Projektowanie, konstrukcja i ocena nukleaz CRISPR/Cas9 w celu edycji genów związanych z porastaniem przedżniwnym pszenżyta

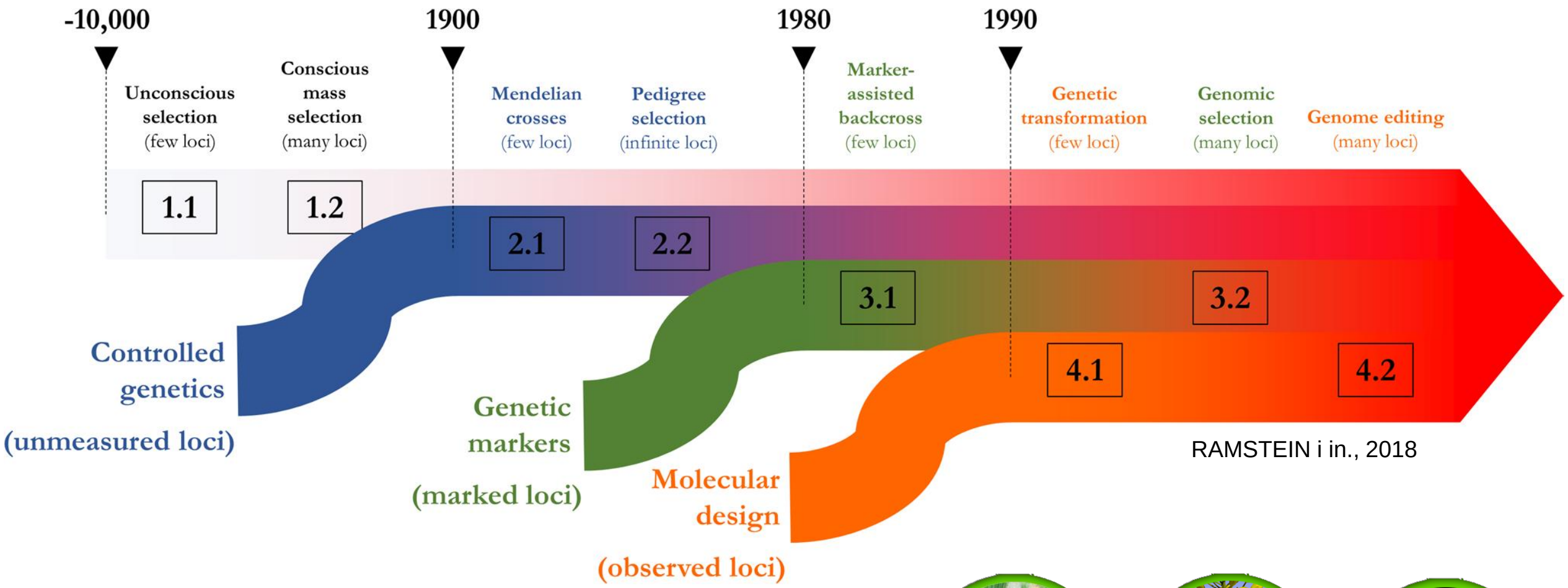
Krzysztof Michalski, Anna M. Linkiewicz

Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

05-870 Błonie, Radzików
krzysztof.michalski@ihar.edu.pl

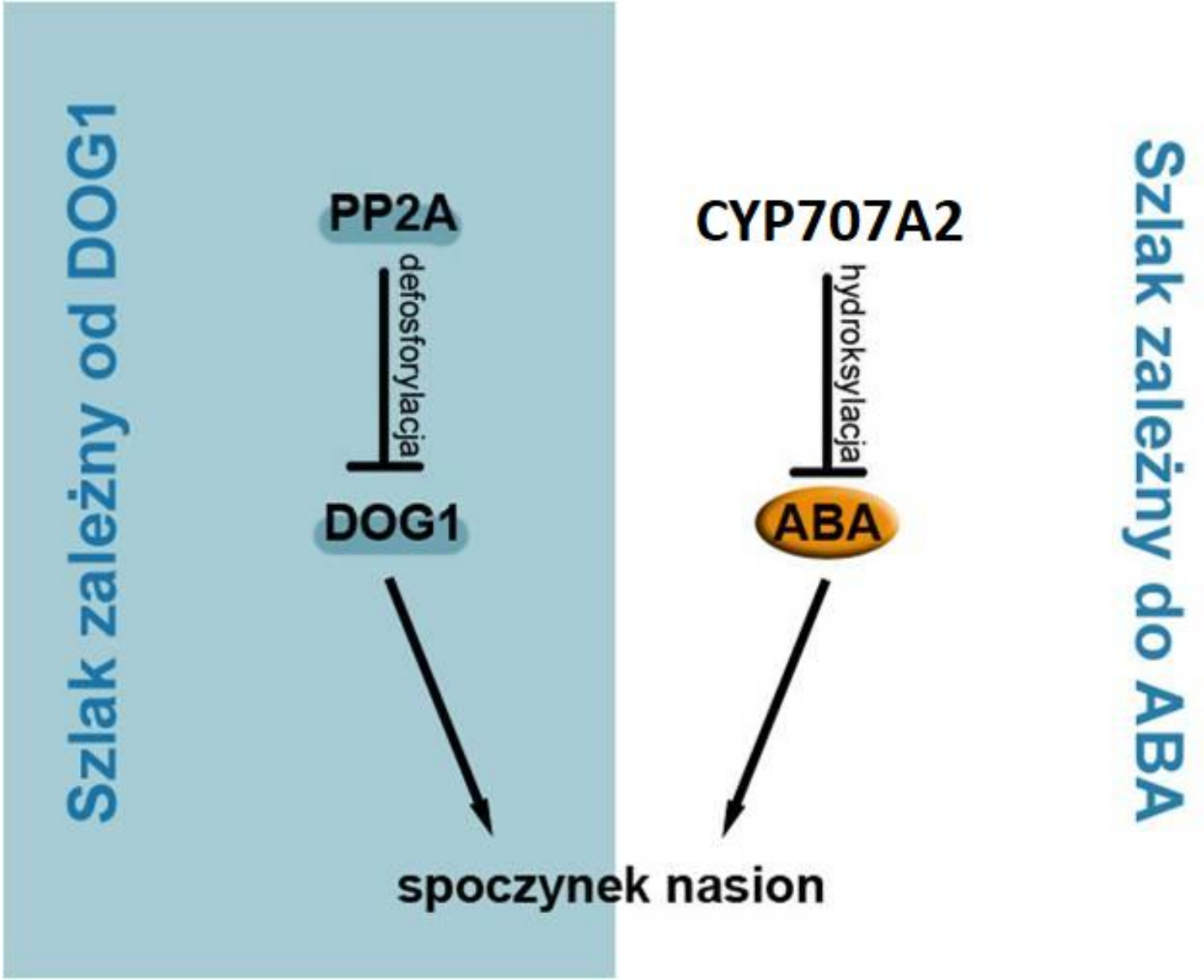
Badania podstawowe na rzecz Postępu Biologicznego w Produkcji Roślinnej w latach 2014-2020

Hodowla 4.0



RAMSTEIN i in., 2018

Regulacja spoczynku nasion



Ocena jakości konstruktu

OFF-TARGET

- Czy nukleaza jest specyficzna tylko dla wybranego miejsca w genomie?

ON-TARGET

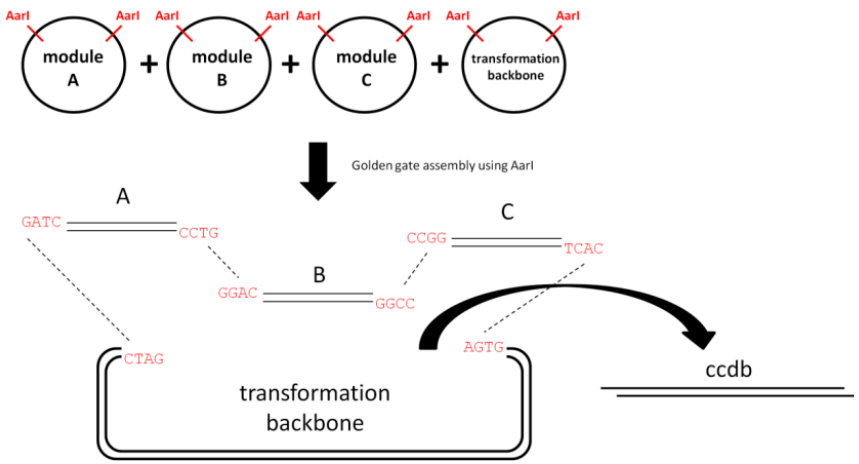
- Czy nukleaza wykazuje aktywność w wybranym miejscu w genomie?
- Jaka jest wydajność nukleazy?

Etapy pracy: projektowanie i synteza konstruktów

CRISPRdirect

E-CRISP
Design of CRISPR constructs
dkfz. GERMAN CANCER RESEARCH CENTER

NARZĘDZIA DO PROJEKTOWANIA ON-LINE



SYNTEZA TYPU GOLDEN-GATE wg. CERMAK i in., 2017

pMOD_A1110
Module A, Promoter: ZmUbi, Gene: TaCas9, Terminator: HSP

pMOD_B2518
Module B, Promoter: TaU6, Gene: Esp3I ccdb cassette for single gRNA spacer cloning, Terminator: Pol III

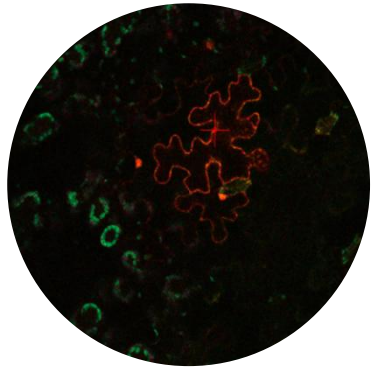
pMOD_C3003
Module C, Promoter: CmYLCV, Gene: GFP, Terminator: pea rbcsE9

pTRANS_230
Empty Backbone: Type: T-DNA, Plant Selection: 2x35S:bar

Metody oceny konstruktów

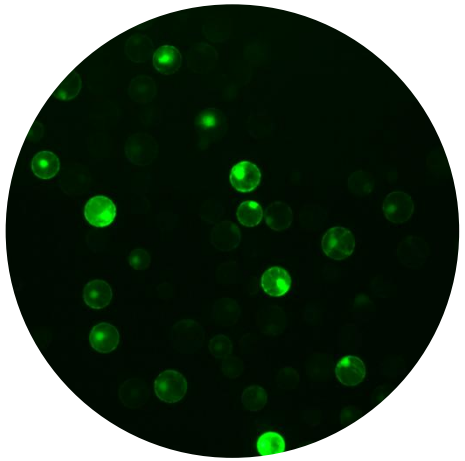
TRANSFORMACJA DROŻDŻY

- Konieczność zastosowania konstruktów optymalizowanych dla ekspresji w drożdżach
- Konieczność wprowadzania nukleazy i sekwencji docelowej
- Niskie koszty i wymagania sprzętowe



KO-TRANSFECJA Z MARKEREM FLUORESCENCYJNYM

- Konieczność zastosowania specjalistycznego sprzętu
- Wprowadzana jest nukleaza i sekwencja docelowa
- Szybka, jednoetapowa analiza

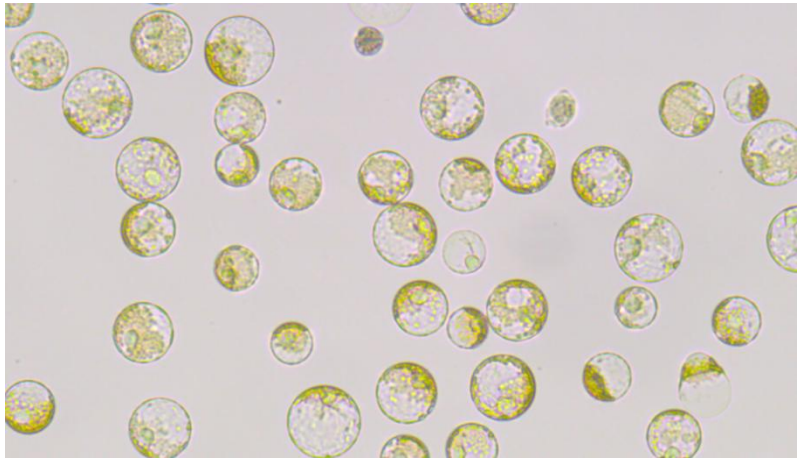


TRANSFEKCJA PROTOPLASTÓW

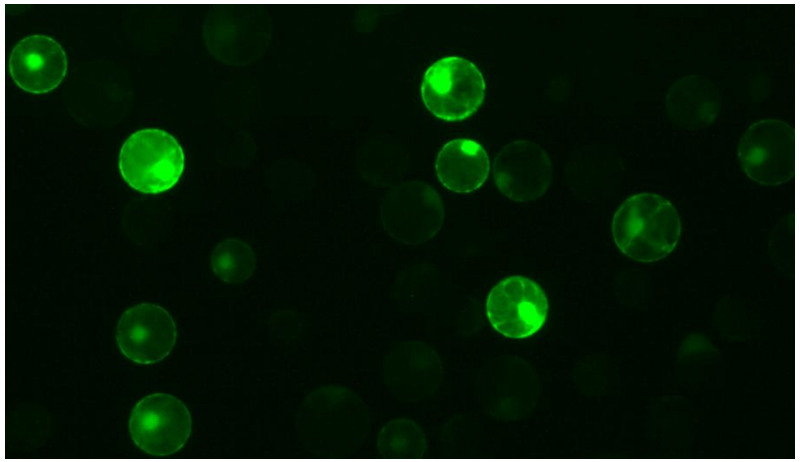
- Wieloetapowa optymalizacja
- Wprowadzana jest jedynie nukleaza
- Niskie wymagania sprzętowe

Etapy pracy: optymalizacja transfekcji protoplastów

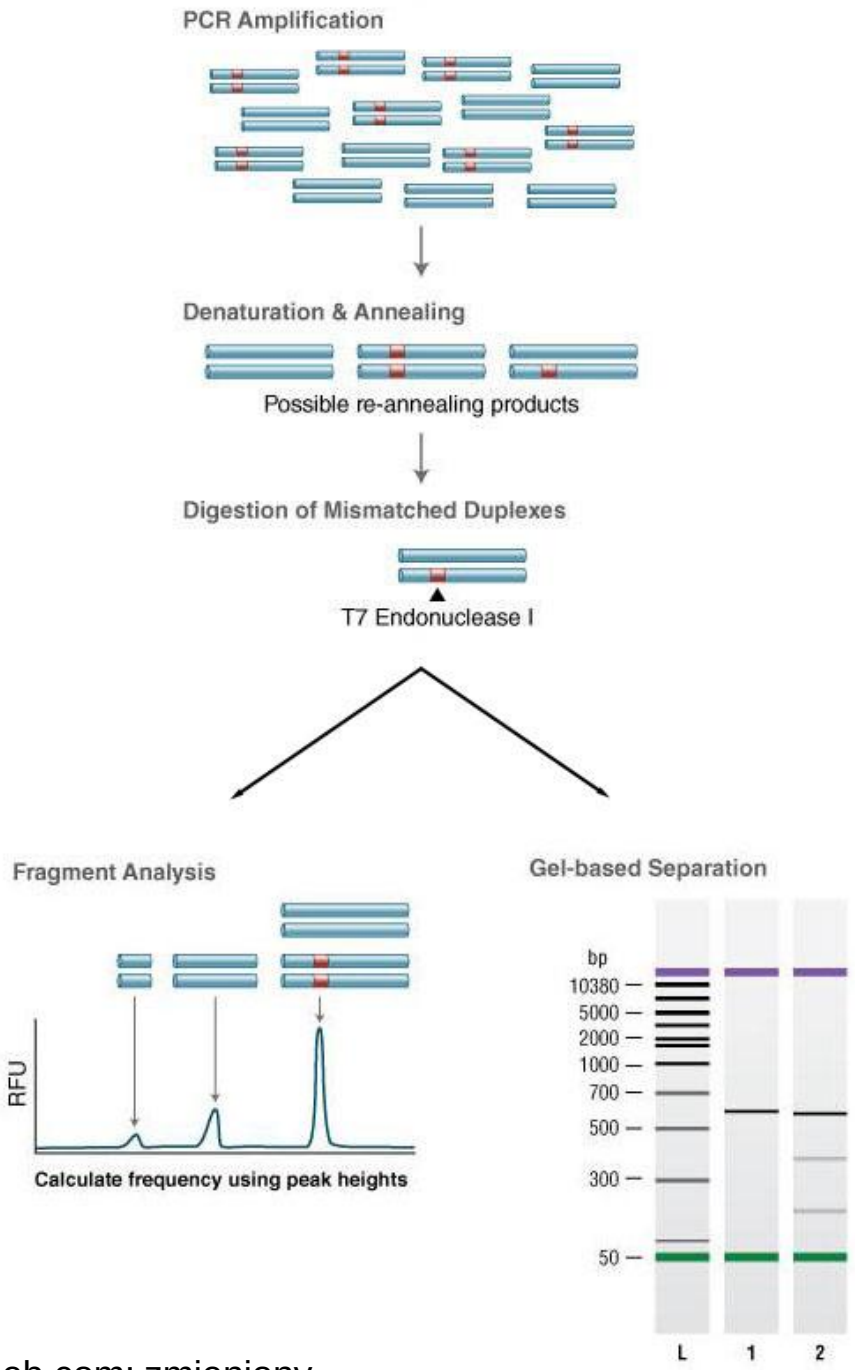
- Optymalizacja izolacji protoplastów
  - Dostosowanie protokołu izolacji do pszenżyta



- Optymalizacja transfekcji
  - Ustalenie odpowiedniego stosunku ilości plazmidu do protoplastów



Detekcja mutacji: test T7



izolacja DNA z protoplastów

↓

reakcja PCR

↓

denaturacja i rehybrydyzacja produktów

↓

trawienie endonukleazą T7

↓

analiza:

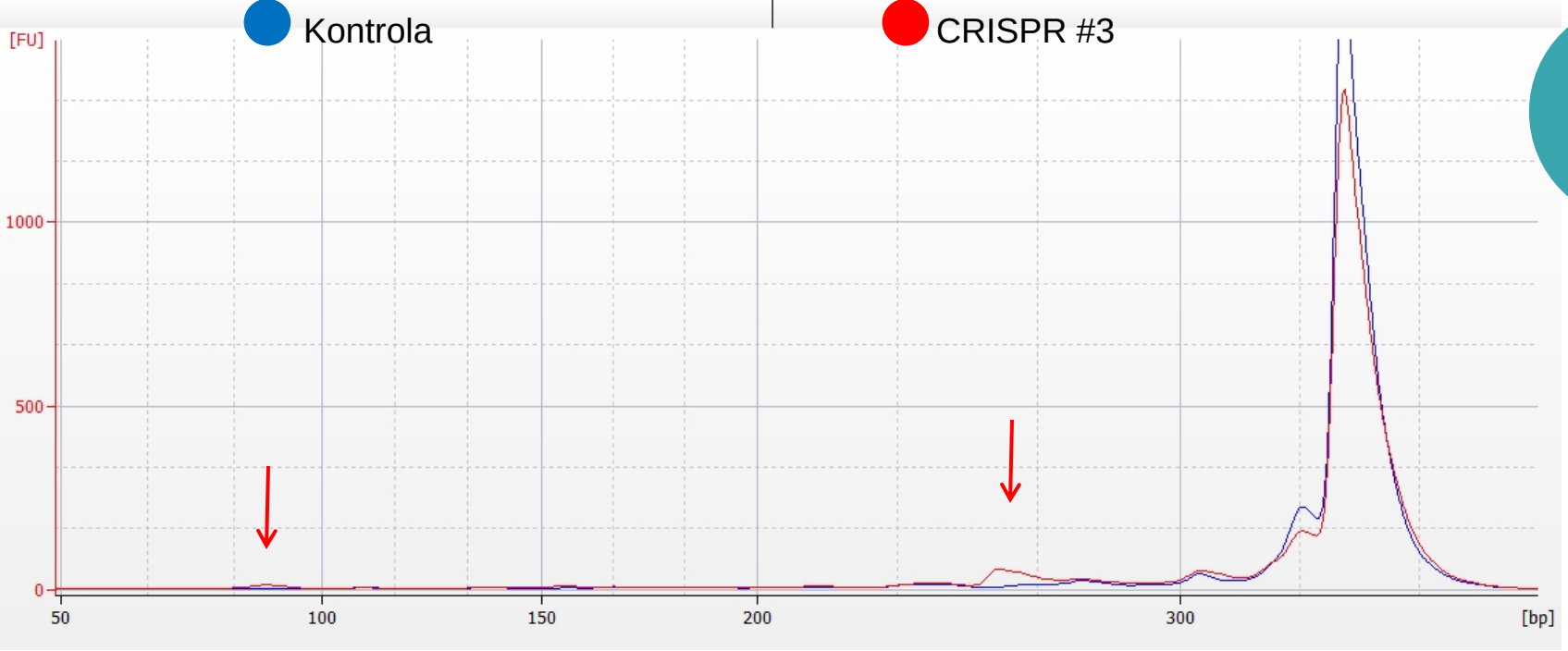
↙ ↘

elektroforeza | analiza fragmentów

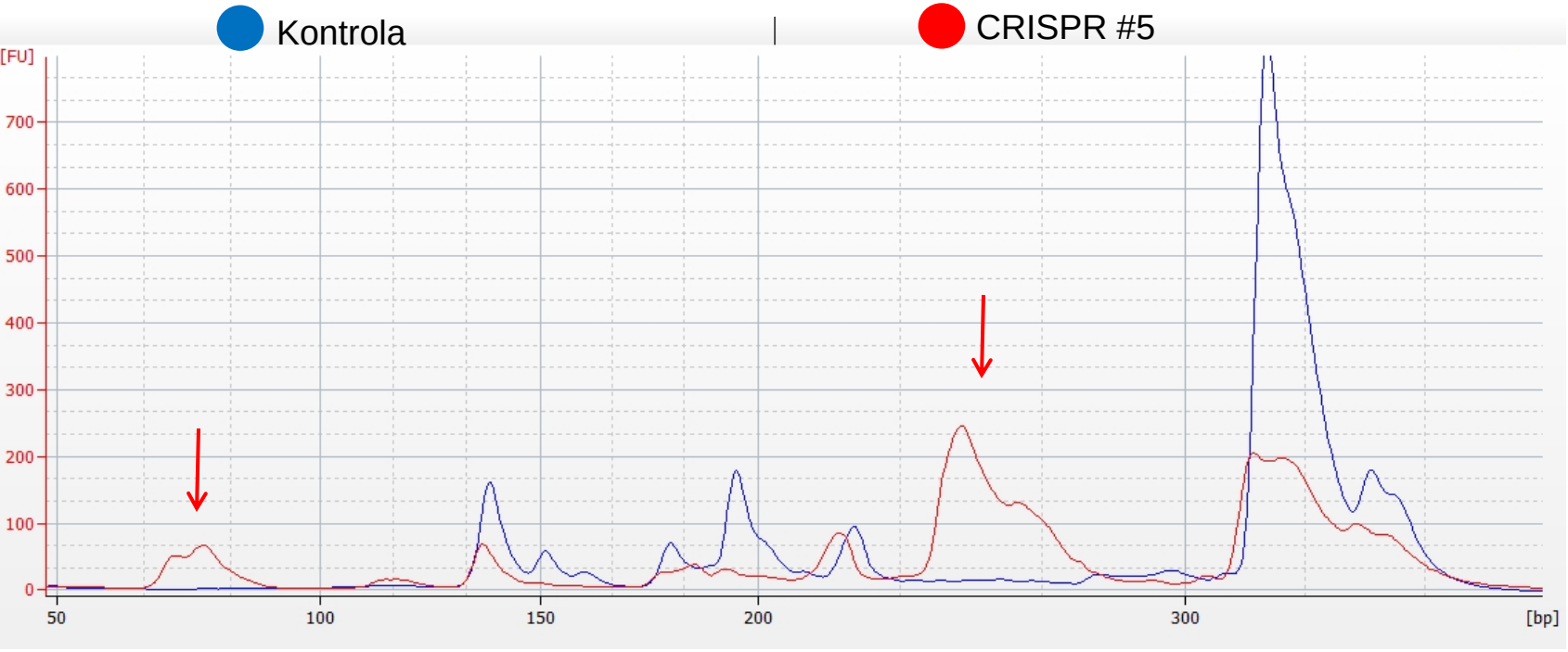
neb.com; zmieniony

Test T7

Analiza fragmentów: BioAnalyzer 2100



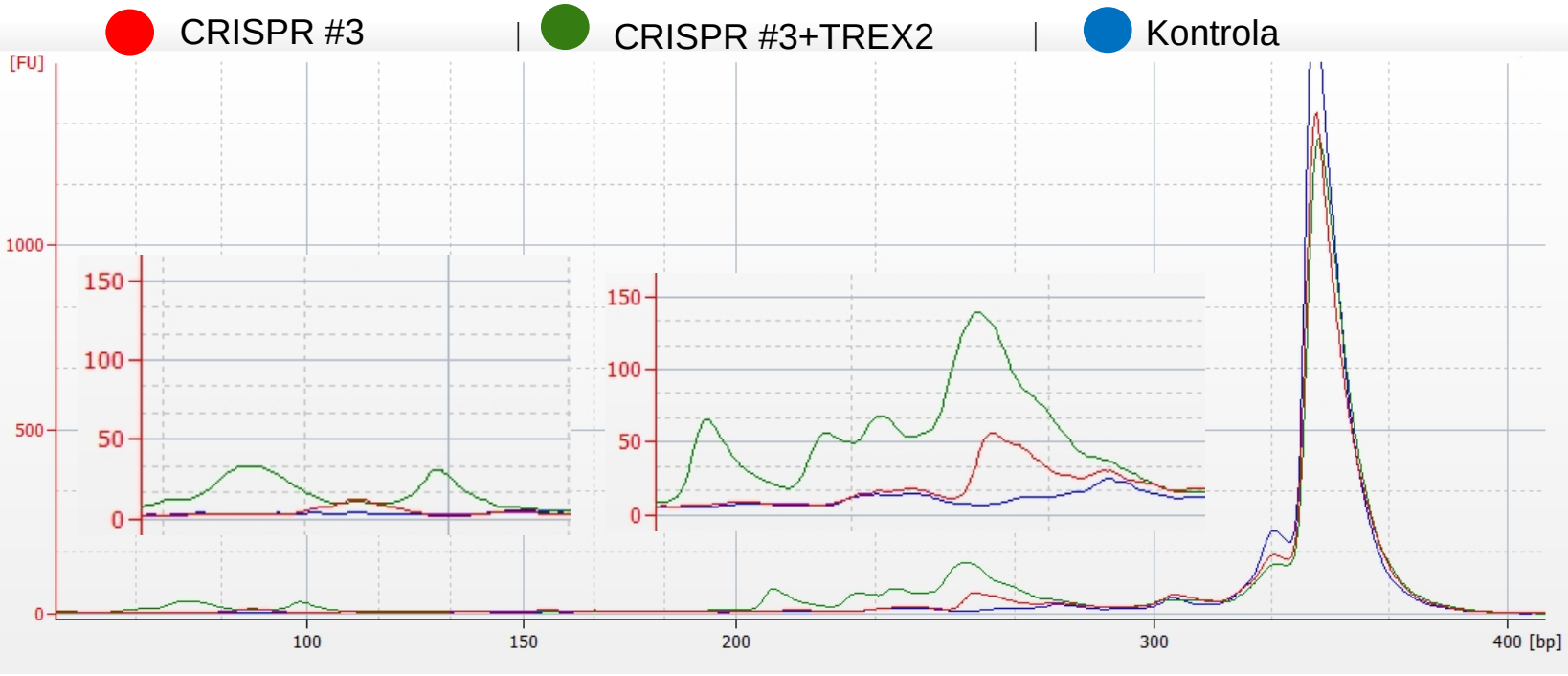
~3%



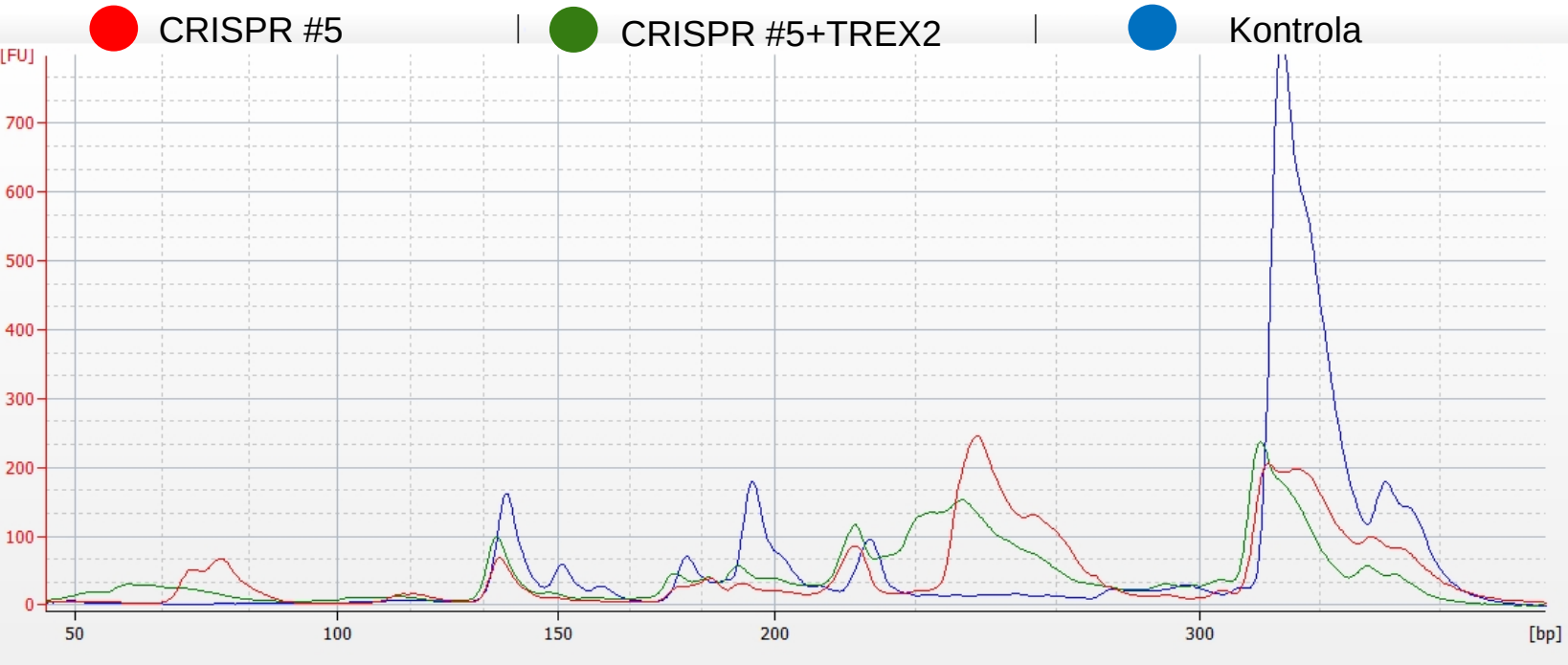
~30%

Test T7

Analiza fragmentów: BioAnalyzer 2100



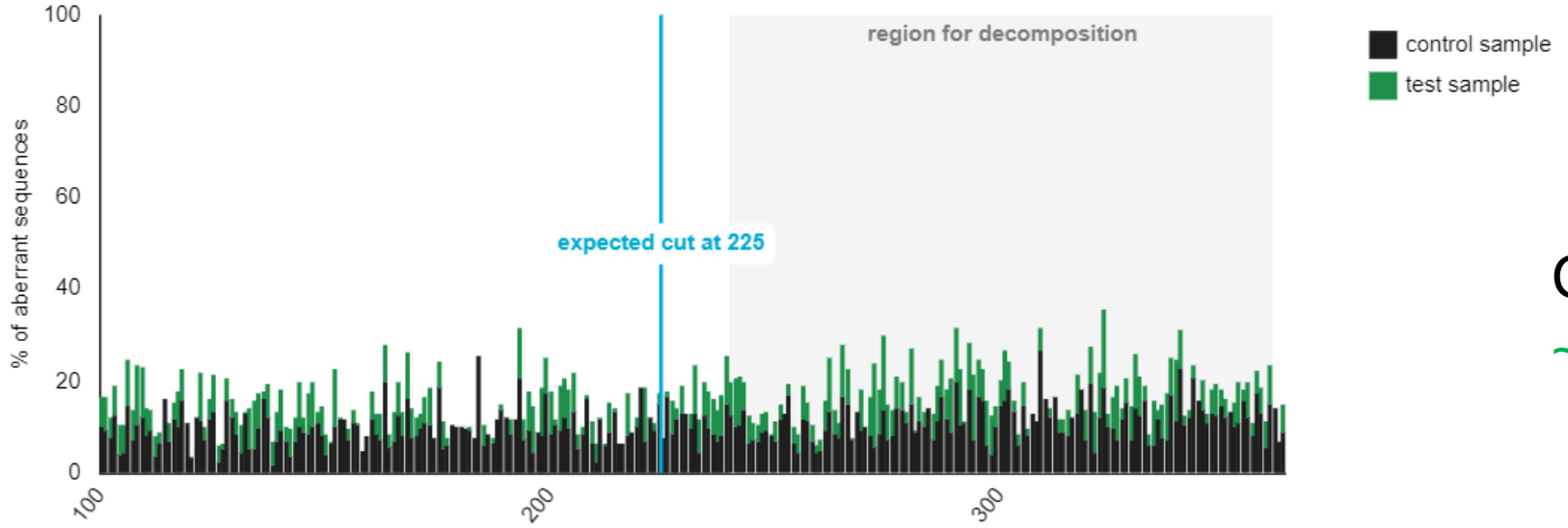
3% vs. 13%



30% vs. 35%

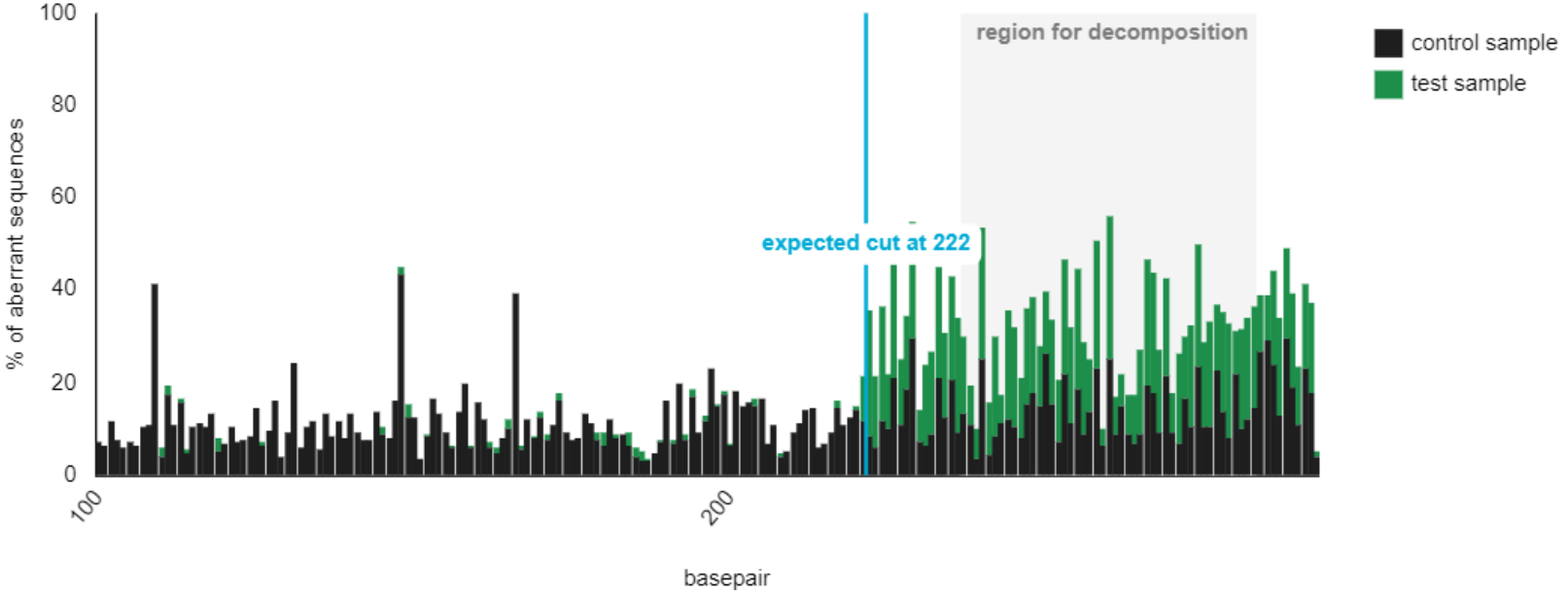
Sekwencjonowanie

Sekwencjonowanie SANGER + analiza TIDE



CRISPR #3

~10%



CRISPR #5

~30%

Warto zapamiętać

- **Analiza aktywności wykorzystująca transfekcję protoplastów pszenżyta umożliwią ocenę i wybór najwydajniejszych konstruktów CRISPR/Cas9**

- **Stosowanie kontruktów z egzonukleazą TREX2 zmienia profil generowanych mutacji, co ułatwia ich wykrywanie w teście T7**