



# Gene editing mit CRISPR/Cas9

## Inhalt

1. Einführung: Gen-Editierung mit Cas9.....	2
2. Experimente .....	3
2.1 Alkalische Lyse .....	3
2.2 Transfektion der gRNA und Cas9 in HEK-293 Zellen .....	4
2.3 Fluoreszenzmikroskopie.....	4
2.4 Polymeraseketten-Reaktion (PCR) .....	5
2.5 Agarosegel-Elektrophorese .....	5
3. Quiz:.....	6

## 1. Einführung: Gen-Editierung mit Cas9

Der Begriff Gen-Editierung "*gene editing*" umfasst eine Reihe molekularbiologischer Methoden, mit deren Hilfe man DNA zielgerichtet verändern kann. Um dies zu erreichen muss zunächst bestimmter Lokus in der DNA geschnitten werden. Dabei werden Enzyme eingesetzt, die an der entsprechenden Stelle einen Doppelstrangbruch erzeugen. Dieses führt zur Aktivierung von Reparatursystemen in der Zelle, die man teilweise nutzen kann, um DNA-Sequenzen gezielt zu verändern.

Neben den klassischen Zinkfinger-nukleasen (ZFN) und das *Transcription Activator-like Effector Nucleases* (TALENs), bietet das neuartige CRISPR/Cas-System die Möglichkeit, präzise Veränderungen in einem Genom vorzunehmen. Die Abkürzung **CRISPR** steht für *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* und ist Bestandteil eines natürlichen Resistenzmechanismus von Bakterien gegenüber Phagen-Befall. Diese Wiederholungen der Virussequenzen wurden im Laufe der Zeit in das Bakteriengenom integriert und dienen der Erkennung eines neuen Befalls. Ein spezifisches RNA-Transkript (**crisprRNA**) sorgt dafür, dass die komplementäre Stelle im Genom gefunden, und anschließend durch die Nuklease **Cas** (**CRISPR associated**) geschnitten wird. Dieses natürliche System wird in modifizierter Weise genutzt, um gezielt Veränderungen in der DNA vorzunehmen. Dabei kann eine synthetisch hergestellte **guideRNA** in Zellen eingeschleust werden, um eine bestimmte DNA-Sequenz zielgerichtet zu verändern. Zurzeit wird diese Methode eingesetzt, um DNA-Sequenzen zu verändern, zu eliminieren oder einzufügen.

## 2. Experimente

### 2.1 Alkalische Lyse

Das **pCRISPR-Plasmid** wird in den folgenden Schritten aus einer Bakterienkultur isoliert. Dieses Plasmid wird in einem weiteren Experiment (Transfektion) in humane Zellen eingeschleust, und der *Knock-out* des rot fluoreszierenden Gens eingeleitet.

- ✓ 1. **1,3 ml der Bakterienkultur** (2 x 650µl) in ein Reaktionsgefäß überführen.
- ✓ 2. 3 Minuten bei 8000 U/min zentrifugieren. Überstand wegschütten, mit dem Bakteriensediment (Pellet) weiterarbeiten.
- ✓ 3. **250 µl Lösung 1 (Resuspendierungspuffer)** zum Bakterienpellet geben und vortexen bis sich alle Zellen gelöst haben. *lab dancer*
- ✓ 4. **250 µl Lösung 2 (Lysispuffer)** hinzugeben. **Vorsichtig mischen, nicht vortexen.** 5 Minuten inkubieren. Die Zellen sind nun lysiert. *sehen lassen* *2x schütteln*
- ✓ 5. **350 µl Lösung 3 (Neutralisierungspuffer)** hinzugeben und **vorsichtig mischen, nicht vortexen.** Die Lösung flockt, da Proteine, genomische DNA und Zelltrümmer ausfallen, die Plasmid-DNA bleibt gelöst.
- ✓ 6. 10 Minuten bei 13400 U/min zentrifugieren.
- ✓ 7. 800 µl des Überstandes (**enthält DNA!**) auf die DNA-bindende Glasfaser-Säule pipettieren.
- ✓ 8. 1 Minute bei 13400 U/min zentrifugieren, die Flüssigkeit im unteren Gefäß wegschütten.
- ✓ 9. **700 µl Lösung 4 (Waschpuffer)** auf die Säule pipettieren, 1 Minute bei 13400 U/min zentrifugieren und anschließend die Flüssigkeit wegschütten.
- ✓ 10. Die Säule erneut 1 Minute bei 13400 U/min zentrifugieren.
- ✓ 11. Die Säule in ein neues Reaktionsgefäß stellen.
- ✓ 12. **100 µl Lösung 5 (Elutionspuffer)** auf die Glasfaser-Säule pipettieren und 2 Minuten inkubieren.
- ✓ 13. 1 Minute bei 13400 U/min zentrifugieren um die DNA von der Säule zu lösen. Die Säule kann nun entsorgt werden.
- ✓ 14. Beschrifte den Deckel mit dem Namen DNA und einem Kürzel
- ✓ 15. Herzlichen Glückwunsch, Du hast die DNA isoliert!

## 2.2 Transfektion der gRNA und Cas9 in HEK-293 Zellen

HEK-293 Zellen ist ein transformierte humane Zelllinie, die es schon seit 1973 gibt. Im XLAB wurden die Zellen genetisch so verändert, dass sie das rot fluoreszierende Protein dauerhaft exprimieren. Die rote Fluoreszenz soll mit einer geeigneten guide RNA und der programmierbaren Endonuklease Cas9 ausgeschaltet werden. Dazu müssen die beiden Komponenten in die HEK-293 Zellen eingeschleust (transfiziert) werden. Polyethylenimin (PEI) wird als klassisches Fällmittel zur Aufbereitung von Zellextrakten genutzt. Hierbei fällt es auf Grund seiner Ladung in erster Linie die hoch negativ geladenen Nukleinsäuren und kann von den Zellen durch Endozytose aufgenommen werden

- ✓ 1. Pipettiere 55 µl Zellmedium in ein neues Reaktionsgefäß und gebe 20 µl Plasmid DNA dazu
- ✓ 2. Vortexe für 5 Sekunden
- ✓ 3. Pipettiere 66 µl Medium in ein anderes Reaktionsgefäß und gebe 9 µl PEI dazu, vortexe
- ✓ 4. Pipettiere die PEI-Lösung zu dem DNA-Ansatz und vortexe
- ✓ 5. Inkubiere die Mischung für 30 min bei Raumtemperatur (RT)
- ✓ 6. Tropfe die DNA-PEI Mischung auf die Zellen
7. Inkubiere die Zellen für 24 h bei 37°C im Inkubator
- ✓ 8. Wechsel das Medium am nächsten Morgen
- ✓ 9. Analysiere den *knockout* nach 24h im Mikroskop.

Die Auswertung des CRISPR-Experiments folgt nach 24 - 48 Stunden. Diese Zeit brauchen die Zellen um Cas9 zu bilden, die gRNA herzustellen und letzten Endes das Gen zu schneiden.

## 2.3 Fluoreszenzmikroskopie

Analyse der CRISPR behandelten HEK-293 Zellen im Fluoreszenzmikroskop. Folgender Filter werden genutzt um die Fluoreszenz in den Zellen zu analysieren:

Grüner Filter: Rote Fluoreszenz wird sichtbar, der Knock-out des roten Fluoreszenzproteins in den Zellen wird nachgewiesen.

## 2.4 Polymeraseketten-Reaktion (PCR)

Eine schnelle und effiziente Methode, um DNA und Gene in Zellen unterschiedlicher Organismen nachzuweisen, ist die PCR. In diesem Experiment werden Bakterien-Kolonien auf Cas9 untersucht. Das PCR-Amplifikat hat eine Größe von 760 Basenpaaren (bp).

- ✓ 1. Pipettiere alle unten aufgeführten Reagenzien in ein Reaktionsgefäß:

59,25 µl H<sub>2</sub>O  
7,5 µl Taq-Puffer  
3,0 µl Cas9 vorwärts Primer (Annealing Temp. 58°C)  
3,0 µl Cas9 rückwärts Primer (s.o.)  
1,5 µl dNTPs  
0,75 µl Taq-Polymerase

-----

75 µl

- ✓ 2. Vortexe und zentrifugiere 15 Sek. mit Short Spin (Taste so lange gedrückt halten).
- ✓ 3. Bereite 3 PCR-Gefäße vor (beschrifte mit  $\begin{matrix} + \\ 1 \end{matrix}$ ,  $\begin{matrix} \text{Bakterien} \\ 2 \end{matrix}$  und  $\begin{matrix} - \\ 3 \end{matrix}$ ).
- ✓ 4. Pipettiere je 25µl in jedes Gefäß.
- ✓ 5. Pipettiere 1µl DNA der Positiv-Kontrolle (+) in das vorbereitete Gefäß.
- ✓ 6. Picke mit einer weißen Spitze Bakterienzellen und rühre sie in das zweite Gefäß.
- ✓ 7. Schließe das dritte Gefäß, Negativ-Kontrolle (ohne Zellen/ DNA).
- ✓ 8. Stelle die Gefäße in den Thermocycler.
- ✓ 9. Starte das Programm.

## 2.5 Agarosegel-Elektrophorese

Analytisches Verfahren zum Nachweis bzw. Darstellung von DNA-Molekülen.

### 2.5.1 Herstellung eines 1 %igen Agarosegels:

- ✓ 1. Die Gussform für das Agarosegel vorbereiten, indem die Seitenwände befestigt und der Kamm in den Gelschlitten gesteckt werden.
- ✓ 2. 1 g Agarose in einer Glasflasche abwiegen und 100 ml TAE-Puffer dazu geben. Den Deckel locker auf die Flasche legen und in der Mikrowelle mehrfach aufkochen, bis die Agarose komplett gelöst ist, zwischendurch mischen.
- ✓ 3. Die Agarose in einem Wasserbad auf ca. 60°C abkühlen lassen, 1 µl des DNA-Farbstoffs PqGreen zugeben und gut mischen.
- ✓ 4. Das Gel in die Form gießen und stehen lassen bis es polymerisiert ist (ca. 20min).
- ✓ 5. Danach Kamm und Seitenwände entfernen, den Gelträger in die Elektrophorese-Kammer einsetzen und die Kammer ggfs. mit TAE-Puffer füllen, bis das Gel mit Flüssigkeit bedeckt ist.

### 2.5.2 Vorbereitung und Beladen der Proben:

- ✓1. Bereite drei neue Gefäße vor und beschrifte mit +, Bakterien und - .
- ✓2. Pipettiere 10µl des PCR-Probe in die vorbereiteten Gefäße, dann 2µl Ladepuffer dazu.
- ✓3. 5 Sekunden vortexen, anschließend 10 Sekunden zentrifugieren (short spin).
- ✓4. 12 µl in jeweils eine Geltasche pipettieren.
- 5. Elektrophorese starten und ca. 15 Minuten bei 100 Volt durchführen.
- 6. Auswertung der Ergebnisse mit UV-Licht.

### 3. Quiz:

Fülle die Felder der Abbildung aus.

