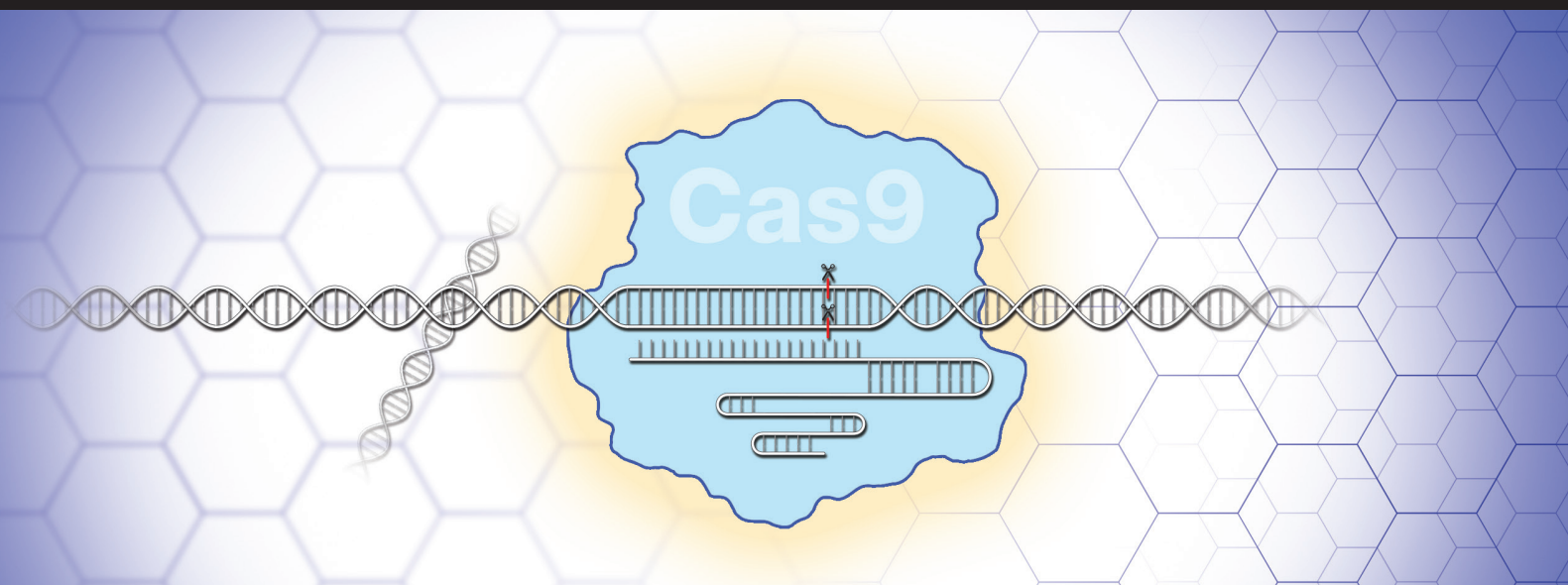


BIO-RAD
Explorer



Out of the Blue CRISPR Kit

Kit nr. 12012608EDU

Elevvejledning

Dansk oversættelse og bearbejdning: Birgit Sandermann Justesen og Solvejg Pedersen, august 2021

BIO RAD

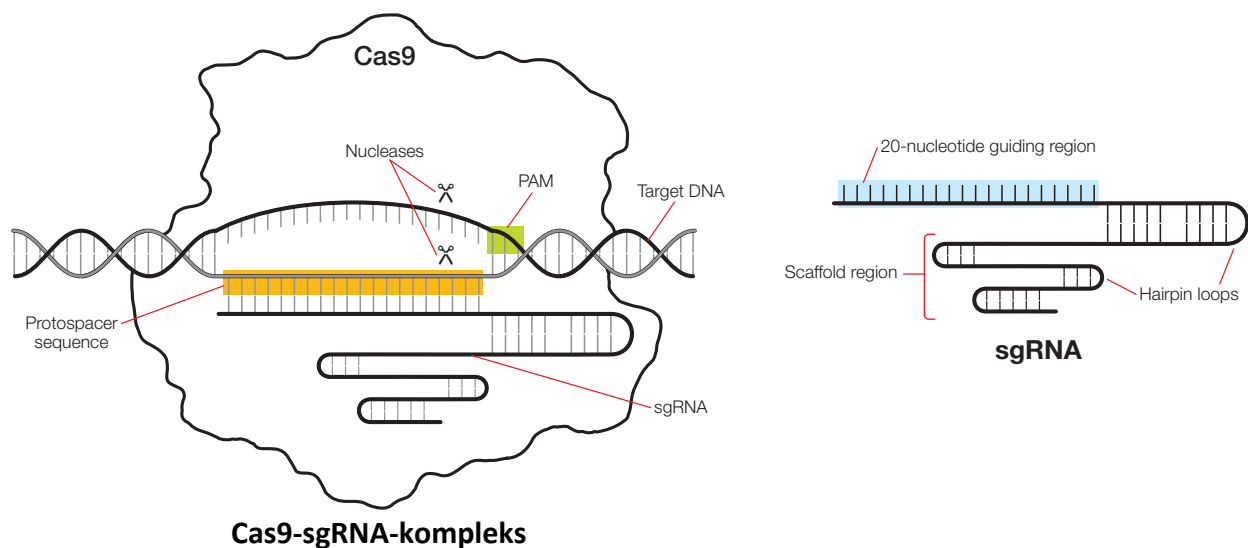
Aktivitet 1

Introduktion til CRISPR-Cas9 Genredigerings-teknologien

Hvad er CRISPR-Cas9 genredigering?

Siden opdagelsen af restriktionsenzym er der udviklet mange nye molekylære værktøjer og teknikker, der i høj grad har udvidet vores muligheder indenfor genteknologien. En af de mest spændende og seneste udviklinger er CRISPR-Cas9-systemet (CRISPR). Begrebet CRISPR refererer til et system, der findes i naturen, som gør det muligt for mikrober at forsvare sig mod virusangreb. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) er sekvenser i genomerne hos nogle prokaryoter, der fungerer som en genomisk registrering af tidligere virusangreb. Sammen med CRISPR-associerede (Cas) proteiner, bruger bakterierne sekvenserne til at genkende og afvæbne fremtidige invaderende vira. Forskere har tilpasset dette system til brug i genteknologien.

Cas9 er den genetiske saks, der blot skal have at vide, hvor den skal klippe henne, før den går i gang. Det får saksen at vide af et vedhæftet stykke RNA, som på grund af sin genetiske sekvens matcher givne DNA-sekvenser i andre organismer. Saksen klipper, hvor dens RNA-sekvens finder et DNA-match. Der findes andre programmerbare redigeringsværktøjer, men det, der gør Cas9 så kraftfuld, er kombination af dens præcision og enkelhed.



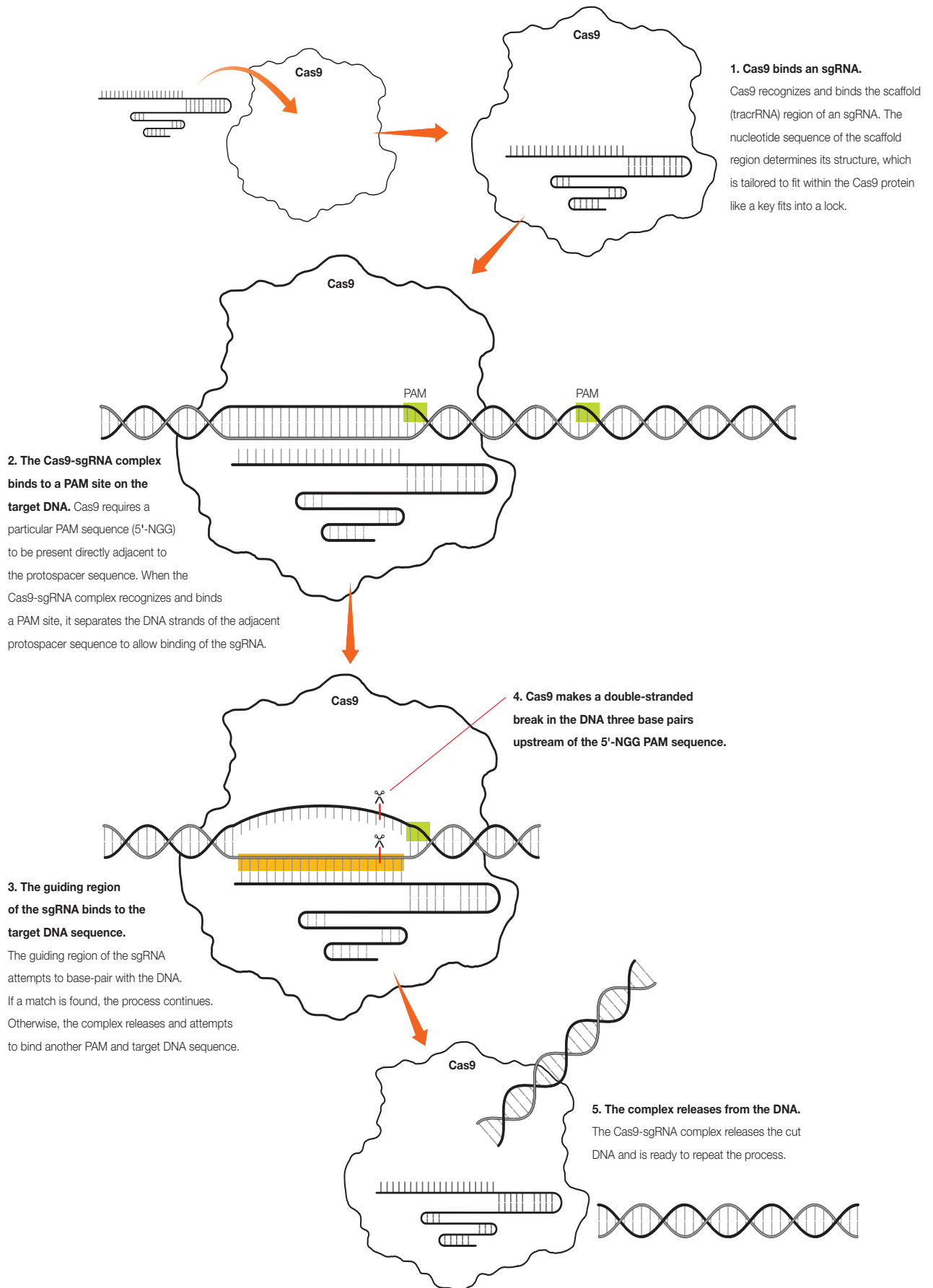
Figur 1: Opbygningen af Cas9 og sgRNA

CRISPR-Cas9-systemet består af følgende komponenter - se figur 1:

- **Cas9-enzym (Cas9)** - en bakteriel endonuklease, der danner et dobbeltstregnet brud (klipper) DNA på et specifikt sted inden for en større genkendelsessekvens eller målsted. Cas9-genkendelsessekvensen inkluderer en 20-nukleotidsekvens kaldet en protospacer, der bestemmes af en RNA-guide bundet til enzymet

- **Single guide RNA (sgRNA)** - en konstrueret form for RNA-guide, der danner et kompleks med Cas9. SgRNA er en cirka 100 nukleotid-lang sammensmeltning af to områder, der forekommer som separate RNA'er i naturen:
 - **Guiding region:** Den styrende del af CRISPR-RNA eller crRNA i naturen, er en ca 20-nukleotidsekvens der er komplementær til mål-DNA-sekvensen, og som definerer, hvor Cas9 klipper. Forskere kan let tilpasse denne sekvens til deres egne mål.
 - Det transaktiverende CRISPR-RNA eller tracrRNA er den del, der binder tæt i en sprække af Cas9-proteinet. Sekvensen for denne region er typisk den samme for alle sgRNA'er
 - **Protospacer (PAM-sekvensen)** er nødvendig for Cas9-funktionen. Cas9 genkender PAM-sekvensen 5'-NGG, hvor N kan være et hvilket som helst nukleotid (A, T, C eller G). Når Cas9 binder til PAM, adskiller den DNA-strengene i den tilstødende sekvens for at tillade binding af sgRNA. Hvis sgRNA er komplementær til den sekvens, skærer Cas9 i DNA'et.

Se figur 2



Aktivitet 1 - del 1

Simulering af mekanismen bag Cas9 DNA-klipning

For at blive klogere på CRISPR-teknologien og den praktiske del i den næste aktivitet, arbejdes der først med en papirmodel. Papirmodellen tager jer igennem CRISPR-Cas9-klipningen ved at benytte en sekvens fra det bakterielle gen *LacZ* som styrer dannelsen af beta-galactosidase. *LacZ*-genet er en del af operon-systemet, som gør det muligt for bakterier at bruge lactose som energikilde.

1. Klip sgRNA'ernes og DNA-strimlerne ud (se side 21 og 22). Cas9 kan forblive på printet.

2. Brug derefter figur 2 som guide og følg figuren trin for trin

- Cas9 binder til en sgRNA: Placer sgRNA1 på Cas9-tegningen ved at følge den stiplede linje
- Cas9-sgRNA-komplekset binders til et PAM-sted. Placer strimmel 1 på strimlen, der går på tværs af Cas9-modellen. Flyt strimlen indtil PAM-boxen på Cas9proteinet matcher en PAM (5'-NGG) sekvens på DNA.
- Guiding regionen på sgRNA skal binde til en DNA-målsekvens. Tjek om DNA-sekvensen er komplementær med sgRNA-sekvensen (U parrer med A, C parrer med G). Hvis de er komplementære, fortsættes processen. Ellers gentages punkt 2 a og 2 b indtil der findes en korrekt placering.
- Cas9 laver et dobbeltstrenget brud i DNA: Saksen indikerer, hvor Cas9 klipper. DNA-strengen. Brug en lineal til at lave en vertikal linje gennem klipningspunktet.

3. Bevis, at du har valgt den rigtige klipning og klip derefter strimlen det korrekte sted. GEM DNA-strimlen til del 4

Fokuspørgsmål:

- Hvor mange nucleotider indeholder sgRNA?
- Kan sgRNA binde til PAM?
- Set i forhold PAM sekvensen, hvor klipper Cas9?

Aktivitet 1 - del 2

Design en Guiding region i sgRNA

CRISPR-teknologien er kraftfuld, fordi DNA-målsekvensen styres af et sgRNA, der kan tilpasses. I denne aktivitet skal I tilpasse styringsområdet for sgRNA så den klipper i et målsted på *lacZ*-genet. DNA-strimmel 2 repræsenterer en DNA-sekvens fra *lacZ*-genet, hvor man ønsker at foretage en editering.

- Brug sgRNA 2, DNA-strimmel 2 og de trin, du fulgte i del 1, til at bestemme den sekvens, der skal styre sgRNA-regionen, til at dirigere Cas9 til at klippe DNA-strimmel 2 ved den røde stiplede linje.
- Skriv nukleotiderne (A, U, C, G) i denne sekvens ind i mellemrummene på sgRNA 2.
- Brug trinene i Cas9 DNA-klipningen til at bekræfte, at den sekvens, du skrev på sgRNA 2 er korrekt.
- Skriv din færdige kode ned her:

sgRNA guiding region sekvens

Fokusspørgsmål:

- Beskriv med egne ord, hvordan PAM-sekvensens 'krav' påvirker fleksibiliteten af CRISPR-Cas9-genets editering.
- Beskriv med egne ord, hvordan man identificerer et DNA-målklipningssted til CRISPR-Cas9 og designe en sgRNA.

Aktivitet 1 - del 3

Sammenligning af forskellige metoder, der kan klippe i DNA

Fleksibiliteten og specificiteten af CRISPR-Cas9-teknologien giver store muligheder for geneditering. Den første DNA "saks" var restriktionszymer, der klippede DNA ved foruddefinerede sekvenser, typisk 4-8 basepar lange. F.eks. vil EcoRI, et restriktionsenzym, der findes i *E. coli*, klippe dobbeltstrenget DNA ved hver GAATTC-sekvens. Hvis EcoRI blev føjet til en prøve, der indeholdt hele det menneskelige genom, vil det klippe ved hver GAATTC-sekvens. Vi kan beregne sandsynligheden for hvor mange gange en bestemt nukleotidsekvens, såsom GAATTC, vil forekomme i et genom. Tabel 1 nedenfor viser de beregnede sandsynligheder for at finde sekvenser af bestemte længder. Disse beregninger er baseret på den antagelse, at DNA-sekvenser er helt tilfældige, og at hver nukleotidposition har lige stor sandsynlighed for at være A, T, C eller G. Brug tabellen til at besvare de efterfølgende spørgsmål.

Sekvens	Sekvens-længde	Sandsynlighedsberegning	Formodet antal i det menneskelige genom
A	1	$1/4 = (1/4)^1 = 0,25$	808.707.500
AC	2	$1/4 * 1/4 = (1/4)^2 = 0,0625$	202.176.875
GAATTC (EcoRI)	6	$1/4 * 1/4 * 1/4 * 1/4 * 1/4 * 1/4 = (1/4)^6 = 2,44 \times 10^{-4}$	789.753
NNNN.....	n	$1/4 * 1/4 * 1/4 * \dots = (1/4)^n$	$(1/4)^n * 3.234.830.000$

Fokusspørgsmål:

- Hvad er sandsynligheden for at en base i en sekvens er adenin? Hvor mange gange forventer du at finde A i det humane genom?
- Hvad er sandsynligheden for at finde en bestemt to-parsekvens? Hvor mange gange forventer du at finde den samme sekvens i det humane genom?
- Hvor mange gange forventer du at finde en EcoRI-klipningssekvens i et DNA-fragment på 1000000 baser?
- Hvor mange gange vil du forvente at finde en specifik 20-basepar-sekvens i det humane genom?
- Skriv den fulde ligning op, som skal bruges til at forudsige forekomsten af en sekvenslængde på n baser i et DNA-fragment med længden X.
- Forklar matematisk, hvorfor det er mere brugbart i genterapi at bruge CRISPR-Cas9-teknologien end at bruge klassiske restriktionszymer.
- Skriv tre forskellige ideer, hvor du mener at CRISPR-Cas9-teknologien er smartere end andre metoder, hvor man ændrer i generne.
- I virkeligheden er DNA-sekvensen af det menneskelige genom IKKE tilfældig. Nogle sekvenser, herunder nogle meget store sekvenser, gentages mange gange i hele det menneskelige genom. Nævn to årsager til, hvordan dette faktum komplicerer brugen af CRISPR-genediteringsteknologi hos mennesker.

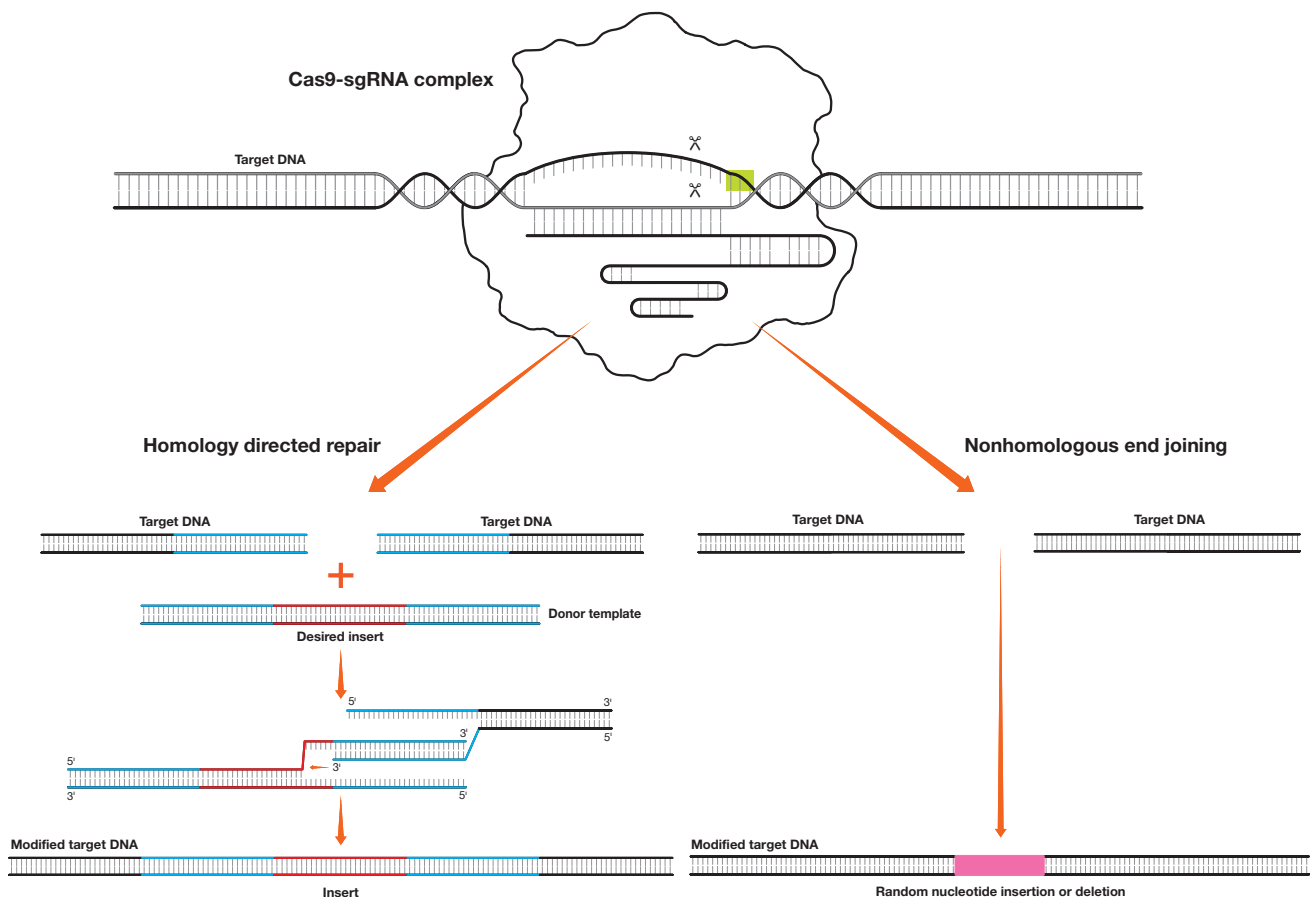
Aktivitet 1 - del 4

Design af donor-template DNA til DNA-reparation

CRISPR-Cas9 kan finde en specifik sekvens i et genom der er milliarder af basepar lang og derefter klippe på et præcist sted inden for denne sekvens. Hvordan kan forskere bruge CRISPR-Cas9's specificitet til at styre målrettet geneditering?

Når kromosomt DNA i en bakteriecelle klippes, dør cellen, medmindre den er i stand til at reparere snittet. Bakterier har udviklet processer til reparation af dobbeltstrengede DNA-brud, der ellers ville føre til celledød. DNA-reparation kan ske på to måder, som vist i figur 3:

- Ikke-homolog endeforbindelse (NHEJ)-enzymet forbinder enderne af det dobbeltstrengede brud sammen igen. Denne proces kan tilfældigt indsætte eller slette en eller flere baser og kan forårsage mutationer, der kan forstyrre genfunktionen eller ekspressionen.
- Homologi dirigeret reparation (HDR)-enzymet lapper bruddet ved hjælp af donor-skabelon-DNA. Forskere designer donorskabelon-DNA'et, som kan omfatte en ønsket sekvens flankeret på begge sider af "homologi -arme", der matcher sekvensen opstrøms og nedstrøms for snittet. En komplementær DNA -streng oprettes under reparation.



Figur 3: DNA-reparation med homolog dirigeret reparation og ikke-homolog dirigeret reparation.

De homologiarme, der bruges i HDR, kan være hundredvis af basepar lange eller længere. For nemheds skyld skal I simulere grundlæggende HDR i denne aktivitet ved hjælp af meget kortere,

kun 15 bp lange homologiske arme. Design en donorskabelon-DNA-sekvens, der kan bruges til at indsætte en sektion af DNA på det klippede sted, som blev dannet i DNA-strimmel 1.

1. Hent de to stykker DNA-strimmel 1. Hvis I ikke allerede har brugt en saks til at klippe strimlen på klipningsstedet, gøres det nu.
2. Klip donorskabelonens DNA-strimmel og en tom DNA-strimmel ud.
3. Det skraverede område på donorskabelonen simulerer en uspecifik DNA-indsættelsessekvens. I de tomme kasser på hver side af det skraverede område og på begge strenge, skrives de 15 bp sekvenser, der matcher nukleotidsekvenserne på hver side af det klippede sted i DNA-strimmel 1. Disse 15 bp sekvenser er jeres homologi-arme.
4. I har nu et komplet donorskabelon-DNA.
5. Brug en saks til at klippe de overskydende ender af donorskabelonstrimlen.
6. Læg stykkerne af DNA-strimmel 1 direkte oven på donorskabelonstrimlens nukleotid-sekvenser, så homologi-armene er justeret, og kun indsættelsessekvensen er synlig. Tape stykkerne sammen.
7. I har nu et redigeret stykke DNA.

Brug den blanke DNA-strimmel sammen med resten af papirmodelstykkerne til at designe donorskabelonsekvenser med 15 bp homologi-arme, der vil fremkalde hver af følgende ændringer af DNA-strimmel 1 ved hjælp af sgRNA 1. I skal inkludere alle nødvendige indsættelsessekvenser samt homologi-armsekvenser. Skriv de sidste sekvenser ind i nedenstående tabel. Understreg de homologiske armområder.

Ønsket ændring	Donor-template-DNA-sekvens
Der skal opstå frameshift	
Indsætte et EcoRI-restriktionssted	

Fokusspørgsmål:

- A. Beskriv to mulige fordele ved at bruge HDR frem for brug af NHEJ i et genediteringseksperiment.
- B. Beskriv to mulige fordele ved at bruge NHEJ frem for brug af HDR i et genediteringseksperiment.
- C. Forklar, hvordan CRISPR-Cas9 sammen med HDR kan bruges til at ændre et enkelt nukleotid, f.eks. ændre et T til et A.
- D. Ud over at indsætte eller udveksle sekvenser er det muligt at fjerne korte sekvenser nær et klippet sted ved hjælp af HDR. Tænk på og beskriv en idé til, hvordan donorskabelon-DNA-sekvensen kan designes til at opnå en sådan fjernelse. Kig på nettet efter behov for at få mere viden om HDR.

Aktivitet 2

LacZ CRISPR Gen-editeringslaboratorium (forsøg)

I denne aktivitet bruges CRISPR-Cas9 til at skære det bakterielle kromosom-DNA i *lacZ*-genet, som koder for enzymet beta-galactosidase (β -gal). *LacZ*-genet er en del af lac-operon, en samling af gener, der gør det muligt for bakterier at bruge lactose, mælkesukker, som energikilde. β -gal nedbryder også den farveløse forbindelse X-gal i to stykker, hvoraf den ene er dybblå. Hvis β -gal udtrykkes af bakterier i nærværelse af X-gal, bliver de blå. I mange år har molekylærbiologer brugt *lacZ*-genet som et målsted for indsættelse af DNA-sekvenser, fordi bakteriekolonifarven indikerer, om eksperimentet er lykkedes eller ej. Den klassiske blå-hvide screeningsteknik anvendes som en visuel indikator til at se, om *lacZ*-genet er redigeret med succes.

Baggrundsviden

Genredigering

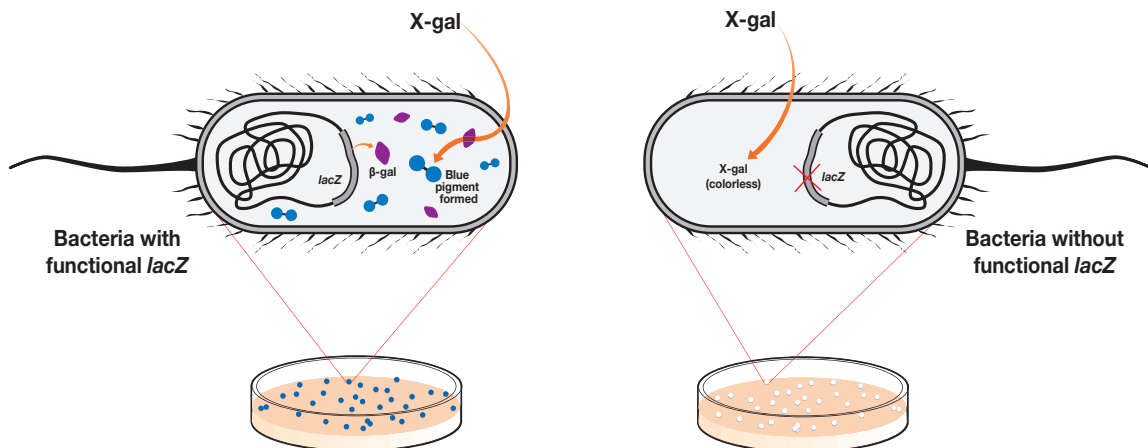
Geneditering involverer to trin: klipping af dobbeltstrengt DNA på et ønsket sted og derefter en styring af DNA-reparationen for at lave den ønskede sekvensændring. Når kromosomalt DNA i en bakteriecelle klippes, dør cellen, medmindre den er i stand til at reparere snittet. Som I så i den tidligere aktivitet, kan celler reparere dobbeltstrengede brud i DNA på flere måder, herunder:

- **Ikke-homolog endeforbindelse (NHEJ)** - specifikke enzymer forbinder enderne af det dobbeltstrengede brud sammen igen. Denne proces kan tilfældigt indsætte eller slette en eller flere baser og kan forårsage mutationer, der kan forstyrre genfunktionen eller ekspressionen.
- **Homologi dirigeret reparation (HDR)** - enzymer reparerer bruddet ved hjælp af donorskabelon-DNA, som er påkrævet for HDR. Forskere designer typisk donorskabelon-DNA, som omfatter en ønsket sekvens flankeret på begge sider af "homologi -arme", der matcher sekvensen opstrøms og nedstrøms for klippestedet. Der dannes en komplementær DNA-streng under reparationen.

I denne aktivitet bruges CRISPR-Cas9 til at klippe bakterielt kromosomalt DNA på et specifikt sted i *lacZ*-genet. Der drages fordel af bakteriecellernes evne til at lave HDR så der opnås en ønsket ændring i *lacZ*-sekvensen. Dette gøres ved at forsyne cellerne med store mængder af et donorskabelon-DNA, som indeholder en sekvens med et stopkodon, der vil afbryde genets funktion.

LacZ-genet og blå-hvid screening

Et gen i lac-operonen, *lacZ*, koder for et enzym kaldet beta-galactosidase (β -gal), som katalyserer hydrolysen af lactose til monosaccharider. β -gal kan også hydrolysere sukkeranalogen X-gal, som producerer et blå pigment, når den er hydrolyseret. Bakterier, der udtrykker funktionel β -gal, bliver blå, når de dyrkes i medier med X-gal som vist i figur 4.



Figur 4: *LacZ*s funktion ved blå-hvid screening

I naturen er det lactose, der inducerer ekspressionen af *lac*-operon. Men eftersom *lac*-operon tillader bakterierne at bruge lactose som fødekilde optager de lactosen og ekspressionen stopper. For at få en kontinuerlig ekspression af *lacZ* bruger forskere en ikke-hydrolyserbar lactoseanalog kaldet IPTG i vækstmediet.

E. coli

Den bakteriestamme, der benyttes i dette forsøg, *E. coli*-HB101-pBRKan har naturligt et funktionelt *lacZ*-gen. Derudover er denne stamme genetisk modificeret til at udtrykke Cas9 og den har et plasmid, der muliggør HDR. Ekspressionen af HDR-DNA reparationssystemet kontrolleres af en arabinose-inducerbar promotor; når bakterierne får arabinose "tænder" de for HDR-DNA reparationsmaskineriet. Kun når det er tændt, kan bakteriecellerne bruge donor-template-DNA'et til at reparere det dobbeltstrengede brud. I lighed med andre laboratoriestammer af *E. coli* er denne stamme modificeret, så den ikke kan benytte NHEJ. Dette er for at øge sikkerheden.

Plasmiderne

Bakterierne producerer normalt ikke hverken sgRNA og donor-skabelon DNA, der kræves for at redigere *lacZ*-genet. I forsøget introduceres sgRNA og/eller donor-skabelon-DNA ved at transformere bakterier med et af to plasmider:

- pLZDonor - (kontrol) inkluderer en donor-skabelons DNA-sekvens, der vil blive brugt af HDR maskineriet til reparation af dobbeltstrengede DNA-brud. Donor-skabelon-DNA inkluderer en indsatssekvens, som indsættes i *lacZ*-genet og ødelægger dets funktion med stopcodon.
- pLZDonorGuide - inkluderer både donorskabelon-DNA-sekvensen fra pLZDonor og en sekvens, der koder for sgRNA. Efter transkriptionen vil sgRNA styre Cas9 hen til det sted i *lacZ*, der skal klippes.

Begge plasmider indeholder desuden et resistensgen mod spectinomycin (SPT).

Aktivitet 2 - del 1

Besvar disse før-forsøget spørgsmål

Starterplade	I mediet	Bakteriekoloniernes farve	Cas9	DNA reparationssystem	sgRNA	Donor skabelon DNA
IX	IPTG, Xgal	blå	+	OFF	-	-
IX/ARA	IPTG, X-gal, arabinose	blå	+	ON	-	-

Tabel 2: Startpladerne

- Med udgangspunkt i tabel 2 forklares med egne ord, hvorfor kolonierne på starterpladerne er blå.
- Hvis bakterierne på starterpladerne IKKE har et funktionelt *lacZ*-gen, hvilken farve vil man så forvente, at kolonierne har?
- Forklar hvilken indflydelse forskellen på IX og IX/ARA-startpladerne har på editeringsaktiviteten (dvs. på forsøget).

Prøve	Medium	plasmider	Cas9	DNA reparations-system	sgRNA	Donor-template DNA	Forventet lacZ-ændring
A	IX	pLZDonor	+	OFF			
B	IX	pLZDonorGuide	+	OFF			
C	IX/ARA	pLZDonor	+	ON			
D	IX/ARA	pLZDonorguide	+	ON			

Tabel 3: Oversigt over pladerne

- Udfyld skemaet ovenfor med '+' og '-' for at indikere hvilke komponenter bakterierne har
- Udfyld den sidste kolonne med de forventede ændringer i *lacZ*-genet.

Plade	Tilsat til mediet	Forventet vækst? (ja/nej)	Koloniernes farve
A	IPTG, X-gal, spectinomycin		
B	IPTG, X-gal, spectinomycin		
C	IPTG, X-gal, spectinomycin		
D	IPTG, X-gal, spectinomycin		

Tabel 4. Resultater

- Udfyld nu, med baggrund i de forrige svar, tabel 4 med jeres forventede resultater.

Del 2 Gen-editering - det praktiske forsøg

Materialer

Til hver gruppe:

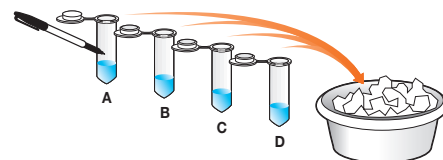
Frisk <i>E. coli</i> IPTG/X-gal (IX) LB startplade	1
Frisk <i>E. coli</i> IPTG/X-gal/ARA (IX/ARA) LB startplade	1
IPTG/X-gal/spectinomycin (IX/SPT) LB-plader	4
LB medie (LB)	1,2 mL
Transformationopløsning (TS) på is	1,5 mL
pLZDonor plasmid (pD), 80 ng/ μ L	40 μ L
pLZDonorGuide plasmid (pDG), 80 ng/ μ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

Fælles:

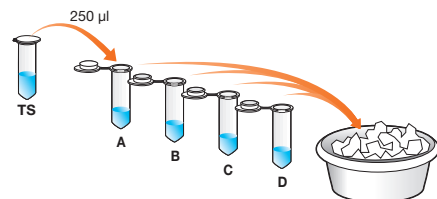
Vandbad eller varmeklok 60°C
Varmeskab 37°C
Tape (malertape)

Fremgangsmåde

1. Mærk fire 2,0 mL mikrocentrifugerør **A-D** og stil dem på is.



2. Tilsæt 250 μ L iskold transformationsopløsning (**TS**) til hvert rør. Stil rørene på is.



3. Tag en steril podenål og saml 5 kolonier op fra IPTG/X-gal (**IX**) pladen.

De 5 kolonier overføres til rør **A** ved at podenålen drejes mellem fingrene i mindst 1 minut - dvs. indtil de er blandet godt op i væsken. Der må ikke sidde nogen bakterier tilbage på podenålsøjlet.

Stil straks på is igen

4. Gentag trin 3 med en ny podenål og overfør til rør **B**

5. Tag en steril podenål og saml 5 kolonier op fra IPTG/X-gal/Ara (**IX/ARA**) pladen

De 5 kolonier overføres til rør **C** ved at podenålen drejes mellem fingrene i mindst 1 minut - dvs. indtil de er blandet godt op i væsken. Der må ikke sidde nogen bakterier tilbage på podenålsøjlet.
Stil straks på is igen.

6. Gentag trin 5 med en ny podenål og overfør til rør **D**

7. Tag en ny pipettespids og tilsæt 10 μ L pLZDonor (**pD**) plasmid til rør **A**. Luk røret og knips mindst tre gange på røret for at blande. Stil tilbage på is.

Med en ny pipettespids tilsættes 10 μ L pLZDonor (**pD**) plasmid til rør **C**. Luk røret og knips mindst tre gange på røret for at blande. Stil tilbage på is.

8. Tag en ny pipettespids og tilsæt 10 μ L pLZDonorGuide (**pDG**) plasmid til rør **B**. Luk røret og knips mindst tre gange på røret for at blande. Stil tilbage på is.

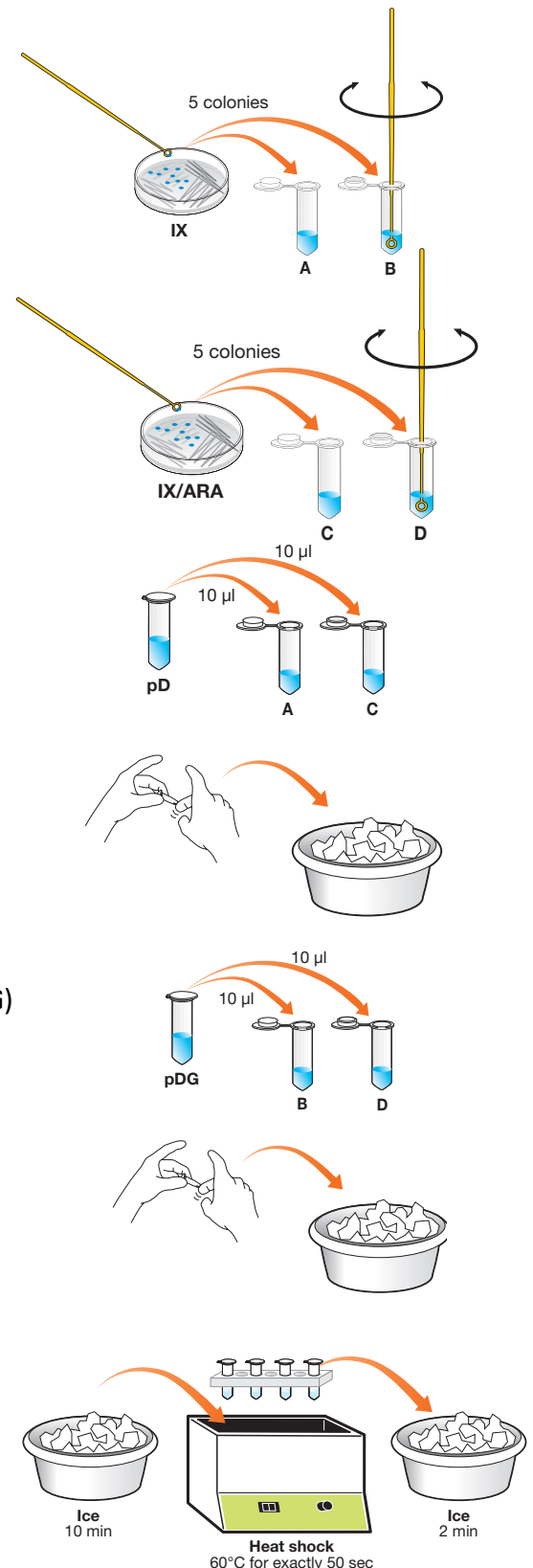
Med en ny pipettespids tilsættes 10 μ L pLZDonorGuide (**pDG**) plasmid til rør **D**. Luk røret og knips mindst tre gange på røret for at blande. Stil tilbage på is.

9. Inkubér alle fire rør i mindst 10 minutter på is.

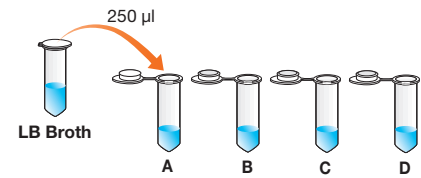
10. Overflyt de 4 rør til varmebadet /varmeblokken og giv rørene et varmechok i præcis 50 sekunder ved 60°C.

11., Flyt straks de 4 rør tilbage på is og lad dem stå på is i to minutter.

12. Tag en ny pipettespids og overfør 250 LB-medium til



hvert rør. Luk rørene og bland indholdet ved at knipse på rørene. Lad rørene stå ved stuetemperatur i 20 minutter eller længere (fx natten over).

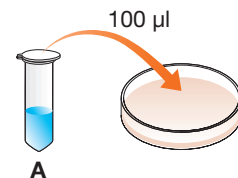


Stoppunkt: Fortsæt efter 20 minutter eller fortsæt næste dag

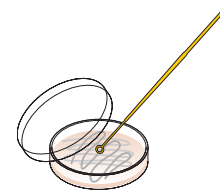
13. Mærk bunden af de 4 IX/SPT-plader **A-D**. Skriv jeres initialer og dato på.



14. Tag rør **A** og knips let på røret for at resuspendere bakterierne. Med ny pipettespids overføres 100 µL prøve **A** til plade **A**.

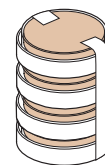


15. Med en steril podenål spredes bakterierne med let hånd jævnt på pladen Roter pladen flere gange, mens der spredes.
Undgå at ødelægge agaroverfladen.



16. Idet I husker at skifte pipettespidser og podenåle, gentages punkt 14 og 15 for **prøverne B-D**.

17. Forsegl pladerne med malertape e.l. og inkubér pladerne med bunden opad ved 37 °C i 24 timer eller ved stuetemperatur i 2-3 dage.



18. Efter inkubationsperioden tjekkes pladerne for blå og hvide kolonier. Hvis det er svært at skelne farverne, stilles pladerne i køleskab i 1-5 dage, hvorefter det vil være lettere at skelne mellem farverne.

19. Tæl kolonierne og analyser resultaterne.
Tæl de blå og hvide kolonier og noter resultaterne i tabel 5.

Brug en permanent tusch til at prikke hver talt koloni.
Hvis der er for mange kolonier, kan det hjælpe at inddele pladen i 4. Brug en lineal til inddelingen.



Plade	Antal blå kolonier	Antal hvide kolonier	Total antal kolonier	% hvide kolonier	Sammenligning med de forventede resultater i tabel 4
A					
B					
C					
D					

Tabel 5: resultater

20. Beregn andelen af hvide kolonier på hver plade

21. Sammenlign resultaterne med de forventede resultater, som I noterede i tabel 4

Efterbearbejdning af resultaterne og forsøget:

- På hvilke plader ses evidens for at Cas9 har klippet i *lacZ*-genet?
- Hvilke af de plader, der viser tegn på, at *lacZ*-genet er blevet klippet, viser også tegn på, at DNA-klipningen er blevet repareret? Bemærk, at reparation af DNA ikke betyder at funktionen af et gen repareres.
- Hvad sker der med en bakterie, hvis et dobbeltstrengt DNA-brud ikke repareres?
- En af pladerne kan have få, eller måske ingen kolonier. Forklar ud fra dine resultater om, hvorfor der ikke var vækst.
- Hvis I har uventede resultater, skal I prøve at forklare disse.
- Beskriv mindst to andre forsøg, der kunne udføres for at verificere, at der forekom kromosomal genredigering i bakterierne.

Aktivitet 3 Afsluttende aktivitet

Bioinformatisk analyse af Cas9 target sites.

CRISPR-Cas9-systemets evne til præcist at editere genomer har stor betydning for behandling af sygdomme. Nogle sygdomme, såsom koronararteriesygdom, seglcelleanæmi og cystisk fibrose, er forårsaget af genetiske mutationer. En CRISPR-baseret terapi, der kan editere det genomiske DNA i cellerne, kan muligvis rette disse mutationer.

Selvom denne type terapi er lovende, er den ikke så entydigt god, som den kan se ud til på overfladen. Som med de fleste terapier er der risici forbundet med metoden, som skal analyseres og forstås, før metoden testes på mennesker. For eksempel kan effekter uden for målcellerne,

hvor et andet gen eller en DNA-sekvens end det tilsigtede redigeres, have konsekvenser for personen. Sådanne risici kan aldrig elimineres fuldstændigt, og sandsynligheden for risici skal altid vurderes.

Et af de første trin i designet af en CRISPR-baseret terapi er at identificere en genediteringsstrategi og vælge et passende Cas9-målsted, der skal klippes. I denne aktivitet undersøges det genetiske grundlag for en sygdom og udforske en CRISPR-baseret genediteringsstrategi; udskiftning, indsættelse eller sletning af en sekvens. Derefter skal I identificere potentielle Cas9-målsekvenser ved at anvende BLAST (fra National Center for Bioinformatics Information (NCBI, en del af National Institutes of Health, NIH)) til at finde lignende sekvenser i det menneskelige genom. Ved hjælp af disse data analyseres jeres potentielle Cas9-målsekvensers risiko for off-target-effekter. Derved kan den mest lovende "kandidat" til en CRISPR-baseret terapi identificeres.

Del 1. Identificering og katalogisering af målsekvenser

1. Læs om den sygdom, du undersøger.

Diskuter med din gruppe, og besvar de sygdomsspecifikke spørgsmål.

2. Scan den medfølgende DNA-sekvens, og identificer alle potentielle Cas9-målsekvenser.

Overvej følgende:

- En Cas9-målsekvens inkluderer en 20-nukleotid protospacersekvens efterfulgt nedstrøms af en passende PAM-sekvens (5'-NGG) i 5' til 3'-retningen. Derfor er en målsekvens 23 nukleotider lang
- Hvis der først søges efter PAM-sekvenser, kan processen gå hurtigere
- Målsekvenser kan findes enten på enten den ene eller den anden af DNA-strengene, men den læses altid i 5' til 3' retningen.

3. Vælg 2-4 kandidatmålsekvenser der skal undersøges nærmere.

Skriv hver sekvens i nedenstående tabel ved hjælp af følgende navngivningskonvention: Gennavn forkortelse-dine initialer-nummer, fx: GENE9-TRP-1.

Målsekvens	Første nukleotids position	Sidste nukleotids position	Nukleotidsekvensen fra 5' til 3' (23 nukleotider)

Del 2: BLAST-søgning efter off-taget-sekvenser (ikke-målsekvenser)

Der kan undertiden findes en hel eller delvis Cas9-målsekvens andre steder i det humane genom, så et sgRNA designet mod et sådant sted kan guide Cas9 til at klippe flere målsteder. BLAST bruges til at finde gener med sekvenser, der helt eller delvist matcher de målsekvenser, I valgte i del 1.

1. Lav en tabel til resultaterne

Brug tabellen fra vejledningen og lav et regneark, hvori resultaterne kan skrives.

2. Lav en BLAST-søgning

BLAST udvikles hele tiden, og de følgende screenshots og vejledningen kan derfor være forskellig fra det, I oplever ved søgningen.

Gå ind på <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

Klik på **Nucleotide BLAST**. Paste jeres målesekvens ind i **Enter Query Sequence**

The screenshot shows the 'Enter Query Sequence' form. The main input field for the accession number, gi(s), or FASTA sequence(s) is empty. To the right, the 'Query subrange' section has 'From' and 'To' input fields, both empty. Below the main input field, there is a section for 'Or, upload file' with a 'Vælg arkiv' button and the text 'intet arkiv valgt'. There is also a 'Job Title' input field and a checkbox for 'Align two or more sequences'.

som fx her:

This screenshot shows the same 'Enter Query Sequence' form, but with the sequence 'GCCGTCCTCCACGGAACGCAAGG' pasted into the main input field. The 'Query subrange' fields remain empty. The 'Or, upload file' section and 'Job Title' field are also visible.

I **Choose Search Set > Database**, vælges **Human RefSeqGene sequences (RefSeq_Gene)**

The screenshot shows the 'Choose Search Set' form. Under the 'Database' section, 'Standard databases (nr etc.)' is selected. The dropdown menu is open, showing 'Human RefSeqGene sequences(RefSeq_Gene)' as the selected option. There are also checkboxes for 'Exclude Optional' (Models (XM/XP) and Uncultured/environmental sample sequences) and 'Limit to Optional' (Sequences from type material). An 'Entrez Query' field is present at the bottom.

Vælg nu **Show Results in a new window** og klik **BLAST**

BLAST® » blastn suite » results for RID-HS4KRK5K013 Home Recent Results Saved Strategies Help

[← Edit Search](#) [Save Search](#) [Search Summary](#) [How to read this report?](#) [BLAST Help Videos](#) [Back to Traditional Results Page](#)

i Your search parameters were adjusted to search for a short input sequence.

Job Title	Nucleotide Sequence
RID	HS4KRK5K013 <small>Search expires on 08-19 03:48 am</small> Download All
Program	BLASTN Citation
Database	genomic/9606/RefSeqGene See details
Query ID	lcl Query_57531
Description	None
Molecule type	nucleic acid
Query Length	23
Other reports	Distance tree of results MSA viewer

Filter Results

Organism only top 20 will appear exclude

Type common name, binomial, taxid or group name

[+ Add organism](#)

Percent Identity to **E value** to **Query Coverage** to

[Filter](#) [Reset](#)

Descriptions | [Graphic Summary](#) | [Alignments](#) | [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments Download [New](#) Select columns Show 100

select all 100 sequences selected [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [New](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), RefSeqGene (LRG_275) on chromosome 1	Homo sapiens	38.2	38.2	100%	0.015	95.65%	32304	NG_009061.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens Gse1 coiled-coil protein (GSE1), RefSeqGene on chromosome 16	Homo sapiens	28.2	72.8	69%	14	100.00%	513695	NG_054715.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens scaffold attachment factor B2 (SAFB2), RefSeqGene on chromosome 19	Homo sapiens	28.2	28.2	60%	14	100.00%	42935	NG_050735.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens tectorin alpha (TECTA), RefSeqGene on chromosome 11	Homo sapiens	28.2	28.2	60%	14	100.00%	95141	NG_011633.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens aryl hydrocarbon receptor interacting protein like 1 (AIPL1), RefSeqGene on chromosome 17	Homo sapiens	28.2	28.2	60%	14	100.00%	18461	NG_008474.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens RNA binding fox-1 homolog 3 (RBFox3), RefSeqGene on chromosome 17	Homo sapiens	26.3	50.5	56%	55	100.00%	528859	NG_053112.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens transmembrane protein 132D (TMEM132D), RefSeqGene on chromosome 12	Homo sapiens	26.3	26.3	56%	55	100.00%	838943	NG_052808.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens BTB domain containing 11 (BTBD11), RefSeqGene on chromosome 12	Homo sapiens	26.3	26.3	56%	55	100.00%	349475	NG_052621.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens T-box brain transcription factor 1 (TBR1), RefSeqGene on chromosome 2	Homo sapiens	26.3	26.3	56%	55	100.00%	15954	NG_046904.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens interleukin 1 receptor accessory protein like 2 (IL1RAPL2), RefSeqGene on chromosome X	Homo sapiens	26.3	26.3	56%	55	100.00%	1208515	NG_012566.3
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens junctophilin 1 (JPH1), RefSeqGene on chromosome 8	Homo sapiens	26.3	26.3	56%	55	100.00%	93624	NG_046331.1
<input checked="" type="checkbox"/> Homo sapiens SH3 and multiple ankyrin repeat domains 2 (SHANK2), RefSeqGene on chromosome 11	Homo sapiens	26.3	74.8	82%	55	100.00%	663941	NG_042866.1

3 Kig på BLAST-resultatet

3.1 Øverst er der et eksakt match for det gen, som I arbejder med. Klik nu på **Description** og få mere information og gå derefter tilbage til BLAST-resultatsiden

3.2 Klik på et af jeres andre resultater og få den information, I kan. Gå derefter tilbage til BLAST-resultatsiden.

3.3 Vælg nu **alle sekvenser (select all)**, klik på **Alignment** og vælg **Alignment view** → **Query-anchored with letters for identities**.

Alignment view: Query-anchored with letters for identities | Line length: 60 | Restore defaults

Download

Query range 1: 1 to 23

Query	1	GCCGTCCTCCACGGAACGCAAGG	23
NG_009061.1	5444	GCCGTCCTCCACGGAACGCAAGG	5422
NG_054715.1	146605	GCCGTCCTCCACGG	146592
NG_054715.1	19060	GCCGTCCTCCA	19070
NG_054715.1	416347	CCTCCACGGAA	416357
NG_050735.1	40254	CCGTCCTCCACGGA	40241
NG_011633.1	30415	GCCGTCCTCCACGG	30402
NG_008474.1	13213	CCGTCCTCCACGGA	13226
NG_053112.1	86792	TCCTCCACGGAAC	86780
NG_053112.1	436838	TCCTCCACGGA	436827
NG_052808.1	699083	CGTCCTCCACGGA	699071
NG_052621.1	269357	CCGTCCTCCACGG	269345
NG_046904.1	15826	CTCCACGGAACGC	15814
NG_012566.3	658726	ACGGAACGCAAGG	658714
NG_046331.1	81604	GCCGTCCTCCACG	81592
NG_042866.1	197561	TCCTCCACGGAAC	197573

3.4 Kig nærmere på sekvensinformationerne

- Jeres sekvens (forespørgsel) vises øverst i resultaterne for let reference. De resterende rækker viser nukleotidsekvenser fra gener, der matcher eller delvist matcher forespørgselssekvensen.
- Linkene til venstre viser identifikationsnumre for forskellige referencegener. Hvert gen i databasen har sit eget identifikationsnummer.
- Til højre for hvert identifikationsnummer er justeringssekvensens startposition efterfulgt af sekvensen og antallet af nukleotider ved slutpositionen. De fleste justeringssekvenser matcher ikke forespørgselssekvens fulde længde.

3.5. Et af de bedste resultater vil være et eksakt match til jeres forespørgsel og være placeret i det gen, I arbejder med. Klik på identifikationsnummeret. Sørg for, at oplysningerne er korrekte (at de matcher det gen, der arbejdes med). Hvis det ikke matcher nøjagtigt, skal I kontrollere, at jeres forespørgselssekvens er korrekt.

4. Noter jeres resultater i tabellen.
Noter, hvis der er match, steder I ikke forventede.

Lav op til fem søgninger (eller så mange som muligt, hvis der er færre end fem), hvis sekvenser omfatter PAM-sekvensen 5'-NGG aligned med forespørgselssekvensen, hvor N er et hvilket som helst nukleotid. Brug linket til identifikationsnummeret til at hente yderligere oplysninger, der skal udfyldes i tabellen. Der kan være flere resultater for et enkelt nummer.

Fremhæv de steder, hvor der er alignment med andre gener end dem I arbejdede med.
Indram det længste alignment.

Fokusspørgsmål:

- A. Hvorfor kan der være mere end et resultat
- B. Hvordan kan et alignmentsmatch være uden for målsekvensen og dermed være et off-target-klippested?
- C. Giver det, at der er mange alignments en højere eller lavere risiko for off-target-effekter?

Del 3 Evaluering af mål

For di sgRNA -sekvensen bestemmer, hvor Cas9 skærer DNA, kan den klippe DNA alle steder, hvor den støder på en komplementær sekvens, det vil sige også på uønskede steder. Sådanne utilsigtede klipninger kaldes off-goals. Forsøg har desuden vist, at Cas9 undertiden klipper DNA, også selvom der er uoverensstemmelser mellem sgRNA- og DNA-sekvenserne. Det betyder, at DNA-sekvenser, der kun delvist matcher sgRNA, er potentielle off-targets klippesteder, selvom PAM-sekvensen stadig er påkrævet.

Generelt kan man sige, at jo flere uoverensstemmelser der er mellem en DNA-sekvens og sgRNA, desto mindre sandsynligt er det, at Cas9 kan klippe.

1. Opskriv kriterier, som I mener skal være opfyldt, for at få så sikker en målsekvens som muligt. Brug de alignment-resultater I fik i BLAST-søgningen.
2. Brug nu jeres kriterier til at evaluere de målområder I valgte i aktivitet 1 og forklar jeres evaluering.

Fokusspørgsmål

- A. Hvilken yderligere information og eksperimenter vil I kræve, hvis I skal vurdere en målsekvens til brug i terapi?
- B. Hvilke bivirkninger kan der være hvis der er off-target-CRISPR-Cas9-aktivitet?
- C. Hvordan kan man afgøre om eventuelle risici er acceptable eller ej?
- D. Skal man betragte off-targets effekter som ikke-terapeutiske CRISPR-eksperimenter i laboratoriet? Hvorfor? /Hvorfor ikke?
- E. Synes du at der skal være forskel på, hvordan man vurderer risici ved henholdsvis CRISPR-baserede terapier og CRISPR-eksperimenter foretaget i laboratoriet?

