

Mikko Mäki

Arabidopsis thaliana genomien muokkaus
CRISPR/Cas-tekniikalla

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioala

Opinnäytetyö

30.5.2016

Tekijä(t) Otsikko Sivumäärä Aika	Mikko Mäki <i>Arabidopsis thaliana</i> genomien muokkaus CRISPR/Cas - tekniikalla 36 sivua + 7 liitettä 30.5.2016
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioala
Ohjaaja(t)	Tutkintovastaava Jarmo Palm Tohtorikoulutettava Hanna Help-Rinta-Rahko
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Helsingin yliopiston Bio- ja ympäristötieteiden laitoksen kasvibiologian osastolle osana laajempaa tutkimusprojektia. Työn tarkoituksena oli yrittää muokata kohdennetusti osa <i>Arabidopsis thaliana</i> DNA:ta CRISPR/Cas9-tekniikalla. Tulosten selvittämiseen käytettiin nested PCR-metodia yhdistettynä T7E1 endonukleasikäsittelyyn.</p> <p>CRISPR/Cas9 on uusi, vuonna 2012 kehitetty genomien muokkaamisen työkalu. Siinä käytetään ohjelmoitua sgRNA:ta ja Cas9-entsyymiä paikantamaan haluttu kohta genomista, kiinnittymään siihen ja leikkaamaan DNA:n molemmat juosteet poikki. Tällä tavalla voidaan aiheuttaa mutaatioita DNA:n korjausmekanismien liittäessä juosteiden päät uudelleen yhteen. Tällä tekniikalla on myös mahdollista leikata pala DNA -ketjusta pois yhdistämällä kaksi sgRNA ohjaussekvenssiä yhden siirtogeenisen plasmidin sisään ja transformoimalla kasvit tällä yhdistelmäplasmidilla. Leikattuun kohtaan voidaan tämän jälkeen liittää uusi pätkä DNA:ta ja täten muuttaa genomia. Tekniikka mahdollistaa esimerkiksi solujen ohjelmoimista ja mahdollisesti perinnöllisten sairauksien hoitamista.</p> <p>Työssä käytetyt CRISPR-konstrukteilla transformoidut T0-siemenet kasvatettiin selektiomaljoilla, joilla ne pystyivät kasvamaan niihin siirtyneen resistenssigeenin avulla. Tämän jälkeen siemenet istutettiin multaan, ja niistä kerättiin muutaman viikon ikäisinä lehtinäytteet. Lehtinäytteistä valmistettiin DNA-näytteitä kloroformi-uutto -tekniikalla. DNA-näytteet monistettiin PCR:llä ja sen jälkeen ne digestoitettiin T7E1-endonukleasin avulla.</p> <p>Työssä ei onnistuttu löytämään yhtäkään positiivista tulosta T7E1-metodilla, mutta sekvensoimalla löydettiin yksi kasvilinja, jossa oli tapahtunut geenin editio. Tämä todistaa alkuperäisen CRISPR-käsittelyn onnistuneen. Koska mahdollisia syitä heikolle onnistumiselle on monia, vaatii CRISPR-menetelmä vielä optimointia ja lisätutkimuksia.</p>	
Avainsanat	Arabidopsis thaliana, CRISPR/Cas9, T7E1

Author(s) Title Number of Pages Date	Mikko Mäki Editing the Genome of <i>Arabidopsis thaliana</i> Using CRISPR/Cas9 Technique 36 pages + 7 appendices 30 May 2016
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Jarmo Palm, Head of Laboratory Sciences Hanna Help-Rinta-Rahko, Doctoral Student
<p>This thesis was completed at Helsinki University's Department of Biosciences, plant biology department, as a part of a larger study.</p> <p>The goal of the thesis was to try edit a targeted part of <i>Arabidopsis thaliana</i>'s DNA with CRISPR/Cas9 –technique. To ascertain the result nested PCR combined with T7E1 endonuclease treatment was used.</p> <p>CRISPR/Cas9 is a new tool for genome editing that was found in 2012. It uses engineered sgRNA and Cas9 enzymes to locate the specific point of the genome, latch on and then cut both strands of the DNA. In this way one can cause mutations, as the DNA's repair path seeks to rebind the strands together. It is also possible to completely cut away a part of the DNA with this technique by combining two different sgRNA guiding sequences into one transgene plasmid and transforming the plants with the recombinant. A new, engineered piece of DNA can then be placed where the old one was cut off from, thus changing the genome. This technique makes it possible for example to reprogram cells and perhaps help eradicate hereditary disease.</p> <p>During the thesis T0 plants transformed with the CRISPR constructs were grown on selection plates, in which they were able to grow thanks to the resistance they gained from CRISPR. Afterwards, they were planted into the soil, and leaf samples were collected when they had grown for a few weeks. DNA was extracted from the leaves using chloroform extraction. Their DNA was multiplied using PCR and then digested using T7E1.</p> <p>The study was unable to produce any positive results using the T7E1 method, but sequencing yielded one positive plant line in which gene editing had taken place. The positive result proves that the CRISPR technique had succeeded. However, as there are multiple possible reasons for the weak results, CRISPR will require more testing and calibration before it can be used reliably.</p>	
Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , CRISPR/Cas9, T7E1

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoria	1
2.1	<i>Arapidopsis thaliana</i>	1
2.2	CRISPR/Cas	2
2.2.1	CRISPR -rakenne ja toiminta	2
2.2.2	CRISPR:n käyttö laboratoriossa	4
2.2.3	T7E1	6
2.3	Nested PCR	7
2.4	Sangerin sekvensointimenetelmä	8
3	Työn suoritus	9
3.1	Lähtökohdat	9
3.2	Kasvatus näytteiden keräämiseen asti	10
3.3	Näytteiden käsittely	14
3.4	PCR ja T7E1	14
3.5	Toisen sukupolven kasvien istutus	18
4	Tulosten tulkinta	19
4.1	Taq-entsyymin tulokset	19
4.2	Phusion-entsyymin tulokset	23
4.2.1	Vanhat alukkeet	23
4.2.2	Uudet alukkeet	28
5	Johtopäätökset	33
	Lähteet	35

Liitteet

Liite 1. CRISPR manual

Liite 2. DNA:n eristys precellys-laitteella

Liite 3. Lehtinäytteiden konsentraatiot

Liite 4. Primerien tiedot

Liite 5. GeneJET Gel Extraction Kit -ohje

Liite 6. Valitut CRISPR-linjat

Liite 7. CRISPR 506_43 -linjan sekvenssi

Lyhenteet

T7E1	T7 endonuclease I. Työkalu mutaatioiden löytämiseen.
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. Bakteerien ja arkkien omistama immuunijärjestelmä.
Cas gene	CRISPR-associated gene. Geeni, joka liittyy CRISPR:n toimintaan.
bp	base pair. DNA:n rakennusosat.
bps	base pairs. DNA:n rakennusosat.
PCR	Polymerase chain reaction (polymeraasiketjureaktio). Tekniikka monistaa DNA:ta.
AGE	Agaroosigeelielektroforeesi. Mittaustapa DNA:n koolle.
sgRNA	single guide RNA. CRISPR:n toimintaa ohjaava RNA.
crRNA	CRISPR RNA. Immuunijärjestelmässä muodostuva RNA.
tracrRNA	trans-aktiivinen crRNA. RNA-pätkä joka liittää crRNA:n Cas-entsyymiin.
DSB	Dual-strand break. Molempien DNA-juovien rikkominen.
NHEJ	Non-Homologous End Joining. Yksi mahdollinen DNA:n korjaustapa.
HDR	Homology Directed Repair. Yksi mahdollinen DNA:n korjaustapa.
PPT	Phosphinothricin. Selektioaine.

1 Johdanto

Opinnäytetyön aiheena oli *Arabidopsis thaliana* eli lituruohon genomien muokkaus CRISPR/Cas-tekniikalla. Tavoitteena oli onnistua katkaisemaan ja sen myötä poistamaan pala *Arabidopsis*in DNA:sta. Tulos tarkistettiin T7E1-endonukleaasiprotokollan avulla. Tutkimuksen aiheena oli DNA:n leikkaamisen jälkeen poistaa lisätty antibioottiresistenssi risteyttämällä ja säilyttää CRISPR:n aiheuttama mutaatio.

2 Teoria

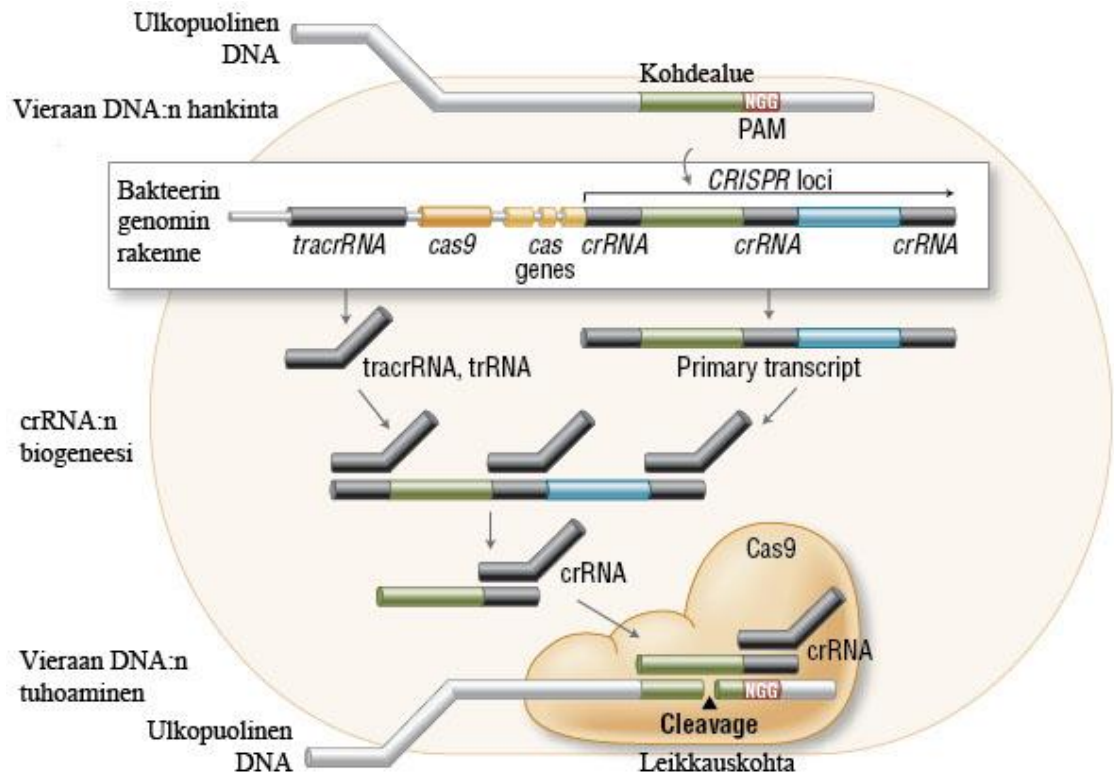
2.1 *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana on hyvin tärkeä kasvi kasvibiologiassa, sillä se toimii laajasti käytettynä mallina. Se tarjoaa hyvän pohjan monelle genetiikan ja molekyylibiologian testeille ja on ensimmäinen kasvi, jonka genomi on sekvensoitu. Noin 115 Mb sen 125 Mb:n genomista on onnistuttu selvittämään. [1.] Sen lisäksi, että sen genomien järjestys tunnetaan, se on myös nopeakasvuinen ja kasvaa monella eri kasvatusalustalla. *Arabidopsis* kukkii noin neljän viikon kuluttua istutuksesta ja sen siemenet ovat kerättävissä noin 6–10 viikon päästä siementen istutuksesta mikä tekee siitä optimaalisen tutkimuskasvin laboratorio-oloissa. [2; 3.] *Arabidopsis* on myös siitä monipuolinen kasvi, että se kasvaa hyvin niin mullassa kuin agarillakin. Tämä mahdollistaa helpon selektion tai juurten tutkimisen. Selektiossa voidaan testata eri *Arabidopsis*-linjojen antibioottiresistenssia. Kasvit joilta se puuttuu joko kuolevat, menettävät klorofyllinsä ja kellastuvat tai lakkaavat kasvamisesta. Siemeniä lisätessä kasvit voidaan myös jälkikäteen siirtää agarilta multa, jossa ne kasvavat normaalisti siementen keräykseen asti. Koska lituruoho on itsepölytteinen kasvi, voidaan kasvihuoneissa helposti kerätä haluttua mutanttia *Arabidopsis*-linjasta. [4.] *Arabidopsis* kasvaa siemenestä kukkaan vain yhden kaavan mukaisesti. Sen ensimmäiset kaksi lehteä, sirkkalehdet, ovat soikeat ja kasvavat vastakkain toisiaan. Myöhemmät lehdet ovat enemmän ovaalin muotoisia, ja tulevat esille ruusukkeen muodossa kärkikasvupisteestä. [5.]

2.2 CRISPR/Cas

2.2.1 CRISPR -rakenne ja toiminta

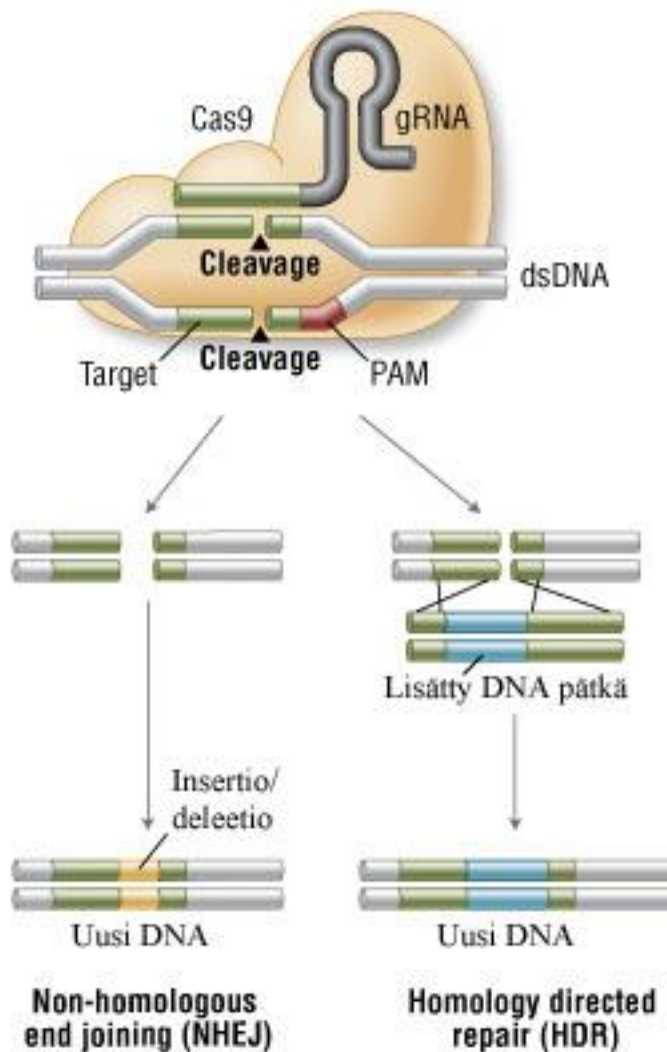
CRISPR on lyhenne sanoista clustered regularly-interspaced short palindromic repeats. Se on useiden bakteerien ja arkkien adaptiivinen immuunijärjestelmä, joka koostuu lyhyistä (noin 20 bp) toistuvista jaksoista, joita erottaa toisistaan lyhyet DNA-palat joita kutsutaan välikkeiksi. Tähän asti on löydetty kolme erillistä CRISPR-mekanismia, joista tyyppi II CRISPR on tutkituin ja tällä hetkellä käytössä oleva. Se löydettiin *Streptococcus pyogenes* -bakteerista. Siinä hyökkäävästä DNA:sta irrotetaan pala, joka liitetään välikkeeksi toistuvien jaksojen väliin. Siitä alkaa muodostua CRISPR RNA:ta eli crRNA:ta, jonka tarkoituksena on ohjata Cas9 oikeaan kohtaan hyökkäävää DNA:ta. Erillinen trans-aktiivinen crRNA eli tracrRNA tarvitaan crRNA:n irrottamiseen ketjusta RNase III- ja Cas9-entsyymien avustuksella. Tämän jälkeen Cas9 etsii protospacer adjacent motif (PAM) -aluetta, joka on lyhyt DNA sekvenssi, johon Cas9 sitoutuu. *Streptococcus pyogenes*in käyttämä PAM on aina 5' NGG 3' pätkä DNA:ta. PAM puuttuu bakteerien ja arkkien omasta järjestelmästä, joten sen käyttäminen tunnistimena estää Cas9-entsyymiä leikkaamasta siepattuja crRNA-pätkiä. Tämän jälkeen yhdistelmä voi käyttää crRNA:ta tunnistamaan kyseisen DNA:n kohdan. Jos crRNA pystyy sitoutumaan kokonaan, Cas9 käyttää RuvC- ja HNH-endonukleaasialueita leikatakseen molemmat ketjut DNA:ta (DSB eli double-stranded break). [6; 7; 8.] Kuva 1 esittää CRISPR:n toiminnan bakteerien immuunijärjestelmänä (7).



Kuva 1. CRISPR:n toimintamalli. [7, muokattu].

Tapahtunut DSB korjaantuu yleensä toisella kahdesta yleisestä korjaustavasta. Nämä tavat ovat tehokas, mutaatioita aiheuttava Non-Homologous End Joining (NHEJ) ja heikompi, mutta tarkempi, Homology Directed Repair (HDR). NHEJ on yleisin ja hyvin aktiivinen korjaustapa, jossa DNA:n päät sitoutuvat uudelleen kiinni. Tämä korjaustapa on kuitenkin hyvin herkkä virheille ja johtaa usein lyhyisiin nukleotidien insertioihin tai deleetioihin. Nämä mutaatiot voivat aiheuttaa geenin toiminnon lakkaamisen, mitä hyödynnetään tutkittaessa geenien tarkoitusta. HDR:ssä taas leikattuun kohtaan liitetään valmis DNA-pätkä, joka sitoutuu siihen. Tätä voidaan käyttää ohjelmoimaan geeniä. [6.] Kuvassa 2 näkyy hyvin kummankin korjaustavan toimintamalli (7).

Genomin muokkaus ja DNA:n korjaus



Kuva 2. Genomin muokkaus ja DNA:n korjaustavat. [7, muokattu].

2.2.2 CRISPR:n käyttö laboratoriossa

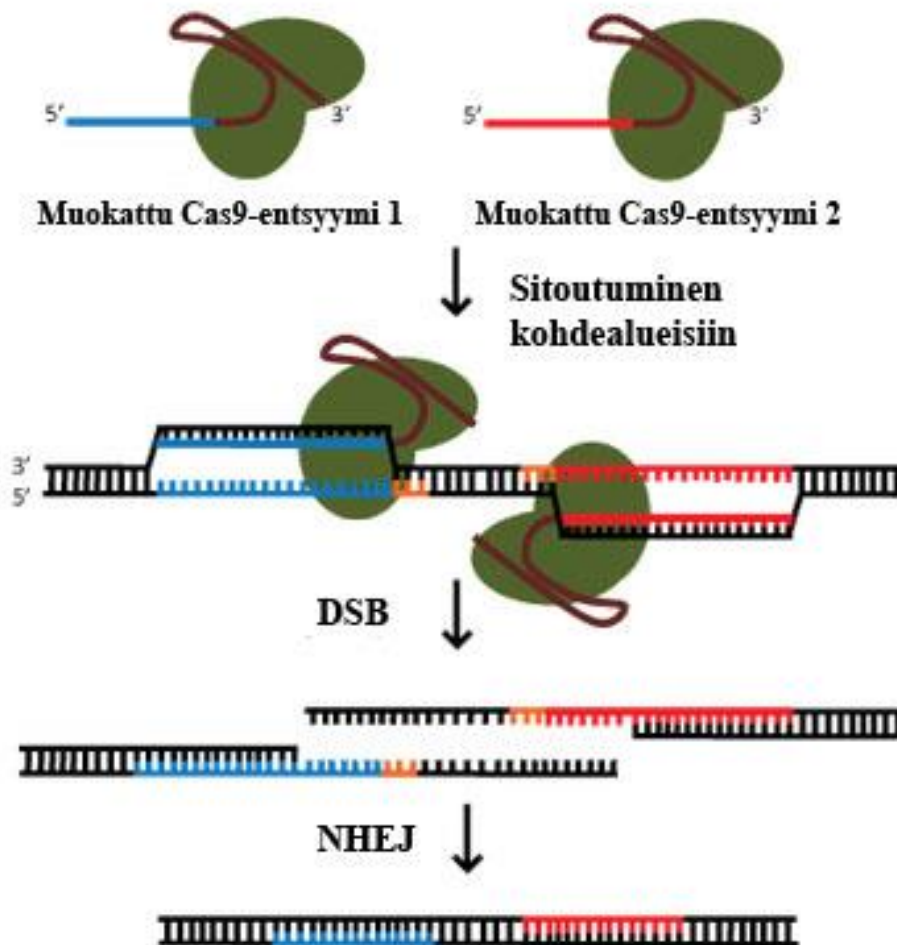
Tyyppin II CRISPR:in helppokäyttöisyys ja yksinkertaisuus tekivät siitä loistavan työkalun genomien kanssa työskentelyyn laboratorioissa. Sen käytännöllisyyttä parannettiin vielä entisestään kun kolmesta alkuperäisestä komponentista (Cas9, crRNA ja tracrRNA) onnistuttiin yhdistämään crRNA ja tracrRNA yhdeksi single guide RNA:ksi (sgRNA). Single guide RNA:n avulla on mahdollista ohjata Cas9 haluttuun kohtaan DNA:ta muokkaamalla lyhyttä crRNA:ta. [7; 8.]

CRISPR:iä voidaan hyödyntää tutkittaessa eri geenien vaikutuksia kasveissa, eläimissä tai jopa ihmisissä. Käyttäen NHEJ-korjaustapaa geenin toiminta voidaan saada lakkaamaan, joka auttaa selvittämään kyseisen geenin tarkoitusta. HDR:n avulla voidaan luoda spesifisiä, ohjelmoituja muutoksia valituissa geeneissä. [6.]

Vaikka CRISPR on itsessään jo hyvin spesifinen työkalu, kliinisessä käytössä sen spesifisyys ei kuitenkaan ole tarpeeksi hyvä. CRISPR:in spesifisyys muodostuu suurilta osin sgRNA:n sekvenssistä verrattuna koko genomiin. Vaikka sgRNA olisi ohjelmoitu liittymään vain haluttuun kohtaan, joskus se sitoutuu osittain sopivaan kohtaan, aiheuttaen leikkauksen väärässä kohdassa. Näitä leikkauksia kutsutaan off-target-alueiksi. Geenikohtaista spesifisyyttä voidaan lisätä muokkaamalla Cas9-entsyymiä. RuvC:n ja HNH:n aktivoivat aminohappojäännökset on tunnistettu ja niitä muokkaamalla voidaan luoda Cas9-entsyymi, jossa on vain yksi aktiivinen leikkausalue. Tämä johtaa siihen, että Cas9 leikkaa vain yhden juosteen DNA:sta kahden sijaan. Tällaista Cas9-entsyymiä kutsutaan nimellä Cas9 nickase. [6.]

Yhden juosteen leikkaantuessa DNA pystyy helposti korjaamaan itsensä HDR:llä käyttäen leikkaamatonta puolta templaattina, mikä johtaa siihen, ettei mutaatioita synny. Mutta jos käytetään kahta erillistä muokattua Cas9-entsyymiä, jotka kohdistuvat DNA:n eri juosteisiin, voidaan saada aikaan DSB vaikka leikkaukset ovat eri kohdissa. Koska on epätodennäköistä, että kaksi muokattua Cas9-entsyymiä sitoutuu off-target tarpeeksi lähelle toisiaan aiheuttaakseen DSB:n, lisää tämä tapa vahvasti CRISPR:in spesifisyyttä. [6.] Kuva 3 havainnollistaa tämän työtavan (7).

CRISPR/Cas9-tekniikkaa voidaan myös käyttää geenien aktivoimiseen tai hiljentämiseen. Koska Cas9-entsyymien sitoutuminen kohteeseen ei liity RuvC ja HNH nukleaasialueisiin, voidaan molemmat niistä säätää pois päältä. Näin ollen syntyy nuclease dead Cas9 (dCas9), joka ei leikkaa DNA:ta vaikka se sitoutuisi siihen. Jo pelkästään sitomalla dCas9 transkription aloitusalueelle pystyttiin transkription aloitus hiljentämään. Tämän lisäksi dCas9 voidaan lisätä transkription aktivaattoreita tai hiljentäjiä. Näiden dCas9 fuusioproteiinien sitoutuminen promoottorialueelle johtaa transkription aktivointiin tai hiljentämiseen. [6.]



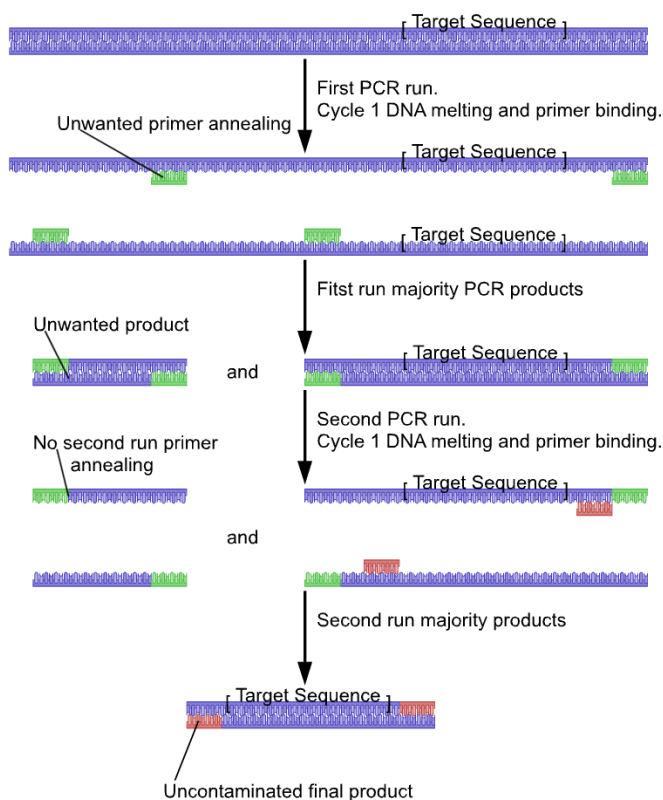
Kuva 3. Cas9 nickase toimintamalli. [6, muokattu].

2.2.3 T7E1

T7-endonukleaasi I on työkalu jota voidaan käyttää CRISPR/Cas9 aiheuttamien muutosten havaitsemiseen. Teoriassa se pystyy havaitsemaan PCR:llä monistetun villityypin DNA:n ja CRISPR/Cas9-mutatoituneen DNA:n eron ja digestoimaan niistä syntyneen heterodupleksin. Näin ollen lopputulos on mahdollista tarkistaa ja vahvistaa agarosigeelielektroforeesilla. [9.]

2.3 Nested PCR

Vaikka PCR perustuu alukkeiden spesifiseen sitoutumiseen kohde-DNA:ssa, on mahdollista, että yksittäiset alukkeet sitoutuvat väärin kohtiin ja näin monistavat väärää DNA:ta. Nested PCR:än tarkoituksena on lisätä halutun tuotteen määrää ja PCR:n spesifisyyttä. Siinä suoritetaan kaksi kierrosta PCR:ää, vaihtaen alukepareja kierrosten välissä. Nested PCR:ssä voidaan käyttää kahta erillistä alukeparia, tai käyttää toista ensimmäisen kierroksen aluketta ja vain yhtä uutta aluketta, jolloin sitä kutsutaan semi-nested PCR:ksi. Ensimmäisellä kierroksella alukepari sitoutuu DNA:han ja monistaa sitä normaalisti. Sen aikana voi helposti syntyä ylimääräisiä, ei-haluttuja DNA-pätkiä alukkeiden sitouduttua väärin kohtiin. Toisella kierroksella käytetään seuraavaa alukeparia, joka sitoutuu ensimmäisen PCR:n sisäisiin DNA-pätkiin. Tämä aiheuttaa sen, että vaikka ensimmäisellä kierroksella olisi tullut virheellistä DNA:ta, toinen kierros poistaa ne lopullisesta tuotteesta. [10.] Kuvassa 4 on kaavio nested PCR:n toiminnasta (11).

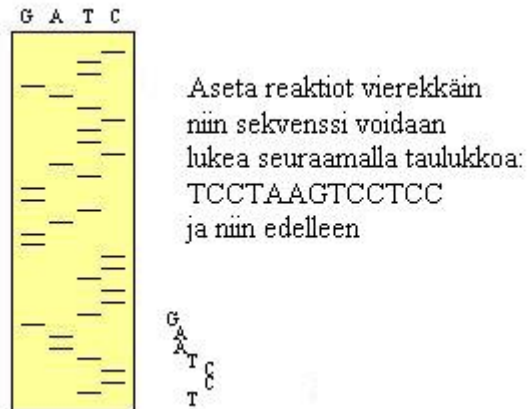


Kuva 4. Nested PCR -kaavio.

2.4 Sangerin sekvensointimenetelmä

Sekvensointi on työkalu, jolla tutkitaan DNA:ta selvittämällä nukleotidien järjestys. Sangerin sekvensointimenetelmässä käytetään dideoksinukleotidejä (ddNTP) eli muokattuja nukleotidejä. Liittyttyään sekvenssiin ddNTP:t estävät uusien nukleotidien liittymisen ketjuun.

Jotta DNA voidaan sekvensoida, täytyy sen olla yksijuosteista. Tämän jälkeen siihen kiinnitetään aluke haluttuun kohtaan. Tämän jälkeen näytteet jaetaan neljään eri putkeen. Jokaiseen putkeen lisätään DNA polymeraasia ja kaikkia neljää nukleotidiä, sekä yhtä neljästä, muokatusta ddNTP:stä (ddGTP, ddATP, ddTTP tai ddCTP). Kun muokatut ddNTP:t sitoutuvat ketjuun, ne pysäyttävät ketjun kasvamisen. Tällä tavalla kaikki näytteet alkavat samasta nukleotidistä ja päättyvät yhteen emäkseen ketjussa. Kunhan DNA:ta valmistuu tarpeeksi, sitoutuu ddNTP:t jokaiseen emäkseen koko ketjulta, muodostaen erikokoisia tuotteita. Tuotteet voidaan sen jälkeen ajaa agarosigeelillä, jolloin saadaan selville näytteen DNA-sekvenssi. Kuvassa 5 on havainnollistava esimerkki tuloksista. [12; 13.]



Kuva 5. Sanger sekvensoinnin tulokset ja tulkinta. [13, muokattu].

Tätä tekniikkaa on ajan kanssa kehitetty, ja se voidaankin nykyään suorittaa käyttämällä vain yhtä putkea neljän sijaan. Tähän putkeen lisätään kaikki neljä ddNTP:tä, jotka on merkitty erivärisillä väriaineilla. Näin ollen eripituiset ketjut voidaan erottaa värin, ei paikan, perusteella. Väriaineet fluoresoivat eri aallonpituuksilla, mikä myös mahdollistaa niiden mittaamisen suoraan geeliltä tietokoneelle. Tuloksista muodostuu

kromatogrammi, jossa eriväriset huiput vastaavat nukleotidien paikkaa sekvenssissä. [13.]

3 Työn suoritus

3.1 Lähtökohdat

Työssä käytettiin neljää eri *Arabidopsis*-linjaa: 506, 531, 531+731 ja 534+731. 506 ja 531 ovat single DSB -linjoja, kun taas 531+731 ja 534+734 ovat double DSB -linjoja. Linjojen nimet tulevat suoraan siitä, mistä kohtaa sgRNA on ohjelmoitu leikkaamaan DNA:n. Kuvassa 6 näkyy värjättyinä eri kasvien tunnistettavat pätkät ja leikkauskohdat. Värjätty alue kuvastaa aluetta, joka sgRNA on ohjelmoitu tunnistamaan ja mihin se liittyy, ja tummempi, yksittäinen alue on kohta jonka Cas9 leikkaa. Sininen tunnustusalue menee päällekkäin punaisen kanssa, ja ensimmäinen tummennettu alue on sinisen alueen leikkauskohta.



```

1 ATGACAGAAGAATACGAGgtgcgacttctgatttctaattcttcagctttattgaatttttctatgtttgaattcagattatt
87 agggatcaaatcggatgtaaaagctgtgtcatttttaactctgcgccatgaaatcaagatggtgaatcattgtttaaggaacaagt
173 attcaaatatggttcttcaatgttactggaatggggaaaaccaattataaaaaatctgagcttttaggattattagtgaatggta
259 tcacttctcttttgatcaataagaatcatgatttagtcttagatgagtcctttggcttttatcttaaatcggaatcctgtgtagctt
345 cgttgttctctgtttctgattcttaaccaaagttcatgacttttggagtttgggtgtaattgttattgaagagttgagctgatga
431 tatcttatagGTTGATGAGCAGAAGCAAGCTGCTGCTGATGTTGTTTAGTTATITCCAGGTTGCAATGGCCTGATTGGTAACC
517 A T A C T C G T C C T A C G A C T G A G G T T G C A T T T G A T G A A G g t a a g t t a t t g a a t t g t t t c a g c c a t c t a g t g t g a t t g a g t a t g a c c
603 a c t t t t a g g a t g a t g a c t c t a g c t a c t t t t t t a t a g G A G A T C T C T G G A A T G C C A A C T T C T C T G A A G G A A G A G A C T C T T C T A G A G
689 C A G C T T C T C T G A T C C A C T T G G C G A A T C A T C A A G C T C C G G T A T G C C A G G C T A G A T A A A A C G G A T A G T T T C A G G G C A C T T T G A

```

Kuva 6. Linjojen tunnistus- ja leikkauskohdat genomissa.

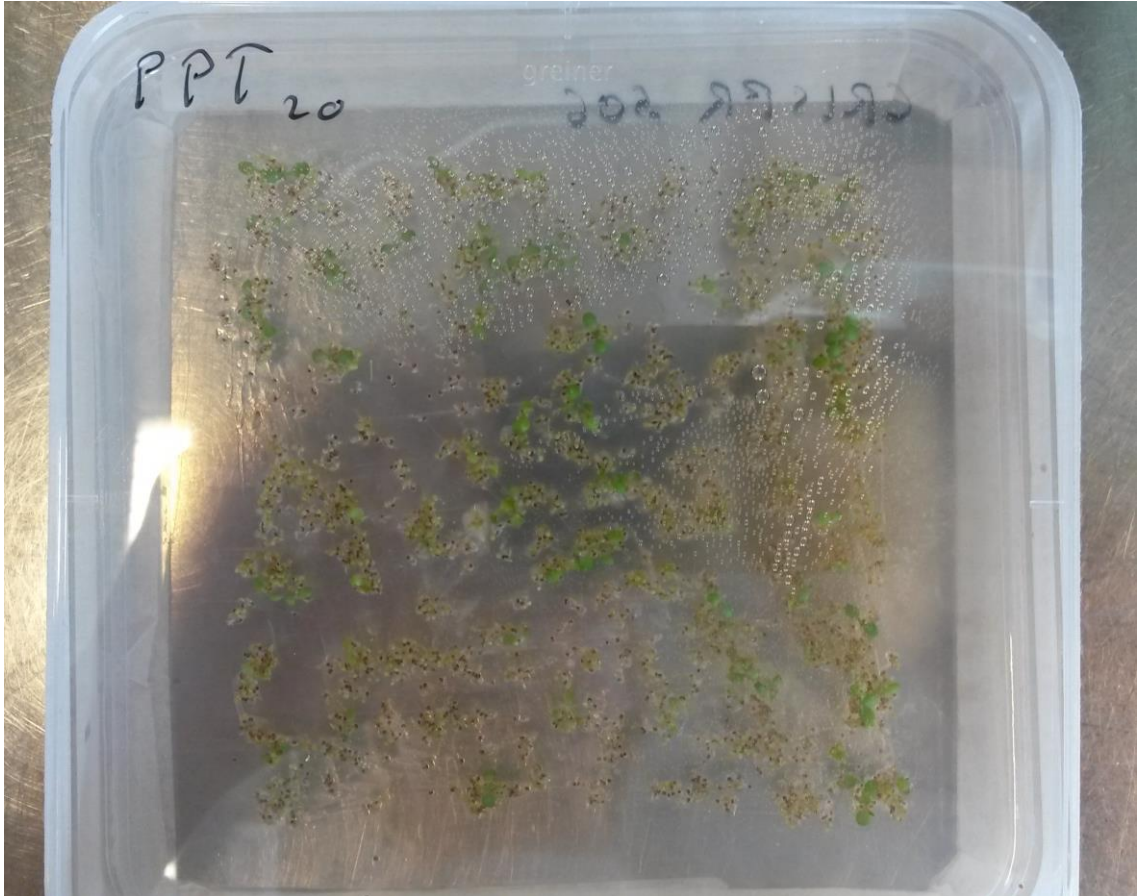
Opinnäytetyön alkaessa CRISPR oli jo suoritettu kloonauksella ja Floral-dipping - tekniikalla *Arabidopsis* linjoille. Liitteestä 1 löytyvät ohjeet kasvien CRISPR-käsittelylle.

3.2 Kasvatus näytteiden keräämiseen asti

Opinnäytetyö aloitettiin keräämällä kaikkien linjojen kuivuneet kasvit kasvihuoneelta kasvatusalustoiltaan keräyspusseihin ja keräämällä niiden siemenet talteen, jotta saatiin ensimmäisen sukupolven kasvit. Siemenet kerättiin kuivuneista kasveista hyvin varovaisesti, eritellen roskat siivilöiden avulla pois mahdollisimman hyvin. Tämän jälkeen siemenet kerättiin pieniin kuoriin. Tässä vaiheessa valmistettiin selektiomaljat kasvatuksia varten. Ensimmäisenä yritettiin selektiota fosphinothricinillä (PPT:llä). Kun maljat olivat valmiita, aloitettiin siementen sterilointi.

Kerätyt siemenet steriloidtiin pienissä erissä kaatamalla siemeniä eppendorf-putkiin. Niitä huuhdeltiin 7–8 minuutin ajan 70-prosenttisella etanolilla, jonka jälkeen niitä käsiteltiin vielä 2–3 minuuttia 100-prosenttisellä etanolilla ja lopuksi siemeniä huuhdeltiin tislatulla vedellä. Jokaisessa vaiheessa putkia sekoitettiin kääntelemällä niitä ylösalaisin.

Siementen steriloinnin jälkeen ne ripoteltiin selektiomaljoille, jotka suljettiin teippaamalla ne kiinni. Kasveille suoritettiin vernalisaatio eli idunviritys säilyttämällä niitä 2-3 päivää jääkaapissa, jonka jälkeen ne laitettiin valokaappiin kasvamaan. Kuvassa 7 näkyy esimerkkinä kuva linjan 506 selektiomaljasta.



Kuva 7. 506-linjan selektiomalja.

Maljoja seurattiin päivittäin kontaminaatioiden varalta. Kun maljalta paljastui kontaminaatiota, esimerkiksi sienikasvustoa tai hometta, kontaminoitunut osa leikattiin varovasti irti steriilillä terällä ja hävitettiin asianmukaisesti. Tämän jälkeen malja suljettiin uudelleen ja asetettiin takaisin valokaappiin kasvamaan. Maljoilta tutkittiin kasveja, joiden lehdet olisivat huomattavasti vihreämmät kuin muiden kasvien lehdet. Kahden kuukauden ja useiden maljojen jälkeen yhtäkään positiivista tulosta ei ollut löytynyt.

Kyselyä aiheesta Isossa-Britanniassa olevilta kollegoilta, joilta alkuperäiset siemenet linjoja varten olivat, päätimme yrittää selektiota kanamysiinillä. Heti ensimmäisiltä maljoilta löytyi kellastuneita ja vahvan vihreitä kasveja sekaisin, ja siirtämällä edelleen vihreitä kasveja erillisille jatkomaljoille, jotka oli myös käsitelty kanamysiinillä, löydettiin lopulta positiivisia kappaleita jokaisesta linjasta. Näitä mutanteja ryhdyttiin sen jälkeen siirtämään multaan, ja jokaista linjaa tuli yksi levyllinen kasvatettavaksi, eli 51 näytettä per linja. Näytteet siirrettiin maljoilta valmiiksi kosteaan multaan pinseteillä varoen vahingoittamasta lehtiä tai juuria.

Linjasta 531 löydettiin myös mutantti, jonka sirkkalehti oli sydämen muotoinen normaalin soikean muodon sijaan. Kyseinen yksilö otettiin sivuun omaan rasiaansa, ja nimettiin sydännäytteeksi (♥-näyte). Kuvassa 8 näkyy linjan 531 levy sekä kuvassa 9 linjan 531 sydänlehtinen mutantti.



Kuva 8. CRISPR 531 -linjan kasvulevy.



Kuva 9. Sydänlehtinen mutantti.

Muutaman viikon kuluttua istutuksesta kaikilta 205 näytteeltä leikattiin kaksi lehteä precellys-putkiin, joihin oli etukäteen lisätty pieni lusikallinen lasipalloja, ja lehdet upotettiin heti nestemäiseen tyypeen säilytystä varten. Kuvassa 10 näkyy, miten lehtiä säilytettiin keräyksen jälkeen.



Kuva 10. Lehtinäytteiden säilytys.

3.3 Näytteiden käsittely

Lehtien keräämisen jälkeen kasvit jätettiin kasvamaan ja siirryttiin työskentelemään itse lehtinäytteiden parissa. Ensimmäisenä niistä eristettiin DNA, joka tapahtui liitteen 2 ohjeen mukaisesti. Ohjeesta poikettiin sen verran, että askeleen 13 eli ensimmäisen sentrifuugauksen jälkeen jouduttiin palaamaan askeleeseen 7, eli precellys-laitteen käyttöön, sillä yksi kierros precellys-laitteessa ei ollut tarpeeksi pilkkomaan lehtinäytteitä kunnolla. Tämän jälkeen toistettiin vorteksointi ja sentrifuugaus, ja jatkettiin loppuun ohjeen mukaisesti. Tavoitteena oli eristää yli 100 ng/μl konsentraatio näytteistä, jotta PCR:ään olisi tarpeeksi materiaalia. Liitteessä 3 näkyy useiden näytteiden konsentraatiot ennen PCR:n aloittamista. Kun näytteet olivat valmiita, pystyttiin niitä säilyttämään pakkasessa PCR:n ja T7E1-protokollan (14) aloittamiseen asti.

3.4 PCR ja T7E1

Ensimmäisen vaiheen PCR:n reagenssit löytyvät taulukosta 1. Tarkemmat tiedot lopullisista alukkeista löytyy liitteestä 4.

Taulukko 1. 1st taq master mix.

Reagenssi	Määrä (µl)
KCl	2,5
Mg ²⁺	2,5
Primer F	1
Primer R	1
dNTP	1
Mq-vesi	15,8
Taq-entsyymi	0,2

Työssä käytettiin Thermo Scientific Taq DNA polymerase #EP0402 –entsyymiä. Kaikki määrät ovat per yksi näyte eli määrät kerrottiin PCR:ssä käytettyjen näytteiden määrällä. Reagenssit pipetoitiin PCR-putkiin, jotka pysyvät koko pipetoinnin ajan jäissä. Pipetointisuhde oli 24 µl master mixiä ja 1 µl templaatti DNA:ta. Tämän jälkeen aloitettiin ensimmäinen PCR-ohjelma. Ohjelma löytyy taulukosta 2.

Taulukko 2. Ensimmäisen vaiheen PCR.

temp	98 °C	120 s	
temp	98 °C	10 s	
			34
temp	65 °C	30 s	sykliä
temp	72 °C	75 s	
temp	72 °C	300 s	
temp	4 °C	0 s	
END			

Ensimmäisen PCR-ohjelman ajettua tarkistettiin PCR:n onnistuminen ajamalla ne AGE:lla. Ajo suoritettiin 1-prosenttisella geelillä. 15 µl pipetoitiin geelille, jolloin käytettäväksi jäi 10 µl tuotetta. Tulosten tarkistuksen jälkeen tehtiin master mix toista ohjelmaa varten. Se on hyvin samankaltainen ensimmäisen kanssa, mutta alukkeet vaihdettiin toisen kierroksen alukkeisiin. Taulukossa 3 näkyvät toisen PCR-ohjelman reagenssit.

Taulukko 3. 2nd taq master mix.

Reagenssi	Määrä (µl)
KCl	2,5
Mg ²⁺	2,5
nPrimer F	1
nPrimer R	1
dNTP	1
Mq-vesi	16,6
Taq-entsyymi	0,2

Reagenssit pipetoitiin taas PCR-putkiin, tällä kertaa pipetointisuhteena oli 24,8 µl master mixiä ja 0,2 µl ensimmäisen PCR:n tuotetta templaatiksi. Tämän jälkeen ajettiin toinen PCR-ohjelma, joka löytyy taulukosta 4.

Taulukko 4. Toisen vaiheen PCR.

temp	98 °C	120 s	
temp	98 °C	10 s	 20 sykliä
temp	65 °C	30 s	
temp	72 °C	75 s	
temp	95 °C	120 s	
temp	-2 °C /s to 85 °C	20 s	
temp	-0.1 °C /s to 25 °C	30 s	
temp	16 °C	0 s	
END			

Myös toisen PCR:n tulokset varmistettiin AGE:lla. Tulosten varmistamisen jälkeen olisi siirrytty digestioon, mutta toisesta PCR:stä ei saatu yhtään positiivisia tuloksia, joten PCR jouduttiin aloittamaan alusta. Työ toistettiin uusilla alukkeilla, mutta toisen kierroksen PCR pysyi edelleen negatiivisena. Tämän jälkeen aloitettiin PCR alusta siirtymällä taq-entsyymistä phusion-entsyymiin. Valittiin Thermo Scientificin Phusion Hot Start polymerase F-540L -entsyymi.

Phusionia varten luotiin uusi master mix, jonka reagenssit löytyvät taulukosta 5.

Taulukko 5. Phusion master mix.

Reagenssi	Määrä (µl)
Buffer HF	4
dNTP	0,5
Mq-vesi	12,5
Primer F	1
Primer R	1
phusion-enz	0,5

Master mixiä käytettiin 19,5 µl ja templaattia 0,5 µl. Samaa master mixiä käytettiin myös toisella kierroksella, alukkeet vain vaihdettiin toisen kierroksen alukkeisiin.

PCR:n kohdalla suoritettiin myös lämpötilagradientti, jonka ohjelma löytyy taulukosta 6.

Taulukko 6. Lämpötilagradientin ohjelma.

temp	98 °C	120 s	
temp	98 °C	10 s	
			34
grad	55 - 70 °C	30 s	sykliä
temp	72 °C	75 s	
temp	72 °C	300 s	
temp	4 °C	0 s	
END			

Parhaaksi lämpötilaksi osoittautui noin 68 °C, joten se valittiin myöhempitä PCR-ohjelmia varten. Tämän jälkeen suoritettiin ensimmäinen PCR yhden näytteen ja kontrollien kokeiluerällä. Koska phusionia oli vain 20 µl, pipetoitiin se kaikki geelille. Tämän takia tulokset leikattiin ja eristettiin geeliltä Thermo Scientifin GeneJET Gel Extraction Kitillä. Sen ohjeet löytyvät liitteestä 5. DNA:n eristyksen jälkeen siirryttiin toiseen PCR-ohjelmaan. Phusionin avulla saatiin positiivinen tulos toisesta PCR:stä ja näin ollen siirryttiin T7E1 digestioon. Sitä varten luotiin uusi master mix, jonka reagenssit löytyvät taulukosta 7.

Taulukko 7. T7E1 master mix.

Reagenssi	Määrä (µl)
10x NEB #2 buffer	2
T7E1 enz	0,25
Mq-vesi	7,75

Master mixiä ja PCR -tuotetta lisättiin kumpaakin 10 µl. Näytteitä inkuboitiin upottamalla ne 37 °C hiekkahauteeseen 20 minuutin ajaksi. Tämän jälkeen ne ajettiin agarosigeelielektroforeesilla 2-prosenttisella agar geelillä. Digestion tulos oli negatiivinen, joten tämän jälkeen tilattiin kahdet uudet alukkeet F1-1 ja R1-1 sekä F1-2 ja R1-2 ja suoritettiin molemmille gradientt ajo sekä taq-entsyymillä että phusion-entsyymillä, yrittäen selvittää parhaiten toimiva yhdistelmä. Entsyymiksi valittiin phusion, alukkeiksi valittiin CRISPR nested 1-2 ja lämpötilaksi 68 °C. Tämän jälkeen suoritettiin muutamia PCR-ohjelmia, kunnes viimeisenä yrityksenä päätettiin keskittyä sydännäytteeseen. Sydännäyte valittiin, koska sen lehden muoto oli selvä merkki mutaatiosta, mikä teki siitä lupaavimman näytteen positiivista tulosta varten. Sydännäytteestä tehtiin normaali ajo, mutta toisesta ajosta ei saatu kunnollisia tuloksia. Koska syyksi epäiltiin liian vähäisiä DNA:n määriä, päätettiin ensimmäisessä ajossa tehdä keräys sydännäytteestä. Tehtiin yksi, iso kaivo joka täytettiin näytteellä ja geelijaon jälkeen leikattiin varovasti ja eristettiin geelistä. Tästä saatiin vahva tulos toisella ajolla ja pystyttiin siirtymään digestioon, jonka tulos ikävä kyllä oli edelleen negatiivinen.

3.5 Toisen sukupolven kasvien istutus

Työajan loppuessa ja negatiivisten tulosten jatkuessa päätettiin viimeisenä työnä käydä linjat valokuvista läpi, valita lupaavimman näköiset linjat ja istuttaa niistä uudet näytteet. Liitteessä 6 on kuva jossa näkyy ympyröitynä valitut linjat. Linjat lasketaan vasemmalta alhaalta aina palaten takaisin alariville uudelle riville edetessä. Valintaperusteena käytettiin kasvin kokoa muihin verrattuna eli etsittiin hyvin suuria tai hyvin pieniä kasveja. Valitut linjat löytyvät listattuna taulukossa 8.

Taulukko 8. Valitut CRISPR-linjat.

CRISPR	Linja
506	1
	16
	43
	50
531	3
	39
531+731	38
	43
534+731	3
	28
	39

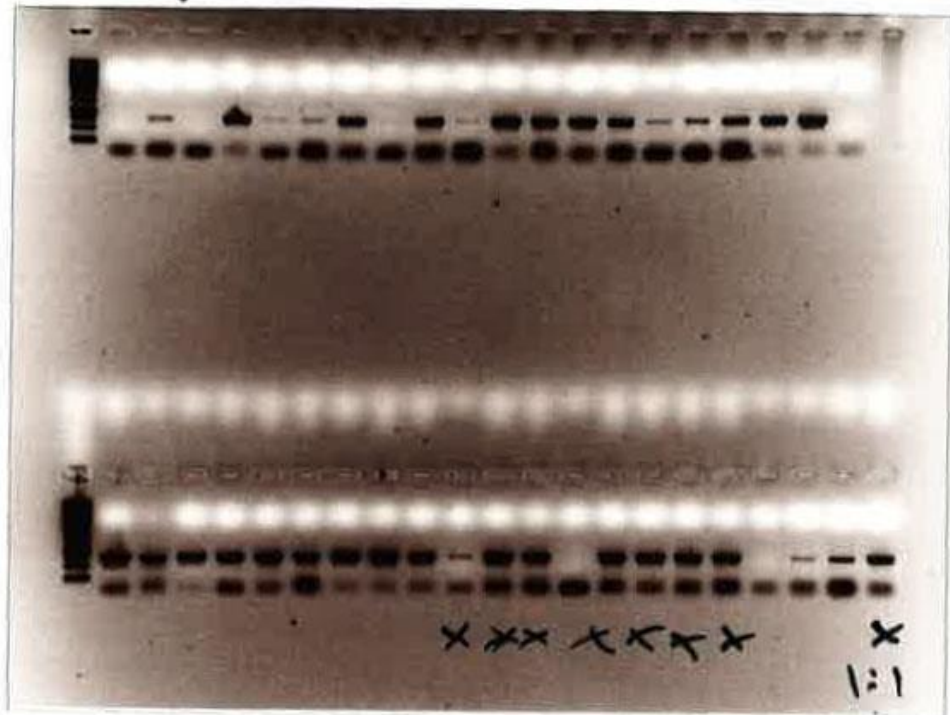
4 Tulosten tulkinta

4.1 Taq-entsyymin tulokset

Kuvassa 11 ylempi tumma viiva on merkki positiivisesta monistusreaktiosta. Odotettu monistustuotteen koko oli 1307 bp ja molekyylikokostandardina toimii 1 kbp molekyylikokostandardi. Näytteinä käytettiin jokaisen CRISPR-linjan 10 ensimmäistä näytettä. CRISPR 531 -linja 10 oli korvattu sydännäytteellä. Standardeina käytettiin Colombia-0 (col-0) ekotyyppejä ja EMS186, Hanna Help-Rinta-Rahkon löytämää mutanttia aiemmasta mutageneesikokeesta, sekä niiden sekoitusta suhteessa 1:1. Vaikka osa näytteistä näyttikin negatiivista, saatiin hyvä määrä positiivisia näytteitä toista PCR-ohjelmaa varten.

Run BioRad 2015-09-11 17hr 08min

Taq 1st run



Printed 11 9 2015 17 12 20

Page 1 of 1

Kuva 11. Ensimmäinen ajo taq-entsyymillä.

Toinen ajo taq-entsyymillä ei kuitenkaan antanut yhtään positiivista tulosta, edes kontrolleista. Odotettu monistustuotteen koko oli 771 bp. Kuvassa 12 näkyy molekyylikokostandardit selvästi, mutta muu geeli on tyhjä.

Run BioRad 2015-09-14 16hr 42min

Taq 2nd run



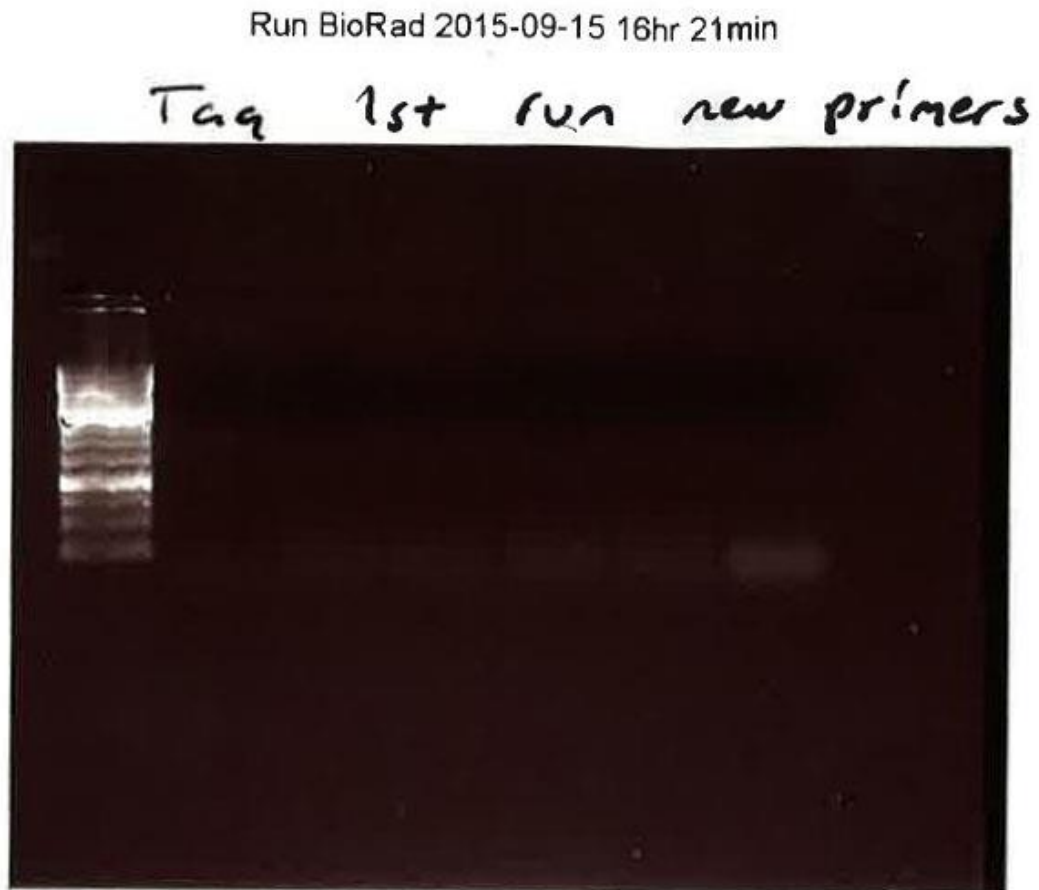
Printed 14 9 2015 16 43 51

Page 1 of 1

Kuva 12. Toinen ajo taq-entsyymillä

Kuvassa 13 näkyy, että uusilla alukkeilla ei monistuminen onnistunut ensimmäisen kierroksen PCR-ajossa.

Tässä vaiheessa pääteltiin, että taq-entsyymi ei ole tarpeeksi spesifinen antamaan kunnollisia tuloksia, ja siirryttiin käyttämään phusion-entsyymiä.



Printed: 15 9 2015 16 22 11

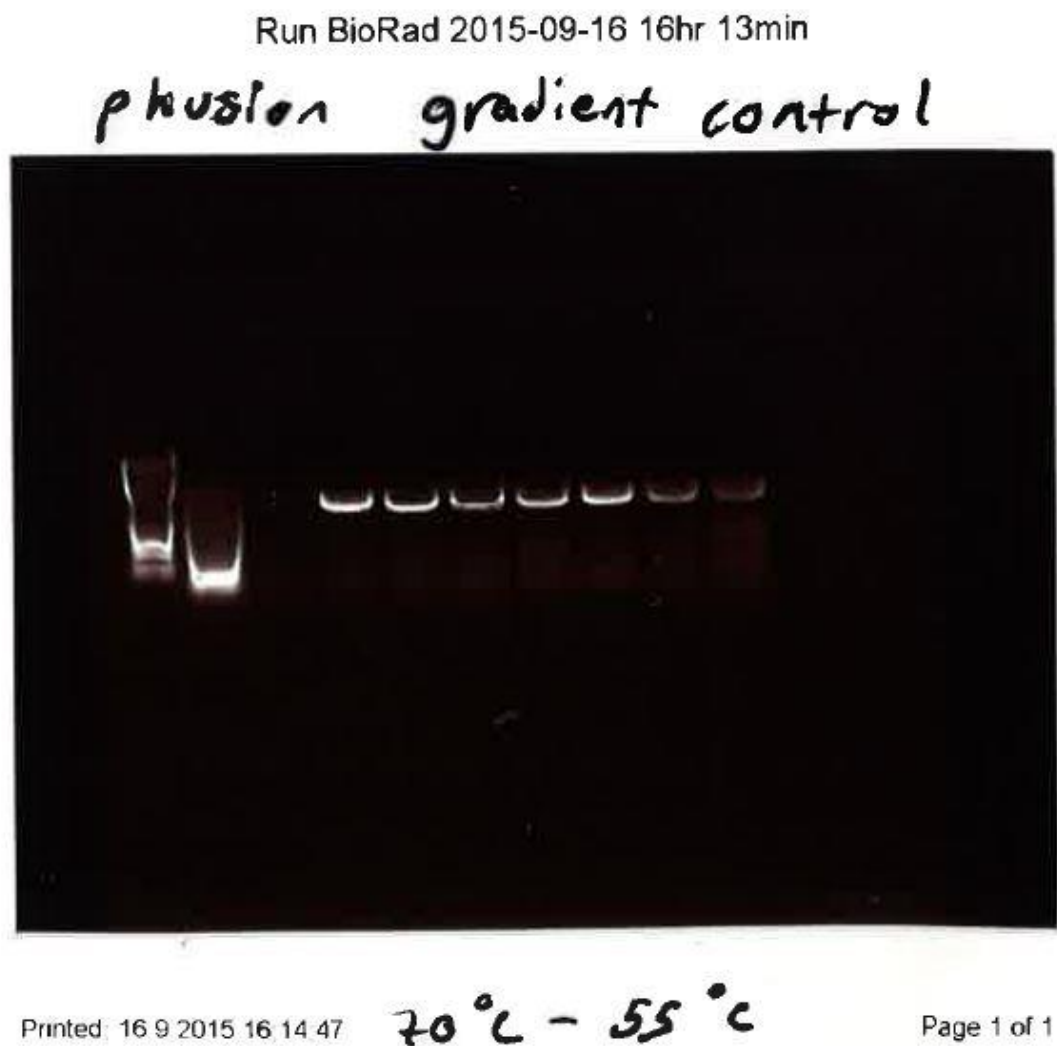
Page 1 of 1

Kuva 13. Ensimmäinen ajo uusilla alukkeilla taq-entsyymillä.

4.2 Phusion-entsyymien tulokset

4.2.1 Vanhat alukkeet

Kuvasta 14 nähdään, että molekyylikokostandardit ajautuivat huonosti. Tästä huolimatta olivat tulokset tarpeeksi selviä sopivan lämpötilan havaitsemiseksi. Vaikka 5 ensimmäistä (lämpötilat 70 °C; 68,125 °C; 66,25 °C; 64,375 °C; 62,5 °C ja 60,625 °C) olivat kaikki sopivan tarkkoja, valittiin lämpötilaksi 68 °C.



Kuva 14. Gradienttiajo phusion-entsyymillä.

Kuvassa 15 näkyvät ensimmäisen ajon tulokset. Siitä nähdään, että positiivinen tulos saatiin näytteestä 534+731 linja 2 ja kontroleista col-o ja sekoitus 1:1. Tässä vaiheessa myös huomattiin että molekyylikokostandardi oli huonolaatuinen, ja se vaihdettiin myöhempisiin ajoihin.



Kuva 15. Ensimmäinen ajo phusion-entsyymillä.

Kuvasta 16 nähdään, että näyte ja kontrollit sijoittuvat kaikki 700 ja 800 bp:n väliin, joten voidaan turvallisesti olettaa näytteiden olevan 771 bp ja näin ollen positiiviset.



Kuva 16. Toinen ajo phusion-entsyymillä.

Kuvassa 17 näkyvät ensimmäisen digestion tulokset. Siitä nähdään, että T7E1-digestio ei onnistunut. Positiivisessa näytteessä näkyisi kaksi pienempää monistusjuovaa, jotka yhteenlaskettuna olisivat kuvassa näkyvän juovan kokoiset.

Run BioRad 2015-09-22 18hr 16min



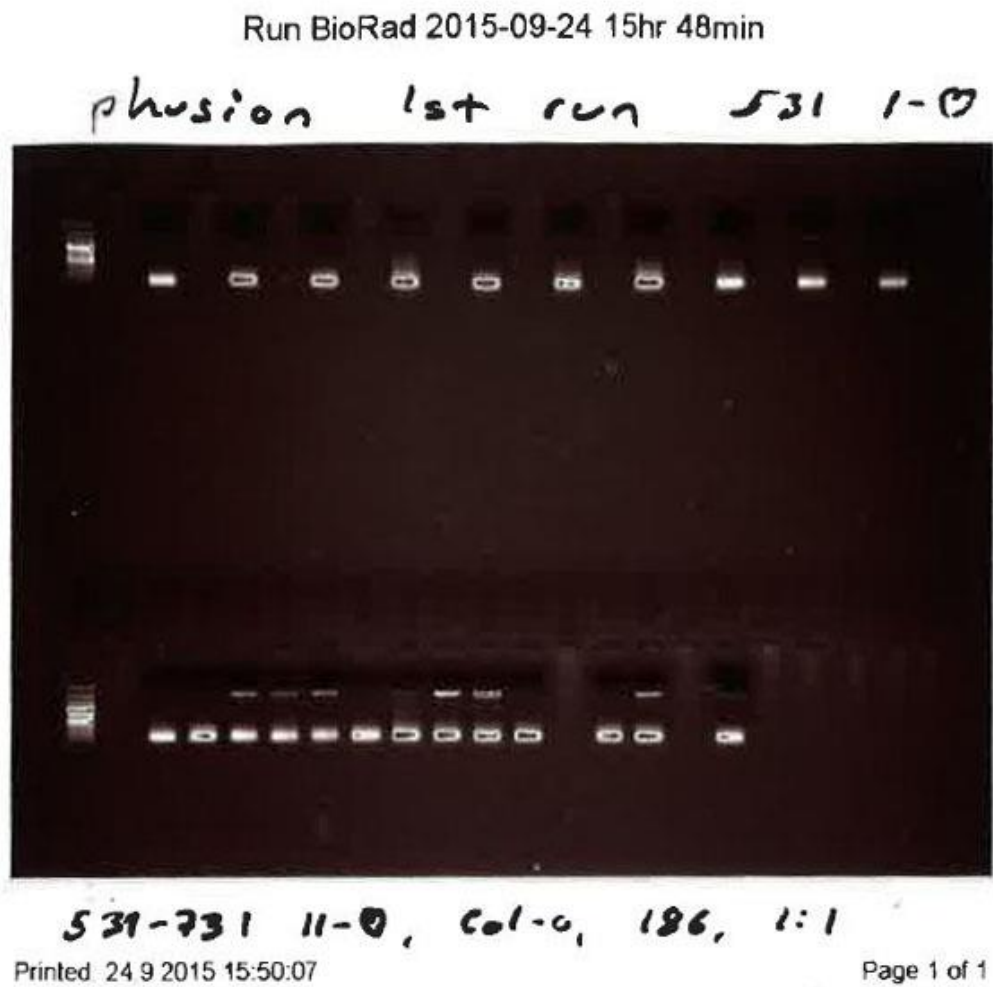
Printed: 22 9 2015 18:17:51

no digestion
-but at least the
PCR worked.

Page 1 of 1

Kuva 17. Phusion-digestio.

Kuvasta 18 nähdään, että ajettaessa isolla määrällä näytteitä positiiviset tulokset olivat hyvin harvinaisia. Vain viisi näytettä ja yksi kontrolli antoivat heikon positiivisen tuloksen. Syyn pääteltiin olevan alukkeet, ja uudet alukkeet tilattiin myöhempiä ajoja varten.



Kuva 18. Phusion ensimmäinen ajo CRISPR 531 ja 531+731.

4.2.2 Uudet alukkeet

Taq-entsyymiä yritettiin saada toimimaan uusilla alukkeilla, mutta kuvasta 19 nähdään, että kaikki näytteet antoivat negatiivisen tuloksen. Tässä vaiheessa päätettiin luopua kokonaan taq -entsyymin käytöstä.



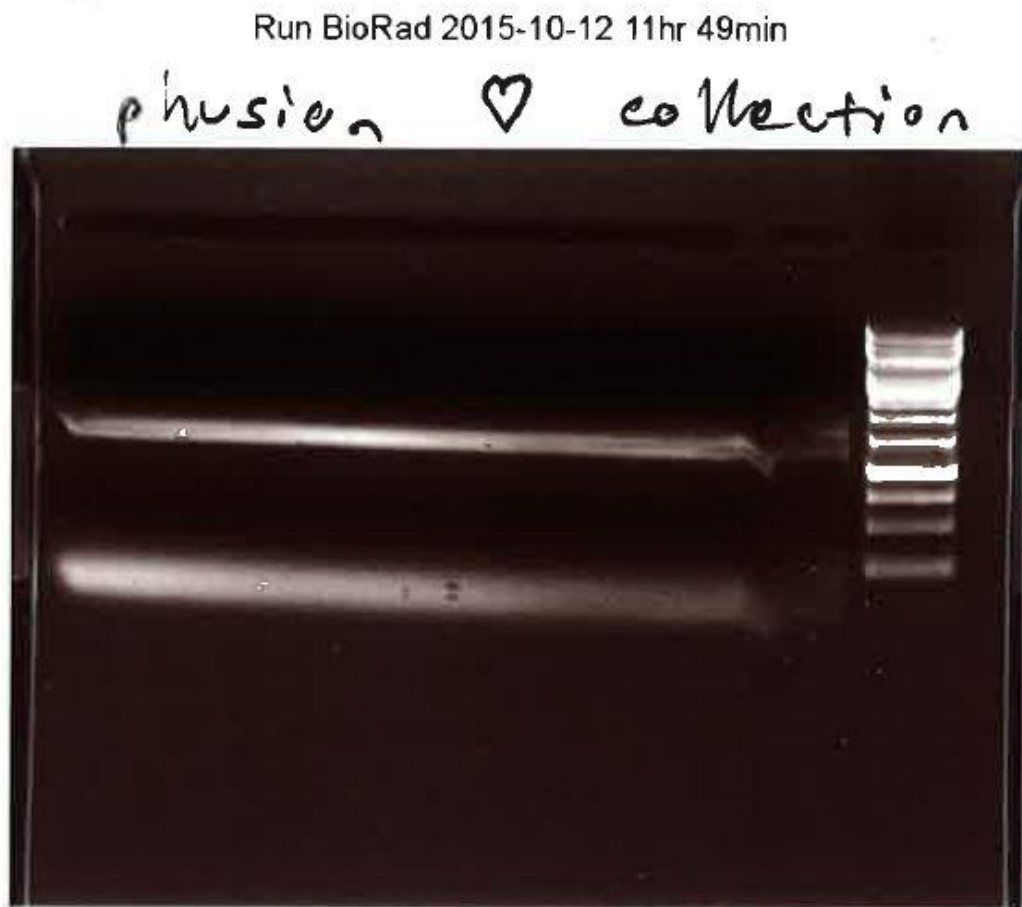
Kuva 19. Taq-entsyymin gradienttiajo uusilla alukkeilla.

Kuvasta 20 nähdään, että hyviä tuloksia ovat alukkeille 1-1 neljä ensimmäistä tulosta (lämpötilat 70 °C; 68,125 °C; 66,25 °C; 64,375 °C ja 62,5 °C). Alukkeille 1-2 ainoastaan kaksi ensimmäistä tulosta ovat hyvät (lämpötilat 70 °C ja 68,125 °C). Aiemman gradientin tuloksena oli 68 °C, ja koska 1-2 alukkeiden tulos 68 °C:n kohdalla näytti paremmalta, päätettiin käyttää sitä myöhemmissä PCR-ajoissa.



Kuva 20. Phusion-entsymin gradienttijaio uusilla alukkeilla.

Kuvassa 21 näkyy tulokset sydännäytteen keräyksestä. Vaikka näyte onkin ajautunut hiukan vinoon, pystyttiin siitä silti arvioimaan, että se oli noin 1300 bp eli oikean kokoista.

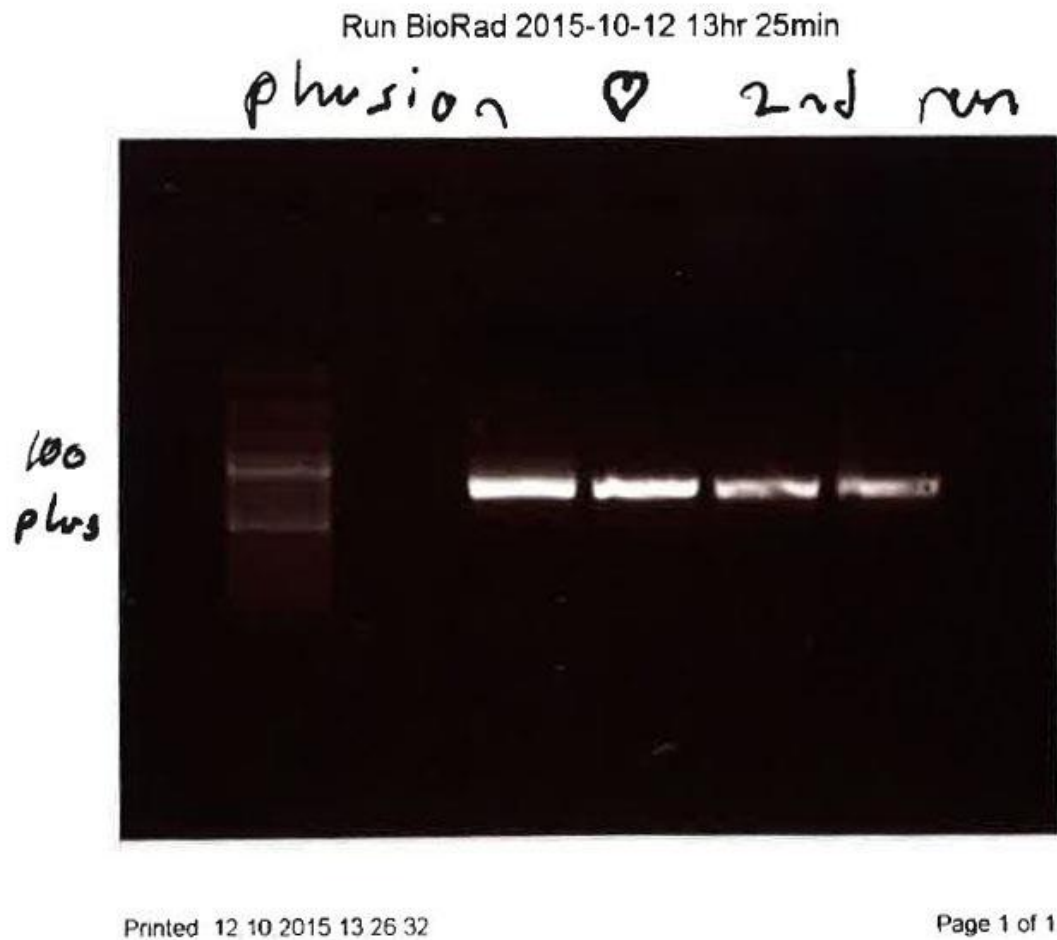


Printed 12 10 2015 11 50 34

Page 1 of 1

Kuva 21. Sydännäytteen keräys ensimmäisellä kierroksella.

Kuvassa 22 näkyy ensimmäisen ajon sydännäytteet tiivistettynä kahdeksi näytteeksi. Vaikka molekyylikokostandardi näkyykin hyvin huonosti, ovat näytteet 700-800 bp eli oikeaa kokoa. Kaksi ensimmäistä ovat sydännäytteitä, ja kaksi viimeisintä kontrollit col-0 ja 1:1 sekoitus.



Kuva 22. Sydännäytteiden toinen ajo.

Kuvassa 23 näkyy sydännäytteiden digestion tulokset. Positiivisia tuloksia ei saatu näkymään huolimatta suuresta näytemäärästä.



Kuva 23. Sydännäytteiden digestio.

Liitteessä 7 on vielä listattu CRISPR 506_43 -linjan sekvensoinnin tulokset, jotka saatiin oman työaikani päättymisen jälkeen. Nuolen osoittamassa kohdassa, missä sekvenssi muuttuu yksiviivaisesta kaksiviivaiseksi, yksi C-nukleotidi on ilmestynyt normaalin genomien väliin eli on tapahtunut insertio. Tämä on positiivinen tulos CRISPR:n onnistumisesta, vaikka T7E1-protokollalla ei onnistuttu selvittämään yhtäkään positiivista tulosta.

5 Johtopäätökset

Koska yksi positiivinen tulos onnistuttiin löytämään, voidaan sanoa että CRISPR-tekniikalla on onnistuttu leikkaamaan *Arabidopsis thaliana* DNA:ta. Se miksi onnistuimme löytämään vain yhden positiivisen tuloksen, johtuu monestakin asiasta. Alkuperäisessä kloonauksessa ja floral dipping:ssä on mahdollisesti onnistunut vain hyvin pieni osa, jolloin myöhemmissä sukupolvissa on hyvin vähän mutatoituneita jälkeläisiä. Tämä on kuitenkin hyvin epätodennäköistä, koska selektiomaljoilta löytyi useita resistenttejä kasveja. Koska positiivinen näyte saatiin sekvensoimalla, ei digestiolla, voi olla että enemmän positiivisia näytteitä jäi löytämättä väärän tekniikan takia. Jos muitakin linjoja olisi sekvensoitu, voi olla että useampi positiivinen näyte olisi löydetty. Lopputulokseen vaikuttavat asiat kerääntyivät koko matkan varrelta, joten käydään läpi johtopäätöksiä aihe kerrallaan.

Työn aikana selvisi, ettei taq-entsyymi toiminut ilman optimointia sen käyttöä varten. On mahdollista, että optimoimalla PCR paremmin voitaisiin taq-entsyymi saada toimimaan. Ajanpuutteen takia käytettiin kuitenkin kalliimpaa phusionia, sillä se on paremmin optimoitu jo valmiiksi.

Siinä missä DNA:ta pystyttiin monistamaan nested PCR:n avulla, ei T7E1:n avulla saatu kumminkaan yhtäkään positiivista tulosta. Tuloksia läpikäydessä huomasin itse eron käytettyjen PCR-ohjelmien ja T7E1-protokollassa annettujen ohjeiden välillä. Protokollassa annetuissa ohjeissa lukee, että ensimmäisessä ohjelmassa pitäisi käyttää 20 sykliä, ja toisessa 35 sykliä. Meidän käyttämissä PCR-ohjelmissa nämä syklit olivat menneet väärin päin, jolloin ensimmäisessä käytettiin 35 sykliä ja toisessa 20. Tämä tarkoittaa että digestiossa oli vähemmän DNA:ta kuin ohje oletti. Tämä saattaa olla syynä T7E1-digestion epäonnistumiselle, mutta muitakin mahdollisia syitä on. CRISPR:n yleisin aiheuttama mutaatio on deletio, sillä se tuhoaa DNA:ta. Meidän tapauksessamme ainoa positiivinen näyte oli kuitenkin yhden nukleotidin insertio. Mutaatio saattoi myös olla liian pieni, jolloin T7E1 ei olisi tarpeeksi spesifinen löytämään mutaatiota.

Koska työn tarkoituksena oli yrittää saada CRISPR-tekniikka toimimaan tutkimamme geenin inaktivoimiseksi, voidaan työtä pitää vain niukkana onnistumisena. On selvää, että CRISPR vaatii työkaluna vielä paljon työtä ennen kuin sitä voidaan käyttää

luotettavasti. Tällä hetkellä CRISPR:in toimivuuden tarkistaminen on hiukan kallista, vaatii joko phusion-entsyymiä tai jopa sekvensointia tulosten tarkistamista varten.

Tekniikkaa kehitetään jatkuvasti ja siihen keskittymällä voidaan sen tuloksia parantaa entisestään. Lituruoho ei ole käytetyin kohde CRISPR/Cas9-tekniikassa, joten sen kehittämiseen tarvitaan vielä työtä ja aikaa, jotta siitä saadaan vahvempi työkalu kasvibiologian puolelle.

Lähteet

- [1] Nature. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. 2000. Verkkodokumentti. <<http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/full/408796a0.html>> Luettu 28.4.16.
- [2] Weigel, Detlef & Glazebrook, Jane. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002, s 7.
- [3] National Institutes of Health. Verkkodokumentti. <<http://modelorganisms.nih.gov/arabidopsis/index.html>> Luettu 28.4.16.
- [4] Weigel, Detlef & Glazebrook, Jane. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002, s 12–13.
- [5] Weigel, Detlef & Glazebrook, Jane. *Arabidopsis: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002, s 3.
- [6] CRISPR/Cas9 Guide. Verkkodokumentti. <<https://www.addgene.org/crispr/guide/>> Luettu 9.5.16.
- [7] Alex Reis, Ph.D. CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology. Verkkodokumentti. <<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>> Luettu 1.5.16.
- [8] Rosanna, Stanford. An introduction to CRISPR gene engineering. Verkkodokumentti. <mimic.stanford.edu/public/Rosanna/Intro_to_CRISPR.pptx> Luettu 1.5.2016.
- [9] Integrated DNA Technologies. CRISPR/Cas9 editing: mutation detection. Verkkodokumentti. <<https://www.idtdna.com/pages/docs/default-source/catalog-product-documentation/crispr-mutation-detection.pdf?sfvrsn=7>> Luettu 1.5.16.
- [10] Davidson. Nested Primers for PCR. Verkkodokumentti. <<http://www.bio.davidson.edu/courses/genomics/method/nestedpqr.html>> Luettu 1.5.16.

- [11] Wheeler, Richard. Verkkodokumentti.
<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nested_PCR.png> Luettu 9.5.16.
- [12] Sangerin menetelmä. Verkkodokumentti.
<http://www.solunetti.fi/fi/solubiologia/sangerin_menetelma/2/> Luettu 17.5.16.
- [13] Obenrader, Sarah. The Sanger Method. Verkkodokumentti.
<http://www.bio.davidson.edu/courses/molbio/molstudents/spring2003/obenrader/sanger_method_page.htm> Luettu 17.5.16.
- [14] T7E1 protocol. Verkkodokumentti. <<http://www.tools-biotech.com/image/2014/05/27/20140527101154.pdf>> Luettu 29.4.16.

CRISPR manual

How to CRISPR a gene:

1. Select a 20 bp target within the gene of interest. The target sequence was first published to be a consensus of 5' GNNNN NNNNN NNNNN NNNNN NGG 3' and can be selected either on the sense or antisense DNA strand (Mali *et al.*, 2013). However, according to P. Mali (personal communication) the G at the 5' end can be replaced with any other base. For purposes of detecting mutations introduced by Cas9 using the restriction enzyme site loss method (Voytas, 2013), we normally select a target that overlaps with a restriction site (avoid Bsal and BbsI/BpiI) in the 3' half of the target sequence as Cas9 cuts towards the 3' end of the target (Jinek *et al.*, 2012). The scheme illustrating the pipeline of the targeted mutagenesis *in planta* is shown in Fig. 1 (Nekrasov *et al.*, 2013).

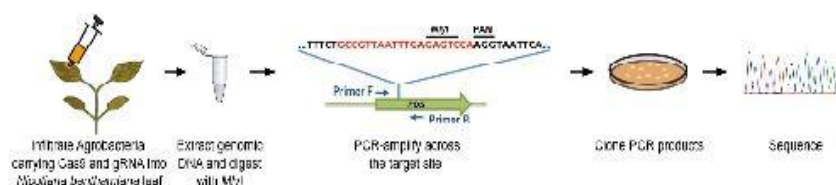


Figure 1. Scheme illustrating the pipeline of the targeted mutagenesis *in planta* using the Cas9 RNA-guided endonuclease.

Alternatively, one may decide to knock-out a gene by creating a large deletion with two sgRNAs targeting two adjacent sequences within a locus of interest. In this case, CRISPR/Cas-induced deletions can be easily detected using the AFLP analysis as shown in Figure 2 (Belhaj *et al.*, In Press).

2. Design the forward sgRNA primer as following:
tgtggtctca **ATTG** NNNN NNNNN NNNNN NNNNN **gttttagagctagaaatagcaag**
 (Bsal site is in blue, the 20 bp guide sequence is in red)

The reverse primer is:

tgtggtctca **AGCG** TAATGCCAACTTTGTAC

Amplify an sgRNA using pICH86966::AtU6p::sgRNA_PDS construct (Addgene plasmid 46966) as a template. The resulting PCR product will be as following (sequence in bold belongs to primers):

tgtggtctcaATTGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAA
 AATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTCTTTTTCTAGACCCA
 GCTTTCTTGTACAAAGTTGGCATTACGCT**gagaccaca**

3. Desalt the PCR product using Sepharose CL-6B (Sigma) or purify with a PCR purification kit and set up a cut-ligation reaction using Bsal with a level 0 construct pICSL01009::AtU6p (Spec^R) and a Level 1 destination vector pICH47751 (Carb^R) or pICH47761 (Carb^R) as illustrated in Fig. 3a and Fig. 4a. The cut-ligation is performed as described in Weber *et al.* (2011). Transform the ligation into *E. coli* and select white colonies on agar with X-Gal and carbenicillin.

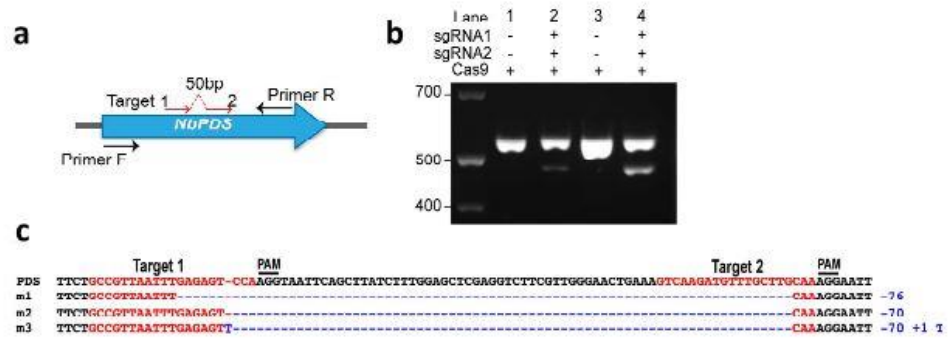


Figure 2. Generation of a chromosomal deletion by targeting two adjacent target sequences within the *PDS* locus of *Nicotiana benthamiana*.

(a) Cartoon explaining setup of the experiment. **(b)** Detection of deletion mutations using the AFLP analysis. Agarose gel shows PCR bands amplified across targets 1 and 2 using genomic DNA extracted from respective leaf samples. Cas9, sgRNA1 and 2 were expressed in *N. benthamiana* leaf tissue using the standard agroinfiltration protocol. In lane 2, Cas9/sgRNA1/sgRNA2 were expressed from three separate plasmids, while in lane 4 they were expressed from a single plasmid. **(c)** Types of deletion mutations identified. Bottom PCR bands from lanes 2 and 4 were cloned into a high copy vector and 15 individual clones were sequenced. All clones contained deletions that can be grouped in three different types (m1-3).

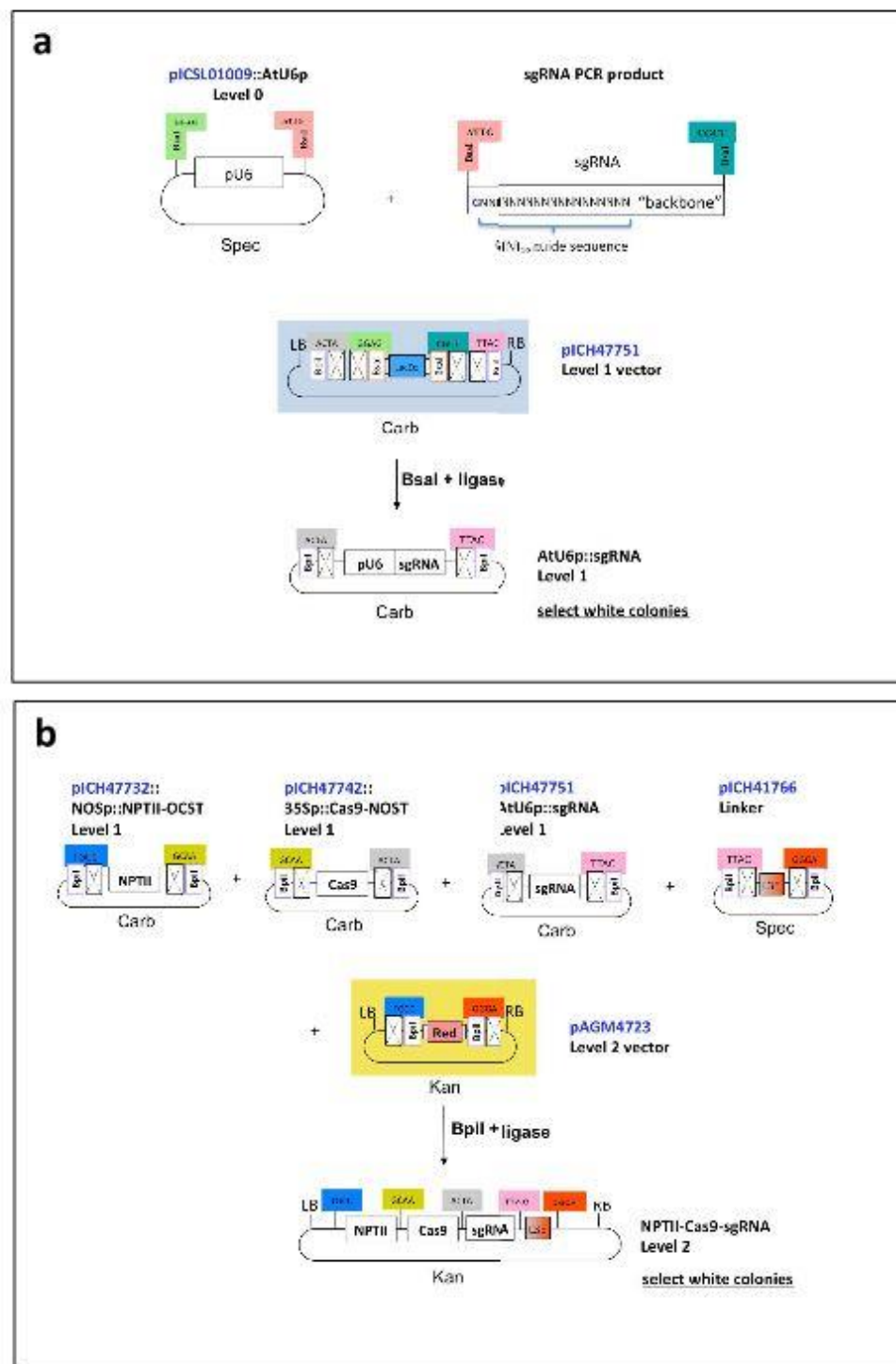


Figure 3. Scheme illustrating the assembling of Cas9/sgRNA expressing constructs with a single sgRNA.

(a) sgRNA is placed under the Arabidopsis U6 promoter in a Level 1 Golden Gate vector.

(b) NPTII in planta selectable marker, Cas9 and an sgRNA are assembled together in a Level 2 Golden Gate vector.

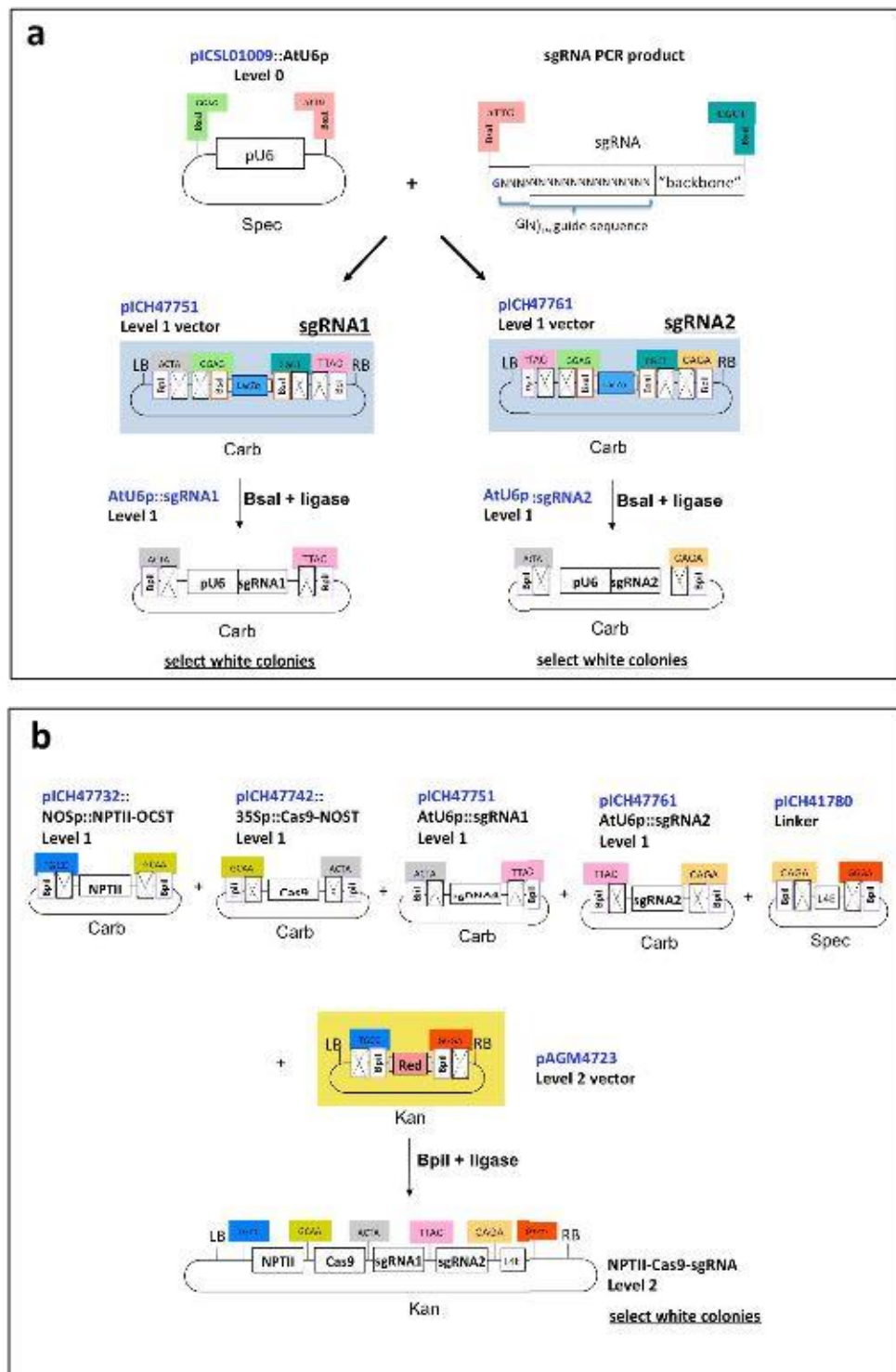


Figure 4. Scheme illustrating the assembling of Cas9/sgRNA expressing constructs with two sgRNAs for the purpose of creating a large deletion.
(a) sgRNAs are placed under the Arabidopsis U6 promoter in Level 1 Golden Gate vectors.
(b) NPTII in planta selectable marker, Cas9 and an two sgRNAs are assembled together in a Level 2 Golden Gate vector.

4. Assemble Level 1 modules expressing an in planta selectable marker (e.g. NPTII), Cas9 and an sgRNA in a Level 2 vector pAGM4723 as illustrated in Fig. 3b (single sgRNA) and Fig. 4b (two sgRNAs). Perform the cut-ligation using BpiI (BbsI). Transform the ligation into *E. coli* and select white colonies on kanamycin.
5. Transform the final Level 2 Cas9/sgRNA construct into Agro.

Figure 4 shows an example of generating a chromosomal deletion by targeting two adjacent target sequences in *Nicotiana benthamiana*.

References

- Nekrasov, V. *et al. Nature Biotech.* **31**, 691-693 (2013).
- Mali, P. *et al. Science* **339**, 823-826 (2013).
- Voytas, D. *Annu Rev Plant Biol.* **64**, 327-350 (2013).
- Jinek, M. *et al. Science* **337**, 816-821 (2012).
- Belhaj *et al. Plant Methods* (In Press).
- Weber, E. *et al. PLoS One* **6**:e16765 (2011).

DNA:n eristys precellys-laitteella

Tässä liitteessä on kuva ohjeesta, jonka avulla eristettiin tarvittavat DNA-näytteet kerätyistä lehtinäytteistä.

Ykä's lab, Dec 201

NA extraction

10x konstruktio: alkuaan

works with 'challenging' material, such as dead leaves, for genotyping purposes (PCR)

1. Arabidopsis leaf in Precellys tube.
2. Add 3 glassballs and 600 μ l Precellys-buffer to the tube.
3. Add β -mercaptoethanol to the buffer. 1 μ l / näyte
4. Add 500 μ l buffer to each tube
5. Turn machine (Precellys 24) on from button behind.
6. Put the tubes evenly to the rack.
7. Program 6800-3x5-30.
8. Program 5 second shake, 1 minute brake x3. Wait for 5 min before opening the lid.
9. Let machine cool for 5 min before turning off.
10. Incubate at 65°C for 10 min
11. Add 500 μ l of chloroform (or 1:1 chloroform:phenol)
12. Mix by vortexing – let stand for 2 min, vortex again
13. Spin at 10 000 rpm for 5 min
14. Remove supernatant to a new tube, add 500 μ l of chloroform \rightarrow 1,5 ml eppari!
15. Mix by vortexing – let stand for 2 min, vortex again
16. Spin at 10 000 rpm for 10 min
17. Add 800 μ l EtOH to new tubes \rightarrow 1,5 ml eppari!
18. Transfer all of the supernatant to EtOH tubes
19. Put tubes in freezer for 20 min or ON
20. Spin for 20 min at 13 000 rpm \rightarrow kyllä fuugi!
21. Take out supernatant
22. Add 200 μ l of 70% EtOH
23. Shake
24. Spin at 6000 rpm for 10 min
25. Take out the ethanol
26. Let dry out (maybe in the fume hood or on the bench with a paper towel on top for few hours)
27. Add 50 μ l of TE
28. Shake on a stand for half an hour
29. Leave in the fridge ON and use the next day
30. Dilute 1:10 and 1:50

1 μ l should be OK for a 20- μ l PCR reaction

Extraction buffer:
100 mM Tris pH 8
1.4 M NaCl

Lehtinäytteiden konsentraatiot

ISPR konsentraatiot ng/ml

506:

1: 64,3	6: 432,6
2: 240,5	7: 203,4
3: 87,1	8: 383,8
4: 126,6	9: 369,7
5: 127,4	10: 442,7

531:

1: 162,7	6: 125,9
2: 432,3	7: 855,2
3: 314,9	8: 233,1
4: 360,0	9: 171,8
5: 285,5	10 (0): 213,6

531+731:

11: 90,0	16: 150,7 388,9
12: 284,9	17: 504,2 96,8
13: 14,5	18: 65,9
14: 82,3 105,5	19: 95,9
15: 200,3 51,5	20 (0): 16,2 (260/230 → 11,07)

CRISPR konsentraatiot:

506: ng/ μ l

11 = 348,6
12 = 727,4
13 = 525,2
14 = 270,1
15 = 456,0

16 = 178,4
17 = 554,0
18 = 495,8
19 = 533,7
20 = 553,2

534-731: ng/ μ l

21 = 691,8
22 = 180,1
23 = 916,6
24 = 807,1
25 = 563,3

26 = 368,0
27 = 287,2
28 = 249,0
29 = 577,6
30 = 833,9

531: ng/ μ l

10 = 822,5
11 = 832,5
12 = 1157,0
13 = 736,5
14 = 459,0
15 = 350,4

16 = 463,0
17 = 532,1
18 = 541,4
19 = 474,7
20 = 330,3

531-731: ng/ μ l

30 = 686,1
31 = 558,9
32 = 374,3
33 = 553,5
34 = 426,7
35 = 527,6

36 = 708,4
37 = 431,7
38 = 272,3
39 = 496,1
40 = 408,7

Primerien tiedot

Sequence (5'->3')

DRQ comp F BamHI

Forward primer tataGGATCC **GCTAATGGACGTTGTGTTGTI**

DRQ comp R BamHI

Reverse primer tataGGATCC **CAAGCTTCAGTGCTTTGGACA**

Product length 1963 + 20 (from tataGGATCC)

Genomic fragment used for complementation –

TGA in an in-frame stop

F primer, **R primer**, **CODING REGION**, **CRISPR NESTED F1_2**, **CRISPR NESTED R1_2**

5'- promoter

gctaatggacggtgtgtgttgtatatcaatatcattgccttggtagacataagcattaacagaccatagaggttgaatatt
agatttgtgtgtgtgtgtgtgtgatgcaaaagtgtttgcttctcaagaatcatgagattatacaaatattatacaatttag
ataatgtgttgaattggaaccgctaaatagcatataaagtgagtataattgtccctgatctcgcaagttccaataaaattg
aacaacaccttccaataagtcatctgtattgtatatactgactgatccgatttaataagaacaaaatcaaatctaaaacca
aaaagaaaaacctttagcaaaaaatgataggacaagtaattgtgtgatgtgcacaagcttgcgtttttat**gcgac**
cggaataaaatacacggcgtttacagtaagtaaaatagtgtttattcacttccagccccacaatttaagagaaattatcaa
taaaccttagtagtatcgaatagtcctacaaaatagaattcgaaccagcgagctgggtgttctcgaattcgaagctgag
atcaaataggtaaagtaggtcacttggtagctgtcttctacacaagaccagaagagagccaaacagaggaatac
gcttctccaca**ATGACAGAAGAATACGAG**gtgcgactctgatttcaattctcagcttattgaatttttctatgtttt
gaaattcagattattaggatcaaatcggatgtaaaagctgtgtcattttaatctgcgcatgaaatcaagatgttgaatcat
tgtttaaaggaacaagattcaaatatgtttctcaatgttactggaatgggaaaaccaattataaaaatctgagcttta
ggattattagtgaatggtatcactccttttgatcaataagaatcatgattagtcttagatgagtcctttggctttatctaaatcg
gaatcctgttagcttctgttctgtttctgattcttaaccaaagttcatgactttggagtttgtgtgtaattgtattgaagagt
tgagctgatgatattatag**GTTGATGAGCAGAAGCAAGCTGCTGCTGATGTGTTGTTTAGT**
TATTCCAAGTTTGCAATGGCCTGCATTGGTAACCATACTCGTCCTACTGACATGAG
GTTGCATTTGATGAAGgtaagttattgaattgtttcagccatctagtgtgattgagatgaccacttttaggatgatg
actctagctactttttatag**GAGATCTCTGGAATGCCAACTTCTCTGAAAGGAAGAGACTCTT**
CTAGAGCAGCTTCTCCTGATCCACTTGCGAATCATCAAGCTCCGGTACTGCCAG
GCTAGATAAAACGGATAGTTTCAGGGCACTTTGAtttagttttctcactgtcaggtctcataaga
tatatgctagtggattacaggataagtatctgtggccgaggaacactactatcaagtttaacttttgatttcgccccatgatagt
gtcaaatgttattaatgctgtattctcagatgtgtttctgaaaaataaatgctatgctgctacttcgagataaatatctcc
catttctgaatagagtattactatcgtgtattctatgttat**cccgagcacagaacatggttct**tgagtcagattgttcggtat
ggaaacctagatcatcaaaagttggaaggtatagcaacctaatcagctattgatattcctggtgttccaaaagaaattt
agtcttctatccacagttcgttctcagttagactctgatcttfaatgttggtaacagtagtaattgttttgaggagagttcacata
ctgcgatgtaacatccataatttt**gtccaaagcactgaagctt**gaaaaggagcat -3'- UTR

GeneJET Gel Extraction Kit –ohje

PRINCIPLE

The DNA fragment of interest is excised from an agarose gel, placed in a microcentrifuge tube, solubilized in binding buffer and applied to the column. The chaotropic agent in the binding buffer dissolves agarose, denatures proteins and promotes DNA binding to the silica membrane in the column. As an added convenience, the binding buffer contains a color indicator that allows for easy monitoring of the solution pH for optimal DNA binding. Impurities are removed with a simple wash step. Purified DNA is then eluted from the column with the elution buffer. The recovered DNA is ready for use in downstream applications.

IMPORTANT NOTES

- Prior to the initial use of the kit, dilute the **Wash Buffer** (concentrated) with ethanol (96-100%):

	50 preps #K0691	250 preps #K0692
Wash Buffer (concentrated)	9 mL	45 mL
Ethanol	45 mL	225 mL
Total Volume	54 mL	270 mL

After the ethanol has been added, mark the check box on the bottle to indicate the completed step.

- Examine the **Binding Buffer** for precipitates before each use. Re-dissolve any precipitate by warming the solution to 37 °C and cooling to 25 °C.
- Wear gloves when handling the **Binding Buffer** as this solution contains irritants (see p.9 for SAFETY INFORMATION).
- Do not reuse electrophoresis buffer when extracted DNA fragment will be used directly for sequencing.

ADDITIONAL MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED

- Ethanol 96-100%.
- Isopropanol.
- 3 M sodium acetate, pH 5.2 (may be necessary).
- Microcentrifuge.
- 1.5 or 2 mL microcentrifuge tubes.
- Heating block or water bath.

PURIFICATION PROTOCOLS

Note

- Read IMPORTANT NOTES on p. 3 before starting.
- All purification steps should be carried out at **room temperature**.
- All centrifugations should be carried out in a table-top microcentrifuge at $>12000 \times g$ (10 000-14 000 rpm, depending on the rotor type).

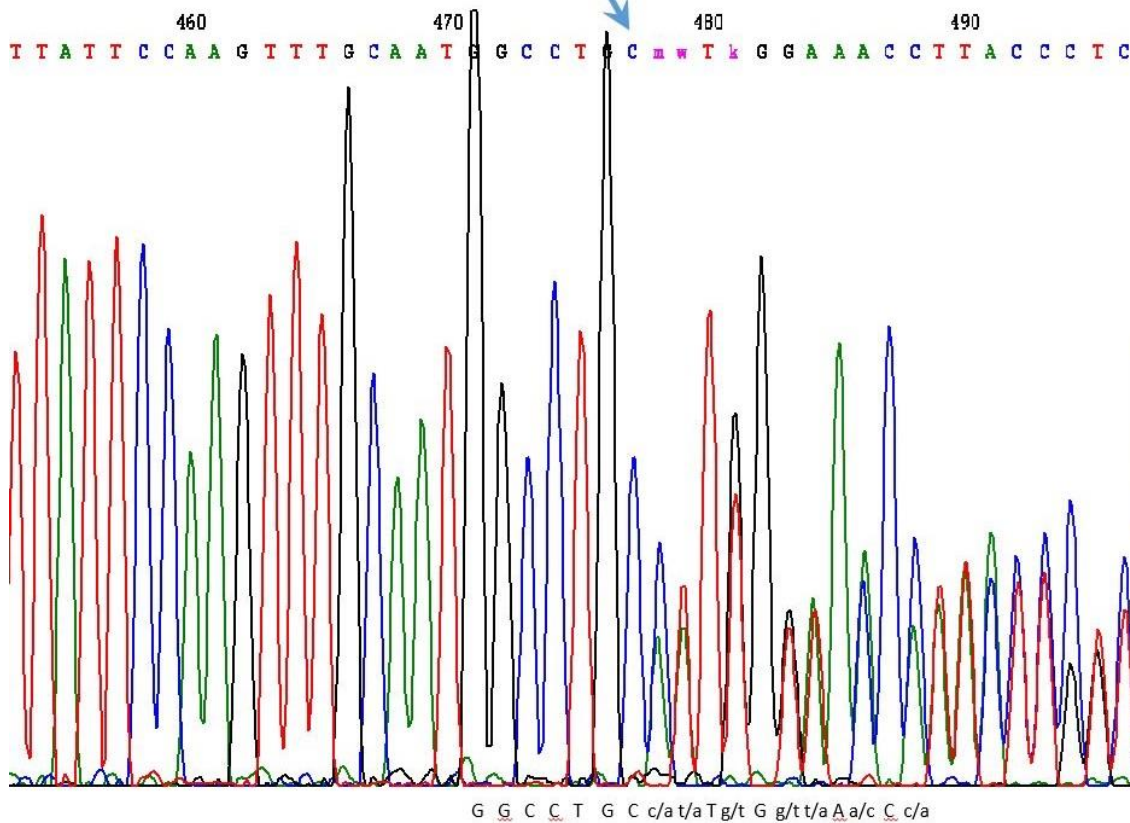
Protocol A. DNA extraction from the gel using centrifuge

Step	Procedure
1	Excise gel slice containing the DNA fragment using a clean scalpel or razor blade. Cut as close to the DNA as possible to minimize the gel volume. Place the gel slice into a pre-weighed 1.5 mL tube and weigh. Record the weight of the gel slice. Note. If the purified fragment will be used for cloning reactions, avoid damaging the DNA through UV light exposure. Minimize UV exposure to a few seconds or keep the gel slice on a glass or plastic plate during UV illumination.
2	Add 1:1 volume of Binding Buffer to the gel slice (volume: weight) (e.g., add 100 μL of Binding Buffer for every 100 mg of agarose gel). Note. For gels with an agarose content greater than 2%, add 2:1 volumes of Binding Buffer to the gel slice.
3	Incubate the gel mixture at 50-60 °C for 10 min or until the gel slice is completely dissolved. Mix the tube by inversion every few minutes to facilitate the melting process. Ensure that the gel is completely dissolved. Vortex the gel mixture briefly before loading on the column. Check the color of the solution. A yellow color indicates an optimal pH for DNA binding. If the color of the solution is orange or violet, add 10 μL of 3 M sodium acetate, pH 5.2 solution and mix. The color of the mix will become yellow.
4 for ≤ 500 bp and >10 kb DNA fragments	<i>Optional:</i> use this step only when DNA fragment is ≤ 500 bp or >10 kb long. <ul style="list-style-type: none"> • If the DNA fragment is ≤ 500 bp, add 1 gel volume of 100% isopropanol to the solubilized gel solution (e.g. 100 μL of isopropanol should be added to 100 mg gel slice solubilized in 100 μL of Binding Buffer). Mix thoroughly. • If the DNA fragment is >10 kb, add 1 gel volume of water to the solubilized gel solution (e.g. 100 μL of water should be added to 100 mg gel slice solubilized in 100 μL of Binding Buffer). Mix thoroughly.
5	Transfer up to 800 μL of the solubilized gel solution (from step 3 or 4) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube. Note. <ul style="list-style-type: none"> • If the total volume exceeds 800 μL, the solution can be added to the column in stages. After each application, centrifuge the column for 30-60 s and discard the flow-through after each spin. Repeat until the entire volume has been applied to the column membrane. Do not exceed 1 g of total agarose gel per column. • Close the bag with GeneJET Purification Columns tightly after each use!

Step	Procedure
6	<p><i>Optional:</i> use this additional binding step only if the purified DNA will be used for sequencing.</p> <p>Add 100 μL of Binding Buffer to the GeneJET purification column. Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.</p>
7	<p>Add 700 μL of Wash Buffer (diluted with ethanol as described on p. 3) to the GeneJET purification column. Centrifuge for 1 min. Discard the flow-through and place the column back into the same collection tube.</p>
8	<p>Centrifuge the empty GeneJET purification column for an additional 1 min to completely remove residual wash buffer.</p> <p>Note. This step is essential to avoid residual ethanol in the purified DNA solution. The presence of ethanol in the DNA sample may inhibit downstream enzymatic reactions.</p>
9	<p>Transfer the GeneJET purification column into a clean 1.5 mL microcentrifuge tube (not included). Add 50 μL of Elution Buffer to the center of the purification column membrane. Centrifuge for 1 min.</p> <p>Note.</p> <ul style="list-style-type: none"> • For low DNA amounts the elution volumes can be reduced to increase DNA concentration. An elution volume between 20-50 μL does not significantly reduce the DNA yield. However, elution volumes less than 10 μL are not recommended. • If DNA fragment is >10 kb, prewarm Elution Buffer to 65 °C before applying to column. • If the elution volume is 10 μL and DNA amount is \leq 5 μg, incubate column for 1 min at room temperature before centrifugation.
10	<p>Discard the GeneJET purification column and store the purified DNA at -20 °C.</p>

CRISPR 506_43 -linjan sekvenssi

Sequencing – 506' forward



506' reverse

200 210 220 230 240 250
C A A C C T C A T G T C A G T A G G A C G A G T A T G G T T A C C A A T G **G** T G **C** C T T G G C A A A C T G

