überzählige gegossene Platten können bei Bedarf als Ersatzplatten verwendet werden.

Hinweis: Spectinomycin wird durch zu hohe Temperaturen (> 60 °C) zerstört. Geben Sie das Spectinomycin erst hinzu, wenn der Agar ausreichend abgekühlt ist, um den Kolben anfassen zu können. Allerdings erstarrt der Agar bei 27 °C, daher müssen die Platten gegossen werden, bevor er zu stark abgekühlt ist. Sie können Ihre Kolben in ein 50 °C warmes Wasserbad stellen, um zu verhindern, dass der Agar zu schnell abkühlt.

Hinweis: Spülen Sie den KIX/SPT-Kolben sofort aus, um zu verhindern, dass erstarrter Agar am Boden haften bleibt.

14. Lassen Sie die Platten nach dem Erstarren des Agars (~30 min) zwei Tage bei Raumtemperatur vor Licht geschützt trocknen (nicht in Folie einwickeln).

Hinweis: Die Zusatzstoffe in **KIX** Mix sind lichtempfindlich, aber die Platten sollten während des Trocknens nicht eingepackt werden. Das zweitägige Trocknen der Platten verbessert die Aufnahme der flüssigen Transformationsproben der Kursteilnehmenden.

15. Wickeln Sie die Plattenstapel nach dem Trocknen in Alufolie ein, um sie vor Licht zu schützen. Anschließend können Sie sie in Plastikfolie einwickeln oder wieder in die Original-Plastikhülle geben. Die Platten umgedreht bei 4 °C im Kühlschrank lagern. Auf diese Weise können die Platten bis zum Gebrauch bis zu zwei Wochen lang aufbewahrt werden.

2 Tage vor Lerneinheit 2 Bakterien rehydratisieren

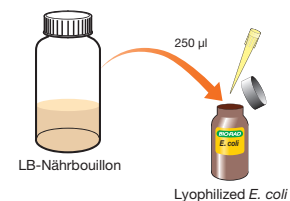
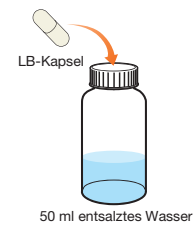
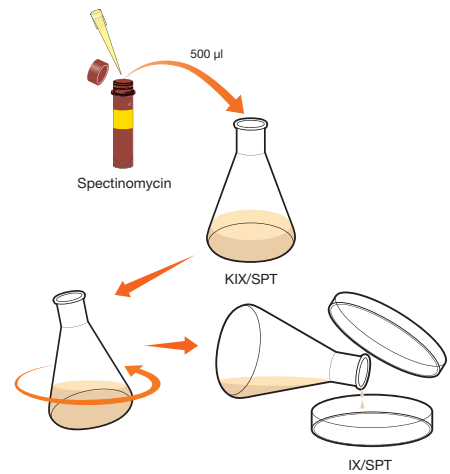
Wenn Sie die Starterplatten bei 37 °C inkubieren, rehydratisieren Sie die Bakterien 2 Tage vor Lerneinheit 2.

Wenn Sie die Starterplatten bei Raumtemperatur inkubieren, rehydratisieren Sie die Bakterien 4 Tage vor Lerneinheit 2.

16. Geben Sie die Kapsel mit LB-Nährbouillon und 50 ml destilliertes oder entsalztes Wasser in eine 150–250 ml Flasche. **Setzen Sie den Deckel lose auf** und erhitzen Sie den Inhalt der Flasche im Autoklaven oder in der Mikrowelle drei Mal bis zum Sieden. Lassen Sie die Nährbouillon auf Raumtemperatur abkühlen. Schrauben Sie den Deckel fest zu und bewahren Sie die Flasche bei 4 °C auf. Vor dem Gebrauch Raumtemperatur annehmen lassen.

Hinweis: Bei Verwendung eines Autoklaven kann dieser Schritt mit Schritt 9 kombiniert werden.

17. Verwenden Sie eine **sterile** Pipettenspitze und geben Sie 250 µl auf Raumtemperatur gebrachte LB-Nährbouillon in das Fläschchen mit lyophilisierten *E. coli* HB101-pBRKan. Verschließen Sie das Fläschchen mit den *E. coli* wieder und schütteln Sie es behutsam, um die Bakterien zu resuspendieren. Inkubieren Sie das Fläschchen für 8 bis 24 Stunden bei 37 °C.



18. Kochen Sie die restliche LB-Nährbouillon als Vorsichtsmaßnahme gegen Kontamination mit locker aufgesetztem Deckel einmal in der Mikrowelle auf. Schrauben Sie den Deckel fest zu und bewahren Sie die Flasche bei 4 °C auf.

24 Stunden vor Lerneinheit 2 Starterplatten ausstreichen und inkubieren

19. Streichen Sie die rehydratisierten *E. coli* HB101-pBRKan mit einer sterilen Kunststoff-Impföse auf acht IX- und acht IX/ARA-Platten aus.

Wichtiger Hinweis! Die richtige Plattenausstrichtechnik zur Erzeugung von Einzelkolonien ist für den Erfolg unerlässlich. Befolgen Sie das in den Schritten A–D gezeigte Ausstrichmuster. Dabei werden die *E. coli* zunächst in einem Quadranten außen von Schalenrand zu Schalenrand ausgestrichen (A). Dann wird die Platte um eine Vierteldrehung gedreht. Führen Sie die Impföse, wiederum von Schalenrand zu Schalenrand, mehrmals durch den gerade ausgebrachten Ausstrich bis in den nächsten Quadranten (B). Wiederholen Sie diesen Vorgang noch zweimal (C, D).

20. Inkubieren Sie die Starterplatten umgedreht 24 Stunden in einem Inkubator bei 37 °C. Achten Sie darauf, dass die Platten im Inkubator vor Licht geschützt sind, aber wickeln Sie sie nicht fest in Folie ein. Es reicht aus, die Tür des Inkubators mit Folie abzudecken.

Hinweis: Alternativ können Starterplatten umgekehrt bei Raumtemperatur (20–25 °C) 72 Stunden im Dunkeln inkubiert werden.

Vor Lerneinheit 2 Lösungen verteilen und bei 4 °C aufbewahren

Zur Vermeidung einer Kontamination sollte **LB-Nährbouillon frühestens 3 Tage vor Lerneinheit 2 verteilt werden**. Die anderen Lösungen können bis zu 7 Tage vor Lerneinheit 2 verteilt werden.

21. Für jeden der acht Arbeitsplätze vier 2 ml-Röhrchen wie folgt beschriften: **TS**, **LB**, **pD**, und **pDG** (= insgesamt 32 Röhrchen).

22. Geben Sie in jedes der acht mit **TS** beschrifteten Röhrchen 1,2 ml Transformationslösung.

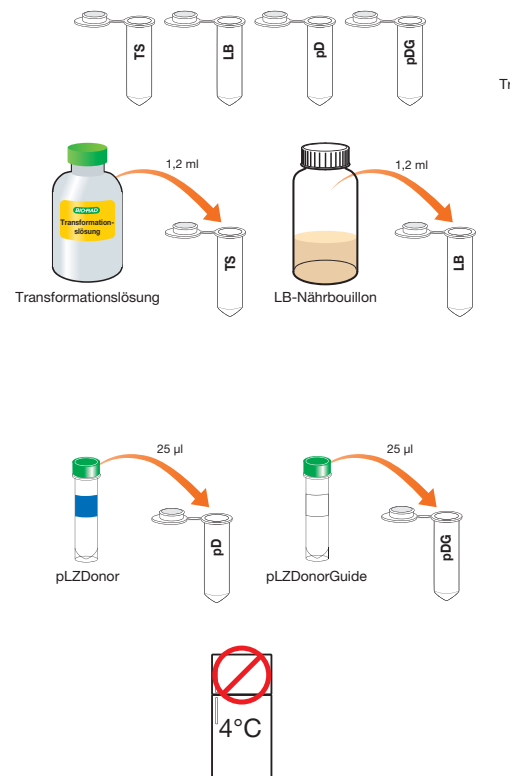
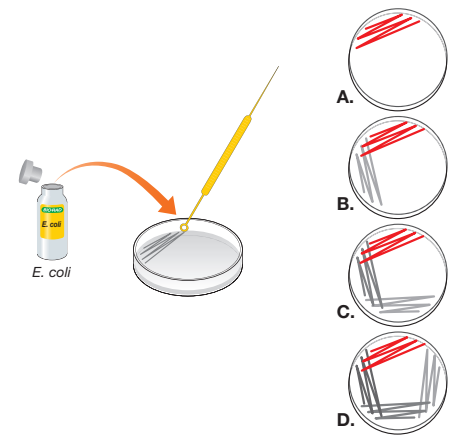
23. Geben Sie in jedes der acht mit **LB** beschrifteten Röhrchen 1,2 ml sterile LB-Nährbouillon.

24. Zentrifugieren Sie pLZDonor und pLZDonorGuide kurz, um die Flüssigkeit am Boden der Röhrchen zu sammeln.

25. Geben Sie in jedes der acht mit **pD** beschrifteten Röhrchen 25 µl pLZDonor-Plasmid.

26. Geben Sie in jedes der acht mit **pDG** beschrifteten Röhrchen 25 µl pLZDonorGuide-Plasmid.

27. Bewahren Sie alle Lösungen bis zum Gebrauch bei 4 °C auf. Lassen Sie alle Reagenzien mit Ausnahme der Transformationslösung (**TS**) Raumtemperatur annehmen, bevor sie von den Kursteilnehmenden verwendet werden.



Die Arbeitsplätze der Kursteilnehmenden an dem Tag einrichten, an dem Lerneinheit 2 stattfindet.

Arbeitsplatz der Kursteilnehmenden

Materialien	Menge
Frische LB-Starterplatte mit <i>E. coli</i> IPTG/X-gal (IX)	1
Frische LB-Starterplatte mit <i>E. coli</i> IPTG/X-gal/ARA (IX/ARA)	1
LB-Platten mit IPTG/X-Gal/Spectinomycin (IX/SPT)	4
LB-Nährstoffbouillon (LB)	1,2 ml
Transformationslösung (TS) auf Eis	1,2 ml
pLZDonor-Plasmid (pD), 80 ng/μl	25 μl
pLZDonorGuide-Plasmid (pDG), 80 ng/μl	25 μl
Volumenverstellbare Mikropipette (100–1.000 μl) und Spitzen (empfohlen)	1
Volumenverstellbare Mikropipette (20–200 μl) und Spitzen	1
Volumenverstellbare Mikropipette (2–20 μl) und Spitzen	1
Mikroteströhrchen, 2,0 ml	4
Gelbe Impföse	8
Eiswasser mit zerstoßenem Eis	1
Permanentmarker	1
Schwimmständer aus Schaumstoff (bei Verwendung eines Wasserbads)	1
Röhrchenständer (empfohlen)	1
Abfallbecher	1

Gemeinsam genutzter Arbeitsplatz

Materialien	Menge
Wasserbad oder Trockenbad (Vertiefungen mit Wasser gefüllt), eingestellt auf 60 °C	1
Inkubationsofen oder Schüttelinkubator mit Ablage, eingestellt auf 37 °C (empfohlen)	1
Laborklebeband	

Hintergrundinformationen für Kursleitende

Das Out of the Blue CRISPR-Cas9-System

lacZ-Gen und Blau-Weiß-Screening

In dieser Lerneinheit verwenden die Kursteilnehmenden die CRISPR-Cas9-Technologie, um das *lacZ*-Gen zu inaktivieren. Dieses ist von Natur aus im Chromosom von *E. coli* HB101-pBRKan, dem Bakterienstamm, der in diesem Kit verwendet wird, vorhanden. Ein Gen im bakteriellen *lac*-Operon, *lacZ*, codiert das Enzym β -Galactosidase (β -Gal), das es *E. coli* ermöglicht, Lactose zu hydrolysieren. β -Gal kann aber auch ein farbloses Lactose-Analogon, X-gal, hydrolysieren, was zur Bildung eines blauen Pigments führt. Das Vorhandensein blauer oder weißer Kolonien ist ein sichtbarer Hinweis auf eine erfolgreiche Editierung des *lacZ*-Gens: Bakterien mit funktionellem *lacZ* nehmen eine blaue Farbe an, wenn sie auf Medium mit X-Gal wachsen, solche mit einem editierten, nicht funktionsfähigen *lacZ*-Gen bleiben weiß (Abbildung 1).

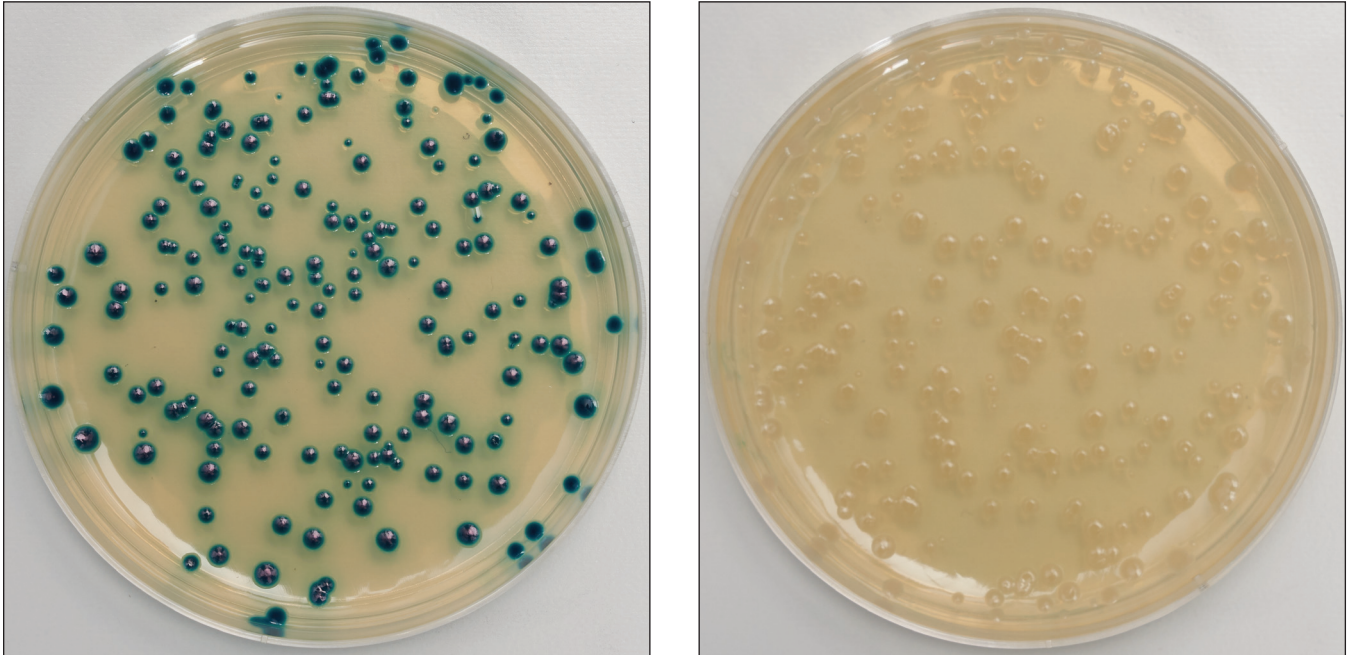


Abb. 1 Auf Medium mit X-gal ausplattierte *E. coli*. Bakterien mit funktionellem *lacZ*-Gen sind blau (links). Bakterien mit editiertem, nicht funktionsfähigen *lacZ*-Gen sind weiß (rechts).

CRISPR-Cas-vermittelte Brüche in der DNA

Charakteristisch für CRISPR ist die Verwendung von CRISPR-assoziierten Proteinen bzw. Cas-Proteinen, die auf bestimmte DNA-Sequenzen abzielen. Cas9 ist die „klassische“, in CRISPR-Technologien verwendete bakterielle Endonuklease, aber seitdem sind noch viele andere identifiziert und entwickelt worden. Cas9 kann so programmiert werden, dass sie an einer bestimmten Zielstelle Doppelstrangbrüche in der DNA erzeugt. Die Zielstelle wird durch ein kurzes RNA-Molekül bestimmt, das als Guide-RNA bezeichnet wird und mit Cas9 einen Komplex bildet.

Homologiegesteuerte DNA-Reparatur

Nachdem Cas9 ein Chromosom aufgeschnitten hat, muss dieses auf irgendeine Weise repariert werden, sonst sterben die Bakterien. Die bei dieser Lerneinheit verwendeten Bakterien sind an sich nicht in der Lage, DNA-Brüche zu reparieren. Sie sind aber so konstruiert, dass sie die Enzyme für einen DNA-Reparaturprozess exprimieren, der als homologiegesteuerte Reparatur (HDR) bezeichnet wird. Die Gene, die den HDR-Signalweg codieren, stehen unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors. Für die Reparatur eines DNA-Bruchs wird bei der HDR eine Donor-DNA-Matrize mit Homologie zu den Sequenzen, die die Schnittstelle flankieren, benötigt. Die Donor-DNA-Matrize befindet sich auf den im Kit enthaltenen Plasmiden (siehe unten).

E. coli HB101-pBRKan

Die in diesem Kit enthaltenen Bakterien, HB101-pBRKan, wurden so verändert, dass sie das Cas9-Enzym exprimieren. Sie tragen ein Plasmid mit Genen für die homologiegesteuerte Reparatur (HDR) unter der Kontrolle eines Arabinose-induzierbaren Promotors. Als Selektionsmarker enthält das Plasmid auch ein Gen für Kanamycin-Resistenz.

sgRNA und Donor-DNA-Matrize

Die Kursteilnehmenden transformieren *E. coli* HB101-pBRKan mit einem der beiden Plasmide, von denen ein jedes ein Gen für Spectinomycin-Resistenz trägt:

- pLZDonor – (Kontrolle) enthält die Sequenz einer Donor-DNA-Matrize, die von der HDR-Maschinerie verwendet wird, um DNA-Doppelstrangbrüche zu reparieren. Die Donorsequenz enthält ein Stoppcodon, das die Funktion von *lacZ* beeinträchtigt, wenn es eingefügt wird
- pLZDonorGuide – enthält sowohl die Sequenz der Donor-DNA-Matrize, die in pLZDonor vorhanden ist, als auch eine Sequenz, welche die single guide RNA (sgRNA) codiert. Nach der Transkription leitet die sgRNA das Cas9-Protein an die Stelle, an der *lacZ* geschnitten werden soll

Die Donor-Matrizensequenz enthält ein Stoppcodon, an dem die Translation des *lacZ*-Gens endet. Bakterien, bei denen eine Geneditierung unter Verwendung dieser Donor-DNA-Matrize stattgefunden hat, exprimieren keine funktionsfähige β -Gal, sondern bilden weiße Kolonien. Bakterien mit einem DNA-Doppelstrangbruch in ihrem Chromosom, aber ohne einen aktiven Mechanismus zur Reparatur des Bruchs, sterben.

Wie die Komponenten zusammenarbeiten

Bei diesen Lerneinheiten werden verschiedene Mediumzusätze verwendet, um zu den verschiedenen Versuchsergebnissen zu gelangen (Tabelle 3).

- Alle Platten enthalten das Antibiotikum Kanamycin als Selektionsmarker für *E. coli* HB101-pBRKan
- Alle Platten enthalten IPTG (Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid) und X-Gal (5-Brom-4-chlorindol-3-yl- β -D-galactopyranosid) für das Blau-Weiß-Screening. IPTG ist ein nicht metabolisierbares Galactose-Analogon, das die Expression des *lac*-Operons, einschließlich *lacZ*, das β -Gal codiert, induziert
- Arabinose induziert die Expression der HDR-Enzyme. Eventuell ist den Kursteilnehmenden nicht klar, warum die Versuchsplatten (IX/SPT) keine Arabinose enthalten. Da der gesamte Prozess der Geneditierung, einschließlich der HDR, bereits vonstatten gegangen ist, wenn die Kursteilnehmenden ihre Bakterienproben ausplattieren, ist es nicht erforderlich, dass die Versuchsplatten Arabinose enthalten
- Platten, die Spectinomycin enthalten, dienen der Selektion auf Bakterien, die mit pLZDonor oder pLZDonorGuide transformiert wurden

Tabelle 3. Mediumzusätze für Starterplatten und LB-Agarplatten für den Versuch.

Plattenbezeichnung	Kanamycin* Selektionsmarker für den Bakterienstamm	IPTG Induziert die Expression von β -Gal	X-gal Hydrolysiert von β -Gal zur Erzeugung eines blauen Pigments	Arabinose Induziert die Expression des HDR- Systems	Spectinomycin Selektionsmarker für pLZDonor und pLZDonorGuide
IX	✓	✓	✓		
IX/ARA	✓	✓	✓	✓	
IX/SPT	✓	✓	✓		✓

*** Wichtig!** Alle bei dieser Lerneinheit verwendeten Platten enthalten das Antibiotikum Kanamycin (K), das zur Selektion des Bakterienstamms verwendet wird. Der Einfachheit halber wurden „K“ und Kanamycin im Text und in den Beschriftungen in allen Lehrmaterialien für Kursteilnehmende in dieser Lerneinheit weggelassen. Wenn Sie die Funktion von Kanamycin mit Ihren Kursteilnehmenden besprechen möchten, verwenden Sie die Beschriftung KIX anstelle von IX und erläutern Sie Ihren Kursteilnehmenden den Zweck.

Die Kursteilnehmenden starten die Lerneinheit mit den Bakterien, die auf zwei verschiedenen Starterplatten (**IX** und **IX/Ara**) angezüchtet wurden.

- Alle Bakterien exprimieren Cas9.
- Die auf **IX**-Platten gewachsenen Bakterien exprimieren die für HDR erforderlichen Enzyme nicht (Reparatursystem ist INAKTIV)
- Die auf **IX/ARA**-Platten gewachsenen Bakterien exprimieren die für HDR erforderlichen Enzyme (Reparatursystem ist AKTIV)

Bakterien aus beiden Starterplatten werden entweder mit pLZDonor oder pLZDonorGuide transformiert (siehe Abbildung 2).

- Die mit pLZDonor transformierten Bakterien verfügen nicht über die sgRNA, die benötigt wird, damit *lacZ* von Cas9 geschnitten wird. Daher findet keine Geneditierung statt und die Kolonien der transformierten Bakterien sind blau, unabhängig davon, ob das Reparatursystem aktiv oder inaktiv ist
- Die mit pLZDonorGuide transformierten Bakterien verfügen sowohl über die sgRNA als auch über die Donor-DNA-Matrize.
 - Wenn das HDR-System nicht exprimiert wird (Arabinose fehlt), wird die DNA zwar von Cas9 geschnitten, aber es findet keine DNA-Reparatur statt, und die Zellen sterben. Es ist kein Wachstum zu beobachten
 - Wenn das HDR-System exprimiert wird (Arabinose ist vorhanden), wird die DNA von Cas9 geschnitten und die HDR-Maschinerie verwendet die Donor-DNA-Matrize aus pLZDonorGuide, um das Loch zu stopfen, und führt ein Stopp-Codon in das *lacZ*-Gen ein. Die Kolonien der transformierten Bakterien sind weiß
- Die Herstellung von DNA-Doppelstrangbrüchen durch Cas9 und die Reparaturprozesse beginnen sofort nach der Transformation. Diese Prozesse sind vor dem Ausplattieren auf **IX/SPT**-Platten weitgehend abgeschlossen
- Spectinomycin im **IX/SPT**-Agarmedium dient der Selektion auf erfolgreich transformierte Bakterien

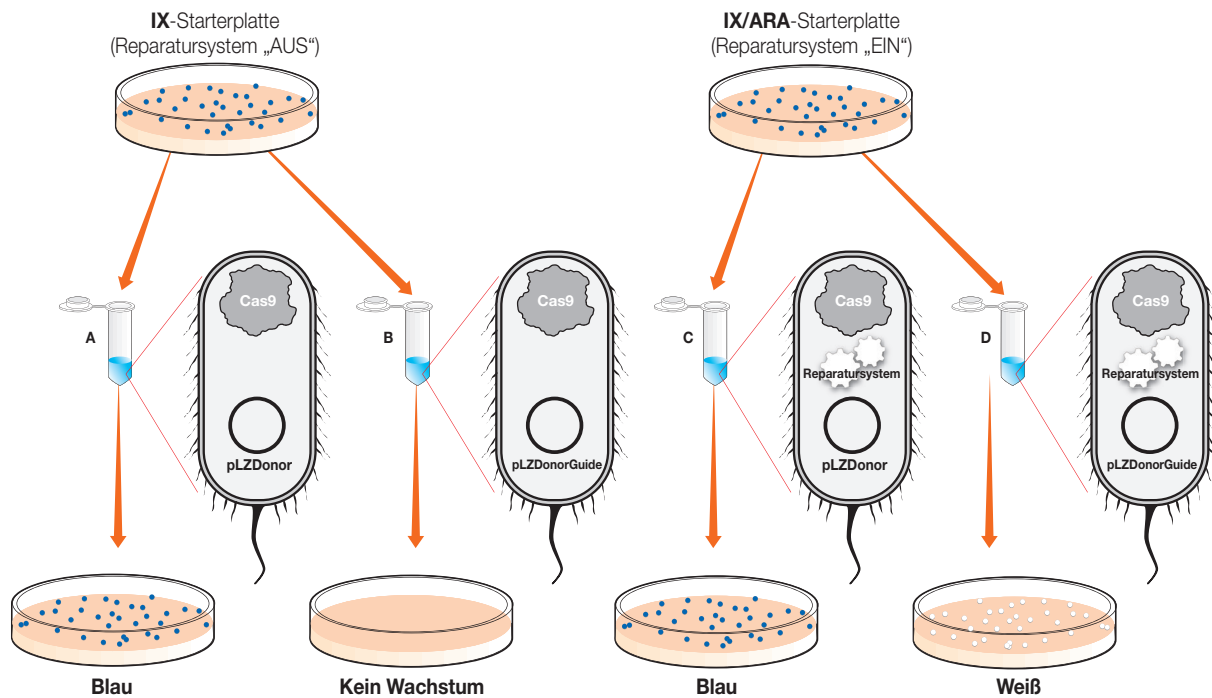


Abb. 2. In dieser Lerneinheit durchgeführte Transformationen. Dargestellt sind die erwarteten Ergebnisse.

Lerneinheit 1

Einführung in die CRISPR-Cas9-Geneditierungstechnologie

Die Lerneinheiten in diesem Kit konzentrieren sich auf das Vorgehen zur Anwendung der Technologie der CRISPR-Cas9-Geneditierung. Die Kursteilnehmenden erhalten dadurch ein grundlegendes Verständnis des bakteriellen adaptiven Immunsystems als Ausgangspunkt für diese Technologie. Es können zusätzliche Hintergrundinformationen aus dem vorliegenden Dokument, ein Video oder ein Nachrichtenartikel zur Verfügung gestellt oder konkrete Anweisungen gegeben werden, um den Kursteilnehmenden diese Konzepte in entsprechenden Details vorzustellen. Weitere Ressourcen sind in den Anhängen aufgeführt.

Ziele: Die Kursteilnehmenden lernen die Schritte der Cas9-vermittelten DNA-Spaltung kennen und können sagen, an welcher Stelle eine Spaltung erfolgt, wenn ihnen die jeweilige sgRNA-Sequenz bekannt ist. Die Kursteilnehmenden können mathematische Modelle verwenden, um die relative Spezifität von Restriktionsenzymen und Cas9 zum Schneiden von DNA zu erklären.

Tipps und Hinweise für den Unterricht	
Teil 1. Simulation des molekularen Mechanismus der Cas9-vermittelten Spaltung von DNA	<ul style="list-style-type: none"> • Diese Lerneinheit ist so konzipiert, dass sie überwiegend von den Kursteilnehmenden durchgeführt wird • Die Kursteilnehmenden sollten sgRNA 1 und DNA Strip 1 verwenden • Bei der in der Lerneinheit verwendeten DNA-Sequenz handelt es sich um einen Abschnitt des chromosomalen <i>E. coli lacZ</i>-Gens • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Überprüfen Sie die Genauigkeit der Vorhersage der Schnittstellen durch die Kursteilnehmenden und sprechen Sie etwaige Fehler an • Option: Stellen Sie eine größere DNA-Sequenz eines relevanten Gens und eine sgRNA-Sequenz Ihrer Wahl bereit. Lassen Sie die Kursteilnehmenden die Schnittstelle vorhersagen
Teil 2. Design der Guiding-Region einer sgRNA	<ul style="list-style-type: none"> • Die Kursteilnehmenden sollten sgRNA 2 und DNA Strip 2 verwenden • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Überprüfen Sie die Genauigkeit der Vorhersage der Schnittstellen durch die Kursteilnehmenden und sprechen Sie etwaige Fehler an. Die korrekte sgRNA-Sequenz ist in den im Kit enthaltenen Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen angegeben • Option: Stellen Sie eine größere DNA-Sequenz eines relevanten Gens bereit und bitten Sie die Kursteilnehmenden, eine sgRNA-Sequenz aufzuschreiben, die innerhalb der bereitgestellten DNA-Sequenz schneidet
Teil 3. Vergleich der Spezifität von DNA schneidenden Tools	<ul style="list-style-type: none"> • Bei den Fragen in diesem Teil sollen die Kursteilnehmenden davon ausgehen, dass das menschliche Genom eine Zufallssequenz aus A, T, C und G ist. Tatsächlich enthält das menschliche Genom aber viele Wiederholungen von Nukleotidsequenzen • Diskutieren Sie die möglichen Auswirkungen von Sequenzwiederholungen wie Paraloge, Orthologe und <i>Alu</i>-Wiederholungen auf die Spezifität der CRISPR-Cas9-Technologie • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Überprüfen Sie die Berechnungen und Interpretationen der Kursteilnehmenden. Beachten Sie die im Kit enthaltenen Empfehlungen für Kursleitende zur Beantwortung von Fragen
Teil 4. Design einer Donor-DNA-Matrize für die DNA-Reparatur	<ul style="list-style-type: none"> • Weisen Sie in den Diskussionen mit den Kursteilnehmenden auf den Unterschied zwischen Genreparatur, d. h. der funktionsbezogenen Reparatur der Sequenz eines Gens, und der DNA-Reparatur, d. h. der Reparatur von Brüchen im DNA-Molekül, hin • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Bitten Sie die Kursteilnehmenden, die DNA-Stränge ihrer Donor-Matrize zu präsentieren, bevor Sie sie auf die geschnittenen DNA-Strips kleben. Bitten Sie andere Kursteilnehmende um eine Beurteilung • Option: Lassen Sie die Kursteilnehmenden die vollständige Sequenz des <i>lacZ</i>-Gens in der NCBI-Datenbank suchen und eine sgRNA-Zielsequenz und eine Sequenz für eine Donor-DNA-Matrize vorschlagen, um ein Stoppcodon im Leseraster einzufügen

Lerneinheit 2

lacZ CRISPR-Geneditierungslabor

Ziel: Die Kursteilnehmenden führen eine Geneditierung auf chromosomaler Ebene durch und lernen die erwarteten Ergebnisse eines CRISPR-Cas9-Experiments kennen.

Tipps und Hinweise für den Unterricht	
Teil 1. Besprechung der als Vorbereitung auf die Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	<ul style="list-style-type: none"> • Alle Platten in dieser Lerneinheit enthalten Kanamycin als Selektionsmarker für den in diesem Kit verwendeten Bakterienstamm. Der Einfachheit halber wurden „K“ und Kanamycin im Text und in den Beschriftungen in allen Lehrmaterialien für Kursteilnehmende weggelassen. Wenn Sie die Funktion von Kanamycin mit Ihren Kursteilnehmenden besprechen möchten, verwenden Sie die Beschriftung KIX anstelle von IX • Die Geneditierung in dieser Lerneinheit erfolgt chromosomal und ist weitgehend abgeschlossen, wenn die Kursteilnehmenden ihre Proben ausplattieren und inkubieren. Das Ausplattieren und Inkubieren ermöglicht die Bildung von Kolonien mit einem sichtbaren Phänotyp • Den Kursteilnehmern ist möglicherweise nicht klar, warum Arabinose in den Versuchsplatten nicht erforderlich ist. Arabinose wird für die DNA-Reparatur benötigt, die unmittelbar nach der Transformation beginnt. Sobald der Schnitt im Bakterienchromosom repariert ist, wird die Reparaturmaschinerie nicht mehr benötigt. Alle Tochterzellen, die während der Koloniebildung erzeugt werden, weisen das editierte Chromosom auf, das nicht erneut von Cas9 geschnitten wird • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Bevor die Kursteilnehmenden mit Teil 2 fortfahren, überprüfen Sie ihre Antworten in den Tabellen 3 und 4 der Hinweise für Kursteilnehmende auf Fehler
Teil 2. Durchführung des Geneditierungsprotokolls	<ul style="list-style-type: none"> • Vor dem Hitzeschockschritt ist es wichtig, dass die Kursteilnehmenden ihre Proben immer auf Eis halten, es sei denn, sie überführen aktiv Lösungen • Wenn Sie mit der Out of the Blue Genotyping Extension fortfahren, müssen die Kursteilnehmenden ihre Bakterienplatten behalten. Einzelheiten finden Sie auf bio-rad.com/outoftheblue oder in den Hinweisen für Kursleitende für den Out of the Blue Genotyping Extension-Kurs • Wenn Ihre Kursteilnehmenden ihre Platten nicht unmittelbar nach der Inkubation analysieren, können Sie sie bis zur Analyse gekühlt (4 °C) bis zu zwei Wochen aufbewahren
Teil 3. Besprechung der zur Aufbereitung der Laboraktivitäten vorgesehenen Fragen	<ul style="list-style-type: none"> • Auf Platte B sollten keine Kolonien wachsen, da die Bakterien über aktives Cas9 mit Guide-RNA verfügen, aber keine Expression des gentechnisch eingeführten DNA-Reparatursystems aufweisen, da sie auf Medium ohne Arabinose wachsen. In seltenen Fällen kann es vorkommen, dass auf Platte B einige weiße Kolonien wachsen. In diesen Bakterien fand wahrscheinlich eine seltene Deletion statt, bei der ein Teil des <i>lacZ</i>-Gens deletiert, die chromosomale DNA aber intakt gelassen wurde • Das CRISPR-Cas9-Geneditierungssystem in diesem Kit ist hocheffizient, aber nicht zu 100 %. Einige Kursteilnehmende werden auf Platte D blaue Kolonien finden, die von Bakterien mit nicht modifiziertem <i>lacZ</i>-Gen stammen • Option: Wenn Sie mit der näheren Charakterisierung der Genotypisierungsergebnisse fortfahren, lassen Sie die Kursteilnehmenden den Genotyp einer Kolonie analysieren, in der eine Deletion stattgefunden hat • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Bitten Sie die Kursteilnehmenden, die Rolle von IPTG, X-Gal und Spectinomycin im Experiment zu erklären • Beurteilungsmöglichkeit des Wissensstands: Bitten Sie die Kursteilnehmenden, sich zu überlegen, welche Farbe die Bakterienkolonie voraussichtlich hätte, wenn eine Probe davon auf Platten subkultiviert würde, die IPTG und X-Gal, aber kein Spectinomycin enthalten

Capstone-Lerneinheit

Identifizierung und Analyse von Cas9-Zielsequenzen mittels Bioinformatik

Ziel: Die Kursteilnehmenden erarbeiten medizinische Anwendungen von CRISPR und überlegen sich, welche realen Faktoren das Risiko von Off-Target-Effekten bei Krankheitstherapien beeinflussen. Die Kursteilnehmenden vertiefen ihre Kenntnisse bei der Verwendung von BLAST und rekapitulieren die grundlegenden Anforderungen an die Konzeption von CRISPR-Experimenten.

Einleitung

Die Möglichkeit von Off-Target-Effekten ist ein wichtiges Argument in ethischen Diskussionen über die Technologie der CRISPR-vermittelten Geneditierung. Die Wahl der Zielschnittstelle und der erforderlichen Guide-RNA-Sequenz ist entscheidend, um das Risiko von Off-Target-Effekten zu reduzieren. Kursteilnehmenden, die sich zum ersten Mal mit der CRISPR-Technologie beschäftigen, sind diese Einschränkungen möglicherweise nicht ohne Weiteres bewusst, und sie erkennen auch nicht die Notwendigkeit einer Risikobewertung während der Konzeptionierung und der Entwicklung von Gentherapien. In diesem Kurs werden Ihre Kursteilnehmenden BLAST verwenden, um mögliche Cas9-Zielschnittstellen in einem therapeutisch relevanten Gen basierend auf den Risiken von Off-Target-Effekten zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Lerneinheit sind qualitativ; sie sollen die Kursteilnehmenden zu entsprechenden Fragestellungen veranlassen und keine Antworten auf die tatsächlichen Risiken in Verbindung mit CRISPR-Anwendungen geben. Bei dieser Lerneinheit gibt es keine richtigen und falschen Antworten, sondern nur gut begründete Argumente. Sie bietet den Kursteilnehmenden die Möglichkeit, ein genau festgelegtes Ziel zu untersuchen, etwas auszuprobieren, zu scheitern und von vorne zu beginnen.

Hinweise zur Konzeptionierung der Lerneinheit und ihren Grenzen

In der Realität ist die Beurteilung von Guide-RNA-Sequenzen im Hinblick auf Off-Target-Effekte komplex. Wissenschaftlern stehen zahlreiche kostenlose Online-Tools zur Verfügung, um Kandidaten für RNA-Sequenzen zu finden und zu beurteilen, aber deren Algorithmen und Bewertungskriterien sind komplex und/oder eigentumsrechtlich geschützt. In dieser Lerneinheit verwenden die Kursteilnehmenden BLAST nicht nur, um den Umgang mit einem so wichtigen Tool zu üben, sondern auch, weil es das tatsächliche Vorkommen von Off-Target-Sequenzen veranschaulicht. Obwohl diese Lerneinheit nicht den Arbeitsablauf abbildet, der in der Wissenschaft üblich ist, hilft sie den Kursteilnehmenden dennoch, sich einige grundlegende Designelemente vor Augen zu halten.

- BLAST ist Einschränkungen unterworfen, wenn es um kurze Sequenzen geht, und priorisiert Sequenzen mit Nukleotid-Alignment gegenüber Sequenzen mit intermittierenden Mismatches oder Alignment-Lücken. Infolgedessen könnte BLAST einige Sequenzen, bei denen die Wahrscheinlichkeit, ein Off-Target zu sein, hoch ist, ignorieren
- BLAST ist nicht in der Lage, ein Wildcard-Nukleotid (N) bei der Suche nach kurzen Nukleotidsequenzen korrekt zu berücksichtigen. Stattdessen ignoriert der Algorithmus alle Nukleotide stromabwärts von N, was in diesem Fall die Sequenz des „Protospacer Adjacent Motif“ (PAM; an den Protospacer angrenzendes Motiv) beinhaltet
- Eine umfassende Off-Target-Suche sollte die Protospacer-Sequenz mit jeder der vier PAM-Kombinationen (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG und 5'-GGG) beinhalten. Da BLAST nicht in der Lage ist, N in einer einzelnen Abfragesequenz korrekt zu verarbeiten, sind vier separate Recherchen in BLAST, eine für jede PAM-Sequenzkombination, erforderlich, um das Off-Target-Potenzial einer Kandidatenzielsequenz tatsächlich beurteilen zu können. Aufgrund des begrenzten Zeitrahmens wurde diese Lerneinheit vereinfacht, und die Kursteilnehmenden verwenden nur eine Sequenz
- Die Human Reference Gene Database, mit der die Kursteilnehmenden in dieser Lerneinheit arbeiten, enthält nur Gensequenzen. Daher werden alle Abfrageergebnisse von Gensequenzen stammen, was dazu beiträgt, den Kursteilnehmenden die potenziellen biologischen Auswirkungen eines außerhalb der Zielstelle stattfindenden DNA-Schnitts zu verdeutlichen. Es werden keine Off-Targets außerhalb von Genen gefunden werden, aber die Ergebnisse werden für die Kursteilnehmenden viel einfacher zu interpretieren sein
- Lassen Sie die Kursteilnehmenden zur weiteren Vertiefung eine Liste mit Designanforderungen für einen Softwareentwickler erstellen, um ein sgRNA-Design tool zu entwickeln

Tipps und Hinweise für den Unterricht	
Teil 1. Identifizierung und Katalogisierung von Zielsequenzen	<ul style="list-style-type: none"> • Teilen Sie die Kursteilnehmenden in Gruppen auf und geben Sie jeder Gruppe ein Infoblatt zu einer Krankheit (koronare Herzkrankheit, Sichelzellanämie oder Mukoviszidose) • Die bereitgestellten Gensequenzen weisen eine begrenzte Länge auf, um die Anzahl der in Frage kommenden Zielstellen zu reduzieren • Alle infrage kommenden Zielstellen sollten 23 Nukleotide lang sein (Protospacer-Sequenz plus ein PAM am 3'-Ende) und als einzelsträngige Sequenz in 5'-zu-3'-Richtung geschrieben werden • Erinnern Sie die Kursteilnehmenden daran, dass die Leitsequenz der sgRNA komplementär zu einer Zielsequenz ist. Durch Auswahl einer Zielstelle wird also auch die Sequenz der sgRNA festgelegt. Daher entspricht das „Design“ der Leitregion einer sgRNA im Wesentlichen der Auswahl einer bestimmten Zielsequenz
Teil 2. Durchführung einer BLAST-Suche nach Off-Target-Sequenzen	<ul style="list-style-type: none"> • BLAST-Abfragesequenzen müssen in 5'-zu-3'-Richtung geschrieben werden, können aber von beiden DNA-Strängen stammen • Die Kursteilnehmenden verwenden BLAST, um Off-Target-DNA-Sequenzen zu finden, die mit ihrer DNA Kandidatensequenz ganz oder teilweise übereinstimmen. Sie suchen nicht nach RNA-Sequenzen • Option: Wenn eine Gruppe mehrere Kursteilnehmende hat, kann jede/r die eigenen Kandidatensequenzen mit einer der vier PAM-Sequenzoptionen (5'-AGG, 5'-TGG, 5'-CGG und 5'-GGG) abfragen. Bitte beachten Sie die Hinweise oben zur Gestaltung der Lerneinheit und deren Einschränkungen
Teil 3. Bewertung der Kandidatenzielsequenzen	<ul style="list-style-type: none"> • Die Kursteilnehmenden werden eventuell auf Zugangsnummern für lange Sequenzen stoßen, die mehrere unabhängige Gene enthalten, von denen jedes seine eigene Zugangsnummer hat. Diese Gene sind demnach doppelt in der Datenbank vorhanden. Der Einfachheit halber ist es möglicherweise am besten, wenn die Kursteilnehmenden solche langen Sequenzen bei der Analyse ihrer Ergebnisse ignorieren Beispiel: NG_000007.3 ist ein langes DNA-Fragment, das fünf Globin-Gene enthält, darunter <i>HBB</i>, das auch separat unter der Zugangsnummer NG_059281.1 verzeichnet ist • Bei der Erarbeitung von Suchkriterien könnten die Kursteilnehmenden zum Beispiel Folgendes berücksichtigen: <ul style="list-style-type: none"> – ob eine potenzielle Off-Target-Sequenz in der richtigen Orientierung an eine PAM-Sequenz angrenzt – wie viele potenzielle Off-Target-Sequenzen vollständig mit der Zielsequenz übereinstimmen – wie viele potenzielle Off-Target-Sequenzen mit mindestens 80 % (bzw. einem anderen Prozentanteil) der Zielsequenz übereinstimmen – die Position und das Muster von Fehlpaarungen zwischen einer potenziellen Off-Target-Sequenz und einer Target-Sequenz (vom PAM entfernt oder in der Nähe des PAM) • Die Kursteilnehmenden sollten bei ihren Suchkriterien zwei Aspekte des Risikos für Off-Targets berücksichtigen: den Grad des Risikos, dass eine bestimmte Off-Target-Stelle geschnitten werden könnte, und die Menge riskanter Off-Targets, die es für eine einzelne Zielsequenz gibt

Anhang A

Strukturierte Debatte der Kursteilnehmenden über CRISPR-Geneditierung

Dem enormen Potenzial der CRISPR-Geneditierungstechnologie zur Lösung von Problemen in der Medizin, Landwirtschaft und Umweltpflege steht ein mindestens ebenso großes Missbrauchspotenzial gegenüber. Zwar sind die ethischen Debatten um die Gentechnik nicht neu, aber die Tatsache, dass CRISPR genauer und einfacher durchzuführen sein könnte als andere Technologien, hat von neuem Bedenken hinsichtlich seiner Anwendungen entfacht. Eine Debatte bietet den Kursteilnehmenden die Gelegenheit, an den laufenden öffentlichen Diskussionen über die CRISPR-Technologie teilzuhaben und ihr Verständnis der wissenschaftlichen Fakten zu stärken.

Themenschwerpunkte

- An welchem Punkt überwiegt das Risiko eines unbeabsichtigten Off-Target-Editings das Potenzial für eine Heilung oder Behandlung einer schweren Erkrankung?
- Sollte die Keimbahn-CRISPR-Gentherapie erlaubt sein? Solche Veränderungen könnten genetische Krankheiten eliminieren, aber könnte es auch unbeabsichtigte Folgen für eine Bevölkerungsgruppe geben?
- Wenn CRISPR verwendet werden kann, um Krankheiten auszumerzen, sollte es dann auch zur genetischen Verbesserung verwendet werden, zum Beispiel, um die Augenfarbe, die Intelligenz, sportliche Fähigkeiten oder Körpergröße zu verändern?
- Wer sollte entscheiden, welche genetischen Veränderungen erlaubt oder verboten sind?

Tag eins – Vorbereitung

1. Suchen Sie einen aktuellen Artikel, der einen bestimmten Anwendungsfall einer CRISPR-basierten Geneditierungstechnologie beschreibt. Verwenden Sie einen Artikel, in dem die jeweils verwendeten Techniken erklärt werden.
2. Teilen Sie die Klasse nach dem Zufallsprinzip in zwei Gruppen: die eine Gruppe ist Befürworter der Anwendung der CRISPR-Geneditierungstechnologie in dem Artikel, die andere Gruppe ist dagegen.
3. Erklären Sie das Format der Debatte und lassen Sie jedes Team einen Gruppenführer auswählen.

Tag zwei bis fünf – Recherchearbeit der Kursteilnehmenden

4. Verteilen Sie den Artikel an die Kursteilnehmenden. Lassen Sie die Kursteilnehmenden weitere Nachforschungen zu dem Fall anstellen und ihre Ergebnisse im Pro/Contra-Datenblatt auf Seite 22 festhalten; vergeben Sie optional Hausaufgaben.
5. Die Teams sollen die Rechercheergebnisse aller Gruppenmitglieder zusammentragen.
6. Fordern Sie die beiden Teams auf, jeweils eine 4-minütige eröffnende Stellungnahme zu verfassen und einen Sprecher zu wählen.

Tag sechs – Die Debatte**Tabelle 4. Format der Debatte.**

Abschnitt	Erforderliche	Zeit
Eröffnende Stellungnahme	4 min	Die Befürworter tragen eine eröffnende Stellungnahme zur Unterstützung ihrer Argumentation vor
Pause	2 min	Die Gegner stellen eine Liste von Fragen zusammen, von denen sie glauben, dass sie Lücken in der Argumentation der Befürworter aufzeigen
Fragen	2 min	Die Gegner präsentieren ihre Fragen
Eröffnende Stellungnahme	4 min	Die Gegner tragen eine eröffnende Stellungnahme mit Gegenargumenten vor
Pause	2 min	Die Befürworter stellen eine Liste von Fragen zusammen, von denen sie glauben, dass sie Lücken in der Argumentation der Gegner aufzeigen
Fragen	2 min	Die Befürworter präsentieren ihre Fragen
Widerlegung	2 min	Die Befürworter präsentieren Antworten auf die Fragen der Gegner
Widerlegung	2 min	Die Gegner präsentieren Antworten auf die Fragen der Befürworter
Abschließende Stellungnahmen	3 min	Gegnerische Sichtweise
Abschließende Stellungnahmen	3 min	Befürwortende Sichtweise

Beurteilungskriterien

	4	3	2	1
Eröffnende Stellungnahmen	Gut formuliert, sehr gut gegliedert, recherchiert und präsentiert	Gut gegliedert, recherchiert und präsentiert	Einigermaßen gegliedert, recherchiert und präsentiert	Mängel in der Gliederung, nur teilweise korrekt recherchiert, nicht gut präsentiert
Fragen	Die Fragen waren durchdacht, warfen berechnete Bedenken auf, beruhten auf Recherchen und wurden gut präsentiert	Die Fragen waren einigermaßen durchdacht, warfen einige Bedenken auf, und wurden gut präsentiert	Die Fragen beruhten nicht auf Recherchen, warfen keine berechtigten Bedenken auf oder waren nicht gut präsentiert	Die Fragen bezogen sich nicht auf das Thema, warfen keine berechtigten Bedenken auf oder waren nicht gut präsentiert
Widerlegung	Die Kursteilnehmenden verwendeten Recherchedaten und Schlussfolgerungen, um die Argumente direkt zu widerlegen	Die Kursteilnehmenden verwendeten Recherchedaten und Schlussfolgerungen, um die Argumente teilweise zu widerlegen	Es gelang den Kursteilnehmenden nicht, anhand von Recherchedaten und Schlussfolgerungen die Argumente zu widerlegen	Den Kursteilnehmenden gelang es nicht, die Argumente zu widerlegen
Abschließende Stellungnahmen	Die abschließende Stellungnahme war gut formuliert, sehr gut gegliedert, recherchiert und präsentiert	Die abschließende Stellungnahme war gut gegliedert, recherchiert und präsentiert	Die abschließende Stellungnahme war einigermaßen gegliedert, recherchiert und präsentiert	Die abschließende Stellungnahme hatte Mängel in der Gliederung, war nur teilweise korrekt recherchiert und nicht gut präsentiert
Mitarbeit als Teil eines Teams (Beurteilung durch Teamkollegen)	Brachte sich in vollem Umfang ein und leistete einen Beitrag zum Team	Brachte sich ein und leistete einen Beitrag zum Team	Brachte sich teilweise ein, war für das Team einigermaßen hilfreich	Brachte sich wenig ein, war für das Team wenig hilfreich

Pro/Contra-Datenblatt

Erstellen Sie eine Liste der Vorteile der Verwendung der CRISPR-Geneditierungstechnologie, die im Artikel erwähnt werden (inkl. Literaturverweise).

Erstellen Sie eine Liste der negativen Folgen der Verwendung der CRISPR-Geneditierungstechnologie, die im Artikel erwähnt werden (inkl. Literaturverweise).

Berücksichtigen Sie Forschungsdaten, welche die Behauptungen der jeweils anderen Gruppe widerlegen können. Bauen Sie diese in Ihre eröffnende bzw. abschließende Stellungnahme ein.

Anhang B

CRISPR-Cas9 als mikrobielles Immunsystem

Tiere haben ein komplexes Immunsystem, das die koordinierten Aktivitäten mehrerer Zelltypen, Organe und Signalsysteme umfasst, um aktive Infektionen zu erkennen und darauf zu reagieren. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass Prokaryoten, also Bakterien und Archaeen, ebenfalls über eine Form der adaptiven Immunität verfügen, die es ihnen ermöglicht, Virusinfektionen zu erkennen und darauf zu reagieren: das CRISPR-Cas-System.

Einige prokaryotische Genome enthalten kurze, palindromische DNA-Sequenzen, die viele Male wiederholt werden. Zwischen den Wiederholungen befindet sich eine individuelle Abstandshalter- bzw. „Spacer“-Sequenz. Diese Sequenzwiederholungen werden als „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ bzw. CRISPR bezeichnet (Abbildung 3). Auf jede palindromische Wiederholung folgen kurze Segmente von Spacer-DNA, die mit DNA-Sequenzen übereinstimmen, die in Bakteriophagen-Genomen gefunden werden (Bakteriophagen sind Viren, von denen bekannt ist, dass sie Bakterien infizieren). Neben CRISPR-Sequenzen sind auch Gruppierungen von CRISPR-assoziierten bzw. Cas-Genen vorhanden. Diese Cas-Gene codieren Enzyme, die DNA, wie präzise molekulare Scheren, an bestimmten Stellen schneiden.

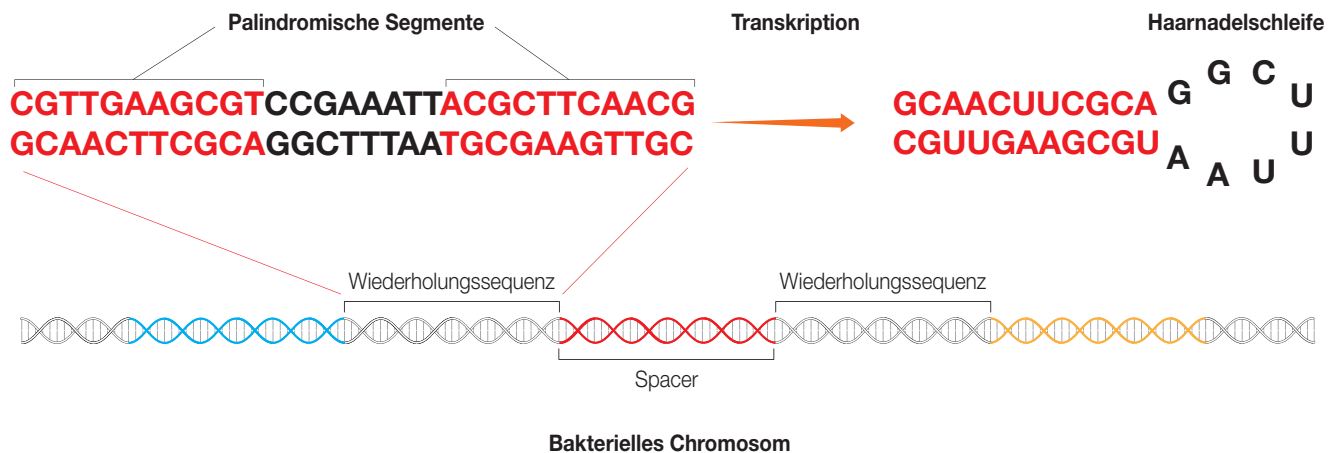


Abb. 3 Eine Region eines bakteriellen Genoms mit gruppierte kurze palindromische Wiederholungen mit regelmäßigen Abständen („Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats“ bzw. CRISPR). Prokaryotische Genome enthalten Cluster von palindromischen Wiederholungen. Diese Wiederholungen sind durch kurze Segmente von Spacer-DNA getrennt (in regelmäßigen Abständen unterbrochen). Diese CRISPR-Segmente treten neben Gruppierungen von CRISPR-assoziierten bzw. Cas-Genen auf. Diese codieren Cas-Enzyme, die DNA schneiden können. Bei einer palindromischen Wiederholung ist die Nukleotidsequenz in beiden Richtungen gleich, und bei der Transkription bildet die resultierende RNA eine Struktur mit mehreren Haarnadelschleifen.

Im Jahr 2007 gelang es, diese merkwürdigen Fakten miteinander zu kombinieren, indem gezeigt wurde, dass CRISPR- und Cas-Gene zusammenarbeiten, um eine Form der Immunantwort auf die Invasion von Bakteriophagen bereitzustellen (Barrangou et al. 2007), die drei Phasen umfasst (Abbildung 4):

- **Schneiden und Einsetzen** – Wenn Bakterien mit einem Virus infiziert werden, verwenden sie Komponenten ihres CRISPR-Systems, um die eindringende virale DNA zu zerschneiden und Teile davon (Spacer) als „Erinnerung“ an die Infektion in ihr eigenes Genom einzufügen.
- **Überwachung** – Bakterien transkribieren die Spacer in RNA, die mit dem Cas-Enzym einen Komplex bilden kann. Diese Komplexe verwendet die Zelle zur Überwachung auf eine DNA-Sequenz, die zu der RNA komplementär ist.
- **Abwehr** – Wenn übereinstimmende (virale) DNA gefunden wird, bindet der Spacer-RNA-Cas-Komplex daran und schneidet die virale DNA, um sie an der Replikation zu hindern. Dadurch wird die Virusinfektion gestoppt.

Mit diesem System können Bakterien Sequenzen von vielen verschiedenen infizierenden Viren sammeln, um eine „Bibliothek“ zu erstellen. Da die CRISPR-Sequenz in genomischer DNA enthalten ist, wird sie an jede Generation weitergegeben, und die Bibliothek wird mit der Zeit immer größer.

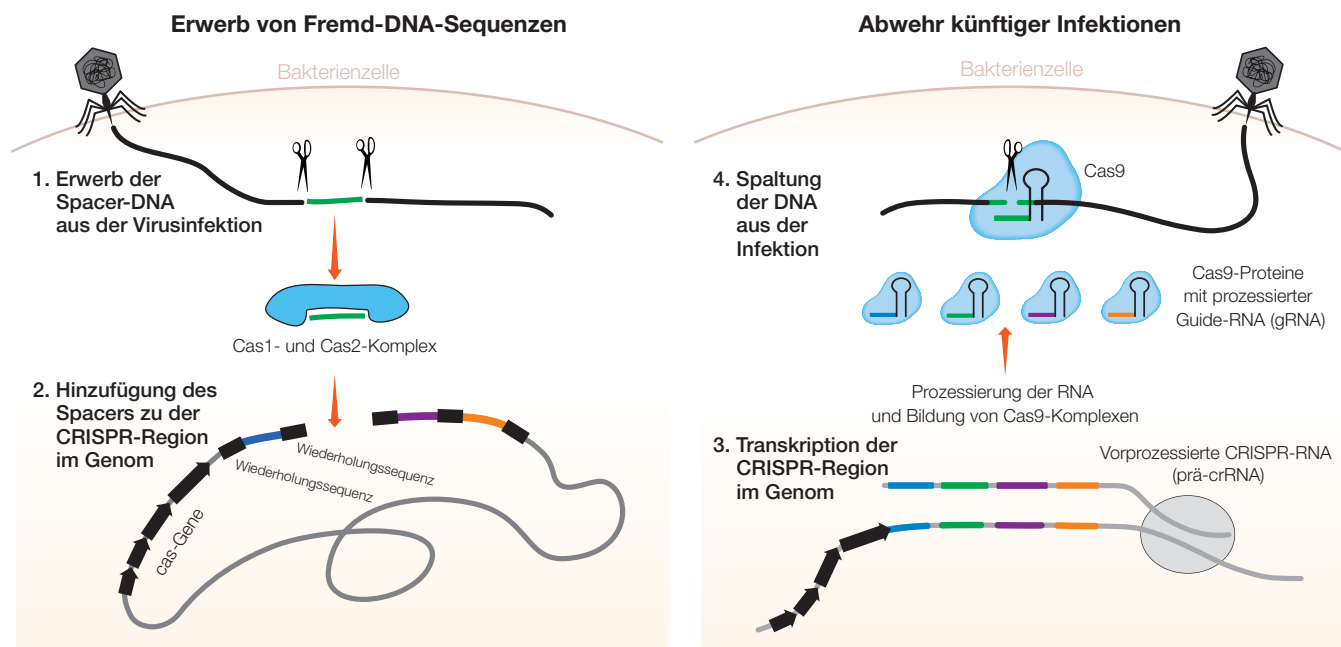


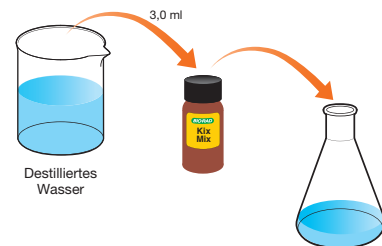
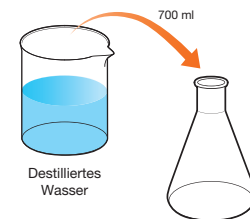
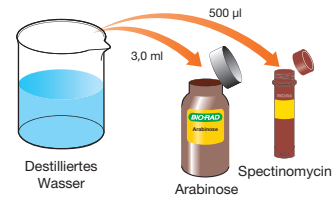
Abb. 4 Das mikrobielle CRISPR-Cas9-Abwehrsystem. 1. Die Cas1-Cas2-Enzyme des Mikroorganismus erkennen Fremd-DNA und schneiden ein Segment heraus. 2. Die Cas1-Cas2-Enzyme fügen den DNA-Abschnitt als Spacer in die CRISPR-Region ihres eigenen Genoms ein. 3. Eine Spacer-Sequenz wird transkribiert und dann mit einem Cas9-Protein verknüpft. 4. Bei einer erneuten Infektion durch denselben Eindringling kann der CRISPR-Cas9-Komplex die fremde DNA-Sequenz erkennen und schneiden, um eine vollständige Infektion zu verhindern.

Anhang C

Hinweise zur Herstellung von LB-Agarplatten mit einer kleinen Mikrowelle

Wenn Ihre Mikrowelle für einen 1 l-Kolben zu klein ist, gehen Sie nach der folgenden Anleitung vor, bei der 500 ml-Kolben für die Mikrowelle verwendet werden, um LB-Agarplatten vorzubereiten. Die anschließenden Schritte sind dann dieselben wie im normalen Verfahren.

1. Beschriften Sie einen 500 ml-Kolben mit **KIX** und zwei 500 ml-Kolben mit **KIX/SPT**.
2. Geben Sie 3,0 ml destilliertes oder entsalztes Wasser in das Fläschchen mit Arabinose. Mischen Sie die Flüssigkeit etwa 30 Sekunden lang auf dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren, damit sich die Arabinose leichter löst. Wiederholen Sie das Mischen auf dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren alle paar Minuten, bis die Arabinose vollständig gelöst ist (kann mehr als 10 Minuten dauern).
3. Geben Sie 500 µl destilliertes Wasser in das Fläschchen mit Spectinomycin. Mischen Sie die Flüssigkeit auf dem Vortexmischer oder durch Auf- und Abpipettieren, bis sich das Spectinomycin gelöst hat.
4. Geben Sie 700 ml destilliertes oder entsalztes Wasser in einen leeren 1 l-Kolben.

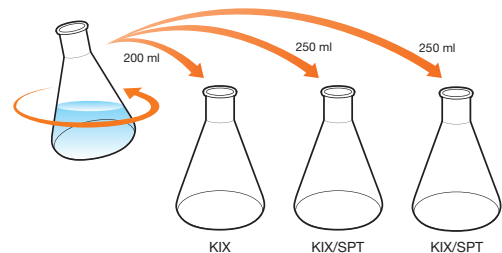


5. Geben Sie 3,0 ml destilliertes Wasser in das Fläschchen mit KIX Mix, verschließen Sie es mit dem Deckel und schütteln Sie es 5 Sekunden, um den Inhalt zu mischen. Gießen Sie die Aufschlämmung von KIX Mix in den 1 l-Kolben.

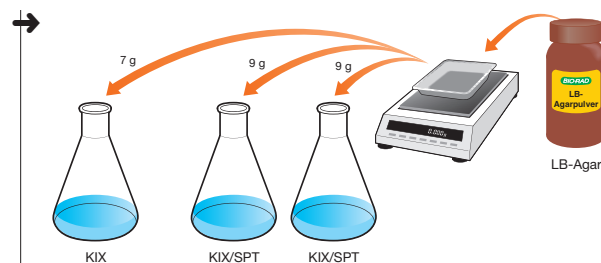
Sicherheit! Der KIX Mix enthält Kanamycin, IPTG und X-Gal, die bei Einatmen gesundheitsschädigend sind. Entnehmen Sie das trockene KIX Mix-Pulver erst nach Zugabe von Wasser aus dem Fläschchen.

Hinweis: Der KIX Mix löst sich nicht vollständig auf und kann klumpig aussehen.

6. Wiederholen Sie Schritt 5 mindestens zweimal, um das KIX Mix-Fläschchen gründlich zu spülen. Überprüfen Sie, ob der gesamte Inhalt des Fläschchens in den Kolben gelangt ist.
7. Schwenken Sie die Lösung für 20 Sekunden oder solange, bis das unlösliche weiße Pulver gleichmäßig suspendiert ist. Geben Sie sofort 200 ml in den **KIX**-Kolben. Schwenken Sie die Suspension nochmals kurz und gießen Sie sofort 250 ml in jeden mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben.



8. Geben Sie 7 g LB-Agar-Pulver in den mit **KIX** beschrifteten Kolben. Geben Sie 9 g LB-Agar-Pulver in jeden der mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben. Zum Mischen schwenken.

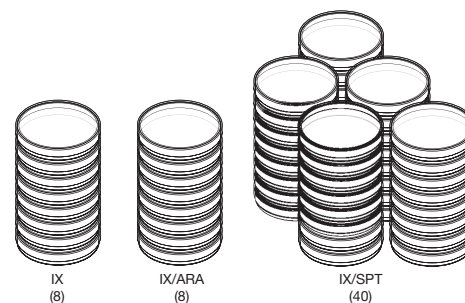


9. Stellen Sie jeden Kolben in die Mikrowelle und bringen Sie den Inhalt drei Mal zum Sieden, aber achten Sie darauf, dass der Inhalt nicht überkocht. Starten Sie mit 3 Minuten und verlängern Sie bei Bedarf um jeweils 1 Minute.

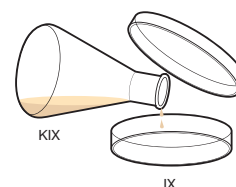


Hinweis: Verwenden Sie einen Untersetzer bzw. einen Handschuh bei der Arbeit mit dem heißen Kolben. Achten Sie darauf, dass der LB-Agar nicht überkocht. Verwenden Sie eine niedrigere Einstellung der Mikrowelle und behalten Sie den Agar sorgfältig im Auge. Lassen Sie den geschmolzenen Agar etwas abkühlen, bevor Sie ihn schwenken, damit er nicht überkocht.

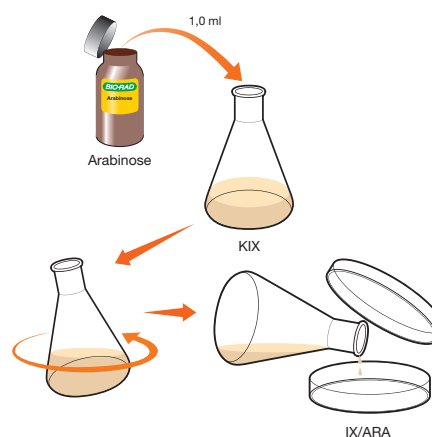
10. Beschriften Sie acht Platten mit **IX**, acht Platten mit **IX/ARA** und 40 Platten mit **IX/SPT**.



11. Befüllen Sie schnell acht **IX**-Platten zu einem Drittel bis zur Hälfte (~10 ml) mit geschmolzenem **KIX** LB-Agar.



12. Geben Sie 1,0 ml rehydratisierte Arabinose zu dem restlichen geschmolzenen **KIX** LB-Agar. Schwenken Sie den Behälter, um seinen Inhalt zu mischen, und befüllen Sie acht **IX/ARA**-Platten ungefähr zu einem Drittel bis zur Hälfte (~10 ml) mit dem geschmolzenen Agar.



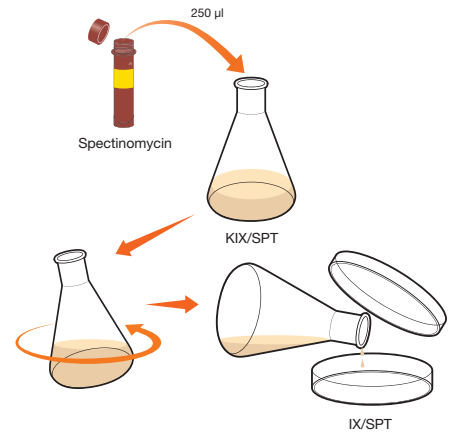
13. Sobald die mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben so weit abgekühlt sind, dass man sie in der Hand halten kann (etwa 50 °C), geben Sie in jeden mit **KIX/SPT** beschrifteten Kolben 250 µl rehydratisiertes Spectinomycin. Zum Mischen Schwenken und mindestens 40 **IX/SPT**-Platten zu einem Drittel bis zur Hälfte (~10 ml) mit dem geschmolzenen **KIX/SPT** LB-Agar befüllen. Etwaige überzählige gegossene Platten können bei Bedarf als Ersatzplatten verwendet werden.

Hinweis: Spectinomycin wird durch zu hohe Temperaturen (> 60 °C) zerstört. Geben Sie das Spectinomycin erst hinzu, wenn der Agar ausreichend abgekühlt ist, um den Kolben anfassen zu können. Allerdings erstarrt der Agar bei 27 °C, daher müssen die Platten gegossen werden, bevor er zu stark abgekühlt ist. Sie können Ihre Kolben in ein 50 °C warmes Wasserbad stellen, um zu verhindern, dass der Agar zu schnell abkühlt.

14. Lassen Sie die Platten nach dem Erstarren des Agars (~30 min) zwei Tage bei Raumtemperatur vor Licht geschützt trocknen (nicht in Folie einwickeln).

Hinweis: Die Zusatzstoffe in **KIX** Mix sind lichtempfindlich, aber die Platten sollten während des Trocknens nicht eingepackt werden. Das zweitägige Trocknen der Platten verbessert die Aufnahme der flüssigen Transformationsproben der Kursteilnehmenden.

15. Wickeln Sie die Plattenstapel nach dem Trocknen in Alufolie ein, um sie vor Licht zu schützen. Anschließend können Sie sie in Plastikfolie einwickeln oder wieder in die Original-Plastikhülle geben. Die Platten umgedreht bei 4 °C im Kühlschrank lagern. Auf diese Weise können die Platten bis zum Gebrauch bis zu zwei Wochen lang aufbewahrt werden.



Ressourcen

Weiteres Unterrichtsmaterial finden Sie auf [bio-rad.com/outoftheblue](https://www.bio-rad.com/outoftheblue).

CRISPR-Technologie (Allgemein)

Adli M (2018). The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 9, 1,911.

Barrangou R (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1,709–1,712.

Carroll D (2017). Genome editing: past, present, and future. *Yale J Biol Med* 90, 653–659.

National Science Foundation (2015). Rewriting genetic information to prevent disease. [nsf.gov/discoveries/disc_summ.jsp?cntn_id=134286&org=NSF](https://www.nsf.gov/discoveries/disc_summ.jsp?cntn_id=134286&org=NSF), Stand: 30. Oktober 2019.

Cong L et al. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas Systems. *Science* 339, 819–823.

Cribbs AP and Perera SMW (2017). Science and bioethics of CRISPR-Cas9 gene editing: an analysis towards separating facts and fiction. *Yale J Biol Med* 90, 625–634.

Jinek et al. (2012). A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.

Ran FA et al. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2,281–2,308.

CRISPR-Anwendung bei humanen Krankheiten

Sichelzellanämie (HBB)

Dever DP et al. (2016). CRISPR-Cas9 β -globin gene targeting in human haematopoietic stem cells. *Nature* 539, 384–389.

Park SH et al. (2019). Highly efficient editing of the β -globin gene in patient-derived hematopoietic stem and progenitor cells to treat sickle cell disease. *Nucleic Acids Res* 47, 7,955–7,972.

Erkrankungen der Herzgefäße (PCSK9)

Ding Q et al. (2014). Permanent alteration of PCSK9 with in vivo CRISPR-Cas9 genome editing. *Circ Res* 115, 488–492.

King A (2018). A CRISPR edit for heart disease. *Nature* 555, S23–S25.

Mukoviszidose (CFTR)

Firth AL et al. (2015). Functional gene correction for cystic fibrosis in lung epithelial cells generated from patient iPSCs. *Cell Reports* 12, 1,385–1,390.

Hodges CA and Conlan RA (2019). Delivering on the promise of gene editing for cystic fibrosis. *Genes Dis* 6, 97–108.

Rechtliche Hinweise

BIO-RAD ist eine Marke der Bio-Rad Laboratories, Inc.

Alle hier genannten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

© 2022 Bio-Rad Laboratories, Inc.

Dieses Produkt ist nicht für die Selbstanwendung bestimmt.

BIO-RAD

**Bio-Rad
Laboratories, Inc.**

Life Science
Group

Website bio-rad.com USA 1 800 424 6723 Australia 61 2 9914 2800 Austria 00 800 00 24 67 23 Belgium 00 800 00 24 67 23 Brazil 4003 0399
Canada 1 905 364 3435 China 86 21 6169 8500 Czech Republic 00 800 00 24 67 23 Denmark 00 800 00 24 67 23 Finland 00 800 00 24 67 23
France 00 800 00 24 67 23 Germany 00 800 00 24 67 23 Hong Kong 852 2789 3300 Hungary 00 800 00 24 67 23 India 91 124 4029300 Israel 0 3 9636050
Italy 00 800 00 24 67 23 Japan 81 3 6361 7000 Korea 82 2 3473 4460 Luxembourg 00 800 00 24 67 23 Mexico 52 555 488 7670
The Netherlands 00 800 00 24 67 23 New Zealand 64 9 415 2280 Norway 00 800 00 24 67 23 Poland 00 800 00 24 67 23 Portugal 00 800 00 24 67 23
Russian Federation 00 800 00 24 67 23 Singapore 65 6415 3188 South Africa 00 800 00 24 67 23 Spain 00 800 00 24 67 23 Sweden 00 800 00 24 67 23
Switzerland 00 800 00 24 67 23 Taiwan 886 2 2578 7189 Thailand 66 2 651 8311 United Arab Emirates 36 1 459 6150 United Kingdom 00 800 00 24 67 23

