

Siiri Mero

CRISPR/Cas9-menetelmän optimointi *T. reesei*- -transformaatioissa

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

28.11.2017

Tekijä Otsikko Sivumäärä Aika	Siiri Mero CRISPR/Cas9-menetelmän optimointi <i>T. reesei</i> - transformaatiossa 38 sivua + 3 liitettä 28.11.2017
Tutkinto	Laboratorioanalyttikko (AMK)
Tutkinto-ohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaajat	Johtava tutkija Nina Aro Lehtori Tiina Soininen
<p>Opinnäytetyö suoritettiin Teknologian tutkimuskeskus VTT:n tiloissa laboratoriossa, jossa kehitetään rihmasienikantoja proteiinien tuottoa varten. Työn tarkoituksena oli optimoida käytettävää <i>Trichoderma reesei</i> -transformaatiota, jossa geneettistä materiaalia siirretään PEG 6000 välitteisesti protoplastien avulla solusta toiseen. Optimoinnin tavoitteena oli tulevaisuudessa saada säästettyä sekä aikaa että resursseja.</p> <p>CRISPR/Cas9 on vuonna 2012 kehitetty genominmuokkausmenetelmä, jonka toiminta perustuu Cas9 endonukleaasientsyymien toimintaan. Menetelmässä tarvitaan myös gRNA-kompleksi, joka on muodostunut crRNA:sta ja tracrRNA:sta. gRNA:n sekvenssin avulla Cas9 ohjautuu tiettyyn kohtaan genomisessa DNA:ssa. Mikä tekee CRISPR/Cas9 -menetelmästä niin merkittävän, on sen tarkkuus ja nopeus; DNA-juoste saadaan katkaistua tehokkaasti juuri oikeasta kohdasta vähäisellä työllä</p> <p>Neljän eri transformaation kautta vertailtiin ja selvitettiin esimerkiksi eri transformaatioliuosten optimaalisia pitoisuuksia, donor-DNA:n määrän vaikutusta saatujen pesäkkeiden määrään sekä crRNA:iden mahdollisuutta targetoitua kahteen eri lokukseen samassa transformaatiossa. Alussa selvitettiin myös parasta selektiomarkkeria tulevia transformaatioita varten.</p> <p>Tuloksista selvisi transformaatioiden onnistuvan vähennetyllä protoplastien määrällä, sillä transformaatiot toistettiin niin monta kertaa, että pesäkkeiden suuri määrä ei voinut olla esimerkiksi kontaminaatiosta johtuva. Kokeilla todistettiin myös, että käytetyllä donor-DNA:n määrällä on vaikutusta saatujen pesäkkeiden lukumäärään sekä optimaalisten pitoisuuksien vaihtelevan käytetystä crRNA:sta riippuen.</p> <p>Viimeisenä tehtiin PCR-seulonnat, joilla selvitettiin mihin klooneihin oli onnistuneesti saatu CRISPR-menetelmän avulla siirrettyä haluttu DNA-jakso. Myös kahteen eri lokukseen targetoituneita crRNA:ita oli useita tapauksia. Tulosten perusteella menetelmän toimivuus todettiin onnistuneeksi.</p>	
Avainsanat	Transformaatio, CRISPR/Cas9, <i>T. reesei</i>

Author Title Number of Pages Date	Siiri Mero Optimization of CRISPR/Cas9 Method in <i>T. reesei</i> Transformation 38 pages + 3 appendices 28 November 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructors	Nina Aro, Principal Scientist Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>This study was carried out at VTT, Technical Research Centre of Finland, premises in a laboratory that develops filamentous fungus strains and yield of proteins. The aim of the study was to optimize the <i>Trichoderma reesei</i> transformation, in which the genetic material is transferred PEG 6000 solution medially via protoplasts from one cell to another. The goal of the optimization was to save both time and resources in the future.</p> <p>CRISPR/Cas9 is a genomic modification method developed in 2012. Its action is based on the functioning of Cas9 endonuclease enzyme. The method also requires gRNA complex, which consists of crRNA and tracrRNA. Using the gRNA sequence, Cas9 is directed to a particular site in genomic DNA. What makes CRISPR/Cas9 method so significant is its accuracy and speed; the DNA strand can be effectively cut off at the right place with minimum effort.</p> <p>Through four different transformations for example the optimum concentrations of different transformation solutions, the effect of the amount of donor-DNA on the number of colonies and the ability of crRNAs to target two different locus during one transformation were compared and studied. In the beginning the best selection marker was also studied for future transformations.</p> <p>The results showed that transformations succeeded even with the reduced amount of protoplasts, as the transformations were repeated so many times that the large number of colonies could not be, for example, due to contamination. The experiments also demonstrated that the amount of used donor-DNA has an effect on the number of colonies obtained and that the optimum concentration depends of the used crRNA.</p> <p>Lastly, PCR screenings were performed to determine which clones had successfully obtained the desired DNA-section transposed by the CRISPR method. There were also several cases of success of crRNAs targeting two different locus. Based on these results the effectiveness of the method was found to be successful.</p>	
Keywords	Transformation, CRISPR/Cas9, <i>T. reesei</i>

Sisällys

Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Työn teoria	1
2.1	<i>Trichoderma reesei</i>	1
2.2	Protoplastit ja niiden valmistus	3
2.3	Transformaation selektiomarkkerit	3
2.3.1	Hygromysiini	4
2.3.2	Asetamidi	4
2.3.3	<i>pyr4</i>	5
2.4	Perinteisen transformaatiomenetelmän haasteet	5
2.5	CRISPR/Cas9-menetelmä	6
3	Materiaalit ja menetelmät	8
3.1	Menetelmän optimointi	8
3.2	Käytetyt kasvumaljat	9
3.3	Käytetyt plasmidit ja niiden käsittely	9
3.4	Käytetyt protoplastit	12
4	Transformaation optimointi ja tulosten tarkastelu	12
4.1	<i>T. reesei</i> -transformaatiot	12
4.2	Selektiomarkkereiden vertailu	13
4.3	Toinen transformaatio	17
4.4	Kolmas transformaatio	23
4.5	Neljäs transformaatio	27
4.6	PCR-seulonta	32
5	Päätelmät	34
	Lähteet	36

Liitteet

Liite 1. IDT:n käyttöohje - Alt-R CRISPR-Cas9 system

Liite 2. PCR:n Phire-ohjelma

Liite 3. Agarosigeelikuvat PCR-seulonnoista

Lyhenteet

amdS	asetamidaasia koodaava geeni.
CBH _I	sellobiohydrolaasi .
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. DNA-jaksoja, jotka ovat osa bakteerien ja arkkien immuunijärjestelmää.
crRNA	CRISPR RNA. RNA, joka muodostuu immuunijärjestelmässä.
DMPC	dimetyylidikarbonaatti. Yhdiste, jota käytetään veden käsittelyssä RNAasien poistamiseksi.
gRNA	guideRNA eli ohjain-RNA. crRNA:sta ja tracrRNA:sta muodostuva kompleksiksi, joka toimii RNA-ohjausjaksona.
tracrRNA	trans-aktiivinen crRNA. RNA, jonka avulla crRNA kiinnittyy Cas-entsyymiin.

1 Johdanto

Opinnäytetyö suoritettiin Teknologian tutkimuskeskus VTT Oy:n proteiininuottolaboratoriossa, jossa kehitetään tehokkaita rihmasieni- tai mikrobikantoja proteiinien tuottoon. Tällä hetkellä VTT Oy on johtava tutkimuslaitos *Trichoderma reesei* -rihmasienien kehittämisessä tuotanto-organismeiksi. Tutkinnassa on varsinkin eri proteiininuottokantojen fysiologiset tuotantoprosessit, jotta proteiininuotto-organismeja saataisiin kehitettyä tehokkaammiksi.

CRISPR/Cas9-menetelmä on yksi tämän hetken suurimpia keksintöjä geeninmuokkauksen saralla. Mikä tekee CRISPR/Cas9:stä niin ylivoimaisen, on sen edullisuus, nopeus ja tarkkuus; DNA-juoste saadaan katkaistua tehokkaasti juuri oikeasta kohdasta vähäisellä työllä. Menetelmän käyttöä varten tarvitsee oikeastaan vain selvittää DNA:n emäsjärjestys sekvensoinnilla.

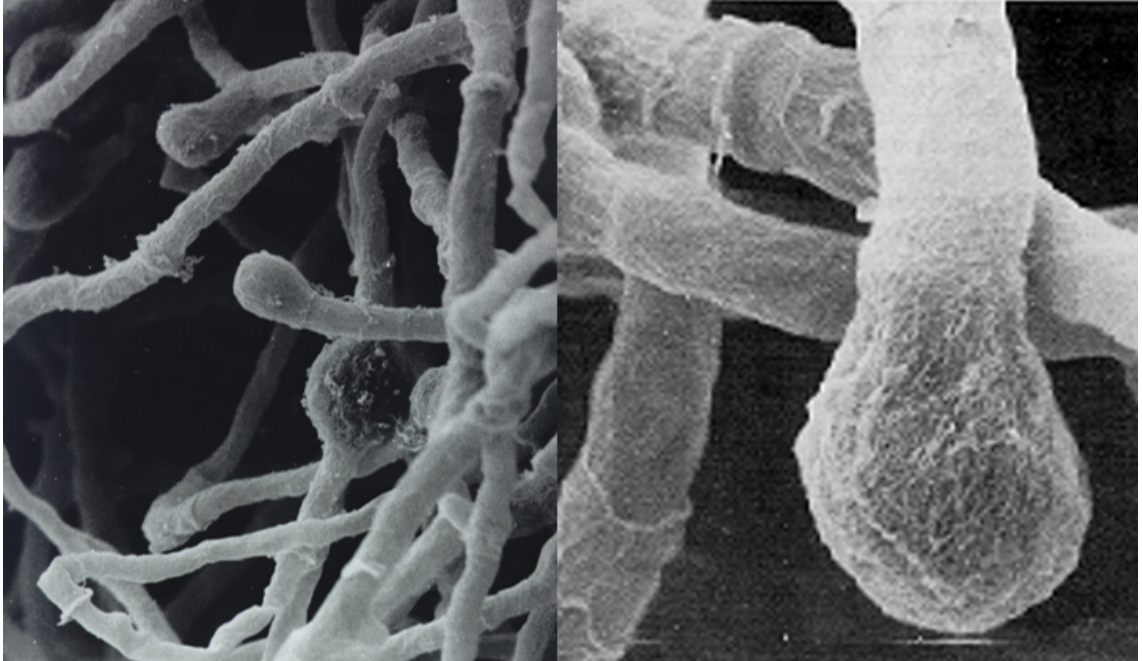
Tavoitteena oli tutkia ja optimoida CRISPR/Cas9-menetelmän toimintaa *T. reesei* -rihmasienen transformaatioissa, jotta tulevaisuudessa voitaisiin säästää resursseja, aikaa sekä materiaaleja. Neljän eri transformaation kautta vertailtiin ja selvitettiin esimerkiksi eri transformaatioliuosten optimaalisia pitoisuuksia, donor-DNA:n määrän vaikutusta saatujen pesäkkeiden määriin sekä crRNA:iden mahdollisuutta targetoitua kahteen eri lokukseen samassa transformaatioissa. Opinnäytetyön tutkimuksissa koitettiin vähentää käytettyjen protoplastien määrää transformaatioissa, sekä jättää top-agar kokonaan pois.

2 Työn teoria

2.1 *Trichoderma reesei*

Trichoderma reesei (kuva 1.) on teollisuudessa laajasti käytetty rihmasieni, joka on eniten tutkittu sekä yleisimmin käytetty sellulolyyttisten entsyymien tuottaja. Sen erittämiä entsyymejä voidaan hyödyntää esimerkiksi elintarvike- ja paperiteollisuudessa sekä jätteiden hajotuksessa [1]. Sen laajaa käyttöä selittää kyky sekä syntetisoida että erittää kasvualustaan suuria määriä proteiineja [2]. Sellulaasien transkriptionaalista säätelyä sekä erityksen etenemistä on laajalti tutkittu proteiininuotannon parantami-

seksi. On raportoitu kantoja, jotka tuottavat jopa 100 g/l proteiineja. Esimerkiksi CBH1 proteiinia koodittaa *cbh1* geeni, joka vastaa jopa 50 %:sta kokonaisproteiineista. [3.] Tästä johtuen *cbh1* säätelyalue ja paikka genomissa soveltuvat erittäin hyvin myös vieraiden proteiinien tuottoon.



Kuva 1. *Trichoderma reesei* -rihmasieni. Kuva Nina Aro.

Alun perin *Trichoderma* liitettiin neljän muun sienilajin kanssa samaan taksoniin yli 200 vuotta sitten, mutta vasta toisen maailmansodan aikaan tutkimus mätääntymisen saralla paljasti sen potentiaalin sellulolyyttisenä sienenä. 20 vuotta tämän jälkeen onnistuttiin tunnistamaan ja eristämään isolaatti QM6a, joka nimettiin *T. reesei*ksi sen tutkijan Elwyn T. Reesen mukaan. Tällä hetkellä perustutkimuksen ja bioteknologian kannat ovat peräisin tästä isolaatista. QM6a toimiikin ainoana esikantana monille mutanteille, joita on käytetty sellulaasituotannossa. [4, s. 43.]

Vuosien aikana *T. reesei* -kantojen käytöstä teollisessa mittakaavassa on kertynyt runsaasti tutkimuksia, tietoa sekä kokemuksia, osoittaen sienen mahdollisuuden toimia turvallisena isäntänä erilaisille vaarattomille geenituotteille [4, s. 198]. QM6a-peräisiä mutantteja käytetäänkin entsyymituotannossa, sekä sovelletaan elintarvike-, rehu- ja lääketeollisuudessa. [5.]

2.2 Protoplastit ja niiden valmistus

Protoplastit ovat soluja, joista on poistettu soluseinä, jolloin niitä pitää kasassa vain ulkoinen solukalvo. Yleisin tapa poistaa soluseinä on entsyymaattisella käsittelyllä, jossa entsyymit pilkkovat rihmasienen soluseinän polymeereja. Protoplastien teko suoritetaan yleensä osmoottisessa liuoksessa, jonka konsentraatio on sama kuin soluilla. Näissä olosuhteissa solut eivät hajoa käsittelyn aikana. Kun soluseinä on poistettu, syntynyt protoplasti on muodoltaan pallomainen. [6.]

Inkuboinnin jälkeen protoplastit sisältävä liuos suodatetaan sinterin läpi, jolloin liuoksen hajonneista soluista ja soluseinän osista päästään eroon. Protoplastit kerätään pelletiksi putken pohjalle sentrifugoimalla, jonka jälkeen ne pestään 1,2 M sorbitoli - 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) -liuoksella ja sentrifugoidaan uudestaan [7]. Pelletti resuspendoidaan 1,2 M sorbitoli - 10 mM CaCl₂ - 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) -liuokseen.

Protoplasteja käytetään monin eri tavoin kantakehityksessä ja tutkimustyössä. Ne toimivat PEG 6000 -välitteisen transformaation lisäksi esimerkiksi elektroporaatiossa, lämpöshokki- sekä pH-käsittelyssä. [6.]

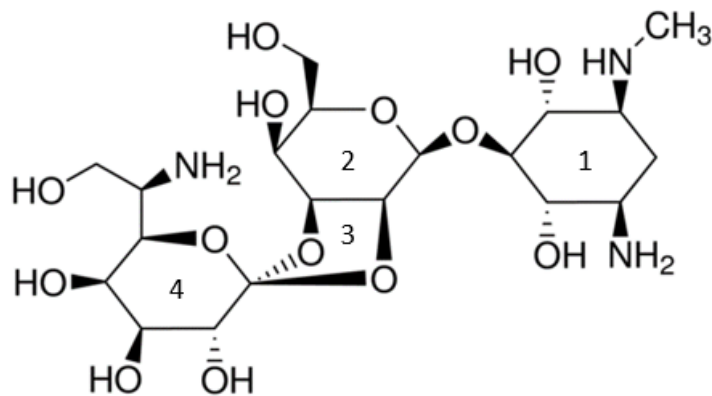
2.3 Transformaation selektiomarkkerit

Transformaatiossa geneettinen materiaali siirtyy DNA:n välityksellä solusta toiseen. Transformaatiot voidaan esimerkiksi suorittaa PEG 6000 -välitteisesti protoplasti-transformaatiolla. Entsyymaattisesti käsitellyistä protoplasteista on poistettu soluseinä osmoottisesti stabiloiduissa olosuhteissa, jonka seurauksena ne vastaanottavat DNA:ta helpommin [4, s. 226]. PEG eli polyetyleeniglykoli taas lisää solukalvon läpäisevyyttä ja helpottaa näin protoplastien kykyä vastaanottaa DNA:ta. [8.]

Transformaation eräs optimointikohde on kolmen eri selektiomarkkerin vertailu, joista tehokkaimmalla jatkettiin seuraavissa transformaatioissa. Selektiomarkkerit eli merkki geenit mahdollistavat siirtogeenisten solujen kasvun tietyllä maljalla. Paljon käytetään esimerkiksi antibiootikestävyysgeenejä, jolloin kestävyysgeenin sisältävät solut kasvavat antibioottia sisältävillä maljoilla, kun taas ilman kestävyysgeeniä olevat solut kuolevat. [8.]

2.3.1 Hygromysiini

Hygromysiini B on antibiootti, jota *Streptomyces hygroscopicus* -bakteeri tuottaa. Sen resistenssigeeni löydettiin 1980-luvun alkupuolella. Sitä käytetään solujen selektion lisäksi varsinkin eläinlääketieteessä sisäloisten häädössä. Rakenteeltaan hygromysiini B on glykosidi, joka koostuu kolmesta aminosokerikomponentista (kuva 2), joskin sillä on kaksi eetterisidosta, jotka muodostavat kolmannen renkaan toisen ja neljännen renkaan väliin. [9.]

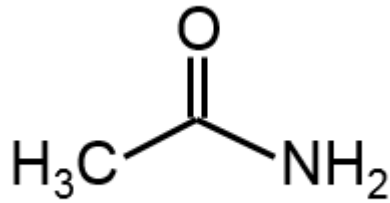


Kuva 2. Hygromysiini B -antibiootin rakennekaava [10. muokattu]

Hygromysiinin toiminta transformaatioissa perustuu proteiinisynteesiä estävään vaikutukseen. Se toimii sekä prokaryooteissa että eukaryooteissa häiritsemällä translokatiota ja aiheuttamalla väärinlukua translaatioissa. Hygromysiinin resistenssigeeni kooditaa kinaasia, joka inaktivoi antibiootin fosforylaatiota. Resistenssin käytössä etuna on, että se ei häiritse muita metabolisia mekanismeja tai solutoimintoja. [11.]

2.3.2 Asetamidi

Asetamidi (kuva 3) on orgaaninen yhdiste, jota käytetään esimerkiksi teollisuusliuottimena sekä osana lääkeaineiden synteesiä. Asetamidin käytön etuna on sen edullisuus verrattuna useimpiin antibiootteihin.



Kuva 3. Asetamidin rakennekaava

Asetamidi toimii transformaatiossa typpilähteenä selektiona. Käytetyillä asetamidi-transformaatiomaljoilla ovat kaikki tarvittavat ravintoaineet sekä hiilenlähteet transformanttien kasvua varten, mutta maljoilta puuttuu typen lähde. Solut pystyvät hyödyntämään kasvumaljoilla olevaa asetamidia vain, jos niihin on transformoitunut ekspresiovektorin kanssa läsnä oleva asetamidaasientsyymiä koodaava geeni. Tällöin solut pystyvät hajottamaan asetamidia ammoniakiksi ja käyttämään sitä hyväksi typpilähteenä. [12.]

2.3.3 *pyr4*

T. reesei *pyr4* -geeni koodaa orotidiini 5'-fosfaattidekarboksylaasi (ODCase) entsyymiä [13], jota tarvitaan uridiinin biosynteesissä. ODCase-aktiivisuuden vaje johtaa solukasvun puutteeseen, ellei ylimääräistä urasiilia tai uridiinia lisätä kasvumediaan. Transformaatiossa *pyr4*:n läsnäolo lisää ODCase-aktiivisuutta, mahdollistaen transformanttien kasvun maljoilla ilman lisättyä urasiilia tai uridiinia. [3.]

2.4 Perinteisen transformaatiomenetelmän haasteet

VTT:llä transformaatiot on suoritettu Penttilän (1987) julkaisun ohjeiden mukaisesti. [14]. Siinä käytettyjen protoplastien, DNA:n ja maljojen määrä on huomattavan suuri saatujen transformanttien määrään verrattuna.

Protoplastien valmistus on vaativaa ja aikaa vievää. Parhaimmillakin valmistuskerroilla saadaan noin 5 ml:aa protoplasteja. Kun niitä käytetään 250 µl:aa transformaatiota kohden, huomataan niiden riittävän vain 20 transformaatioon. Myös donor-DNA:n määrä on suuri, sillä jokaista transformaatiota varten täytyy eristää 10-20 µg:aa plasmidia.

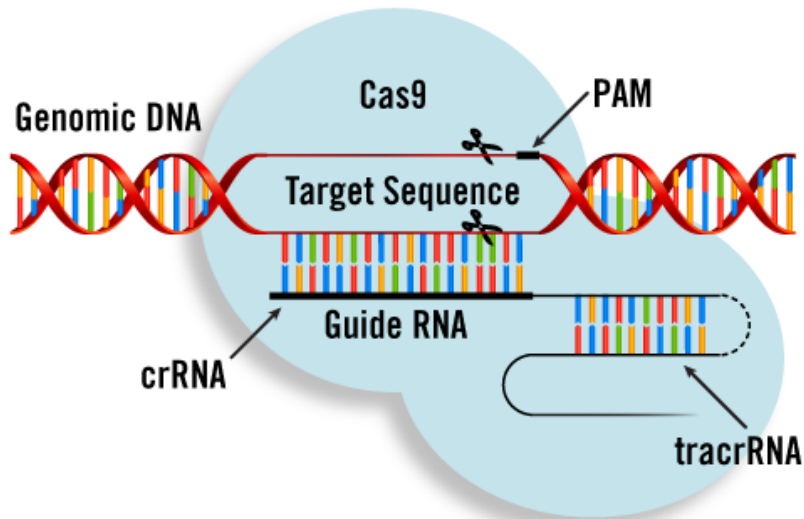
Plasmidia täytyy siis olla valmiina paljon tai sitä pitää joka kerta kasvattaa ja eristää uutta transformaatiota varten.

Koska protoplasteja ja liuoksia käytetään suuria määriä, transformaatioliuoksen lopputilavuus on iso. Tällöin pitää käyttää suuria 15 ml:n greinerputkia eppendorffputkien sijaan. Kaikki liuos kuitenkin käytetään, joten maljoja per transformaatio kuluu 10-30 kappaletta. Jos tämän lisäksi transformoidaan samalla kerralla enemmän kuin yksi plasmidi, maljattujen maljojen määrä nousee nopeasti lähemmäs sataan. Samalla myös top-agarია kuluu runsaasti.

2.5 CRISPR/Cas9-menetelmä

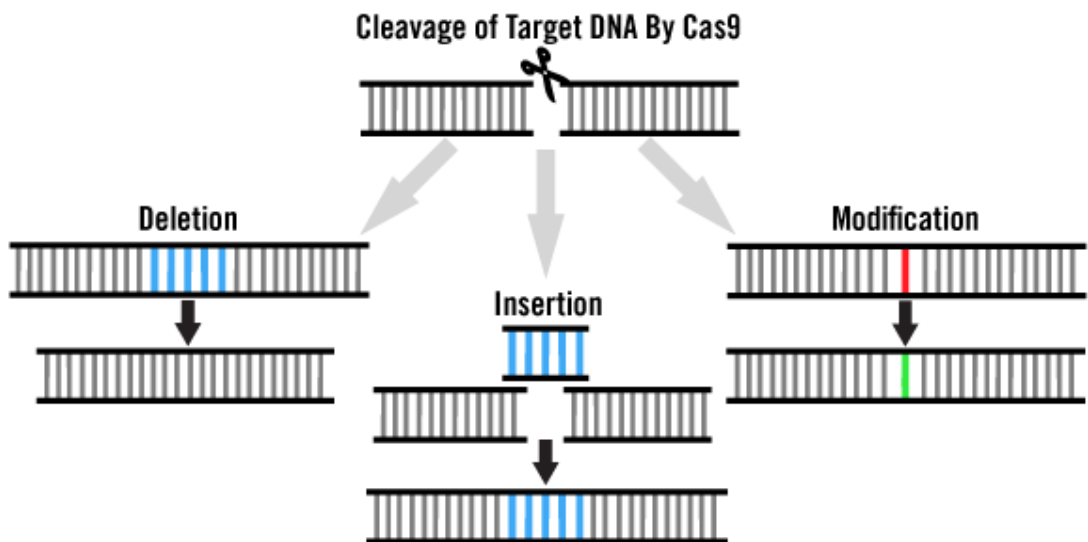
CRISPR/Cas9 on vastikään kehitetty genomien muokkausmenetelmä, joka perustuu Cas9-proteiiniin ja käytettävän gRNA:n toimintaan. Sen vahvuuksia ovat tarkkuus, yksinkertaisuus ja halpuus verrattuna kaikkiin aikaisempiin menetelmiin. Vuoden 2012 jälkeen sitä on sovellettu niin sienten kuin nisäkäs- ja hiivasolujen geenimuokkaustyökaluna. Yksinkertaisimmillaan menetelmään tarvitaan vain Cas9-proteiini, sen ohjaukseen käytetty RNA-juoste sekä donor-DNA. Cas9 (CRISPR associated protein) on endonukleaasi, joka pystyy katkaisemaan DNA-juosteen. [15.]

Tekniikassa crRNA:sta ja tracrRNA:sta muodostetaan gRNA-kompleksi, joka toimii RNA-ohjausjaksona. Molemmat osat tarvitaan, jotta paikkaspesifinen DNA-tunnistus onnistuu. tracrRNA:n avulla crRNA kiinnittyy Cas-entsyymiin. gRNA on lyhyt syntetisoitu RNA, joka koostuu noin 20 nukleotidin sekvenssistä. Cas9 sitoutuu gRNA:han ja ohjautuu sen RNA-sekvenssin perusteella tiettyyn kohtaan muokattavassa organismin genomissa. Genomisessa DNA:ssa se sitoutuu lyhyeen DNA-jaksoon PAM-kohdealueelle (protospacer adjacent motif), jossa se tekee kaksijuosteisen katkoksen (DSB) sitoutuvaan kohtaan kuvan 4 mukaisesti [16]. Hyödyntämällä solun omia korjausmenetelmiä tai tuomalla soluun palan vierasta DNA:ta sen genomia pystytään muokata erittäin tarkasti. Cas9 saadaan vietyä kohteeseen joko suoraan proteiininä tai plasmidivektorin avulla.



Kuva 4. Kaavakuva CRISPR/Cas9 toiminnasta [15.]

Cas9:n muunnokset (kuva 5) ovat laajentaneet CRISPR:n soveltamisaloja varsin lyhyessä ajassa. Vaihtoehtoina menetelmässä on esimerkiksi inaktivaatio tai insertointi. Inaktivaatiossa Cas9 leikkaa DNA:n tietystä kohtaa, jolloin solu pyrkii itse liittämään katkokset yhteen. Näin voidaan tarkastella tietyn geenin poiston vaikutusta soluun. Insertoinnissa taas katkottuun kohtaan liitetään haluttu geeni. [17.]



Kuva 5. CRISPR/Cas9:n eri sovellukset kaaviona [15.]

3 Materiaalit ja menetelmät

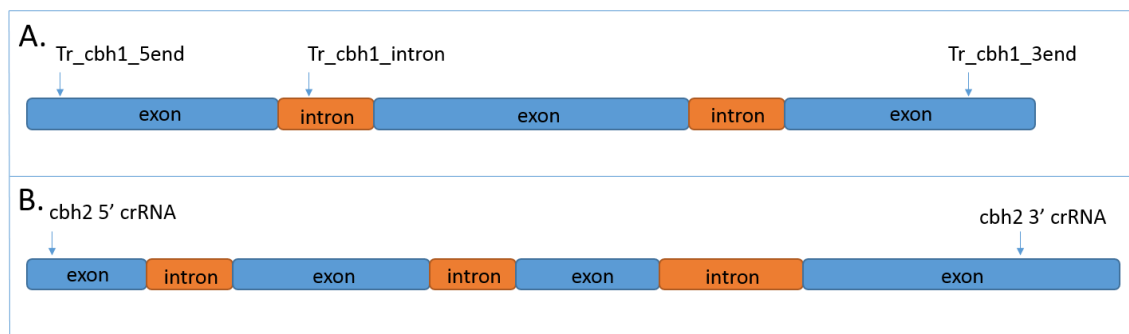
3.1 Menetelmän optimointi

Opinnäytetyössä käytettiin viittä eri crRNA:ta, jotka ovat listattuna taulukkoon 1. Taulukkoon on merkitty myös sekvenssit, joiden perusteella donor-DNA:n sekvenssistä löydetään niitä vastaavat kohdat.

Taulukko 1. Työssä käytetyt crRNA:t ja niiden sekvenssit

	crRNA	Sekvenssi
1.	Tr_cbh1_intron	CCTGACGCTATCTTCTTGTT
2.	Tr_cbh1_5end	GTCGGCCTGCACTCTCCAAT
3.	Tr_cbh1_3nd	GGACCTACCCAGTCTCACTA
4.	cbh2_5end	TCTCACCACGCTGGCTACGCTGG
5.	cbh2_3end	CCAAGCACCAGCTTGAGGCGCCG

Alla olevassa kuvassa 6 on hahmoteltu käytettyjen crRNA:iden paikat *cbh1* ja *cbh2* geenien koodaavilla alueilla.



Kuva 6. A. *Cbh1* geenin koodaava alue ja crRNA:iden kohdat geenissä. B. *Cbh2* geenin koodaava alue ja crRNA:iden kohdat geenissä

Tässä työssä keskityttiin aluksi tärkeimpään sellulaasigeeniin, *cbh1*:een, jonka promoottori on voimakas ja useimmiten käytetty promoottori proteiiniutuotannossa, ja jonka sijainti genomissa on osoittautunut hyväksi alueeksi ekspressoida vieraita proteiineja. Myöhemmin käytettiin myös *cbh2* geenin lokusta. Nämä geenit koodaavat sellulaasientsyymejä, jotka hajottavat selluloosaa glukoosiksi. Ne katkaisevat ensin sello-

bioyksiköitä polysakkaridiketjujen päistä, jonka jälkeen sellobioosi katkaistaan glukooksi. [18, s. 3 & 366.]

3.2 Käytetyt kasvumaljat

T. reesei -transformaatioissa käytettiin kolmea eri selektiota, joihin vaadittiin erilaisia maljoja. Taulukkoon 2 on koottu opinnäytetyössä käytetyt maljat ja niiden ainesosat.

Taulukko 2. Opinnäytetyössä käytetyt maljat.

Maljat	Ainesosat
pyr4 transformaatiomaljat	KH ₂ PO ₄ (15 g/L), (NH ₄) ₂ SO ₄ (5 g/L), glukoosi (20 g/L), hivenaineet* (1 ml/L), sorbitoli (182,2 g/L), raastettu agar (18 g/L), MgSO ₄ (2,4 mM), CaCl ₂ (4,1 mM), pH 5.5.
Hygromysiini transformaatiomaljat	Samat kuin pyr4 transformaatiomaljoissa + hygromysiini (125 µg/ml)
Hygromysiini-amds transformaatiomaljat	Samat kuin pyr4 transformaatiomaljoissa + hygromysiini (125 µg/ml), 10mM asetamidi, 12,5 mM CsCl
TrMM-Triton	Samat kuin pyr4 transformaatiomaljoissa, mutta ilman sorbitolia ja lisätty Triton X-100 konsentraatiossa 0,1 %.

* FeSO₄ x 7 H₂O (5 g/L), MnSO₄ x H₂O (1,6 g/L), ZnSO₄ x 7 H₂O (1,4 g/L), CoCl₂ x 6 H₂O (3,7 g/L)

3.3 Käytetyt plasmidit ja niiden käsittely

Seuraavia plasmideja (taulukko 3) käytettiin transformaatioissa ja CRISPR/Cas9-tekniikassa donor-DNA:na.

Taulukko 3. Opinnäytetyössä käytetyt plasmidit.

Plasmidi	Konsentraatio	Selektiomarkkeri	Lokus
B8052	464 ng/ μ l	Hygromysiini B	<i>cbh1</i>
B8669	660 ng/ μ l	<i>amdS</i>	<i>cbh1</i>
B7375	292 ng/ μ l	<i>pyr4</i>	<i>cbh1</i>
B8176	581 ng/ μ l	<i>pyr4</i>	<i>cbh2</i>

Testitransformaation jälkeen jatkettiin vain kahdella plasmidilla, joista B7375 toimii *cbh1*-geenin lokukseen targetoituvien crRNA:iden donor-DNA:na ja B8176 *cbh2*-geenin lokukseen targetoituvana donor-DNA:na. Kuvassa 7 on esitettyinä plasmidien yksinkertaistettu rakenne.

B7375, *cbh1* lokuksen donor-DNAB8176, *cbh2* lokuksen donor-DNA

Kuva 7. Työssä käytettyjen donor-DNA:iden rakenne. DNA:ssa päiden kylkiosat mahdollistavat donor-DNA:n kohdentumisen oikeaan paikkaan genomissa, ja ilman niitä Cas9:n katkaisukohta ei korjaannu. *pyr4*-osa on välttämätön, jotta selektio transformaatiossa onnistuu.

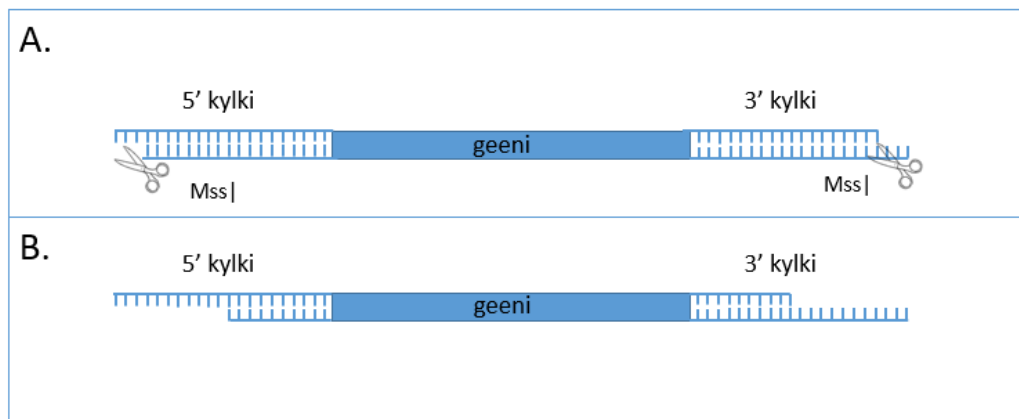
Opinnäytetyössä käytettyjä plasmideja digestoititiin 5 μ g:aa sekä T7-eksonukleaasi käsiteltiin ennen transformaatiota.

Putkeen pipetoitiin kaikki digestiota varten tarvittavat liuokset (taulukko 4). Digestiossa käytettiin Thermo Fisherin MssI-entsyymiä, joka tunnistaa sekvenssissä 5'-päästä lähtien kohdan GTTT ↓ AAAC ja katkaisee sen 37 °C:n lämpötilassa. Entsyymiin annettiin vaikuttaa noin tunnin ajan, jonka jälkeen sen vaikutus inaktivoitiin 65 °C:n lämpötilassa 10 minuutin ajan.

Taulukko 4. Digestiota varten pipetoidut ainesosat.

	Määrä (μl)
plasmidia	7,5-17
10x fast digest buffer	4
<i>Mss</i> I-entsyymi	2
DDIW	17-26,5
Yhteensä	40

Työssä käytettiin New England Biolabsin T7-eksonukleaasia, joka toimii 5' päästä 3' suuntaan katalysoiden 5' nukleotidien poistoa kaksijuosteisesta DNA:sta (kuva 8). Näin aikaansaadaan 3' yksisäikeisiä ulokkeita, jotka tehostavat rekombinaatiota haluttuun kohtaan. [20.]



Kuva 8. Kaavakuva T7-eksonukleasikäsittelystä ennen transformaatiota. A. *Mss*I digestoitu plasmidi ennen käsittelyä. B. T7-eksonukleasi käsitelty plasmidi

Kaikki taulukon 5 osat pipetoitiin yhteen eppendorffputkeen, jota inkuboitiin jäällä kahdeksan minuutin ajan, jonka jälkeen se siirrettiin suoraan 75 °C:n lämpöblokkiin 15 minuutin ajaksi. Tänä aikana reaktio saatiin loppumaan.

Taulukko 5. T7-eksonukleaasikäsittelyn ainesosat.

	Määrä (µl)	Lopullinen pitoisuus
DNA fragmentti (digestoitu)	40	5 µg
10x puskuri 4	5	1x
1M DTT	0,5	10 mM
100x BSA	0,5	1x
T7-eksonukleaasi (10 U/µl)	1,25	12,5 U
DDIW	2,75	
Yhteensä	50	

Plasmidi käytettiin transformaatioon suoraan käsittelyn jälkeen.

3.4 Käytetyt protoplastit

Työssä käytetyt protoplastit (taulukko 6) on valmistettu VTT:n työohjeen [6] mukaisesti. Testitransformaation jälkeen jatkettiin M2070-kannan PP83 protoplasteilla.

Taulukko 6. Opinnäytetyössä käytetyt protoplastit.

Protoplastit	Kanta	Solumäärä
PP73	M2068	$4 \times 10^7 / ml$
PP83	M2070	$5 \times 10^7 / ml$

CRISPR-transformaatioissa sekä niiden valmisteluissa käytettiin RNA-laatuista pipetin kärkiä sekä eppendorffputkia ribonukleaasien takia. Ribonukleaasit eli RNAaasit ovat entsyymejä, jotka hajottavat RNA:ta katkomalla fosfodiesterisidoksia [19]. Myös hanskojen käyttö tästä syystä oli erityisen tärkeää.

4 Transformaation optimointi ja tulosten tarkastelu

4.1 *T. reesei* -transformaatiot

Opinnäytetyössä tehtiin neljä erilaista transformaatiota, jossa tutkittiin seuraavia yhdistelmiä ja asetuksia:

1. Selektiomarkkereiden vertailu ja top-agarin poisjätö
2. Kolmen eri *cbh1* geenin lokukseen targetoituvan crRNA:n optimaalisten pituuksien määrittäminen
3. Kahden eri *cbh2* geenin lokukseen targetoituvan crRNA:n optimaalisten pituuksien määrittäminen, vanhojen kompleksien säilyvyys sekä eri crRNA yhdistelmien toimivuuksien vertailu
4. Donor-DNA:n määrän vaikutus pesäkkeiden lukumäärään, RNP-kompleksien säilyvyys sekä uusi HiFi Cas9

4.2 Selektiomarkkereiden vertailu

Ensimmäisessä transformaatiossa testattiin ja vertailtiin kolmea eri selektiomarkkeria sekä tutkittiin mahdollisuutta tehdä transformaatiot ilman top-agaria. Kaikista kolmesta transformaatiosta suoritettiin rinnakkaiset maljaukset (taulukko 8), joissa DNA-seosta maljattiin samat määrät, mutta toisessa käytettiin top-agaria ja toisessa seos levitettiin transformaatiomaljoille sterilisoiduilla lasihelmillä. Testitransformaatio suoritettiin nykyisen transformaatio-ohjeen mukaisella menetelmällä [14].

Transformaatiot suoritettiin vesihautteessa +54 °C:n lämpötilassa, sillä top-agar jähmettyy huoneenlämmössä. Lämmitettyihin top-agareihin lisättiin taulukon 7 mukaiset liuokset ennen transformaation aloitusta.

Taulukko 7. Testitransformaation top-agareihin tehdyt lisäykset.

	Hygromysiini top-agar, 300 ml	AmdS top-agar, 300 ml	pyr4 top-agar, 400 ml
1 M CaCl ₂	1,23 ml	1,23 ml	1,23 ml
1 M MgSO ₄	720 µl	720 µl	720 µl
1 M CsCl		4,1 ml	
1 M asetamidi		3 ml	
434 mg/ml hygromysiini B	103 µl		

Taulukkoon 8 on listattu yhteenveto kaikista maljauksista ja niihin käytetyistä protoplasteista sekä plasmideista. Jokaisessa selektiossa maljattiin 12 maljaa top-agarilla ja 12

maljaa ilman top-agaria. Negatiivikontrolleina maljattiin myös TE-transformaatioliuoksia samoille maljoille ja top-agareille kuin transformaatiossa.

Taulukko 8. Yhteenveto testitransformaation maljauksista

	Hygromysiini selektio		AmdS selektio		pyr4 selektio	
protoplastit	PP73		PP73		PP83	
DNA	B8052	TE	B8669	TE	B7375	TE
Maljaus top-agarilla ja ilman	4x250 µl	2x500 µl	4x250 µl	2x500 µl	4x250 µl	2x500 µl
	4x100µl		4x100µl		4x100µl	
	4x50µl		4x50µl		4x50µl	
Maljojen määrä yhteensä	24	4	24	4	24	4

Protoplastit nostettiin -80 °C:sta jäille sulamaan hyvissä ajoin ennen DNA:n lisäystä. 250 µl:aan protoplasteja pipetoitiin 50 µl:aa DNA:ta tai TE-puskuria kontrollimaljoja varten. Seoksia inkuboitiin jäällä 20 minuutin ajan, jonka jälkeen ne siirrettiin steriileihin 15 ml:n greinerputkiin. Putkiin lisättiin 2 ml:aa 25 % PEG 6000 – 50 mM CaCl₂ – 10 mM Tris-HCl -liuosta (pH 7,5) ja annettiin seistä huoneenlämmössä viisi minuuttia. Lopuksi lisättiin 4 ml:aa 1,2 M sorbitoli – 10 mM CaCl₂ – 10 mM Tris-HCl -liuosta (pH 7,5). Lisäysten välissä putkia sekoitettiin kääntämällä.

Transformaatiossa käytettiin steriilejä koeputkia, joihin pipetoitiin 8 ml:aa top-agaria. Koeputkiin pipetoitiin 50, 100 ja 250 µl:aa transformaatioseosta samalla vorteksoiden. Kontrollimaljoja varten pipetoitiin 500 µl:aa TE-liuosta. Maljauksen jälkeen maljat nostettiin kasvamaan +28 °C:n lämpötilaan reilun viikon ajaksi.

Pesäkkeiden kasvettua tarpeeksi niiden lukumäärät laskettiin ja kirjattiin ylös (taulukko 9).

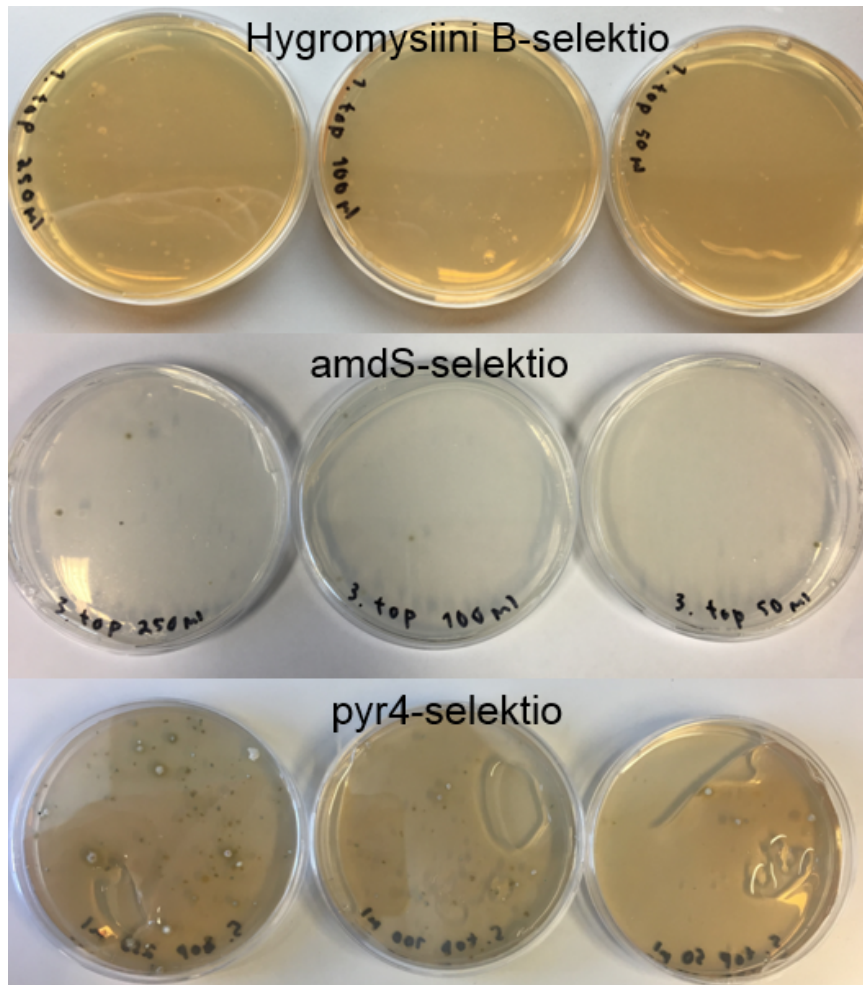
Taulukko 9. Testitransformaation pesäkkeiden lukumäärät merkittynä keskiarvoina.

Hygromysiini selektio		
	Top-agarilla	Ilman top-agaria
50 µl	5	0
100 µl	10	2
250 µl	19	3

AmdS selektio		
	Top-agarilla	Ilman top-agaria
50 µl	2	0
100 µl	2	0
250 µl	5	2

pyr4 selektio		
	Top-agarilla	Ilman top-agaria
50 µl	6	1
100 µl	18	2
250 µl	27	1

Taulukkoon lasketut luvut ovat neljän maljan keskiarvoja. Kuten taulukon arvoista huomataan, ero top-agarilla ja ilman top-agaria maljatuilla maljoilla on huomattava. Tästä voidaan päätellä top-agarin suojaavan protoplasteja ja olevan välttämätön osa seuraavissa transformaatioissa.



Kuva 9. Eri selektiomenetelmien maljat vertailtuna

Kuvassa 9 on vertailtu eri selektiomenetelmillä maljattuja maljoja. Siirryttäessä vasemmalta oikealle top-agariin pipetoidun transformaatioliuoksen määrä pienenee.

Hygromysiini-transformaatiomaljoilla oli suhteellisen paljon pesäkkeitä, mutta ne olivat pieniä verrattuna *pyr4*-maljojen transformantteihin. *Pyr4*-maljojen pesäkkeitä olikin eniten ja ne olivat sopivan kokoisia.

AmdS-transformaatiomaljoilla pesäkkeiden kasvu oli huomattavasti vähäisempää ja hitaampaa kuin muilla maljoilla. Tämän lisäksi maljoilla näkyi paljon pientä taustakasvua, niin transformaatiomaljoilla kuin TE-kontrollimaljoilla.

Kaikki TE-kontrollimaljat olivat kuitenkin puhtaita, mikä viittaa siihen, että transformaatiomaljoilla kasvavat pesäkkeet eivät ole peräisin kontaminaatiosta.

Testitransformaation jälkeen opinnäytetyötä päädyttiin jatkamaan pyr4-selektiolla.

4.3 Toinen transformaatio

Toisessa transformaatioissa tutkittiin eroja kolmen eri *cbh1*-geeniin kohdentuvan crRNA:n sekä eripitoisten transformaatioseosten eroja. Testattiin myös mahdollisuutta vähentää transformaatioliuoksen tilavuutta kymmenesosaan normaalista, jolloin protoplasteja käytettäisiin vain 25 µl:aa

Transformaatiota varten valmistettiin 3 µM:n kompleksit kaikista käytetyistä crRNA:ista (taulukko 1) taulukon 10 mukaisesti.

Taulukko 10. 3 µM crRNA/tracrRNA kompleksiin pipetoidut osat.

Liuos	Määrä (µl)
100 µM Alt-R crRNA	1
100 µM Alt-R tracrRNA	1
Nuclease-Free Duplex -puskuri	32
Yhteensä	34

Komplekseja keitettiin +95 °C:n lämpötilassa viiden minuutin ajan, jonka jälkeen niiden annettiin jäähtyä huoneenlämpöiseksi. Jäähtyneistä 3 µM:n komplekseista valmistettiin 1 µM:n pitoiset laimennokset.

Cas9-proteiinista valmistettiin kaksi eripitoista laimennosta (taulukko 11) RNP-komplekseja varten. Ennen käyttöä Alt-R Cas9-nukleaasi putkea sekoitettiin ja sentrifugoitiin kevyesti. 10x Cas9 aktiivisuuspuskuri laimennettiin 1x pitoiseksi käyttämällä DMPC-laatuista DDIW:tä.

Taulukko 11. Alt-R Cas9-nukleaasin laimennoksiin pipetoidut osat.

	3 µM	1 µM
Alt-R Cas9	1,5 µl	0,5 µl
1x Cas9 aktiivisuuspuskuri	32 µl	33 µl
Yhteensä	33,5 µl	33,5 µl

Seuraavaksi valmistettiin RNP-kompleksit taulukon 12 mukaisesti. Taulukon tarkkoja pipetointimääriä ei ole merkitty julkiseen versioon. IDT:n käyttöohjeen [20] mukaan

RNP-kompleksit säilyvät 4 °C:ssa neljän viikon ajan ja -80 °C:ssa jopa puoli vuotta (liite 1).

Taulukko 12. Toisen transformaation RNP-komplekseihin pipetoidut osat.

Lopullinen konsentraatio	200 nM	150 nM	100 nM	50 nM	10 nM
3 µM tracrRNA/crRNA kompleksi					
1 µM tracrRNA/crRNA kompleksi					
3 µM Cas9					
1 µM Cas9					
1x Cas9 aktiivisuuspuskuri					
Yhteensä	5,4 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl

Kun kaikki RNP-kompleksin osat oli saatu pipetoitua putkeen, komplekseja inkuboitii huoneenlämmössä viiden minuutin ajan.

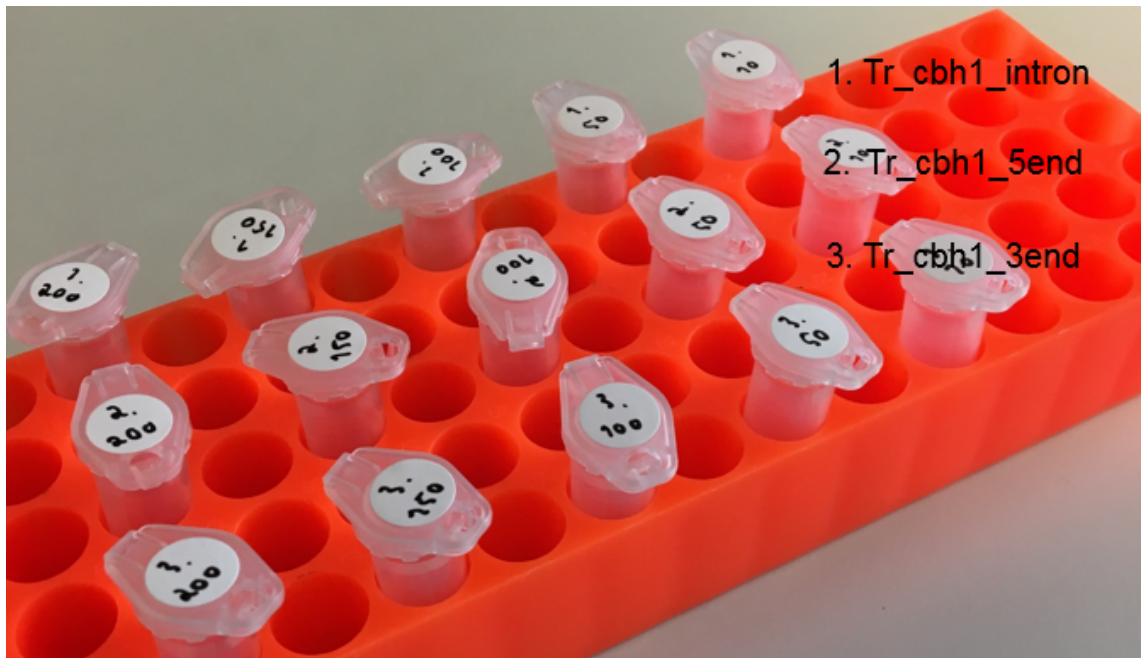
CRISPR-transformaatioita varten B7375 plasmidia digestoitii *MssI*-entsyymillä, mutta ei T7-eksonukleasikäsitelty.

PP83 protoplastien annettiin sulaa jäällä 20 minuutin ajan ennen transformaation aloittamista. Eppendorfputkiin lisättii 25 µl:aa protoplasteja sekä muut komponentit, jotka on listattu taulukossa 13. Taulukon tarkkoja pipetointimääriä ei ole merkitty julkiseen versioon. Tämän jälkeen seoksia inkuboitii jäällä 20 minuutin ajan.

Taulukko 13. Toisen transformaation transformaatioliuoksiin lisätyt komponentit.

	Skaala					Ei CRISPR	TE kontrolli
	200 nM	150 nM	100 nM	50 nM	10 nM		
protoplasteja	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl	25,0 µl
tracrRNA/crRNA/Cas9 - kompleksi (RNP-kompleksi)							
B7375 200 ng/µl							
Nuclease free duplex - puskuri							
TE-puskuri pH 7.5							15,0 µl
yht.	40,4 µl	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl	40,0 µl

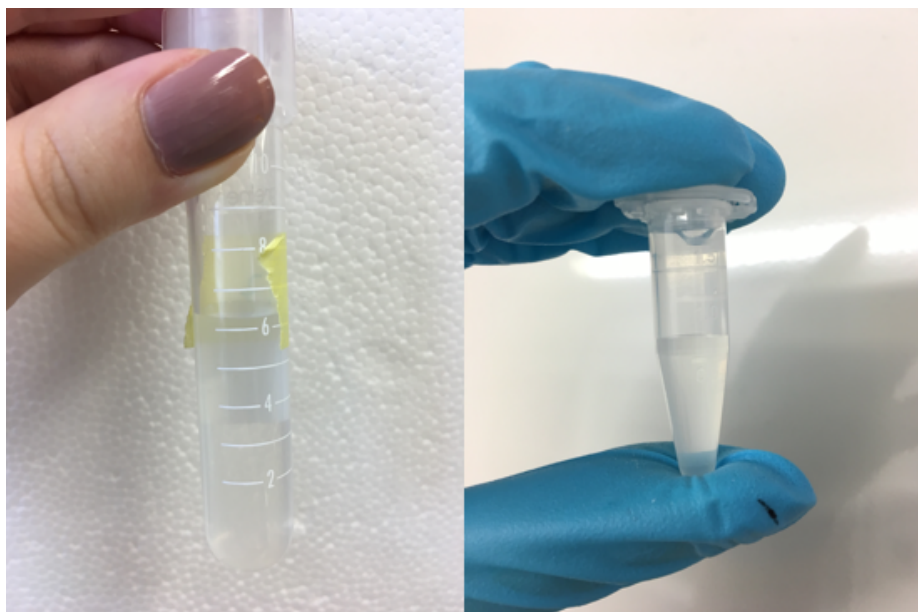
Kuvassa 10 eppendorffputket, joihin on lisätty kaikki transformaatioliuoksen komponentit. On hyvä huomata, että jokaisesta crRNA:sta valmistettiin viisi eripitoista liuosta.



Kuva 10. Kaikki transformoidut liukset pitoisuuksineen

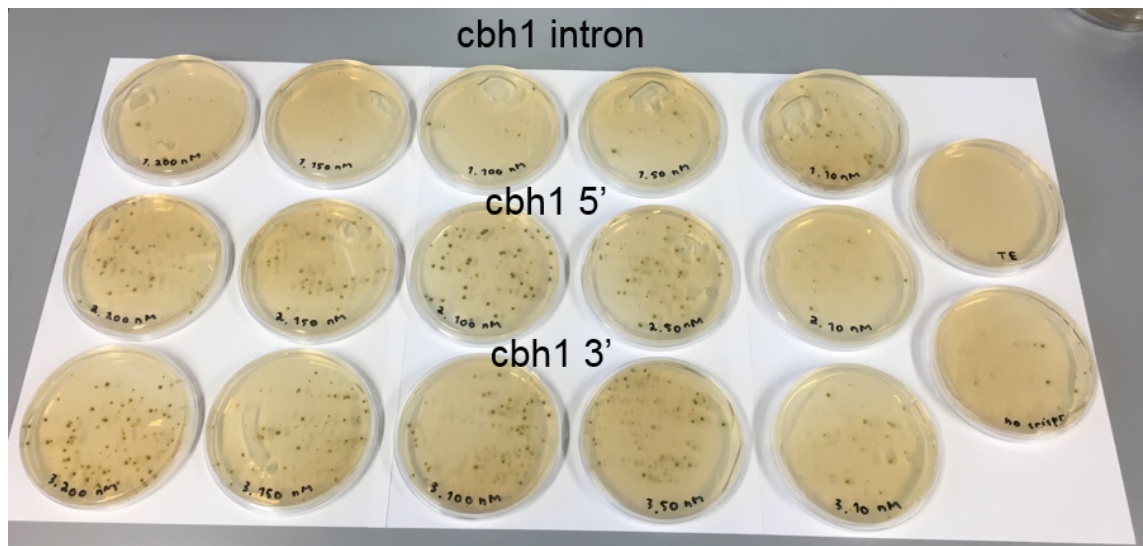
Putkiin lisättiin 200 µl:aa 25 % PEG 6000 – 50 mM CaCl₂ – 10 mM Tris-HCl -liuosta (pH 7,5), jonka jälkeen niitä sekoitettiin kevyesti kääntelemällä ja jätettiin huoneenlämpöön viideksi minuutiksi. Lisättiin 400 µl:aa 1,2 M sorbitoli – 10 mM CaCl₂ – 10 mM Tris-HCl -liuosta (pH 7,5). Kuten huomataan, transformaatioliuoksen tilavuutta vähennettiin kymmenesosaan. Kuvassa 11 on vertailtu eri transformaatioiden liuosmääriä toisiinsa.

8 ml:aan lämmitettyä top-agaria pipetoitiin 50, 200 ja 390 µl:aa transformaatioliuosta samalla vorteksoiden. Jokaisesta transformaatioliuoksesta maljattiin siis kolme maljaa. TE-kontrollimaljojen top-agariin pipetoitiin noin 300 µl:aa TE-transformaatioliuosta. TE-kontrollin lisäksi transformoitiin yksi kontrolli, jota ei CRISPR-käsitelty. Siinä transformaatioliuoksen tilavuus on sama kuin muissa, mutta RNP-kompleksin sijasta siihen on pipetoitu enemmän nuclease free duplex -puskuria.



Kuva 11. Vertailtuna kahteen eri transformaatioon käytetyn liuoksen määrä

Maljauksen jälkeen maljojen annettiin asettua tunnin ajan huoneenlämmössä, jonka jälkeen ne nostettiin kasvamaan +28 °C:n lämpötilaan 10 päivän ajaksi.



Kuva 12. Transformaatiomaljojen pesäkkeet 10 päivän kasvun jälkeen

Kuvassa 12 maljat on aseteltu niin, että vasemmalta oikealle siirryttäessä maljatun liuoksen pitoisuus laskee. Kaikkiin kuvassa näkyviin transformaatiomaljoihin on pipetoitu 200 µl:aa transformaatioliuosta.

Taulukko 14. Toisen transformaation maljojen pesäkkeiden lukumäärät. Tehokkain konsentraatio merkitty taulukkoon keltaisella.

Tr_cbh1_intron					
	200 nM	150 nM	100 nM	50 nM	10 nM
50 µl	2	3	2	5	5
200 µl	9	3	11	15	25
~390 µl	7	11	12	36	41

Tr_cbh1_5end					
	200 nM	150 nM	100 nM	50 nM	10 nM
50 µl	6	7	13	15	2
200 µl	32	32	45	33	12
~390 µl	43	45	60	48	18

Tr_cbh1_3end					
	200 nM	150 nM	100 nM	50 nM	10 nM
50 µl	10	9	6	9	4
200 µl	60	36	30	23	16
~390 µl	51	38	36	35	11

No CRISPR	
50 µl	5
200 µl	11
~390 µl	4

Kuten kuvasta 12 ja taulukosta 14 huomataan, cbh1_intron crRNA on huomattavasti tehottomampi kuin kaksi muuta. Jopa hieman yllättävästi sen tehokkain pitoisuus on 10 nM, kun taas kahdessa muussa saadaan enemmän transformantteja suuremmilla pitoisuuksilla.

Cbh1_3end maljoilla pesäkkeiden lukumäärät kasvavat lineaarisesti, kun siirrytään suurempiin pitoisuuksiin, kun taas cbh1_5end maljoilla tehokkain pitoisuus on 100 nM. Kun vertaillaan transformanttien määriä tehottomimman ja tehokkaimman pitoisuuden kesken, huomataan että 100 nM ja 200 nM maljoilla on neljä kertaa enemmän pesäkkeitä kuin 10 nM pitoisilla maljoilla. Näistä tuloksista voidaan vetää johtopäätökseksi, että transformaatioliuoksen optimaalinen pitoisuus vaihtelee riippuen käytetystä crRNA:sta.

Maljoilla, joihin maljattiin ei CRISPR-käsiteltyä transformaatioliuosta on pesäkkeitä hyvin vähän. Tästä voidaan päätellä CRISPR/Cas9-menetelmän mahdollistavan siirtymisen pienen mittakaavan transformaatioihin.

4.4 Kolmas transformaatio

Kolmannessa transformaatioissa testattiin 3 μM :n tracrRNA/crRNA kompleksien säilyvyyttä, uusia *cbh2*-geenin lokukseen targetoituvia crRNA:ita sekä eri crRNA yhdistelmien toimivuutta. Jos molemmat *cbh1* ja *cbh2* lokuksiin targetoituvat crRNA:t saataisiin siirrettyä samassa transformaatioissa, sen soveltaminen säästäisi tulevaisuudessa kantakehityksessä paljon aikaa.

B7375 ja B8176 plasmideja digestoitiin *MssI*-entsyymillä, mutta ei T7-eksonukleasikäsitelty.

RNP-komplekseihin 1-3 (taulukko 15) pipetoitiin vanhoja 3 μM :n pitoisia crRNA/tracrRNA komplekseja, muihin valmistettiin uudet kuten edellisessä transformaatioissa. Myös Cas9-nukleasin laimennokset tehtiin uudestaan samalla tavalla kuin edellisessä transformaatioissa.

RNP-komplekseja 4-7 (taulukko 15) valmistettiin kolminkertainen määrä, jotta niitä jäi jäljelle seuraavaa transformaatiota varten. Tällöin pystyttiin testaamaan RNP-kompleksien säilyvyyttä. Taulukon tarkkoja pipetointimääriä ei ole merkitty julkiseen versioon.

Taulukko 15. Kolmannen transformaation RNP-komplekseihin pipetoidut osat

	1	2	3	4	5	6	7	8
Lopullinen konsentraatio	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	200 nM
3 µM tracrRNA/crRNA kompleksi	cbh1 intron (vanha)	cbh1 5' end (vanha)	cbh1 3' end (vanha)	cbh1 intron	cbh1 5' end	cbh1 3' end	jokainen cbh1 crRNA kompleksi	cbh2 5' end
1 µM tracrRNA/crRNA kompleksi								
3 µM Cas9								
1 µM Cas9								
Cas9 aktiivisuuspuskuri								
Yhteensä	5 µl	5 µl	5 µl	15 µl	15 µl	15 µl	15 µl	5,4 µl

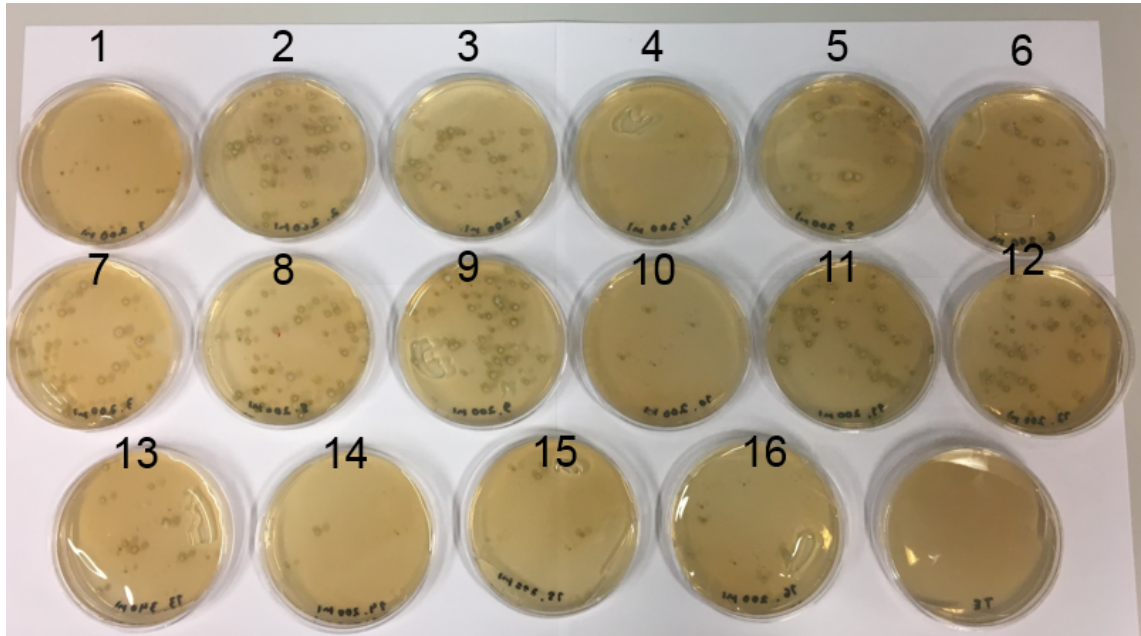
	9	10	11	12	13	14	15	16
Lopullinen konsentraatio	100 nM	10 nM	200 nM	100 nM	10 nM	100 nM	100 nM	Ei CRISPRiä
3 µM tracrRNA/crRNA kompleksi	cbh2 5' end		cbh2 3' end	cbh2 3' end		cbh1 5' end ja cbh2 5' end	cbh1 5' end ja cbh2 3' end	
1 µM tracrRNA/crRNA kompleksi		cbh2 5' end			cbh2 3' end			
3 µM Cas9								
1 µM Cas9								
Cas9 aktiivisuuspuskuri								
Yhteensä	5 µl	5 µl	5,4 µl	5 µl	5 µl	5,2 µl	5,2 µl	5 µl

Transformaatio suoritettiin samalla tavalla kuin edellinenkin. Ainoa ero on, että transformaatioliuoksiin 14 ja 15, joissa käytettiin molempiin lokuksiin targetoituvia crRNA:ita, pipetoitiin vain 1 µl molempia plasmideja. Taulukkoon 16 on lisätty ennen transformatiota valmistettuihin transformaatioliuoksiin tehdyt lisäykset. Taulukon tarkkoja pipetointimääriä ei ole merkitty julkiseen versioon.

Taulukko 16. Kolmannen transformaation transformaatioliuoksiin lisätyt komponentit.

	Skaala				TE kontrolli
	200 nM	100 nM	10 nM	Ei CRISPR	
protoplasteja	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
tracrRNA/crRNA/Cas9 -kompleksi					
B7375 tai B8176 200 ng/µl					
Nuclease free duplex -puskuri					
TE-puskuri pH 7,5					15 µl TE
yht.	40,4 µl	40 µl	40 µl	40 µl	40 µl

Maljauksen jälkeen maljat nostettiin +28 °C:n lämpötilaan kasvamaan 10 päivän ajaksi. Alla olevassa kuvassa 13 näkyy maljojen kasvutilanne tämän ajan jälkeen. Kuvassa näkyville maljoille on maljattu 200 µl:aa transformaatioliuosta.



Kuva 13. Kolmannen transformaation maljojen pesäkkeet 10 päivän kasvatuksen jälkeen.

Kaikilla maljoilla kasvoi pesäkkeitä, lukuun ottamatta TE-kontrollimaljoja, jotka olivat odotusten mukaisesti tyhjiä. Taulukkoon 17 on koottu transformanttien lukumäärät maljoilta.

Taulukko 17. Kolmannen transformaation maljojen pesäkkeiden lukumäärät.

cbh2 5end			
	200 nM	100 nM	10 nM
50 µl	11	7	3
200 µl	36	40	5
~340 µl	56	54	10

cbh1 5end & cbh2 5end	
	100 nM
50 µl	0
200 µl	2
~340 µl	7

cbh2 3end			
	200 nM	100 nM	10 nM
50 µl	15	10	2
200 µl	33	34	10
~340 µl	49	49	12

cbh1 5end & cbh2 3end	
	100 nM
50 µl	2
200 µl	6
~340 µl	6

No CRISPR	
50 µl	2
200 µl	7
~340 µl	6

Jokainen cbh1 crRNA kompleksi	
	100 nM
50 µl	5
200 µl	27
~340 µl	34

Uusien *cbh2*-lokukseen targetoituvien crRNA:iden kahden tehokkaimman pitoisuuden (200 nM ja 100 nM) maljojen pesäkkeiden lukumäärissä ei ole huomattavaa eroa. 10 nM:n pitoisilla maljoilla on kuitenkin reilusti vähemmän pesäkkeitä, joten voidaan olettaa, että optimaalisin pitoisuus on 150 nM:n paikkeilla.

Maljojen 14 ja 15, joissa on käytetty molempiin lokuksiin targetoituvia crRNA:ita, vähäisten transformanttien määrää selittää niihin pipetoidun donor-DNA:n määrä. Niiden transformaatioliuoksiin pipetoitiin vain 1 µl eli 200 ng:aa plasmidia. Seuraavassa transformaatioissa yhdistelmien maljaukset uusittiin 1 µg:lla donor-DNA:ta.

Taulukko 18. Vanhojen ja uusien tracrRNA/crRNA kompleksien pesäkkeiden lukumäärien vertailua.

Vanhat tracrRNA/crRNA 3 μ M kompleksit			
	cbh1 intron	cbh1 5end	cbh1 3end
50 μ l	2	11	12
200 μ l	6	30	23
~340 μ l	14	46	53

Uudet tracrRNA/crRNA 3 μ M kompleksit			
	cbh1 intron	cbh1 5end	cbh1 3end
50 μ l	1	4	7
200 μ l	4	19	26
~340 μ l	11	30	31

Ehkä hieman yllättäen maljoilla, joissa on käytetty säilöttyjä tracrRNA/crRNA-komplekseja, kasvaa enemmän pesäkkeitä (taulukko 18). Tämä voi kertoa kompleksien säilyvyydestä, mutta olisi mielenkiintoista varmistaa PCR-seulontojen kautta, onko oikeiden kloonien määrissä eroja. Jos kompleksit kuitenkin säilyvät, tämä helpottaisi työskentelyä tulevaisuudessa, sillä uusia komplekseja ei tarvitsisi valmistaa jokaisen transformaation yhteydessä.

4.5 Neljäs transformaatio

Neljännessä ja viimeisessä transformaatiossa tutkittiin RNP-kompleksien säilyvyyttä, sekä donor-DNA:n määrän vaikutusta tuloksiin kahdella eri pitoisuudella. Tämän lisäksi testattiin uuden HiFi Cas9-nukleaasin vaikutusta pesäkkeiden lukumäärään.

Taulukkoon 19 on merkitty RNP-komplekseihin pipetoidut osat. Taulukon tarkkoja pipetointimääriä ei ole merkitty julkiseen versioon. Sekä 3 μ M:n pitoiset crRNA/tracrRNA kompleksit että Cas9-nukleaasin laimennokset valmistettiin uudestaan.

B7375 ja B8176 plasmideja digestoitii *MssI*-entsyymillä, mutta ei T7-eksonukleaasikäsitelty.

Taulukko 19. Neljännen transformaation RNP-komplekseihin pipetoidut osat.

	1	2	3	4	5	6
Lopullinen konsentraatio	100 nM	100 nM	100 nM	200 nM	200 nM	200 nM
3 µM tracrRNA/crRNA kompleksi	cbh1 5' end	cbh1 5' end	cbh1 5' end	cbh1 5' end	cbh1 5' end	cbh1 5' end
1 µM tracrRNA/crRNA kompleksi						
3 µM Cas9						
1 µM Cas9						
Cas9 aktiivisuuspuskuri						
Yhteensä	5,2 µl	5,2 µl	5,2 µl	5,4 µl	5,4 µl	5,4 µl
Donor-DNA:n määrä	1 µg	2 µg	3 µg	1 µg	2 µg	3 µg

	7	8	9	10	11	12
Lopullinen konsentraatio	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	100 nM	NO CRISPR
3 µM tracrRNA/crRNA kompleksi	cbh1 5' end säilötty RNP- kompleksi	cbh1 3' end säilötty RNP- kompleksi	cbh1 5' end ja cbh2 5' end	cbh1 5' end ja cbh2 3' end	cbh2 1' end	
1 µM tracrRNA/crRNA kompleksi						
3 µM Cas9					uusi Cas9 HiFi	
1 µM Cas9						
Cas9 aktiivisuuspuskuri						
Yhteensä	5 µl	5 µl	5,2 µl	5,2 µl	5,2 µl	5 µl
Donor-DNA:n määrä	1 µg	1 µg	1 µg + 1 µg	1 µg + 1 µg	1 µg	

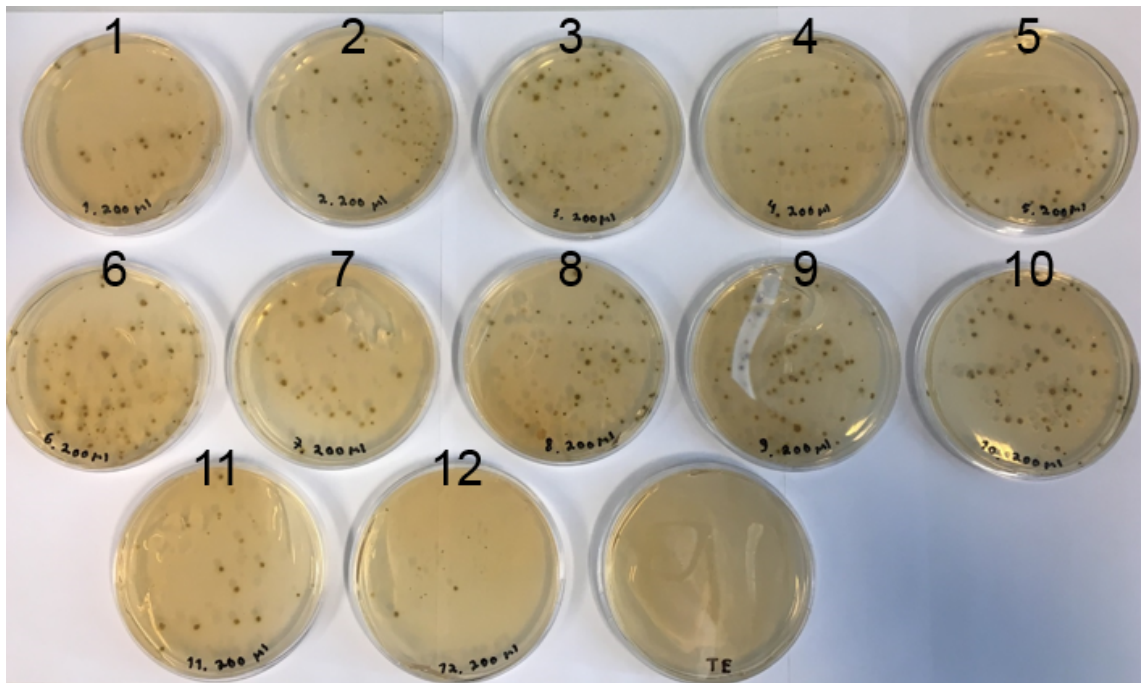
Tässä transformaatioissa keskityttiin enää 100 nM:n ja 200 nM:n pitoisiin liuoksiin, sillä ne ovat aikaisemmin olleet tehokkaimpia. Taulukossa 20 on listattuna transformatioliuoksiin pipetoidut osat. Taulukon tarkkoja pipetointimääriä ei ole merkitty julkiseen versioon.

Taulukko 20. Neljännen transformaation transformaatioliuoksiin lisätyt komponentit.

	Skaala		Ei CRISPR	TE kontrolli
	200 nM	100 nM		
protoplasteja	25 µl	25 µl	25 µl	25 µl
tracrRNA/crRNA/Cas9 -kompleksi				
B7375 tai B8176 200 ng/µl				
Nuclease free duplex -puskuri				
TE-puskuri pH 7,5				15 µl TE
yht.	40,4/45,4 µl	40/45 µl	40 µl	40 µl

Transformaatioliuoksissa joissa donor-DNA:n määrä oli 1 µg, pipetoitiin normaalisti 5 µl:aa plasmidia sekä 5 µl:aa nuclease free duplex bufferia. Transformaatioliuoksissa 9 ja 10 pipetoitiin molempia donor-DNA:ita 5 µl:aa mutta ei ollenkaan puskuria. 2 µg:n liuoksissa plasmidia pipetoitiin taas 10 µl:aa ja 3 µg:n liuoksissa 15 µl:aa.

Transformaatio suoritettiin samalla tavalla kuin edellisekin. Maljauksen jälkeen maljat nostettiin +28 °C:n lämpötilaan kasvamaan 10 päivän ajaksi. Kuvassa 14 on kuva maljoista 10 päivän kasvatuksen jälkeen.



Kuva 14. Neljännen transformaation maljojen pesäkkeet 10 päivän kasvatuksen jälkeen.

Kaikilla maljoilla kasvoi pesäkkeitä, lukuun ottamatta TE-kontrollimaljoja, jotka olivat odotusten mukaisesti tyhjiä.

Taulukko 21. Neljännen transformaation eri donor-DNA:n pitoisuuden määrän vaikutus transformanttien määrään.

cbh1 5end 100 nM			
	1 µg	2 µg	3µg
50 µl	4	10	9
200 µl	27	38	45
~340 µl	48	73	67

cbh1 5end 200 nM			
	1 µg	2 µg	3µg
50 µl	6	10	20
200 µl	31	46	69
~340 µl	53	67	100

No CRISPR	
50 µl	2
200 µl	11
~340 µl	14

Taulukossa 21 on vertailtu eri donor-DNA:n määrän vaikutusta pesäkkeiden lukumääriin. 100 nM:n pitoisilla maljoilla huomataan pesäkkeiden määrän kaksinkertaistuvan, kun donor-DNA:n määrä kasvaa 1 µg:sta 2 µg:aan. 3 µg:n maljoilla pesäkkeiden määrät eivät kuitenkaan ole kasvaneet yhtä jyrkästi, vaan ne ovat samaa luokkaa kuin maljoilla, joissa on 2 µg:aa donor-DNA:ta.

200 nM:n pitoisilla maljoilla taas pesäkkeiden määrät kasvavat tasaisesti mitä suurempiin donor-DNA määriin siirrytään. Voidaan kuitenkin todeta, että donor-DNA:n määrän kasvattaminen lisää transformanttien määriä maljoilla.

Taulukko 22. Neljännen transformaation säilöttyjen RNP-kompleksien maljojen pesäkkeiden lukumäärät.

Säilöttyt RNP-kompleksit		
	cbh1 5end	cbh1 3end
50 µl	5	13
200 µl	26	56
~340 µl	35	89

Taulukossa 22 on vertailtu säilöttyjen RNP-kompleksien transformanttien määriä. cbh1 5end crRNA -maljoilla on suurin piirtein saman verran pesäkkeitä kuin miten paljon oli edellisessä transformaatioissa. Toisilla cbh1 3end -maljoilla taas pesäkkeitä on jostain syystä huomattavasti enemmän. Liuosten voidaan todeta säilyvän, mutta olisi hyvä selvittää skriinauksella kuinka monta prosenttia pesäkkeistä on oikeita klooneja.

Taulukko 23. Neljännen transformaation kahteen eri lokukseen targetoituvien crRNA:iden maljojen pesäkkeiden lukumäärät.

cbh1 5end & cbh2 5end (1µg + 1µg)		cbh1 5end & cbh2 3end (1µg + 1µg)	
	100 nM		100 nM
50 µl	11	50 µl	19
200 µl	63	200 µl	56
~340 µl	105	~30 µl	107

Taulukossa 23 on uusittuna kahteen eri lokukseen targetoituvien crRNA:iden transformaatiot, tällä kertaa suuremmalla määrällä donor-DNA:ta. Pesäkkeitä huomataan tulevan hyvin paljon, joten voidaan mahdollisesti olettaa transformaatioiden onnistuneen molempien lokuksien osalta.

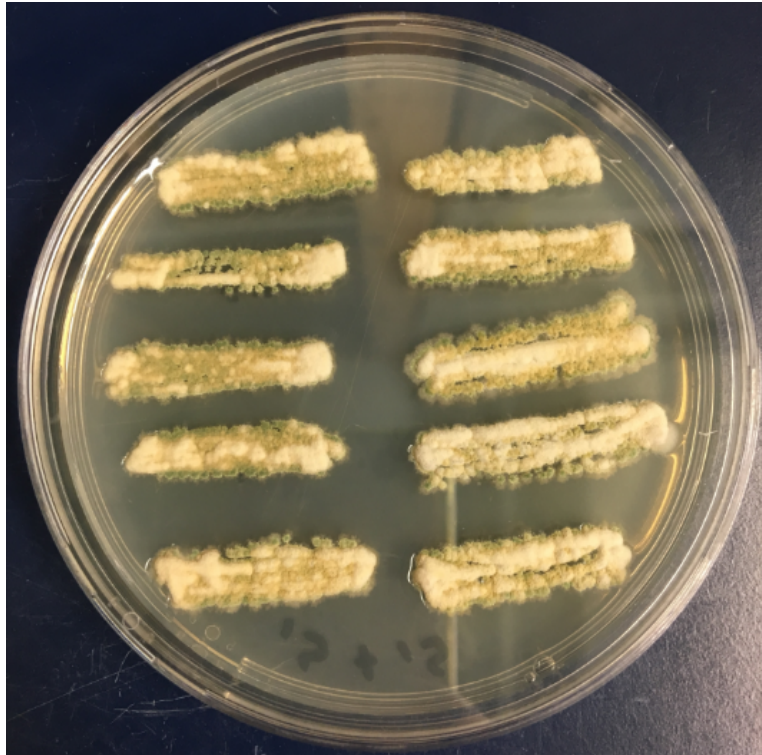
Taulukko 24. Neljännen transformaation Cas9 HiFi nukleaasin vaikutus pesäkkeiden lukumääriin.

cbh1 5 end, uusi Cas9 HiFi	Alt-R Cas9
	100 nM
50 µl	6
200 µl	19
~340 µl	30

Taulukossa 24 on kirjattuna uudella Cas9 HiFi:llä tehdyn transformaation maljojen pesäkkeiden lukumäärät. Kun verrataan uudella Cas9 HiFi nukleaasilla tehtyä transformaatiota edellisiin, huomataan, ettei sen käytöllä oikeastaan ole eroa muuten transformaatioissa käytettyyn Alt-R Cas9-nukleaasiin. Tietysti on vaikea vetää johtopäätöksiä vain yhden transformaation perusteella. Jos aikaa olisi ollut enemmän, sen toimintaa olisi voitu tutkia paremmin erilaisilla yhdistelmillä.

4.6 PCR-seulonta

Kun transformanttien määrät oli saatu laskettua, eri crRNA transformaatioiden tehokkaimmilta konsentraatiomaljoilta poimittiin yksittäispesäkkeitä 50 kappaletta TrMM+Triton -maljoille (taulukko X) kasvamaan viivoiksi. Maljojen annettiin kasvaa +28 °C:n lämpötilassa neljän päivän ajan, kunnes ne olivat kasvaneet tarpeeksi, mutta eivät muuttuneet täysin vihertäviksi (kuva 15).



Kuva 15. TrMM+Triton maljoilla kasvaneet pesäkkeet.

Viivoista poimittiin pala 20 µl:aan laimennuspuskuria ja niiden annettiin liueta sekoituksessa parin tunnin ajan tai yön yli jääkaapissa. Oikeat kloonit seulottiin Thermo Fisherin Phire Plant Direct PCR -kitillä. Käytetyt oligot ja geelillä näkyvien fragmenttien koot ovat listattuina taulukkoon 25.

Taulukko 25. Tiedot viivojen seulonnoista.

cbh1 lokuksen seulonta		
	Oligot	DNA-fragmentin koko
cbh1 5' pää	TO95 & TO96	2,8 kb
cbh1 3' pää	TO08 & T488	1,9 kb

cbh2 lokuksen seulonta		
	Oligot	DNA-fragmentin koko
cbh2 5' pää	TO37 & TO50	1,3 kb
cbh2 3' pää	TO51 & TO61	2,0 kb

Kuvassa 16 on kuvattu oligoiden toimintaa PCR-seulonnessa. Toinen oligo tarttuu sen sekvenssin mukaisesti kasetin *cbh1* 5' tai 3' kyljen päähän ja toinen genomien puolelle.



Kuva 16. Oligoiden asettuminen PCR-seulonnessa.

Liitteenä 2 on kuva käytetyn Phire PCR-ohjelman lämpötiloista ja vaikutusajoista. Alukkeiden liittymisvaiheessa käytettiin joko 50 tai 60 °C:n lämpötilaa ja pidentymisvaiheen kesto vaihteli 40 sekunnin ja 2 minuutin 30 sekunnin välillä.

PCR:n jälkeen tuotteisiin lisättiin 5 µl:aa 5x TD-puskuria, joka toimii latausliuoksena. Tuotteita ajettiin 1 %:lla TBE-agarosigeelillä tunnin ajan. Liitteenä 3 on kuvat kaikista geeleistä.

Taulukko 26. Yhteen lokukseen targetoituneiden crRNA:iden seulontatulokset.

Transformanttien seulonnat			
	5' pää	3' pää	5' ja 3' pää
cbh1 intron (10 nM)	10/37 (27 %)	20/37 (54 %)	6/37 (16 %)
cbh1 5end (100 nM)	18/50 (36 %)	32/50 (64 %)	11/50 (22 %)
cbh1 3end (200 nM)	27/50 (54 %)	27/50 (54 %)	14/50 (28 %)
cbh2 5end (200 nM)	38/49 (76 %)	41/49 (84 %)	35/49 (71 %)
cbh2 3end (200 nM)	28/50 (56 %)	40/50 (80 %)	26/50 (52 %)

Kaikki transformantit kasvoivat hyvin TrMM+Triton maljoilla, paitsi cbh1 intron transformaatiomaljoilta poimitut pesäkkeet, joita kasvoi vain 37 kappaletta.

Taulukossa 26 on listattuna ja laskettuna seulontojen perusteella oikeat kloonit kasva-neista viivoista. 3' päiden DNA-fragmentit ovat pienempiä kuin 5' päiden, joten oletuk-sena oli, että 3' positiivisia klooneja näkyy enemmän. Tämä oletus pitikin paikkaansa.

Kun vertaillaan cbh1 ja cbh2 maljoilta poimittuja pesäkkeitä, cbh2 klooneista molemmat päät ovat oikein huomattavasti suuremmilla prosenteilla. Niissä oikeita klooneja olisi yli puolet transformanteista, kun taas cbh1 transformanteista noin 1/5 olisi oikeita kloone-ja.

Taulukko 27. Kahteen eri lokukseen targetoituneiden crRNA:iden seulontatulokset.

Transformanttien seulonta				
	cbh1 5' pää	cbh1 3' pää	cbh2 3' pää	Kaikki
cbh1 5end + cbh2 5end (100 nM)	29/50 (58 %)	28/50 (56 %)	33/50 (66 %)	12/50 (24 %)
cbh1 5end + cbh2 3end (100 nM)	15/50 (30 %)	12/50 (24 %)	31/50 (62 %)	0/50 (0 %)

Taulukossa 27 on listattuna molempiin eri *cbh* lokuksiin targetoituneiden crRNA:iden seulontatulokset. Ajanpuutteen takia cbh2 5' päätä ei ehditty seuloa, joten tämän vaiku-tus tulee ottaa huomioon tuloksia tarkasteltaessa.

Näiden tulosten perusteella kahteen eri lokukseen targetoitujen crRNA:iden transfor-maatio olisi onnistunut. Cbh1 5end + cbh2 5end maljoilta löydettiin 12 transformanttia, jotka antoivat positiivisen tuloksen kaikista kolmesta päästä.

Vaikka cbh1 5end + cbh2 3end maljoilta ei löytynyt yhtäkään transformanttia, josta olisi kaikki kolme päätä positiivisia, on mahdollista että PCR ei ole toiminut halutulla tavalla. Transformantteja, joissa oli 2 positiivista päätä, löytyi kuitenkin 17 kappaletta.

5 Päätelmät

Koska pesäkkeitä tuli kaikissa eri transformaatioissa paljon, voidaan menetelmän tode-ta toimivan. Kokeet toistettiin myös niin monta kertaa, että kyseessä ei ole kontaminaa-tio tai sattuma. Myös PCR-seulontojen tulokset tukevat tätä johtopäätöstä.

Koska kyseisessä laboratoriossa suoritetaan transformaatioita hyvin usein, yleinen menetelmä on hyvä olla olemassa. Opinnäytetyö kuitenkin todistaa eri transformatioliuosten optimaalisten pitoisuuksien riippuvan käytetystä crRNA:sta. Donor-DNA:n määrällä huomattiin myös olevan suora vaikutus saatujen transformanttien määrään, sillä kun DNA:n määrä tuplattiin, saatiin lähes kaksi kertaa enemmän pesäkkeitä.

Vaikka top-agarin pois jättöä ei kokeiltu enää testitransformaation jälkeen, positiivista on se, että käytettyjen protoplastien määrää per transformaatio saatiin vähennettyä huomattavasti. Pelkona oli, että 25 µl:lla protoplasteja pesäkkeitä ei kasvaisi ollenkaan tai että ne eivät kasvaisi tarpeeksi, vaan jäisivät pieneksi taustakasvuksi.

Ennen VTT:llä CRISPR-transformaatioissa on käytetty aina kahta crRNA:ta onnistumisen maksimoinnissa. Tulokset kuitenkin todistavat että yksi crRNA per *cbh1* lokus riittää pesäkkeiden saamiseen. Uusi Cas9 HiFi ei osoittautunut näiden tulosten perusteella tehokkaammaksi kuin yleensä käytetty Cas9-nukleaasi.

Jos aikaa olisi ollut enemmän, transformaatioita olisi voitu testata useammilla protoplasteilla, joissa olisi esimerkiksi pienempiä solumääriä. Näin nähtäisiin, onko protoplastien solumäärällä vaikutusta käytettävään protoplastien määrään transformaatioissa. Seulontoja olisi myös voitu tehdä enemmän, sillä ne kertovat oikeiden kloonien lukumäärät.

Lähteet

- [1] Nykänen, Marko. 2002. Protein secretion in *Trichoderma reesei*. University of Jyväskylä.
- [2] Liu, R., Chen, L., Jiang, Y., Zhou, Z., Zou, G. 2015. Efficient genome editing in filamentous fungus *Trichoderma reesei* using the CRISPR/Cas9 system. <<https://www.nature.com/articles/celldisc20157>>. Luettu 22.10.2017.
- [3] Smith, J.L., Bayliss, F.T., Ward, M. 1990. Sequence of the cloned *pyr4* gene of *Trichoderma reesei* and its use as a homologous selectable marker for transformation. Verkkodokumentti. <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00362084>>. Luettu 15.10.2017.
- [4] *Trichoderma & Gliocladium* Volume 1, Edited by Harman G.E., Kubicek C.P. 1998. Taylor & Francis.
- [5] Paloheimo M., Haarmann T., Mäkinen S., Vehmaanperä J. 2016. Production of industrial Enzymes in *Trichoderma reesei*. Verkkodokumentti <https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-27951-0_2>. Luettu 15.10.2017
- [6] Protoplast isolation. Verkkodokumentti. <<http://www.saps.org.uk/secondary/teaching-resources/133-protoplast-isolation>>. Luettu 18.10.2017.
- [7] Preparation and freezing of *Trichoderma reesei* protoplasts. VTT Biotechnology method instruction.
- [8] Häikiö, Elina & Kangasjärvi Jaakko. 1999. Biotekniikan riskit. Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset Suomessa. Suomen ympäristö 185. Kuopio: Kuopion Liikekirjapaino Oy.

- [9] Borovinskaya, M. A., Shoji, S., Fredrick, K., Cate, J. 2008. Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2491480/>>. Luettu 15.10.2017.
- [10] Hygromycin B from *Streptomyces hygroscopicus*. Verkkodokumentti. <<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/h3274?lang=fi®ion=FI>>. Luettu 15.10.2017.
- [11] Mach, R.L., Schindler, M., Kubicek, C.P. 1993. Transformation of *Trichoderma reesei* based on hygromycin B resistance using homologous expression signals. Verkkodokumentti. <<https://link.springer.com/article/10.1007/BF00351679>>. Luettu 17.10.2017.
- [12] Read, J.D., Colussi, P.A., Ganatra, M.B., Taron, C.H. 2007. Acetamide selection of *Kluyveromyces lactis* cells transformed with integrative vector leads to high-frequency formation of multicopy strains. Verkkodokumentti. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1950971/>>. Luettu 22.10.2017.
- [13] UniProt. Verkkodokumentti. <<http://www.uniprot.org/uniprot/P14017>>. Luettu 24.10.2017.
- [14] Penttilä M., Nevalainen H., Rättö M., Salminen E., Knowles J. 1987. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Verkkodokumentti. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378111987901107>>. Luettu 18.10.2017
- [15] CRISPR/Cas9 Genome Editing: Transfection Methods. 2017. Verkkodokumentti. <<https://www.mirusbio.com/applications/genome-editing-using-crispr-cas>>. Luettu 12.10.2017.
- [16] 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 13.10.2017.

- [17] CRISPR/Cas9 Guide. Verkkodokumentti.
<<https://www.addgene.org/crispr/guide/>>. Luettu 12.10.2017.
- [18] Trichoderma & Gliocladium Volume 2, Edited by Harman G.E., Kubicek C.P. 1998. Taylor & Francis.
- [19] Roberts, G.C.K., Dennis, E.A., Meadows, D.H., Cohen, J.S., Jardetzky, O. 1969. The mechanism of action of ribonuclease. Verkkodokumentti.
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC223627/>>. Luettu 17.10.2017.
- [20] T7 Exonuclease. <<https://www.neb.com/products/m0263-t7-exonuclease#Product%20Information>>. Luettu 17.10.2017.
- [21] Alt-R CRISPR-Cas9 system: Cationic lipid delivery of CRISPR ribonucleoprotein complex into mammalian cells. IDT Integrated DNA technologies

IDT:n käyttöohje - Alt-R CRISPR-Cas9 system

Opinnäytetyön osalta merkittävät osat IDT:n ohjeesta.

- Mix the two RNA oligos in equimolar concentrations in a sterile microcentrifuge tube. For example, create a final duplex concentration of 1 μM using the following table:

Note: For smaller volumes, such as for 384-well plates, a higher concentration may be necessary.

Component	Amount (μL)
100 μM Alt-R™ CRISPR-Cas9 crRNA	1
100 μM Alt-R™ CRISPR-Cas9 tracrRNA	1
Nuclease-Free Duplex Buffer	98
Total volume	100

- Heat at 95°C for 5 min.
- Remove from heat and allow to cool to room temperature (20–25°C) on your bench top.
- If needed, dilute the complexed RNA to a working concentration (for example, 1 μM) in Nuclease-Free Duplex Buffer or IDTE Buffer.

Note: The crRNA:tracrRNA guide complex can be used for up to 3 months with no loss in activity when stored at –20°C at a concentration of at least 30 μM .

- Before use, thoroughly mix the stock Alt-R S.p. Cas9 Nuclease 3NLS by inverting the tube several times, and briefly centrifuge the tube.
- Dilute Alt-R S.p. Cas9 Nuclease 3NLS to a working concentration (for example, 1 μM) in Cas9 working buffer (Part 1, Step A1). OptiMEM or 1X PBS can be used in place of Cas9 working buffer.

- To produce the RNP for each well in the 96-well plate, combine the following:

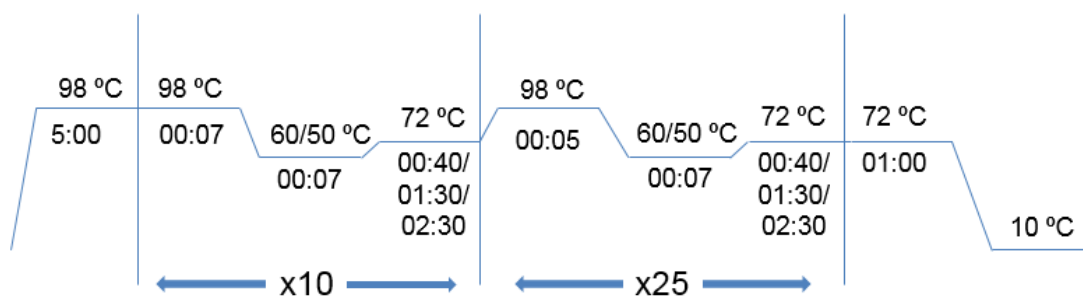
Component	Volume per well (μL)
Complexed crRNA:tracrRNA oligos [1 μM] (Part 1, Step A6)	1.5
Diluted Cas9 nuclease [1 μM] (Part1, Step A8)	1.5
Opti-MEM® Media	22
Total volume	25

- Incubate at room temperature for 5 min to assemble the RNP complexes.

Note: The RNP complex can be stored for up to 4 weeks at 4°C or for up to 6 months at –80°C.

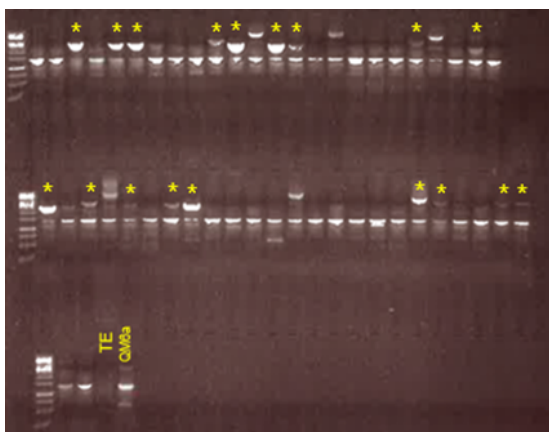
PCR:n Phire-ohjelma

Käytetyn PCR-ohjelman lämpötilat ja vaikutusajat.

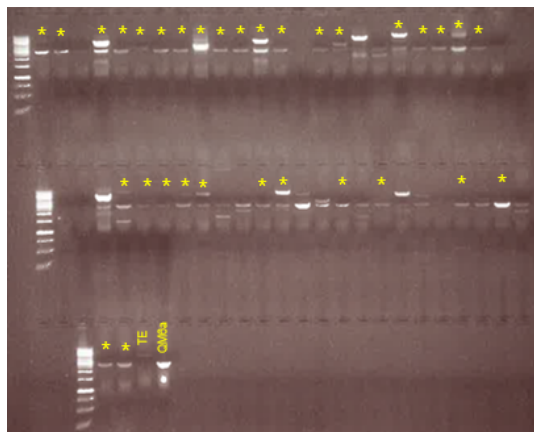


Agaroosigeelikuvat PCR-seulonnoista

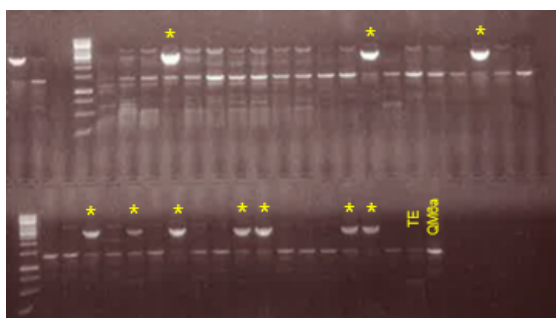
cbh1 5end 5' pää



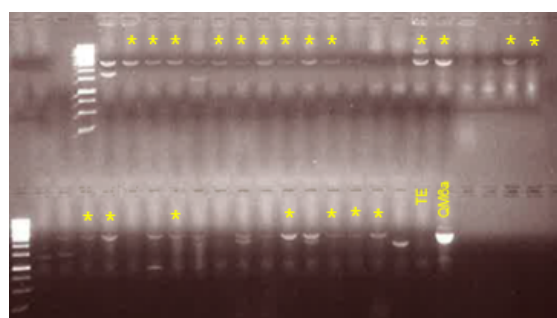
cbh1 5end 3' pää



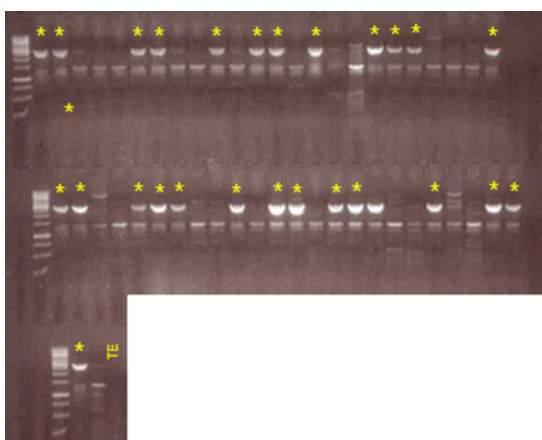
cbh1 intron 5' pää



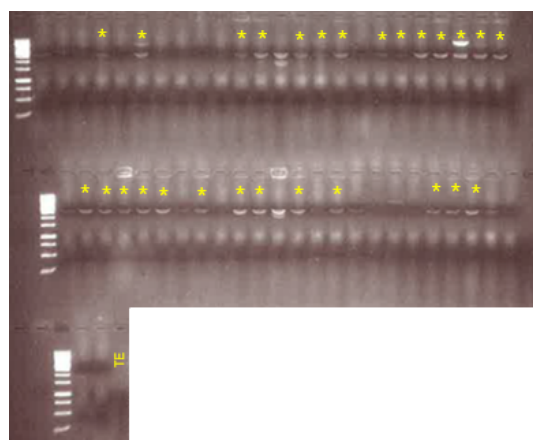
cbh1 intron 3' pää



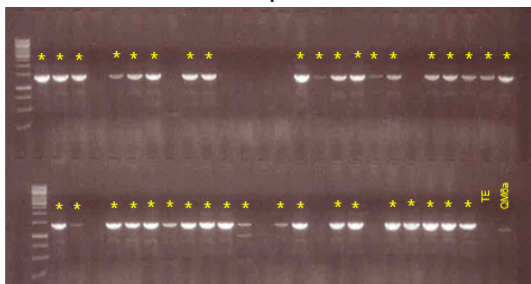
cbh1 3end 5' pää



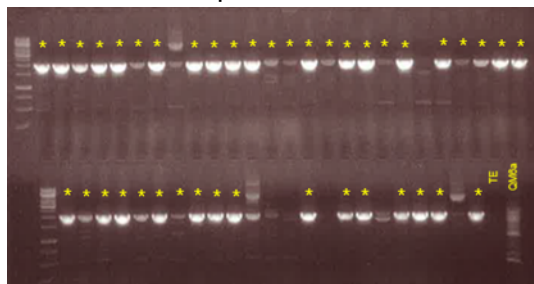
cbh1 3end 3' pää



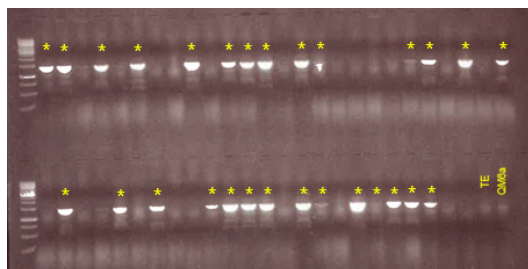
cbh2 5end 5' pää



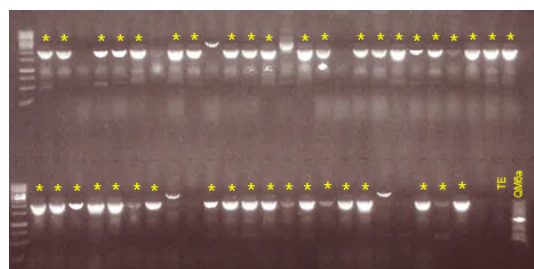
cbh2 5end 3' pää



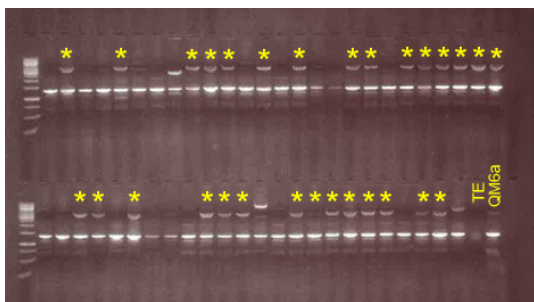
cbh2 3end 5' pää



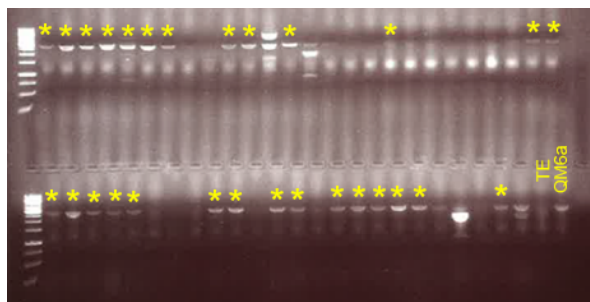
cbh2 3end 3' pää



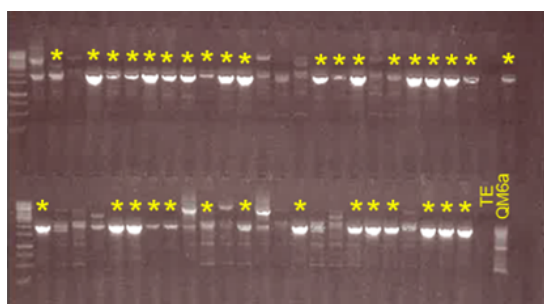
cbh1 5end + cbh2 5end cbh1 5' pää



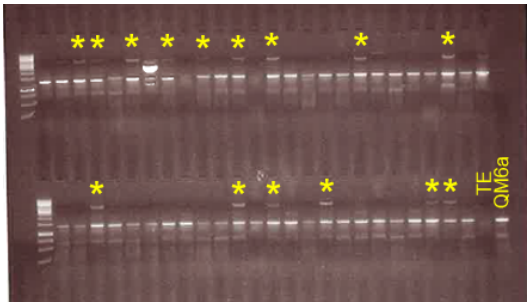
cbh1 5end + cbh2 5end cbh1 3'pää



cbh1 5end+ cbh2 5end cbh2 3'pää



cbh1 5end + cbh2 3end cbh1 5'pää



cbh1 5end + cbh2 3end cbh1 3'pää

