

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja GUČEK

**TARČNA MUTAGENEZA MIKROSPOR OLJNE
OGRŠČICE (*Brassica napus L.*) S TEHNOLOGIJO
CRISPR/Cas9**

MAGISTRSKO DELO

Magistrski študij - 2. stopnja

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ŠTUDIJ BIOTEHNOLOGIJE

Katja GUČEK

**TARČNA MUTAGENEZA MIKROSPOR OLJNE OGRŠČICE
(*Brassica napus* L.) S TEHNOLOGIJO CRISPR/Cas9**

MAGISTRSKO DELO
Magistrski študij - 2. stopnja

**TARGETED MUTAGENESIS OF RAPESEED MICROSPORES
(*Brassica napus* L.) WITH CRISPR/Cas9 TECHNOLOGY**

M. SC. THESIS
Master Study Programme

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo je zaključek Magistrskega študijskega programa 2. stopnje študija Biotehnologije. Delo je bilo opravljeno na Katedri za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin na Oddelku za agronomijo Biotehniške fakultete in na Odseku za sintezno biologijo in imunologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani.

Študijska komisija je za mentorico magistrskega dela imenovala doc. dr. Jano Murovec.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Mojca NARAT

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: doc. dr. Jana MUROVEC

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Kristina GRUDEN

Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

Datum zagovora: 21.12.2016

Podpisana izjavljam, da je magistrsko delo rezultat lastnega raziskovalnega dela. Izjavljam, da je elektronski izvod identičen tiskanemu. Na univerzo neodplačno, neizključno, prostorsko in časovno neomejeno prenašam pravici shranitve avtorskega dela v elektronski obliki in reproduciranja ter pravico omogočanja javnega dostopa do avtorskega dela na svetovnem spletu preko Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete.

Katja Guček

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du2
DK UDK 602.621:575.224:635.44(043.2)
KG mikrospore/oljna ogrščica/tarčna mutageneza/CRISPR/Cas9/elektroporacija
AV GUČEK, Katja, dipl. bioteh. (UN)
SA MUROVEC, JANA (mentorica)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Študij biotehnologije, Magistrski studijski program 2. stopnje Biotehnologija
LI 2016
IN TARČNA MUTAGENEZA MIKROPOR OLJNE OGRŠČICE (*Brassica napus* L.) S TEHNOLOGIJO CRISPR/Cas9
TD Magistrsko delo (Magistrski študij - 2. stopnja)
OP XIV, 61 str., 15 pregl., 18 sl., 67 vir.
IJ sl
JI sl/en
AI Orodje genskega inženiringa CRISPR/Cas9 je vse pomembnejše za modifikacijo genoma različnih organizmov, vedno bolj tudi rastlin. Vzpostavitev metod neposrednega vnosa sgRNA in encima Cas9 pri rastlinah bi pospešilo uporabo te tehnologije v žlahtnjenju rastlin, saj tako pridobljene sorte verjetno ne bodo obravnavane kot gensko spremenjene. V mikrospore oljne ogrščice (*Brassica napus* L.), ki so pomembne za pridobivanje homozigotnih linij, smo zato želeli z elektroporacijo vnesti izoliran protein Cas9 in sgRNA in na ta način povzročiti tarčne mutacije. Za ta namen smo optimizirali pogoje gojenja rastlin, izolacijo njihovih mikrospor ter elektroporacijske parametre. Elektroporacijske pogoje smo izbrali na podlagi njihovega vpliva na živost in regeneracijo mikrospor (z ali brez dodatka proteina Cas9) ter na podlagi uspešnosti vnosa ekspresijskega plazmida z genom *gus*. Za tarčno mutacijo mikrospor oljne ogrščice smo uporabili 6 različnih sgRNA s tarčami na genu *pds*, ki smo jih v kompleksu s proteinom Cas9, v molarnih razmerjih od 0,20:1 do 10:1, vnašali z različnimi elektroporacijskimi pogoji. En dan po elektroporaciji smo izolirali DNA in identificirali morebitne tarčne mutacije z uporabo endonukleaze T7, z metodo PCR-RFLP in z metodo sekvenciranja po Sangerju. Z dobljenimi rezultati tarčnih mutacij nismo mogli z gotovostjo potrditi. Za uspešno tarčno mutagenezo bi bila potrebna nadaljnja optimizacija postopka in/ali bolj občutljiva metoda identifikacije mutacij, kot sta npr. analiza talilne krivulje visoke ločljivosti in sekvenciranje naslednje generacije.

KEY WORDS DOCUMENTATION

ND Du2
DC UDC 602.621:575.224:635.44(043.2)
CX microspores/rapeseed/targeted mutagenesis/CRISPR/Cas9/electroporation
AU GUČEK, Katja
AA MUROVEC, Jana (supervisor)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Master Study Programme in Biotechnology
PY 2016
TI TARGETED MUTAGENESIS OF RAPSEED MICROSPORES (*Brassica napus* L.) WITH CRISPR/Cas9 TECHNOLOGY
DT M. Sc. Thesis (Master Study Programmes)
NO XIV, 61 p., 15 tab., 18 fig., 67 ref.
LA sl
AL sl/en
AB CRISPR/Cas9 tool is gaining importance in genetic engineering of a variety of organisms, increasingly also in engineering of plants. Establishment of a method for direct transfer of preassembled sgRNA and Cas9 protein for targeted mutagenesis would increase the use of the technology in plant breeding since such plants probably won't be regulated as genetically modified. In order to develop such method for rapeseed (*Brassica napus* L.), the aim of our work was to deliver purified Cas9 protein and sgRNA into rapeseed microspores which are important for the production of homozygous lines. For this purpose, we optimized plant growth conditions, isolation of microspores and electroporation conditions. Electroporation conditions were chosen based on their impact on microspore viability, the ability of microspores regeneration (with or without the addition of Cas9 protein), and based on success of inserting an expression plasmid with *gus* gene. For targeted mutagenesis we used 6 different sgRNAs with targets in *pds* gene in complex with Cas9 protein. We delivered complexes with molecular ratios between 0.20:1 to 10:1, with different electroporation parameters. One day after electroporation we isolated DNA from microspores and identified putative mutations using T7 endonuclease, PCR-RFLP, and Sanger sequencing. From the results that we obtained we were not able to confirm target mutations with certainty. For successful targeted mutagenesis further optimization of electroporation conditions and more sensitive methods of identification, such as high resolution melt analysis and/or next generation sequencing, are needed.

KAZALO VSEBINE

| | Str. |
|--|-----------|
| KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA | III |
| KEY WORDS DOCUMENTATION | IV |
| KAZALO VSEBINE | V |
| KAZALO PREGLEDNIC | VIII |
| KAZALO SLIK | IX |
| OKRAJŠAVE IN SIMBOLI | XI |
| SLOVARČEK | XIV |
| 1 UVOD | 1 |
| 1.1 CILJI RAZISKOVALNEGA DELA | 2 |
| 1.2 DELOVNE HIPOTEZE | 2 |
| 2 PREGLED OBJAV | 4 |
| 2.1 OLJNA OGRŠČICA | 4 |
| 2.2 ANDROGENEZA | 4 |
| 2.3 UPORABA PODVOJENIH HAPLOIDOV | 6 |
| 2.4 NOVEJŠE TEHNIKE GENSKEGA INŽENIRINGA | 6 |
| 2.4.1 Delovanje CRISPR/Cas9 | 8 |
| 2.4.2 Uporaba tehnologije CRISPR/Cas9 | 11 |
| 2.4.3 Modifikacije genomov z ribonukleoproteinski kompleksi CRISPR/Cas9 | 11 |
| 3 MATERIALI IN METODE | 14 |
| 3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ | 14 |
| 3.2 POGOJI GOJENJA RASTLIN IN IZOLACIJA MIKROSPOR | 15 |
| 3.2.1 Določanje koncentracije mikrospor | 15 |
| 3.2.2 Določanje živosti mikrospor | 16 |
| 3.2.3 Določanje nukleazne aktivnosti mikrospor | 16 |
| 3.3 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA | 16 |
| 3.4 VPLIV ELEKTROPORACIJSKIH PARAMETROV NA ŽIVOST IN ANDROGENEZO | 17 |
| 3.5 VNOS PLAZMIDA V MIKROSPORE Z ELEKTROPORACIJO | 18 |
| 3.5.1 Histokemični test izražanja <i>gus</i> gena | 18 |

| | |
|---|----|
| 3.6 VNOS RNP-JEV V MIKROSPORE Z ELEKTROPORACIJO | 19 |
| 3.6.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR) | 19 |
| 3.6.2 Transformacija v bakterijo <i>E. coli</i> | 21 |
| 3.6.3 Priprava gojišča za selekcijo | 21 |
| 3.6.4 PCR na osnovi kolonije | 21 |
| 3.6.5 Sekvenčna reakcija | 22 |
| 3.6.6 Načrtovanje vodilne sekvence sgRNA | 23 |
| 3.6.7 Sinteza matrične DNA | 24 |
| 3.6.8 Sinteza sgRNA | 26 |
| 3.6.9 Merjenje koncentracije RNA in DNA | 27 |
| 3.6.10 Analiza z bioanalizatorjem Agilent 2100 | 27 |
| 3.6.11 <i>In vitro</i> testiranje delovanja kompleksa sgRNA in Cas9 | 28 |
| 3.6.11.1 Priprava DNA | 28 |
| 3.6.11.2 <i>In vitro</i> razrez | 29 |
| 3.6.12 Vnos kompleksa sgRNA in Cas9 z elektroporacijo | 30 |
| 3.7 IDENTIFIKACIJA MUTACIJ | 31 |
| 3.7.1 Izolacija DNA iz mikrospor | 31 |
| 3.7.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA | 31 |
| 3.7.3 Pomnoževanje tarčnih eksonov | 31 |
| 3.7.4 Testiranje z endonukleazo T7EI | 33 |
| 3.7.5 Testiranje s PCR-RFLP | 33 |
| 3.7.6 Testiranje s sekvenciranjem po Sangerju | 34 |
| 4 REZULTATI | 35 |
| 4.1 GOJENJE RASTLIN IN IZOLACIJA MIKROSPOR | 35 |
| 4.2 ŽIVOST MIKROSPOR PO IZOLACIJI | 35 |
| 4.3 ŽIVOST MIKROSPOR PO ELEKTROPORACIJI | 36 |
| 4.4 NUKLEAZNA AKTIVNOST IZOLIRANIH MIKROSPOR | 37 |
| 4.5 VPLIV ELEKTROPORACIJE IN VNOSA PROTEINA Cas9 NA EMBRIOGENEZO | 38 |
| 4.6 USPEŠNOST VNOSA PLAZMIDA Z ELEKTROPORACIJO | 40 |
| 4.7 <i>In vitro</i> SINTEZA sgRNA | 41 |

| | |
|--|----|
| 4.8 <i>In vitro</i> TESTIRANJE DELOVANJA RNP KOMPLEKSA | 43 |
| 4.9 IDENTIFIKACIJA MUTACIJ | 44 |
| 4.9.1 PCR reakcija s temperaturnim gradientom | 44 |
| 4.9.2 Endonukleaza T7EI | 45 |
| 4.9.3 Restrikcijski encimi BtgI, BsaWI in HpyCH4V | 47 |
| 4.9.4 Sekvenciranje po Sangerju | 49 |
| 5 RAZPRAVA | 50 |
| 6 SKLEPI | 55 |
| 7 POVZETEK | 56 |
| 8 VIRI | 57 |
| ZAHVALA | |

KAZALO PREGLEDNIC

| | Str. |
|---|------|
| Preglednica 1: Sestava mešanice mikro in makroelementov ter organskih komponent NLN gojišča. | 14 |
| Preglednica 2: Elektroporacijski pogoji uporabljeni v poskusih. | 18 |
| Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena <i>pds</i> . | 20 |
| Preglednica 4: Sestava PCR mešanice za verižno reakcijo s polimerazo Kapa2G Fast. | 20 |
| Preglednica 5: Temperaturni profil za verižno reakcijo s polimerazo Kapa2G Fast. | 20 |
| Preglednica 6: Temperaturni profil za sekvenčno reakcijo. | 23 |
| Preglednica 7: Sekvence oligonukleotidov za sintezo DNA matric. | 24 |
| Preglednica 8: Sestava PCR mešanic za sintezo DNA matric s polimerazo Q5 High-fidelity. | 25 |
| Preglednica 9: Temperaturni profil za sintezo DNA matric s polimerazo Q5 High-fidelity. | 26 |
| Preglednica 10: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje prvega eksona gena <i>pds</i> . | 28 |
| Preglednica 11: Sestava PCR mešanice za verižno reakcijo s polimerazo Q5 High-fidelity. | 29 |
| Preglednica 12: Temperaturni profil za verižno reakcijo s polimerazo Q5 High-fidelity. | 29 |
| Preglednica 13: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za identifikacijo tarčnih mutacij. | 32 |
| Preglednica 14: Vpliv elektroporacije na živost mikrospor. | 37 |
| Preglednica 15: Rezultati <i>in vitro</i> sinteze sgRNA po različnih načinih čiščenja. Koncentracije RNA so bile izmerjene na spektrofotometru NanoVue. | 42 |

KAZALO SLIK

| | Str. |
|---|------|
| Slika 1: Vezava neaktivnega proteina Cas9 s sgRNA v aktiven ribonukleoproteinski kompleks (prirejeno po Cavanagh in Garrity, 2014). | 9 |
| Slika 2: Način vezave ribonukleoproteinskega kompleksa na tarčno DNA in njen razrez (prirejeno po Cavanagh in Garrity, 2014). | 10 |
| Slika 3: Potek transformacije mikrospor z RNP. | 19 |
| Slika 4: Prikaz temperatur v stolpcih za PCR s temperaturnim gradientom. | 32 |
| Slika 5: Način delovanja spletnega orodja TIDE za zaznavanje tarčnih mutacij preko primerjave kromatografov DNA sekvenc mutiranih in nemutiranih vzorcev (prirejeno po TIDE, 2016). | 34 |
| Slika 6: Levo socvetje oljne ogrščice in desno petrijevka z embrijami iz mikrospor. | 35 |
| Slika 7: Mikrospore pobarvane s FDA pri 40x povečavi. A- mikrospore pod navadno lučjo, B- mikrospore pod ustreznim filtrom za detekcijo zelene fluorescence. Žive celice fluorescirajo, mrtve pa ne. | 36 |
| Slika 8: Agarozni gel plazmida po inkubaciji v suspenziji izoliranih mikrospor za preverjanje zunaj celične nukleazne aktivnosti mikrospor. 1- Dolžinski standard 100 bp; 2-13- Mikrospore v gojiščih NLN-13, BK, BK + 2 % PEG po 5-60 minutni inkubaciji; 14- pozitivna kontrola- 1 µg plazmida. 15: pozitivna kontrola- 0,5 µg plazmida. | 38 |
| Slika 9: Vpliv elektroporacije in vnosa proteina Cas9 na regeneracijo embrijov iz mikrospor. Na osi y so prikazani različni elektroporacijski pogoji, na osi x pa število regeneriranih embrijov iz 200000 mikrospor. Rdeča - kontrola; vijolična – EP 1; zelena - EP 2; modra - EP s pulzi dolžine 0,5 ms; rumena- EP s pulzi dolžine 10 ms. | 39 |
| Slika 10: Rezultat histokemičnega GUS-testa izražanja gena <i>gus</i> v transformiranih mikrosporah pri 40 x povečavi. A: kontrola v NLN-13, B: Modra celica pri NLN-13, EP 1, C, D: modre celice pri BK + 2 % PEG, EP 3. | 40 |
| Slika 11: Agarozni gel matrične DNA 1.1 in 1.2 po PCR pred in po čiščenju. 1, 3- DNA 1.1. 2, 4- DNA 1.2. 1,2- neočiščena matrična DNA, 3,4- očiščena matrična DNA. | 41 |
| Slika 12: Elektroforogrami za preverjanje razgrajenosti RNA po <i>in vitro</i> sintezi in čiščenju. Vzorci z enim dodatnim gvaninom so označeni kot sgRNA, z dvema dodatnima gvaninoma pa sgRNA GG. | 42 |
| Slika 13: Agarozni gel in vitro razreza DNA s Cas9 in sgRNA. 1. sgRNA 1.1 + produkt PCR BnPDS 1.3; 2. sgRNA 1.2 + produkt PCR BnPDS 1.3; 3. sgRNA 1.1 + produkt PCR BnPDS 1.5; 4. sgRNA 1.2 + produkt PCR BnPDS 1.5; 5. dolžinski standard 100 bp; 6. produkt PCR BnPDS. | 44 |

Slika 14: Optimizacija PCR s temperaturnim gradientom. A: 2-7, 8-13, 14-19, 20-25 in od 26-31 si temperature sledijo: 56,9 °C, 59 °C, 61 °C, 63 °C, 65 °C, 67,1 °C. 2-7- začetni oligonukleotid BnDET 1.34, 8-13- BnDET 1.56, 14-19- BnDET 6.1, 20-25- BnDET 6.4, 26-31- BnDET 8.

45

Slika 15: Primer razreza DNA z endonukleazo T7E1. 1. Dolžinski standard; 2, 3, 4- BnDET 1.34; 2, 3: vzorca tretiran s Cas9+sgRNA 1.1, EP 5 in 6; 4: - kontrola; 5, 6, 7, BnDET 1.56; 5, 6: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 1.2, EP 5 in 6; 7: - kontrola; 8, 9, 10- BnDET 6.1; 8, 9: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 6.1, EP 1, 2; 10: - kontrola; 11, 12, 13- BnDET 8; 11, 12: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 8.1, EP 2 in 5; 13: - kontrola.

47

Slika 16: Primer analize DNA izoliranih iz mikrospor transformiranih s Cas9+sgRNA 1.1, pomnoženih z BnDET 1.34 in razrezanih z restriktičnim encimom BtgI. 1- dolžinski standard; 2 do 5 DNA iz tretiranih mikrospor; 6- pozitivna kontrola (DNA iz listov, razrezana z BtgI), 7- negativna kontrola (DNA iz listov, brez dodatka BtgI).

48

Slika 17: Primer analize DNA izoliranih iz mikrospor transformiranih s Cas9+sgRNA 8.2, pomnoženih z BnDET 8.2 in razrezanih z restriktičnim encimom BsaWI. 1- dolžinski standard; 2 do 5 DNA iz tretiranih mikrospor; 6- pozitivna kontrola (DNA iz listov, razrezana z BsaWI), 7- negativna kontrola (DNA iz listov, brez dodatka BsaWI).

48

Slika 18: Primer analize DNA izoliranih iz mikrospor transformiranih s Cas9+sgRNA 1.2, pomnoženih z BnDET 1.56 in razrezanih z restriktičnim encimom HpyCH4V. 1- dolžinski standard; 2 do 5 DNA iz tretiranih mikrospor; 6- pozitivna kontrola (DNA iz listov, razrezana z HpyCH4V), 7- negativna kontrola (DNA iz listov, brez dodatka HpyCH4V).

49

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

| | |
|--------------------|---|
| % | odstotek |
| °C | stopinje Celzija |
| angl. | angleško |
| bp | bazni par |
| Cas9 | angl. <i>CRISPR associated protein 9</i> |
| CRISPR | gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev (angl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>) |
| crRNA | angl. <i>CRISPR RNA</i> |
| CTAB | heksadeciltrimetilamonijev bromid |
| dCas9 | katalitično neaktivni protein Cas9 (angl. <i>dead Cas9</i>) |
| ddH ₂ O | bidestilirana voda |
| ddNTP | dideoksinukleotid |
| DICA | dikloroizocianurna kislina natrijeve soli |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>) |
| dNTP | deoksinukleotid trifosfat |
| DTT | ditiotreitol |
| EDTA | etilendiamintetraocetna kislina |
| EP | elektroporacijski pogoj |
| EtBr | etidijev bromid |
| FDA | fluorescin diacetat |
| For/Forward | smerni začetni oligonukleotid |
| g | enota za relativno centrifugalno silo (angl. RCF - <i>relative centrifugal force</i>) |
| G | gvanin |
| GFP | zeleni fluorescentni protein (angl. <i>green fluorescent protein</i>) |
| GUS | β-glukoronidaza |
| HCl | klorovodikova kislina |
| HDR | popravljanje s homologno rekombinacijo (angl. <i>homology direct repair</i>) |
| HEPES | 4-(2-hidroksietyl)-1-piperazinetansulfonska kislina |

| | |
|--------------------|--|
| HRM | analiza talilne krivulje visoke ločljivosti (angl. <i>high resolution melting</i>) |
| IPTG | izopropil β -D-1-tiogalaktopiranozid |
| KOH | kalijev hidroksid |
| M | molarnost (mol l ⁻¹) |
| MgCl ₂ | magnezijev klorid |
| min | minuta |
| NaCl | natrijev klorid |
| NGS | sekvenciranje naslednje generacije (angl. <i>next generation sequencing</i>) |
| NHEJ | zdrževanje nehomolognih koncov (angl. <i>non-homologous end joining</i>) |
| PAM | angl. <i>protospacer adjacent motif</i> |
| PCR | verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>polymerase chain reaction</i>) |
| PEG | polietilen glikol |
| pH | merilo za koncentracijo hidroksilnih ionov v raztopini |
| Rev/Reverse | protismerni začetni oligonukleotid |
| RFLP | polimorfizem dolžin restriktivskih fragmentov (angl. <i>restriction fragment length polymorphism</i>) |
| RNA | ribonukleinska kislina (angl. <i>ribonucleic acid</i>) |
| RNP | ribonukleoproteinski kompleks, kompleks proteina Cas9 in sgRNA (angl. <i>ribonucleoprotein</i>) |
| s | sekunda |
| sgRNA | angl. <i>single guide ribonucleic acid</i> |
| SNP | polimorfizem posameznih nukleotidov (angl. <i>single nucleotide polymorphism</i>) |
| TALEN | nukleaze TAL efektorjev (angl. <i>transcriptional activator-like effector nucleases</i>) |
| TBE | elektroforetski pufer iz Tris-HCl, borove kisline in EDTA |
| TCEP | tris-2-karboksietil-fosfin |
| tracrRNA | angl. <i>trans-activating CRISPR RNA</i> |
| Tris-HCl | tris(hidroksimetil)aminometan - vodikov klorid |
| V cm ⁻¹ | enota za jakost električnega polja (E) |
| X-Gal | 5-bromo-4-kloro-3-indolil- β -D-galaktopiranozid |
| X-Gluc | 5-bromo-4-koloro-3-indolil glukorid |

ZNF

nukleaze z motivi cinkovih prstov (angl. *zinc finger nucleases*)

SLOVARČEK

| | |
|---------------------|--|
| alel | različica gena, ki se nahaja na homolognih kromosomih |
| androgeneza | embriogeneza mikrospor, pridobivanje embrijev iz moških gamet |
| brezprašna komora | komora z laminarnim tokom zraka za delo v sterilnih razmerah |
| DNA polimeraza | encim, ki katalizira povezovanje deoksinukleotidov in s tem sintezo verige DNA, ki je komplementarna matični verigi |
| Haploid | celica ali organizem s polovičnim oz. gametnim številom kromosomov |
| Heterodupleks | dvooverižna DNA, v kateri se komplementarno povežeta enojni verigi DNA, ki se ne prilegata popolnoma |
| Hibrid | križanec dveh čistih linij |
| <i>In vitro</i> | proces, eksperiment, ki poteka v nadzorovanem okolju, kot npr. v laboratoriju |
| Kolhicin | je snov, antimitotik, ki preprečuje delitev celice z zaviranjem nastanka delitvenega vretena med mitozo |
| Nukleaze | encimi, ki katalizirajo hidrolizo fosfodiestrskih vezi v RNA in DNA |
| Restrikcijski encim | encim, ki reže dvovijačno DNA na specifičnih prepoznavnih mestih oz. restrikcijskih mestih |
| RNA polimeraza | encim, ki katalizira sintezo RNA iz smeri verige 5' proti 3' |
| Sekvenciranje | določanje nukleotidnega zaporedja |
| Totipotentnost | plastičnost razvoja rastlinskih celic, sposobnost dediferenciacije celic, ki omogoča nastanek somatskih embrijev ter adventivnih tkiv in organov |
| Voda brez nukleaz | bidestilirana voda, ki ne vsebuje nukleaz |

1 UVOD

CRISPR/Cas9 je kratica za gruče enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev v povezavi s CRISPR povezanim proteinom (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR associated protein - Cas9*). Gre za del imunskega sistema bakterij, ki omogoča obrambo pred tujo DNA (virusom, fagom, plazmidom). Znanost pa je ta sistem, kjer RNA s specifičnim zaporedjem vodi nukleazo do tarčne DNA in jo prereže, uporabila za genski inženiring. Sistem je sestavljen iz dveh bioloških makromolekul, proteina Cas9 in sgRNA (angl. *single guide RNA*), ki se povežeta v kompleks, ki zelo specifično prepozna tarčo in jo razreže. Celični popravljali mehanizmi nato na mestu razreza s popravilom lahko vnesejo v genom tarčno mutacijo (Doudna in Charpentier, 2014; Harrison in sod., 2014).

Tehnologija CRISPR/Cas9 je v zadnjih letih postala pomembno orodje genskega inženiringa za natančne spremembe v genomu. Orodje se uporablja v številnih organizmih, vedno bolj postaja pomembno tudi za uporabo v modelnih in kulturnih rastlinah. Tehnologija je prehitela druge načine spremicanja genomov, saj je hitrejša, enostavnejša, bolj natančna in ekonomsko ugodnejša (Kanchiswamy, 2016).

Eden izmed načinov njene uporabe je ustvarjanje tarčnih mutacij brez uporabe tuje DNA. Gre za princip vnosa ribonukleoproteinskega (RNP) kompleksa sestavljenega iz izoliranega proteina Cas9 in *in vitro* sintetizirane sgRNA. Takšen način vnosa so vzpostavili že pri humanih celicah, živalih in rastlinah. Tarčne mutacije so bile s to metodologijo povzročene pri navadnem repnjakovcu, tobaku, solati, rižu (Woo in sod., 2015) in petuniji *Petunia x hybrida* (Subburaj in sod., 2016). Razvoj načinov vnosa RNP je potreben, saj tehnike brez vnosa tuje DNA obetajo velik potencial za izboljšanje lastnosti, odpornost rastlinskih vrst in pridobivanje novih sort. Mutacije povzročene z RNP kompleksom se namreč ne razlikujejo od naravnih in tistih povzročenih z mutagenezo ter verjetno ne bodo spadale v okvire definicije gensko spremenjenih organizmov (Woo in sod., 2015; Kanchiswamy, 2016; Subburaj in sod., 2016).

Oljna ogrščica *Brassica napus* L., spada v družino križnic Brassicaceae in je druga najpomembnejša oljnica sveta, njeno olje pa je tretje najpomembnejše po svetovni porabi (FAO, 2016). Pomembna je tudi kot modelna rastlina za študije androgeneze. Androgeneza je *in vitro* razvoj embrijev iz moških gamet, pod vplivom stresnih dejavnikov. Iz mikrospor nastanejo haploidi ali podvojeni haploidi, ki so homozigotne linije, ki se uporabljajo pri pridobivanju hibridov. Haploidi se uporabljajo tudi pri žlahtnjenju oljne ogrščice (Xu in sod., 2007; Murovec, 2013; Rahman in Jimenez, 2016).

Homologni gen *pds* kodira encim fitoen desaturazo, ki je pomemben v biosintezni poti β -karotena. Ta encim skrbi za desaturacijo fitoena. Njegova mutacija vpliva vsaj na 20

metabolnih poti, inhibira mnoge gene v biosintezi klorofila, β -karotena in giberilinske kisline. Njegova mutacija povzroči spremembo v fenotipu, ki se odraža v albinizmu in pritlikavosti (Qin in sod., 2007), kar omogoča enostavno spremljanje učinkovitosti metode mutageneze.

1.1 CILJI RAZISKOVALNEGA DELA

Cilj raziskovalnega dela je bil razvoj metode vnosa ribonukleoproteinskega (RNP) kompleksa sgRNA in proteina Cas9 v mikrospore oljne ogrščice *Brassica napus*. S tem smo želeli vzpostaviti metodo tarčne mutageneze brez vnosa tujih DNA v genom rastline.

S tem namenom smo najprej vzpostavili optimalne pogoje gojenja rastlin oljne ogrščice, optimizirali izolacijo mikrospor in preverili njihovo živost ter nukleazno aktivnost.

Za optimizacijo metode vnosa RNP z elektroporacijo smo najprej želeli ugotoviti vpliv elektroporacije in vnosa proteina Cas9 na živost in embriogenezo mikrospor. V mikrospore smo želeli vnesti plazmid z genom *gus*, da bi določili optimalne elektroporacijske pogoje (EP) za uspešno transformacijo, ki smo jo želeli potrditi s histokemičnim testom za izražanje gena *gus*.

Cilj je bila tudi optimizacija *in vitro* sinteze sgRNA z različnimi načini priprave DNA matric in različnimi načini čiščenja DNA in sgRNA.

Z uporabo optimiziranih elektroporacijskih pogojev smo želeli vnesti različne RNP komplekse za povzročitev tarčnih mutacij v različnih eksonih gena *pds* v mikrosporah oljne ogrščice. Mutacije smo želeli potrditi z uporabo restrikcijske endonukleaze, s tehniko polimorfizmov dolžin restrikcijskih fragmentov ter s sekvenciranjem po Sangerju in s primerjavo sekvenc z uporabo prosto dostopnega internetnega orodja TIDE.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predvidevali smo, da bomo z vzpostavljivo optimalnimi pogojev gojenja rastlin oljne ogrščice, dobili odzivne mikrospore z visokim deležem živosti in dobro regeneracijsko sposobnostjo. Nukleazna aktivnost bo večja po daljšem času inkubacije plazmidne DNA v suspenziji mikrospor, zato bo plazmidna DNA bolj razgrajena.

Elektroporacijski pogoji z daljšimi pulzi in močnejšo jakostjo električnega polja bodo bolj negativno vplivali na živost in embriogenezo mikrospor. Dodatek proteina Cas9 bo še dodatno znižal število regeneriranih embrijev.

Z vnosom plazmida z genom *gus* bomo dobili uspešno transformirane mikrospore in z njihovo pomočjo določili optimalne pogoje elektroporacije za vnos kompleksa sgRNA in Cas9 v mikrospore oljne ogrščice.

Z optimizacijo *in vitro* sinteze sgRNA z različnimi načini priprave in čiščenja bomo določili najboljšega za pridobivanje visokih koncentracij nerazgrajene sgRNA.

Vnos RNP bo povzročil tarčne mutacije, ki jih bomo lahko dokazali z restrikcijsko endonukleazo, PCR-RFLP metodo in sekvenciranjem po Sangerju.

2 PREGLED OBJAV

2.1 OLJNA OGRŠČICA

Oljna ogrščica *Brassica napus* L. spada v družino križnic Brassicaceae. Nastala je s spontanim križanjem med *Brassica rapa*, ki ima $2n = 20$ kromosomov, in *Brassica oleacea*, ki ima $2n = 18$ kromosomov (Song in sod., 1988). Tako ima oljna ogrščica 38 kromosomov in je allotetraploid ($2n = 4x$), ker izhaja iz dveh različnih vrst. Zraste približno meter visoko, tvori socvetja in rumeno cveti, njen seme pa je okroglo, drobno in rjava črne barve.

Oljna ogrščica je druga svetovno najpomembnejša poljščina namenjena za pridelavo olja, prva je soja. V sezонаh 2013/2014 in 2014/2015 je svetovni letni pridelek znašal okoli 71 milijonov ton, v letini 2015/2016 pa se je pridelek zmanjšal na 68 milijonov ton. Je vrsta, ki raste tudi v hladnejši klimi, uspeva v Kanadi, Evropi, na Kitajskem ter tudi v toplejših podnebjjih Avstralije in Indije. V Kanadi in Indiji se je v zadnji sezoni njen pridelek povišal, v Evropski uniji, Avstraliji in na Kitajskem pa znižal zaradi zmanjšanja obsega obdelovalnih površin (FAO, 2016).

V preteklosti so olje oljne ogrščice uporabljali skoraj izključno v industriji za mazanje strojev in kot olje za svetilke, zaradi visoke vsebnosti eruka kisline. Zdaj se uporablja predvsem za proizvodnjo olja in biodizla, oljno pogačo z visoko vsebnostjo proteinov pa uporabijo za krmo živali. Z žlahtnjenjem so v 20. stoletju občutno znižali vsebnost eruka kisline in vsebnost glukozinolatov, ki so problematični v krmi živali. Oljno ogrščico z obema lastnostima so poimenovali 'canola', ki je oznaka za oljno ogrščico, katere olje vsebuje manj kot 2 % eruka kisline in manj kot $30 \mu\text{M g}^{-1}$ glukozinolatov v oljni pogači. V njenem žlahtnjenju se vлага veliko truda za izboljšanje lastnosti njenega olja in oljne pogače (Gunstone, 2004).

2.2 ANDROGENEZA

Oljna ogrščica je poleg njene vloge za proizvodnjo olja pomembna tudi kot modelna rastlina za študij androgenize, tj. procesa embriogeneze, kjer se iz moških gamet razvije rastlina zaradi totipotentnosti celic. Nastali haploidi so rastline s haploidnim številom kromosomov, tj. enakem kot pri gametah. To reprogramiranje mikrospor v smeri sporofitskega razvoja je povzročeno s stresnimi dejavniki. V rastlinah embriogeneza *in vivo* poteka v semenski zasnovi po oploditvi jajčne celice z moško gameto, kjer se začne iz enocelične zigote asimetrična delitev, da se razvije popoln embrij. Totipotentnost celic pa omogoča, da iz ženske ali moške gamete brez predhodne oploditve pridobimo embrij preko *in vitro* indukcije haploidov. Nastanek haploidov iz ženskih gamet imenujemo ginogeneza (Murovec, 2013; Soriano in sod., 2013).

Začetnika androgeneze sta Guha in Maheshwari (1964, 1966), ki sta iz *in vitro* gojenih kultur prašnic prva vzgojila haploidne embrije *Datura innoxia*. Leta 1975 sta Thomas in Wenzel vzgojila haploidne embrije iz kulture prašnic *Brassica napus* (Thomas in Wenzel, 1975). Nekaj let pozneje pa so bili vzgojeni tudi iz izoliranih mikrospor oljne ogrščice (Lichter, 1982). Rastlina je postala modelni organizem za študij indukcije haploidne embriogeneze pri dvokaličnicah, saj se iz sveže izoliranih, vakuoliranih mikrospor, ki so izpostavljene stresnim razmeram, dobi veliko število embrijev (Custers in sod., 2001). Prav tako so mikrospore model za študije totipotentnosti rastlinskih celic in model za študije *in vitro* razvoja embrijev (Joosen in sod., 2007).

Za indukcijo embriogeneze kulture mikrospor *Brassica* je potreben stres z inkubacijo pri visoki temperaturi ali dodatek kolhicina, ki je antimitotska snov. Kot stresni dejavnik uporabljajo tudi inkubacijo na nizkih temperaturah, vendar manj pogosto, prav tako nizke doze γ radiacije, etanola, spremembe atmosfere in druge antimitotske snovi (Xu in sod, 2007). Različne temperature inkubacije vplivajo na delitev celic. Na inkubaciji pri 32 °C za dva dni in nato pri 25 °C, se celice delijo simetrično. Celice inkubirane pri konstantnih 18°C pa se delijo asimetrično, kot zigote pri nastanku embrijev. V tem primeru nastane manj embrijev kot pri 32°C (Custers in sod., 1994; Prem in sod., 2012).

Na embriogenezo mikrospor vplivajo tudi genotip, starost rastline, pogoji gojenja rastlin, razvojna faza celic, sestava gojišča in pH, koncentracija mikrospor (Murovec, 2013; Rahman in Jimenez, 2016). Med najbolj odzivne genotipe spada *Brassica napus* L. cv. Topas. Za uspešno embriogenezo je pomembno, da ima ta genotip 16 urno fotoperiodo in konstantno temperaturo rasti pri 18 °C. Po 4 do 5 tednih, ko se začnejo razvijati socvetja, pa je pomembno, da se temperatura zniža na konstantnih 10 °C. Nizka temperatura, pri kateri teden pred izolacijo rastejo cvetni brsti, omogoča, da socvetja rastejo počasneje in da so cvetni brsti enakomernih velikosti. Poleg tega tudi stimulira mikrosporno embriogenezo. Pomembno je, da rastline rastejo pri kontroliranih pogojih v rastni komori, saj pri rastlinah iz polja ali rastlinjaka embriogeneza ni tako učinkovita (Rahman in Jimenez, 2016).

Iz velikosti cvetnega brsta je mogoče predvideti razvojno fazo mikrospor. Mikrospore so najbolj odzivne v pozni eno jedrni fazi. Za to fazo je značilno, da je jedro pomaknjeno proti celični steni. Mikrospore v poznejših razvojnih fazah lahko proizvajajo toksine in druge inhibitorje embriogeneze, zato te niso primerne. Koncentracija celic v gojišču tudi vpliva na embriogenezo, za oljno ogrščico naj bi bila optimalna $4 - 8 \times 10^4$ celic ml^{-1} (Rahman in Jimenez, 2016).

Postopek izolacije lahko ključno vpliva na mikrospore. Custers (2003) priporoča izolacijo iz 12 do največ 15 cvetnih brstov hkrati. Pri prevelikem številu brstov naenkrat je maceracija manj učinkovita, večji pritisk na brste pa poškoduje mikrospore. Maceracija mora biti nežna, tako da se brst samo odpre, mikrospore pa iz njega oddifundirajo. Uspešnost pridobivanja

embrijev iz mikrospor *Brassica napus* L. cv. Topas naj bi bila med 3 % in 10 %. Preostanek celic pa sledi trem usodam: ali se ne delijo ali pride do napake pri reprogramiraju v sporofitni razvoj ali pa nadaljujejo gametofitni razvoj v pelod.

2.3 UPORABA PODVOJENIH HAPLOIDOV

Haploidni embriji, ki jih pridobimo z androgenezo, zrastejo v rastline, ki so sterilne, ker med mejozo ne morejo tvoriti gamet zaradi enojne garniture kromosomov. Podvajanje kromosomov, ki se lahko zgodi spontano ali z dodatkom snovi kot je kolhicin, pa omogoči, da ima rastlina dvojno garnituro kromosomov in se lahko razmnožuje. Takšne rastline se imenujejo podvojeni haploidi (Soriano in sod., 2013). S podvojenimi haploidi je mogoče že v eni generaciji pridobiti stabilne homozigotne linije. S klasičnimi načini pridobivanja homozigotnih linij pa je potrebnih približno 8 generacij samoopraševanja rastlin. Čas za pridobivanje novih sort se tako lahko skrajša za več let (Rahman in Jimenez, 2016).

Takšen način pridobivanja linij omogoča tudi zmanjšanje recesivnih škodljivih lastnosti, saj se te zaradi seleksijskega pritiska hitreje izločijo. Haploidi in podvojeni haploidi se uporabljajo za genske študije zanimivih kvantitativnih lastnosti in za mapiranje genov. Uporabljajo se tudi za pridobivanje haploidov poliploidnih rastlin. V primeru krompirja, ki je tetraploid, ta metoda omogoči križanje z diploidnimi divjimi sorodnimi vrstami in s tem prenos zanimivih lastnosti (Murovec, 2013; Rahman in Jimenez, 2016). Podvojeni haploidi se veliko uporabljajo pri žlahtnjenu oljne ogrščice (Xu in sod., 2007).

Haploidne mikrospore so zanimive tudi za genski inženiring. Transformacije genov pred podvajanjem kromosomov namreč omogočijo, da je regenerirana rastlina transformant, homozigoten za vnesen gen. Genska sprememba je tako dosežena na obeh garniturah kromosomov pri podvojenih haploidih (Rahman in Jimenez, 2016).

2.4 NOVEJŠE TEHNIKE GENSKEGA INŽENIRINGA

Genski inženiring se je tekom let pri rastlinah zelo razvil. Metode za vnos kot so biolistika, elektroporacija, mikroinjiciranje in podobne je v veliki meri nasledila metoda z *Agrobacterium tumefaciens*, ki omogoča stabilen vnos tujega genetskega materiala v rastlinski genom. Zadnjih nekaj let pa so se razvile tudi nove, bolj natančne metode genskega inženiringa. To so metode ZNF - nukleaz z motivi cinkovih prstov (angl. *zinc finger nucleases*), TALEN - nukleaz TAL efektorjev (angl. *transcriptional activator-like effector nucleases*) in CRISPR/Cas9 - gruč enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev s CRISPR povezanim proteinom 9 (angl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat, CRISPR-associated nuclease*). Gre za metode, ki imajo podoben princip delovanja. Vodene nukleaze najdejo v genomu specifično zaporedje in razrežejo dvojno vijačnico. S

tem povzročijo prelom verige, kar sproži spremembe v genomu zaradi delovanja celičnih popravljalnih mehanizmov (Gaj in sod., 2013; Harrison in sod., 2014).

Ti mehanizmi verigi popravijo z združevanjem nehomolognih koncev - NHEJ (angl. *non-homologous end joining*) ali s popravljanjem s homologno rekombinacijo - HDR (angl. *homology directed repair*). Pri združevanju nehomolognih koncev se razrezana konca DNA združita z ligacijo, pri tem lahko na mestu razreza pride do naključne delecije ali insercije nekaj baznih parov. Takšna mutacija v kodirajoči regiji lahko prepreči nastanek proteina ali pa da je sintetiziran protein neaktivен. Če pride do preloma dveh različnih verig, lahko pride z združevanjem nehomolognih koncev do translokacij, večjih delecij in celo izgube celotne genske regije. Pri popravljanju s homologno rekombinacijo pa se kot predlogo uporabi homologna sekvenca. Ta mehanizem popravljanja se uporablja za vnos tujih sekvenc, ki imajo robne konce s homolognimi zaporedji, ki se ujemajo s tistimi na poškodovani verigi DNA. Celice pa lahko poleg eksogenih zaporedij uporabijo tudi endogene homologne sekvence, ki lahko zmanjšajo ali pa popolnoma preprečijo vnos želenih zaporedij (Gaj in sod., 2013; Harrison in sod., 2014).

Nukleaze z motivi cinkovih prstov so sestavljene iz nespecifične FokI restriktivske endonuklaze in iz proteinov cinkovih prstov. Vsak cinkov prst prepozna triplet nukleotidov, zato so po navadi združeni v kompleks 3 do 6 proteinov. Ker je za aktivnost FokI potrebna dimerizacija, se za prelom dvoverižne DNA uporablja dva kompleksa cinkovih prstov z nukleazo. Ta tehnika je bila prvič uspešno uporabljena na vinski mušici leta 2002 (Bibikova in sod., 2002) in od takrat se uporablja za genske modifikacije različnih organizmov (Gaj in sod., 2013; Harrison in sod., 2014).

Proteini TALE se v naravi nahajajo v bakteriji *Xanthomonas*, ki jih izloča z namenom, da se vežejo na specifična zaporedja v gostiteljski rastlini in aktivirajo transkripcijo. Vezavna domena TALE, ki jo je mogoče spremenjati, je sestavljena iz mnogih ponovitev, dolgih 33-35 aminokislin. Te ponovitve prepoznajo posamezne nukleotide tarčne DNA. S povezavo več TALE proteinov dobimo orodje za prepoznavo kateregakoli specifičnega zaporedja. Za uspešen razrez sta potrebna dva kompleksa, saj so TALEni povezani z FokI endonukleazo, ki za aktivno delovanje potrebuje dimerizacijo. Ta tako kot pri ZNF, razreže dvoverižno verigo DNA. Vsestransko ZNF in TALEN omogoča sposobnost oblikovanja vezavnih domen DNA po meri, da prepoznajo specifična zaporedja. Sposobnost vstavljanja sprememb v genomu pa je odvisna predvsem od specifičnosti vezave DNA in afinitete TALEN in ZNF (Harrison in sod., 2014).

Novejša tehnika genskega inženiringa je CRISPR/Cas9, kjer RNA vodi nukleazo Cas9 do tarčne DNA. Sistem temelji na obrambnem sistemu bakterij in arhej pred virusi. Te so razvile od RNA odvisen sistem imunosti, ki specifično prepozna in reže tujo, virusno DNA. CRISPR zaporedja so bila odkrita 1987 leta v *Escherichia coli*, v lokusu z nenavadnimi

ponovitvami (Ishino in sod., 1987). Leta 2000 so ugotovili podobnosti med gručami enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev s ponovitvami v fagih in plazmidnih zaporedjih (Mojica in sod., 2000). Barrangou in sod. (2007) so pokazali, da kratke regije na CRISPR lokusu bakterij, poimenovane "spacer" izvirajo iz genomskih zaporedij virusov. Ta sistem imunosti pri bakterijah namreč deluje na takšen način, da ob vdoru virusa v bakterijo, bakterija shrani kratek del virusne DNA imenovane "protospacer" in ga vgradi v CRISPR lokus, da se lahko odziva na naslednji virusni napad. CRISPR lokus se ob naslednjem napadu prepiše v crRNA, ki vodi Cas protein do komplementarnega tarčnega zaporedja.

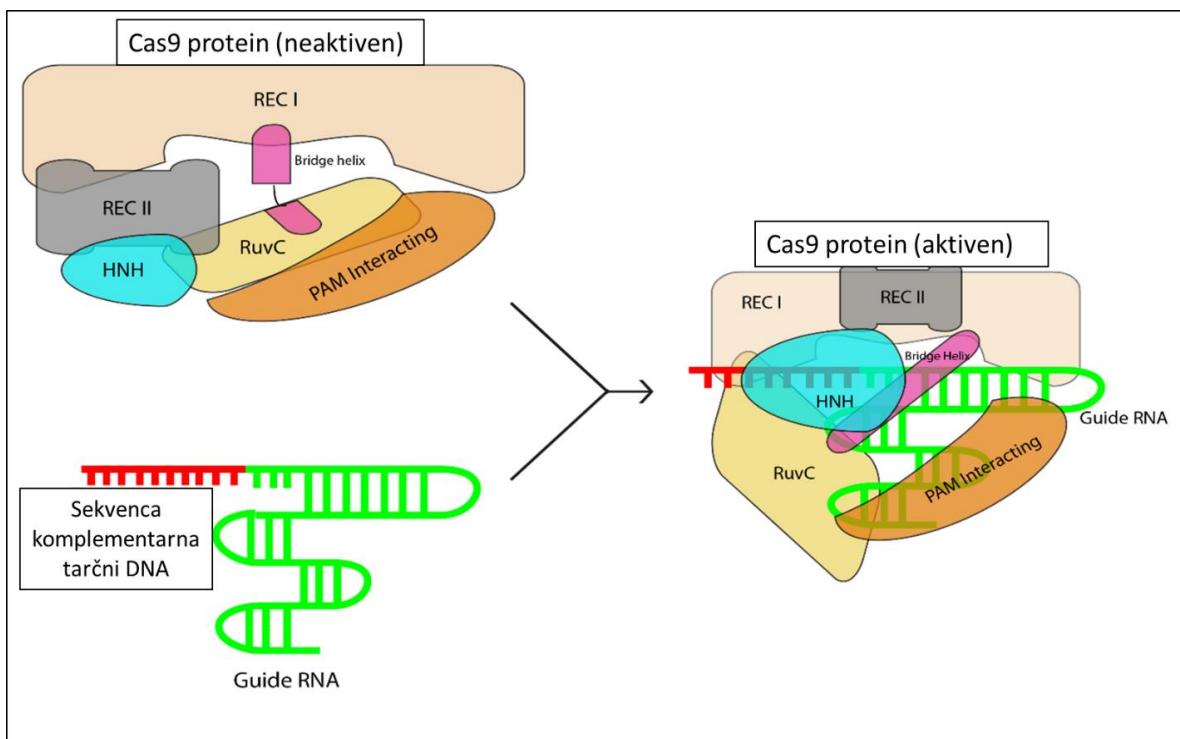
Obstaja 11 različnih sistemov CRISPR/Cas, ki so glede na mehanizem delovanja razvrščeni v tri skupine (I, II, III). Za prvo in drugo skupino sistemov je značilno, da je poleg sekvence "protospacer" skupina nukleotidov, ki se imenuje PAM regija (angl. *protospacer adjacent motif*). PAM regija je ključna za razrez DNA s proteinom Cas, saj omogoča da sistem razlikuje med lastnimi CRISPR zaporedji in virusnimi. Sekvence bakterijskega lokusa CRISPR namreč ne vsebujejo PAM regije. Tip I in III uporabljata velik kompleks večih CAS proteinov, medtem ko tip II potrebuje le en protein za RNA vodeno prepoznavo DNA in rezanje (Doudna in Charpentier, 2014; Harrison in sod., 2014).

2.4.1 Delovanje CRISPR/Cas9

Leta 2012 se je razvila zamisel za uporabo tega principa za genski inženiring (Jinek in sod., 2012). CRISPR/Cas sistem tipa II je bil prilagojen za uporabo kot gensko orodje, tako da so povezali crRNA in tracrRNA (angl. *trans-activating CRISPR RNA*), ki je ključna za zorenje crRNA in vodenje proteina Cas do tarčne DNA. RNA ima krajšo, okoli 20 nukleotidov dolgo, sekenco za prepoznavanje tarče, ki je tej komplementarna. Za poenostavitev sistema so komponenti RNA z dodatkom zanke združili v eno, imerno, gRNA oz. sgRNA (angl. *guide, single guide RNA*) (Jinek in sod., 2012; Harisson in sod., 2014).

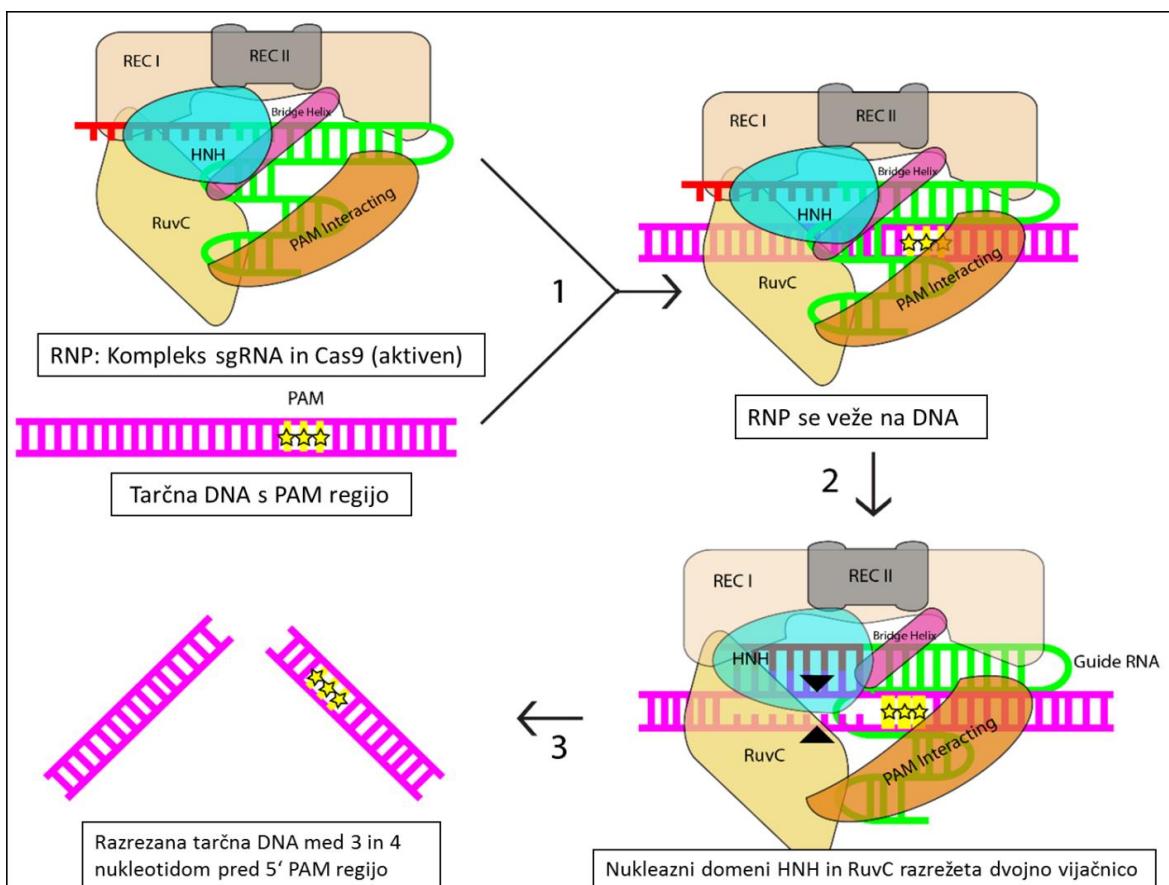
V tej tehnologiji je najbolj pogosto uporabljen protein Cas9, ki izhaja iz *Streptococcus pyogenes*. Njegova specifičnost in delovanje temeljijo na vezavi s PAM regijo, gre za zaporedje 5' –NGG-3', ki ga Cas9 prepozna na zaporedju ter mu omogoča hitro preverjanje sekvenc. Če te regije v zaporedju ni, se protein nanjo ne veže. Ko najde PAM sekenco, se nanjo veže in razpre preostalo DNA, da preveri njeno komplementarnost s sgRNA. Če je podobnost dovolj visoka, dvojno vijačnico prereže (Sternberg in sod., 2014). SgRNA ima okoli 20 nukleotidov dolgo sekenco, ki se prilega na tarčno DNA, vendar se kljub njeni dolžini lahko v genomih pojavi podobna zaporedja, kar lahko povzroči razrez netarčne DNA. CRISPR/Cas9 lahko tolerira tudi do 6 nukleotidnih neujemanj med zaporedjema. Najbolj pomembni za specifičnost so nukleotidi, ki so 8 do 12 mest pred PAM regijo. Krajšanje tarčne sekvene na 15 nukleotidov lahko zmanjša možnost nespecifičnih razrezov, vendar vpliva na uspešnost razreza (Schaeffer in Nakata, 2015).

Cas9 je sestavljen iz šestih domen, REC I, REC II, vezavne vijačnice (angl. *bridge helix*), PAM-vezavne domene, HNH in RuvC (Jinek in sod., 2014). Domena REC I je največja in odgovorna za vezavo s sgRNA. Vloga domene REC II še ni poznana, vezavna vijačnica pa je pomembna za iniciacijo razreza pri vezavi na komplementarno DNA (Nishimasu in sod, 2014). PAM-vezavna domena omogoča vezavo in stabiliziranje na DNA, domeni HNH in RuvC pa sta nukleazi podenoti, vsaka razreže eno verigo DNA (Anders in sod, 2014; Jinek in sod., 2014). Protein je neaktivni, šele ko se nanj veže sgRNA pa se aktivira preko konformacijski sprememb (slika 1). SgRNA ima eno verigo, sestavljeno iz dveh vrst zank, iz ene "tetra loop" in dveh ali več "stem loop", na 5' koncu pa vsebuje zaporedje, ki je komplementarno tarčni DNA (Jinek in sod., 2014).



Slika 1: Vezava neaktivnega proteina Cas9 s sgRNA v aktiven ribonukleoproteinski kompleks (prirejeno po Cavanagh in Garrity, 2014).

Anders in sod. (2014) so predlagali model vezave Cas9 na DNA, njeno razprtje in razrez. Domena proteina Cas9 za vezavo s PAM regijo se preko velikega žleba poveže z gvaninoma. Nato se še preko ostanka lizina poveže na mali žleb preko fosfatne vezavne zanke. To omogoči vzpostavitev vodikove vezi en nukleotid pred PAM, ki stabilizira DNA, in omogoči da se razpre in rotira v smeri sgRNA. Če je zaporedje komplementarno, bo prišlo do prileganja verige DNA s sgRNA. Brez stabilizacije preko PAM bi bila takšna vezava zelo neučinkovita. Ko se verigi priležeta, nukleazni podenoti HNH in RuvC razrežeta DNA med 3. in 4. nukleotidom pred PAM regijo (slika 2).



Slika 2: Način vezave ribonukleoproteinskega kompleksa na tarčno DNA in njen razrez (prirejeno po Cavanagh in Garrity, 2014).

Mnoge variacije sistema CRISPR/Cas9 omogočajo še večjo natančnost pri razrezu DNA, da ne pride do razreza DNA izven tarčne sekvence. Takšna je na primer uporaba fuzijskega sistema z dvema različnima sgRNA, ki se vežeta na obe strani tarčne DNA, da se ta prereže na dveh delih. Na takšen način se specifičnost razreza močno poveča v primerjavi s konvencionalnim CRISPR/Cas9 sistemom (Schiml in sod., 2014). Sistem CRISPR/Cas9 omogoča tudi spreminjanje več genov hkrati, z delecijami in insercijami, tako da se vnesejo številne sgRNA z različnimi tarčnimi zaporedji. Tehnologija omogoča vnos gena, vnos označevalcev proteinov, kot je npr. zeleni fluorescentni protein (GFP, angl. *green fluorescent protein*), vnos promotorjev in drugih regulatornih zaporedij. Ta princip temelji na popravljalnem mehanizmu s homologno rekombinacijo. Modifikacija, da je Cas9 katalitično neaktivien, pa omogoča, da deluje kot aktivator ali represor, saj se lahko veže na tarče, npr. promotorje. Takšen protein se imenuje dCas9 (angl. *dead Cas9*), dodaja se mu lahko tudi oznake, kot so GFP, DNA metilaza, za *in vivo* označevanje pri študijah kromosomov in epigenetike (Bortesi in Fischer, 2015; Schaeffer in Nakata, 2015).

2.4.2 Uporaba tehnologije CRISPR/Cas9

Sistem CRISPR/Cas9 je uporaben na mnogih področjih naravoslovnih znanosti, biotehnologije, agronomije in medicine. Vedno bolj pa postaja pomemben pri uporabi v rastlinah. Med prvimi rastlinami, kjer so uporabili to tehniko, sta bili modelni rastlini navadni repnjakovec *Arabidopsis thaliana* ter tobaka *Nicotiana benthamiana* in *Nicotiana tabacum* (Jiang in sod., 2013; Li in sod., 2013; Nekrasov in sod., 2013). Kmalu so sledile kmetijsko pomembne vrste, kot so pšenica, koruza, riž, sirek, paradižnik in mnoge druge (Belhaj in sod., 2015; Jiang in sod., 2013; Li in sod. 2013; Nekrasov in sod., 2013; Shan in sod., 2013; Gao in sod., 2014; Liang in sod., 2014).

S hitrim razvojem je CRISPR/Cas9 že prehitel starejši metodi, ZNF in TALEN, predvsem zaradi hitrejše in lažje priprave, večje prilagodljivosti in nižje cene. Vendar ima tudi ta sistem nekaj slabosti, te so predvsem razrez netarčnih zaporedij in integracija zaporedij plazmidnega vektorja v genom. Vnos na plazmidu in njegova integracija v genom lahko povzroči dodaten stres za celico in citotoksičnost. Razrez netarčnih DNA zaporedij pa lahko povzroči citotoksičnost, apoptozo in večje kromosomske inverzije, delecije in translokacije (Kanchiswamy, 2016).

2.4.3 Modifikacije genomov z ribonukleoproteinski kompleksi CRISPR/Cas9

Alternativen način vnosa brez uporabe plazmidnih vektorjev v humane celične linije, živali in rastline se je pojavil v letu 2014. Neposredni vnos izoliranega proteina Cas9 in *in vitro* sintetizirane sgRNA omogoča hitrejše, učinkovitejše in bolj specifično delovanje v primerjavi z vnosom CRISPR/Cas9 preko plazmida (Kim in sod, 2014; Lee in sod., 2014; Woo in sod., 2015; Subburaj in sod., 2016). Ključne prednosti so sposobnost hitrejšega urejanja genov in razgradnja kompleksa v celici. Hitrejše predvsem zaradi takojšnjega učinka ob vnosu v celico, kjer so mutacije zasledili že po enem dnevu. Pri vnosu CRISPR/Cas9 s plazmidom pa celice potrebujejo 3 dni za doseganje enakih rezultatov mutacij (Kanchiswamy, 2016).

Takšen način neposrednega vnosa RNP so uporabili že pri humanih celicah, kjer so RNP vnesli v fibroblaste z elektroporacijo in dobili majhen delež razreza netarčne DNA in visok delež tarčnih mutacij. Uporabili so velike količine proteina Cas9 (4.5-45 µg) in sgRNA (6-60 µg) na vzorec, uspešnost je bila 79 % (Kim in sod., 2014). Za vnos mutacij pri nekaterih sesalčjih celicah so vnesli RNP s pomočjo elektroporacije in liposomov ter dosegli 94 % uspešnost transformacije pri T celicah Jurkat (Liang in sod., 2015). Pri glisti *Caenorhabditis elegans* so RNP vstavili z metodo mikroinjiciranja, isti način pa so nato uporabili še pri ribi zebriki in za izbijanje genov pri miškah (Cho in sod., 2014; Sung in sod., 2014). Pri mikroalgi *Chlamydomonas reinhardtii* so s pomočjo elektroporacije vnesli mutacije za izboljšano

fotosintetsko aktivnost in konstitutivno izražanje zeaksantina ter dobili do 0,56 % uspešnost vnosa mutacij (Baek in sod., 2016).

Pri rastlinah pa je vnos RNP uspešno vnesel tarčne mutacije pri protoplastih repnjakovca, tobaka, riža, solate, kjer so s sekvenciranjem naslednje generacije (angl. *next generation sequencing*, NGS) dokazali 46 % uspešnost tarčne mutageneze (Woo in sod., 2015). Prav tako so uspešno vnesli tarčne mutacije v protoplaste *Petunia x hybrida*, kjer so uspešnost vnosa mutacij potrdili s pomočjo endonukleaze T7 in sekvenciranja naslednje generacije, z uspešnostjo med 2,4 % in 21 % (Subburaj in sod., 2016). Pri metodah z vnosom plazmida, je potrebno rastline povratno križati, za odstranitev plazmida in drugega tujega genetskega materiala. V primeru rastlin, ki se razmnožujejo nespolno ali so trajnice, pa odstranitev tuge DNA iz genoma velikokrat ni mogoča. Takšne tarčne mutacije z majhnimi insercijami in delecijami so neprepoznavne v primerjavi s spontanimi, v naravi pojavljajočimi mutacijami. Genetske spremembe, ki nastanejo brez vnosa tuge DNA in so enake naravnim ali tistim povzročenim s klasično mutagenezo, bi lahko zaobšle regulacijske postopke za gensko spremenjene rastline (Woo in sod., 2015; Kanchiswamy, 2016).

Na uspešnost vnosa mutacij s CRISPR/Cas9 tehnologijo vplivajo izbira tarčnega zaporedja, struktura in zaporedje sgRNA, protein Cas9, tip vnosa in tarčne celice, pri uporabi plazmidov pa tudi prilagoditev kodonov na vrsto organizma in način izražanja sgRNA. Pri poročanju o uspešnosti mutacije pa je pomembna tudi občutljivost metode za identifikacijo, lahko se uporabi test z endonukleazo T7, kombinacija PCR in restrikcije, ali PCR in sekvenciranja. Pri PEG transformaciji riževih protoplastov s plazmidom so pri tarčnem genu *pds* ugotovili 38 % učinkovitost transformacije, pri tarčnem genu *mpk5* pa 8 % (Shan in sod., 2013; Xie in Yang, 2013). Prav tako je aktivnost CRISPR/Cas9 sistema odvisna tudi od tipa celic. Pri PEG transformaciji protoplastov tobaka *Nicotiana benthamiana* so pri tarčnem *pds* genu dobili 37,7 % delež mutacij, pri uporabi istega konstrukta, ki so ga vnesli z agroinfiltracijo v liste, pa le 4,8 % delež mutacij. Ta razlika bi lahko nastala zaradi različnih načinov vnosa konstrukta ali pa zaradi razlik v celičnih popravljenih mehanizmih v različnih tipih celic (Li in sod., 2013; Bortesi in Fischer, 2015).

Za vnos RNP se uporablja različne metode, kot so mikroinjiciranje, transformacija s polietilen glikolom (PEG), s kremenčevimi nanodelci (angl. *mesoporous silica nanoparticles*), s celično penetrirajočimi peptidi, transfekcija z liposomi, elektroporacija in biolistika (Kanchiswamy in sod., 2015; Kanchiswamy, 2016). Pri človeških in živalskih celicah je sam vnos preprostejši, pri rastlinskih celicah pa celična stena predstavlja veliko oviro. Protoplasti, rastlinske celice brez celične stene, omogočajo lažji vnos RNP, vendar pri številnih vrstah regeneracija iz protoplastov še ni uspešna. Zato je pomembno optimizirati metode vnosa v rastlinske celice s celično steno. Kanchiswamy in sod. (2015) predlagajo uporabo nanodelcev, saj celična stena zanje ni ovira, hkrati pa ohranjajo proteine aktivne in

stabilne. Takšen način so npr. uporabili pri celicah koruze za vnos proteinov (Martin-Ortigosa in sod., 2014).

Potencialno primerne celice za vnos RNP so tudi mikrospore, ker lahko z njihovo indukcijo *in vitro* regeneriramo celotne rastline. Z naknadnim podvajanjem kromosomov pa rastline, ki so najbolj optimalne za pridobivanje hibridov. S tem bi se izognili protoplastom, saj so veliko bolj občutljivi za regeneracijo in potrebujejo nadaljnja križanja za praktično uporabo v žlahtnjenju. Mikrospore imajo po deljenju iz tetrad tanko in šibko celično steno, šele ko se mikrospora razvije v pelodno zrno stena postane močnejša (Chang in Nueffer, 1989).

Pri elektroporaciji se zaradi električnega polja poveča prepustnost celične membrane, nastanejo pore skozi katere prehajajo molekule, ki drugače ne morejo preko intaktnih celičnih membran. Na elektroporacijo vpliva trajanje in število pulzov, jakost električnega polja, prevodnost elektroporacijskega pufra. Ker gre le za začasen, reverzibilen pojav, se s pridom uporablja v različnih tipih celic za vnos molekul v celice. Visoka jakost električnega polja in predolgi čas trajanja pulza lahko v celici povzročita veliko število por, zaradi katerih celica umre (Maček-Lebar in sod., 1998).

Leta 1990 so s pomočjo propidijevega iodida dokazali, da je bila uspešnost elektroporacije mikrospor ječmena med 5 in 17 % (Joersbo in sod., 1990). Leta 1992 so z metodo elektroporacije uspešno transformirali mikrospore koruze z neposrednim vnosom plazmida s *cat* genom (kloramfenikol acetil transferazo), kjer so zaznali aktivnost pri 7 % mikrospor. Leta 1993 pa so uspešno elektroporirali tudi mikrospore oljne ogrščice. Uporabljali so elektroporacijo s kvadratnim pulzom, za katero je značilno, da jakost električnega polja naraste v trenutku in prav tako pade v trenutku, tako da je med celotno dolžino pulza jakost električnega polja konstantna (Fennell in Hauptmann, 1992; Jardinaud in sod., 1993). Plazmid, ki so ga vnašali pri oljni ogrščici, je vseboval zapis za gen *gus*, ki kodira β -glukoronidazo, ki jo je mogoče zaznati s histokemičnim in spektrofotometričnim testom (Jefferson, 1987; Jardinaud in sod., 1993). Z novimi metodami vnosa in njihovo optimizacijo za posamezne vrste, bi lahko dobili naslednjo generacijo tarčno mutiranih rastlin, brez vnosa tuje DNA v njihov genom (Woo in sod., 2015; Kanchiswamy, 2016).

3 MATERIALI IN METODE

3.1 PRIPRAVA GOJIŠČ

Gojišče NLN-13 smo pripravili po Licher (1982), tako da smo zatehtali 500 mg L^{-1} $(\text{CaNO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 130 g L^{-1} saharoze, $1,038 \text{ g L}^{-1}$ NLN vitaminov (Duchefa) (preglednica 1) in $0,387 \text{ g L}^{-1}$ NLN gojišča (Duchefa) (preglednica 1). Po umeritvi volumna v stekleni bučki, smo umerili gojišče na pH 6 z dodatkom 1M KOH ali 1M HCl in ga z vakuumsko črpalko sterilno prefiltrirali skozi filter s porami $0,22 \mu\text{m}$.

Preglednica 1: Sestava mešanice mikro in makroelementov ter organskih komponent NLN gojišča.

| Sestavina | mg L^{-1} |
|--|--------------------|
| $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| $\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ | 0,025 |
| H_3BO_3 | 10,00 |
| $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ | 18,95 |
| NaFeEDTA | 36,70 |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ | 0,25 |
| $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ | 10,00 |
| KH_2PO_4 | 125,00 |
| KNO_3 | 125,00 |
| MgSO_4 | 61,00 |
| Inozitol | 100,00 |
| Tiamin | 0,50 |
| Piridoksin | 0,50 |
| nikotinska kislina | 5,00 |
| Biotin | 0,05 |
| folna kislina | 0,50 |
| glutation (reduciran) | 30,00 |
| Glicin | 2,00 |
| L-glutamin | 800,00 |
| L-serin | 100,00 |

Gojišče BK smo pripravili po protokolu avtorjev Brewbaker in Kwack (1963), ki je bilo modificirano po Jardinaud in sod. (1993). To smo naredili tako, da smo natehtali 130 g L^{-1} saharoze, 100 mg L^{-1} H_3BO_3 , 300 mg L^{-1} $(\text{CaNO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$, 200 mg L^{-1} $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 100 mg L^{-1} KNO_3 , pH 5,9. Po umeritvi volumna v stekleni bučki, smo umerili pH na 5,9 in gojišče z vakuumsko črpalko sterilno prefiltrirali skozi filter s porami $0,22 \mu\text{m}$. Za gojišče BK z dodatkom PEG 6000 (tj. BK + 2 % PEG) je bilo ključno, da je bilo sveže pripravljeno. Vzeli smo 100 ml sterilnega BK gojišča in mu dodali 2 g PEG 6000 in dobro premešali na magnetnem mešalu.

3.2 POGOJI GOJENJA RASTLIN IN IZOLACIJA MIKROSPOR

Mikrospore oljne ogrščice *Brassica napus* L. cv. Topas smo izolirali iz cvetnih brstov rastlin, ki smo jih gojili v kontroliranih pogojih v rastni komori. Semena oljne ogrščice smo posejali v lonec s substratom, ki smo mu dodali gnojilo z dolgotrajnim delovanjem Osmocote (Substral). Rastline so rastle na 16 urni fotoperiodi pri 18°C in 60 % zračni vlažnosti. Po 4-5 tednih, ko so začele formirati socvetja, smo temperaturo znižali na 10°C. Ob odprtju 1 do 3 cvetov na socvetju, smo socvetja rastlin odtrgali in jih shranili na ledu do izolacije.

Delo smo nadaljevali v brezprašni komori, pri 4°C, da bi rastlinski material ostal svež. Vse uporabljene tekočine so bile predhodno ohlajene, med postopkom pa smo jih shranjevali na ledu. Za vsako maceracijo smo pripravili 10-15 cvetnih brstov velikosti 3-4 mm. Sterilizirali smo jih v sterilnih 100 ml erlenmajericah za 10 minut v 1,67 % razkužilu dikloroizocianurne kisline natrijeve soli (DICA), ki smo mu dodali 3 kapljice močila Tween® 20 v 50 ml ohlajene sterilne ddH₂O. Med sterilizacijo smo jih večkrat pomešali. Cvetne brste in razkužilo smo prelili na sterilno cedilo, to smo odložili na spodnji del sterilne 90 mm petrijevke in cvetne brste prelili s sterilno ddH₂O, tako da so bili brsti popolnoma prekriti. Z rahlim kroženjem cedila smo jih večkrat premešali. Spiranje smo opravili še 2 krat po 1 minuto. V sterilno 50 ml čašo smo odpipetirali 2 ml NLN-13 gojišča in s pomočjo sterilne pincete vanjo prenesli cvetne brste iz cedila. S sterilnim batom smo s širim polobrati nežno zmacerirali brste, da je gojišče dobilo nežno rumeno barvo. Macerat smo prefiltrirali skozi 40 µm filter v 50 ml centrifugirko. Bat smo sprali s 3 ml svežega gojišča NLN-13 ter ga prelili skozi filter, nato smo s 5 ml gojišča ponovno sprali čašo, da bi zbrali čim več mikrospor.

Mikrospore smo nato centrifugirali 3 minute na 1000 obratih min⁻¹ v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5810 R, supernatant smo v brezprašni komori previdno odlili in resuspendirali pelet v 10 ml NLN-13 ter centrifugirali. Spiranje smo ponovili še 1x. Pelet mikrospor smo resuspendirali v 3 ml NLN-13.

3.2.1 Določanje koncentracije mikrospor

Celice smo prešteli s pomočjo števne komore (hemocitometra) Bürker-Türk. Po končani izolaciji smo 15 µl mikrospor odpipetirali na hemocitometer in jih prekrili s krovnim stekelcem. Celice smo prešteli s pomočjo svetlobnega mikroskopa Nicon Eclipse 80i. Celice smo prešteli v številnih kvadratih določenih površin in izračunali povprečje. Povprečje smo nato delili z volumnom dela komore, v katerem smo šteli mikrospore, in tako izračunali koncentracijo celic.

3.2.2 Določanje živosti mikrospor

Živost mikrospor smo preverjali po izolaciji, takoj po elektroporaciji ter 24 ur po elektroporaciji in gojenju na 32 °C v temi. Merjenje živosti je potekalo s fluorescin diacetatom (FDA), 10 µl celic na objektnem stekelcu smo dodali 0,5 µl FDA s koncentracijo 0,1 mg ml⁻¹, prekrili s krovnim stekelcem in pustili 10 minut v temi. Z mikroskopom Nicon Eclipse 80i s setom filtrov za detekcijo zelene fluorescence X-Cite® 120 Fluorescence Illumination System EXFO smo opazovali fluorescenco živih celic, saj FDA obarva le tiste z intaktno membrano. Kot žive smo upoštevali samo najsvetlejše, saj imajo mikrospore močno avtofluorescenco. Pod 10x povečavo smo prešteli žive in nežive celice do skupnega števka 100, nato pa izračunali delež živosti.

3.2.3 Določanje nukleazne aktivnosti mikrospor

Nukleazno aktivnost mikrospor smo merili v 3 različnih gojiščih, z dodatkom plazmida SF-16 s promotorjem Dc3 in *gus* genom (Touraev in sod., 1995), da bi videli vpliv mikrospornih nukleaz na razgradnjo DNA. Uporabili smo tri različna elektroporacijska gojišča (NLN-13, BK, BK+2 % PEG 6000), da bi preverili ali obstaja kakšna razlika med njimi. V gojišče BK je bil dodan PEG, da bi ugotovili, če le-ta vpliva na preprečevanje nukleazne aktivnosti.

25000 mikrosporam v 25 µl elektroporacijskega gojišča smo dodali plazmid do končne koncentracije 25 µg ml⁻¹ ter inkubirali pri 30 °C za 5, 10, 20 in 60 minut. Po inkubaciji smo suspenzijo centrifugirali 5 minut na 60 g in supernatante ter kontrolo (raztopina plazmida v vodi) naložili na agarozno gelsko elektroforezo (1,2 % agarozna, debeline 1 cm, 120 V, 2 uri).

3.3 AGAROZNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Agarozno elektroforezo smo uporabljali za več različnih analiz, kot so: preverjanje uspešnosti PCR (angl. *polymerase chain reaction*), analizo fragmentov pri detekciji mutacij, analizo nukleazne aktivnosti miskrospor. Za te namene smo uporabljali različne gostote agaroze, debeline gela in volumne. Gele smo pripravljali tako, da smo najprej zatehtali določeno količino agaroze (Sigma), jo zmešali z 1x TBE pufrom (89 mM Tris, 89 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) in mešanico zavreli v mikrovalovni pečici. Vmes smo večkrat premešali ter vreli dokler se agarozna ni popolnoma stopila. Nato smo mešanico ohladili na 55°C in dodali 0,5 µg ml⁻¹ etidijevega bromida (EtBr) (Sigma). Vlili smo jo v pripravljen kalup z glavnički. Ko se je gel strdil, smo glavniček odstranili in gel s kalupom vstavili v elektroforezno posodo Bio Rad Sub-Cell® Model 192 (Bio-Rad), ki je bila napolnjena z 0,5x TBE pufrom.

Najprej smo nanesli 5 µl dolžinskega standarda GeneRuler™ 100 bp (ali 1 kb) DNA Ladder (Fermentas), nato pa predpripravljene vzorce DNA. Vzorce smo pripravili tako, da smo jim dodali 1/4 do 1/5 volumna nanašalnega barvila BPB (12,5 % (w/v) Ficoll® 400, 6,7 % (v/v)

bromfenol modro, 10 x TBE) in na kratko centrifugirali. Nekaterim vzorcem pa smo dodajali nanašalno barvilo 6x loading dye (Promega). Elektroforeza je potekala dokler se DNA fragmenti niso ustrezno ločili pri 120 V. Po končani elektroforezi smo DNA fragmente detektirali zaradi vezave z EtBr, s katerim dvooverižna DNA tvori komplekse, pod UV lučjo na Bio Spectrum® S10 Imaging System (UVP).

3.4 VPLIV ELEKTROPORACIJSKIH PARAMETROV NA ŽIVOST IN ANDROGENEZO

Elektroporacijo smo izvajali na Kemijskem inštitutu. Elektroporirali smo na elektroporatorju Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio Rad) z opcijo kvadratnega pulza. Prav tako smo Cas9, ki izhaja iz *Streptococcus pyogenes*, dobili od skupine prof. Jerala iz Kemijskega inštituta, Odseka za sintezno biologijo in imunologijo. Protein je bil izoliran iz kompetentnih celic Rosetta *E. coli*.

Za elektroporacijo smo uporabili mikrospore izolirane iz brstov velikosti 3-4 mm, katerih koncentracija je bila 2×10^6 celic/ml.

Za preverjanje vpliva elektroporacije na živost smo uporabili parametre 1, 2, 3, 5, 6, 7 in 9 (preglednica 2). Za posamezno elektroporacijo smo uporabili 100 µl ohlajenih mikrospor, ki smo jih odpipetirali v ohlajeno 2 mm kiveto in jih elektroporirali. Za kontrolo smo uporabili 100 µl mikrospor, ki jih nismo elektroporirali. Živost mikrospor smo določili pred elektroporacijo, dve uri po elektroporaciji in 24 ur po elektroporaciji, slednjim smo dodali 5 ml svežega gojišča in jih inkubirali na 32 °C v temi. Živost smo določali z FDA (glej 3.2.2 Določanje živosti mikrospor).

Za preverjanje vpliva elektroporacije na androgenezo smo prav tako elektroporirali 100 µl ohlajenih mikrospor. Mikrospore brez dodanega proteina Cas9 smo elektroporirali s parametri od 1 do 8 iz preglednice 2. Mikrospore, katerim smo dodali še 6 µg proteina Cas9, pa smo elektroporirali samo s parametri 1, 2, 5 ali 7. Za vsak parameter smo naredili 2 tehnični ponovitvi. Po elektroporaciji smo mikrosporam dodali sveže NLN-13 gojišče do končnega volumna 5 ml in jih inkubirali v 55 mm petrijevkah na 32 °C v temi za 48 ur. Po 2 dneh smo temperaturo znižali na 25 °C, po 14 dneh pa smo jih 5x redčili, tako da smo jim dodali sveže gojišče NLN-13 in začeli stresanje na 50 obratih/minuto za dodatna 1-2 tedna do regeneracije haploidnih embrijev. Čez en teden smo jih še 3x redčili ter jih prestavili v 90 mm petrijevke. Vse embrije smo po približno 40 dneh prešteli.

Preglednica 2: Elektroporacijski pogoji uporabljeni v poskusih.

| Elektroporacijski pogoj | Čas trajanja/ frekvenca med pulzi | Jakost električnega polja (V cm ⁻¹) | Napetost (V) za 2 mm kiveto |
|-------------------------|-----------------------------------|---|-----------------------------|
| EP 0 | Kontrola | 0 | 0 |
| EP 1 | 4 x 200 µs / 1 Hz | 1000 | 200 |
| EP 2 | 8 x 5 ms / 1 Hz | 600 | 120 |
| EP 3 | 0,5 ms | 250 | 50 |
| EP 4 | 0,5 ms | 500 | 100 |
| EP 5 | 0,5 ms | 750 | 150 |
| EP 6 | 0,5 ms | 1000 | 200 |
| EP 7 | 10 ms | 250 | 50 |
| EP 8 | 10 ms | 750 | 150 |
| EP 9 | 10 ms | 1000 | 200 |

3.5 VNOS PLAZMIDA V MIKROSPORE Z ELEKTROPORACIJO

Za neposredni vnos plazmida GUS smo se ravnali po delu Jardinaud in sod. (1993). Pri izolaciji mikrospor za neposredni vnos plazmida smo uporabili plazmid SF-16 s promotorjem Dc3 in *gus* genom s koncentracijo 970 ng µl⁻¹. Za elektroporacijo smo uporabili 1 x 10⁵ sveže centrifugiranih celic in jih resuspendirali v treh različnih gojiščih, NLN-13, BK in BK z dodatkom 2 % PEG 6000 do volumna 100 µl ter dodali 25 µg ml⁻¹ plazmida. Elektroporirali smo v ohlajenih 2 mm kivetah pri elektroporacijskih pogojih 1, 3, 5 in 7 (preglednica 2). Po 10 minutah smo jim dodali 2,5 ml svežega gojišča in jih pustili na sobni temperaturi še dve uri, nato pa smo jih 24 ur gojili pri 32°C v temi. Po enodnevni inkubaciji smo merili aktivnost encima.

3.5.1 Histokemični test izražanja *gus* gena

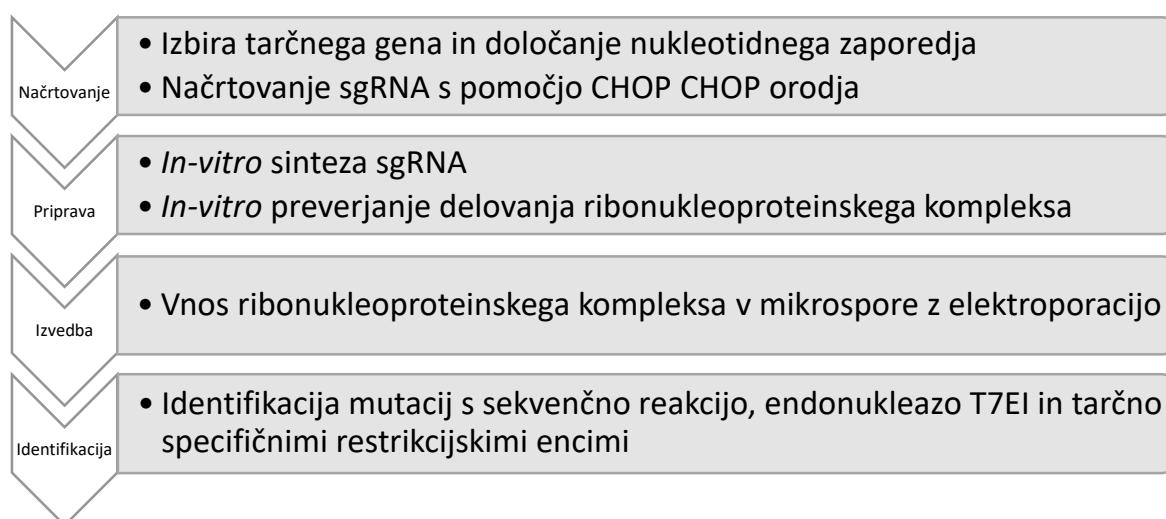
Po 24 urah gojenja mikrospor po neposrednem vnosu plazmida, smo mikrospore centrifugirali 5 minut na 60 g ter odlili supernatant, da je ostalo okoli 80 µl suspenzije celic. Test smo opravili po modificiranem protokolu Jefferson (1987). Najprej smo pripravili založno raztopino 500 mM fosfatnega pufra NaPO₄ pH 6,8 tako, da smo odpipetirali 2,315 ml 1 M Na₂HPO₄ in 2,685 ml 1M NaH₂PO₄ do skupnega volumna 100 ml v ddH₂O, za nadaljnjo uporabo smo ga 10x redčili. Raztopili smo 5 mg X-Gluc (5-bromo-4-koloro-3-indolil glukorid) v 100 µl dimetyl formamida in dodali 5 ml 50 mM NaPO₄ pufra. 40 µl suspenzije celic smo dodali 200 µl substrata X-Gluc v fosftnem pufru in celice inkubirali od nekaj minut do 2 dni v temi na sobni temperaturi ter opazovali aktivnost encima β-glukoronidaza.

Encim β-glukoronidaza razgradi X-Gluc in produkt se obarva modro, kar smo opazovali s pomočjo mikroskopa Nicon Eclipse 80i. Kot kontrolo smo uporabili ne transformirane celice

in ne transformirane celice, katerim smo v gojišče dodali plazmid, vendar jih nismo elektroporirali. Pod različnimi povečavami smo prešteli število obarvanih in število ne obarvanih celic do skupnega števka 100 in tako izračunali uspešnost neposredne transformacije z elektroporacijo.

3.6 VNOS RNP-JEV V MIKROSPORE Z ELEKTROPORACIJO

Transformacija mikrospor z vnosom RNP je potekala v štirih korakih (slika 3). Začeli smo z izbiro tarčnega gena, določanjem njegovega nukleotidnega zaporedja in načrtovanja sgRNA. Nato smo sgRNA *in vitro* sintezirali in preverili delovanje RNP *in vitro*. Naslednja je bila na vrsti izvedba vnosa z elektroporacijo, nato pa še identifikacija tarčnih mutacij.



Slika 3: Potek transformacije mikrospor z RNP.

V različnih podatkovnih bazah obstajajo le delna zaporedja oljne ogrščice, zato smo za načrtovanje sgRNA uporabili lastna zaporedja, ki smo jih dobili s pomočjo določanja nukleotidnega zaporedja po Sangerju s kapilarno elektroforezo. Oljna ogrščica je allotetraploid, zato smo njen DNA klonirali v vektorje in ji tako določili nukleotidno zaporedje.

3.6.1 Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za načrtovanje sgRNA smo uporabili zaporedja, ki smo jih pridobili s kloniranjem DNA iz mikrospor v vektorje pGEM®-T Easy Vector Systems, Promega. Iz izolirane DNA iz listov smo naredili verižno reakcijo s polimerazo oz. PCR (angl. *polymerase chain reaction*) s kompletom regentov Kapa 2G Fast PCR kit. Komplet reagentov Taq polimeraza Kapa 2G Fast dodaja poli-A rep na 3' izgrajene verige, kar omogoča kloniranje DNA v pGEM®-T Easy vektor.

Uporabili smo začetne oligonukleotide, ki so pomnoževali prvi, šesti in osmi ekson gena *pds* (preglednica 3).

Preglednica 3: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje gena *pds*.

| Ime | Zaporedje | Dolžina produkta PCR (bp) |
|----------------|---------------------------|---------------------------|
| BnPDS 1.1-For* | ATGGTTGTGTTGGGAATGTTTC | 165 |
| BnPDS 1.1-Rev* | CTGCAAAGGACCAAGCACTCC | |
| BnPDS 6.1-For | TATGGGCTATATTGAGGAACAAACG | 146 |
| BnPDS 6.1-Rev | CTGCTTCTCATCCATTGTTCAA | |
| BnPDS 8.1-For | GAGAACACATGGATCGAAGAT | 214 |
| BnPDS 8.1-Rev | CTGGAGTGGCAAAGACATAA | |
| BnPDS 8.2-For | GATGGTAATCCACCGGAGAG | 165 |
| BnPDS 8.2-Rev | AGCGTCTCCTTGGATAGTGG | |

*For= smerni začetni oligonukleotid; Rev= protismerni začetni oligonukleotid

PCR smo naredili po protokolu iz preglednice 4. Reagente smo zmešali po vrstnem redu za vsak par začetnih oligonukleotidov posebej. Uporabili smo temperaturni profil iz preglednice 5.

Preglednica 4: Sestava PCR mešanice za verižno reakcijo s polimerazo Kapa2G Fast.

| Komponente | Končna koncentracija | Volumni za 15 µl reakcijo |
|--------------------------------------|----------------------|---------------------------|
| Voda brez nukleaz (IDT) | | 6,24 µl |
| 5x Kapa 2G Buffer A | 1X | 3 µl |
| 10 mM dNTP | 200 µM vsakega | 1,2 µl |
| 10 µM forward začetni oligonukleotid | 0,5 µM | 0,75 µl |
| 10 µM reverse začetni oligonukleotid | 0,5 µM | 0,75 µl |
| DNA (koncentracije 5 ng/µl) | 15 ng genomske DNA | 3 µl |
| Taq DNA polimeraza Kapa 2G Fast | 0,3 enote/15 µl | 0,06 µl |

Preglednica 5: Temperaturni profil za verižno reakcijo s polimerazo Kapa2G Fast.

| Koraki | Temperatura | Čas | Št. ponovitev |
|--------------------------------------|-------------|--------|---------------|
| Začetna denaturacija | 95 °C | 3 min | 1x |
| Denaturacija | 95 °C | 15 s | |
| Prileganje začetnih oligonukleotidov | 60 °C | 15 s | 35x |
| Sinteza fragmentov DNA | 72 °C | 1 s | |
| Zaključno podaljševanje verige | 72 °C | 10 min | 1x |
| Hlajenje vzorcev | 4 °C | ∞ | |

Uspešnost reakcije PCR smo najprej preverili z agarozno elektroforezo (1,2 % agarosa, 0,5 cm debeline, 120 V, 1 ura).

3.6.2 Transformacija v bakterijo *E. coli*

Po potrditvi uspešnosti PCR, smo DNA klonirali v vektorje. Ligacijsko mešanico smo pripravili po navodilih proizvajalca v brezprašni komori tako, da smo na ledu zmešali 3 µl 2x Rapid Ligation buffer T4 DNA Ligase, dodali 0,5 µl vektorja pGEM-T Easy, 0,5 µl T4 DNA ligaze in 2 µl produkta PCR za vsak vzorec. To smo kratko centrifugirali in pustili čez noč na 4 °C. S transformacijo v *E. coli* DH5α kompetentne celice smo nadaljevali naslednji dan. Celice smo na ledu odtalili in v 100 µl celic dodali 3 µl ligacijske mešanice. Naredili smo tudi negativno kontrolo, tako da smo celicam dodali vodo. To smo pustili 30 minut na ledu, nato pa smo izvedli temperaturni šok celic pri 42°C za 1 minuto in jih nemudoma postavil nazaj na led za 3 minute. Dodali smo 900 µl tekočega gojišča LB, ki je bilo predhodno ogreto na 37°C, in dali celice stresat na 120 obratov min⁻¹ za 1 uro pri 37°C. Po stresanju smo celice razmazali na trdo gojišče LB z IPTG, X-Gal in karbenicilinom (glej 3.6.3 Priprava gojišč za selekcijo) in jih dali čez noč na inkubacijo pri 37°C.

3.6.3 Priprava gojišča za selekcijo

Gojišče LB smo pripravili tako, da smo zatehtali 10 g L⁻¹ NaCl, 10 g L⁻¹ triptona, 5 g L⁻¹ kvasnega ekstrakta in 8 g L⁻¹ agarja. Za tekoče gojišče LB smo agar izpustili. Po umerjanju volumna v stekleni bučki, smo umerili še pH na 7. Gojišča smo sterilizirali z avtoklaviranjem za 20 min pri 121°C in pritisku 1,13 bar. Ko se je gojišče LB z agarjem ohladilo na 55 °C, smo dodali 100 µg ml⁻¹ karbenicilina, 0,5 mM IPTG (Izopropil β-D-1-tiogalaktosid), 80 µg ml⁻¹ X-Gal (5-bromo-4-kloro-3-indolil-β-D-galaktozid) in ga razlili v 90 mm petrijevke.

3.6.4 PCR na osnovi kolonije

Na selekcijskem gojišču za modro belo selekcijo smo izbrali bele kolonije za nadaljnjo uporabo za PCR na osnovi kolonij. Bele kolonije naj bi namreč vsebovale DNA konstrukt. Vektor vsebuje zapis za β-galaktozidazo in insert se vstavi v kodirajoče zaporedje α-peptida, ki je ključen za aktivnost encima. Celice, ki inserta nimajo, pa ta encim sintetizirajo. Encim razgradi X-Gal substrat, produkt je modre barve, kar smo videli kot modre kolonije. IPTG služi kot induktor operona lac.

Za preverjanje transformacije smo naredili PCR na osnovi kolonije (angl. *colony PCR*), da smo potrdili prisotnost in dolžino inserta. Na ploščah smo izbrali in označili nekaj belih kolonij, se vsake z zobotrebcem rahlo dotaknili in jo pomočili v 80 µl TE pufra (10 mM Tris, pH 7.5, 0.1 mM EDTA) v PCR tubicah. Te smo inkubirali 8 minut pri 96 °C, da so celice počile in so se izločili plazmidi. Tako dobljeno suspenzijo smo uporabili v PCR na osnovi kolonije. Uporabili smo isti protokol (preglednici 4 in 5), kot za pripravo produktov PCR za transformacijo. Za začetna oligonukleotida smo vzeli T7

(TAATACGACTCACTATAGGG) in SP6 (ATTTAGGTGACACTATAG), ki sta promotorja na uporabljenem vektorju.

Pridobljen produkt PCR smo preverili na gelu (1,2 % agaroza, 0,5 cm debeline, 120V, 1 ura), del reakcije pa prihranili za sekvenčno reakcijo. Ko smo potrdili prisotnost inserta pričakovane dolžine v vektorju, smo nadaljevali s sekvenčno reakcijo.

3.6.5 Sekvenčna reakcija

Za pridobitev kakovostnih zaporedij allotetraploida *Brassica napus* smo uporabili metodo določanja nukleotidnega zaporedja po Sangerju. Pri tej metodi gre za vgrajevanje terminatorskih dideoksi nukleotidov (ddNTP), ki se vgradijo v verigo DNA in na ta način preprečijo nadaljnje izdolževanje verige. Tako dobimo številne fragmente iste molekule DNA, ki se razlikujejo po dolžini za eno bazo. Ker so ddNTP označeni vsak s svojo fluorescentno barvo, lahko detektor kapilarne elektroforeze zazna posamezno bazo preko emisije fluorescentnega barvila, ko se DNA fragmenti ločujejo po velikosti.

Za sekvenčno reakcijo smo najprej očistili produkte PCR na osnovi kolonije z dodatkom alkalne fosfataze FAST AP in eksonukleaze ExoI po spodnjem receptu:

| | |
|---------------------------|---------------|
| PCR produkt | 5 µl |
| FAST AP | 0,5 µl |
| ExoI | 0,1 µl |
| <u>1x PCR pufer (ABI)</u> | <u>1,4 µl</u> |
| Skupaj | 7 µl |

To smo premešali in dali v ciklični termostat 2720 Thermal cycler Applied Biosystems za 45 minut pri 37 °C, nato pa smo encime deaktivirali na 80 °C za 15 minut. Vzorec tako očiščenega produkta PCR smo razdelili na dva dela in pripravili dve različni mešanici za sekvenčno reakcijo, eno z začetnim oligonukleotidom SP6, drugo pa s T7:

| | |
|--------------------------------|---------------|
| Očiščen PCR produkt | 3,5 µl |
| 5x BD pufer | 2 µl |
| BigDye terminator 3.1 | 0,5 µl |
| SP6 /T7 začetni oligonukleotid | 0,2 µl |
| <u>voda brez nukleaz</u> | <u>3,8 µl</u> |
| Skupaj | 10 µl |

Mešanico smo vstavili v ciklični temostat za sekvenciranje čez noč po temperaturnem profilu prikazanim v preglednici 6.

Preglednica 6: Temperaturni profil za sekvenčno reakcijo.

| Koraki | Temperatura | Čas | Št. ponovitev |
|--------------------------------------|-------------|-------|---------------|
| Začetna denaturacija | 96 °C | 3 min | 1x |
| Denaturacija | 96 °C | 10 s | |
| Prileganje začetnih oligonukleotidov | 50 °C | 10 s | 99 x |
| Sinteza fragmentov DNA | 60 °C | 4 min | |
| Zaključno podaljševanje verige | 72 °C | 7 min | 1x |
| Hlajenje vzorcev | 4 °C | ∞ | |

Naslednji dan smo produkte sekvenčne reakcije očistili tako, da smo dodali 2,5 µl 125 mM EDTA in 30 µl absolutnega etanola. Na kratko smo centrifugirali in vzorce prestavili v 96 mestno ploščino MicroAmp (Applied Biosystems). Ploščo smo prelepili s samolepilno alufolijo in jo 5 do 10 x obrnili, nato pa smo jo 15 minut inkubirali v temi na sobni temperaturi. Po inkubaciji smo ploščico centrifugirali 55 minut na 3700 obratih min⁻¹ pri 4 °C v centrifugi Eppendorf centrifuge 5804 R. Po koncu centrifugiranja, smo odlili etanol s hitrim obratom ploščice in narobe obrnjeno ploščo na papirnatih brisačkih še enkrat centrifugirali na 190g za 2 minuti, da je ves etanol odtekel. Ploščo smo še 5 minut inkubirali v temi nato pa dodali 12 µl formamida, prelepili s samolepilno folijo in poslali na Oddelek za zootehniko Biotehniške fakultete, kjer so s kapilarno elektroforezo ABI 3130XL (Applied Biosystems) določili nukleotidno zaporedje na podlagi emisije fluorescentnih barvil iz ddNTP.

3.6.6 Načrtovanje vodilne sekvence sgRNA

Dobljene sekvene različnih eksonov gena *pds* smo uporabili za načrtovanje sgRNA. Načrtovanje sgRNA je potekalo s pomočjo prosto dostopnega internetnega orodja CHOP CHOP (Montague in sod., 2014), kjer smo vnesli eksonska zaporedja, ki kodirajo encim fitoen disaturaza. Orodje nam je s pomočjo algoritmov pokazalo najboljše primere sgRNA. Ta algoritem lahko tudi preveri cel genom in poišče sgRNA, ki je unikatna, tako da ne pride do mutacij izven tarčnega mesta. Izbrali smo tiste tarčne sekvene znotraj gena *pds*, ki so na mestu prereza vsebovale prepoznavno mesto za restriktični encim. Zaporedje na 5' koncu je moralo vsebovati še mesto PAM 5'-NGG-3', ki je pomembno za vezavo Cas9 proteina na DNA.

Gensko specifičen oligonukleotid mora poleg CRISPR sekvence in regije PAM vsebovati tudi promotor za *in vitro* transkripcijo in regijo, ki se prilega na univerzalni oligonukleotid (Gagnon in sod., 2014).

Izbrali smo promotor T7, ki ima sekvenco TAATACGACTCACTATA in prilegajočo regijo s sekvenco GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG. Tako so imeli gensko specifični

oligonukleotidi zaporedje GAAATTAATACGACTCACTATA-N₂₀-GTTTAGAGCTAG AAATAGCAAG, kjer N₂₀ predstavlja tarčno sekvenco.

Pri načrtovanju sgRNA za prvi ekson (tj. sgRNA 1.1), smo za zaporedjem T7 promotorja dodali en ali dva nukleotida gvanina, saj naj bi bila potrebna za uspešno *in vitro* transkripcijo.

Konstanten oligonukleotid je imel sekvenco AAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTT TTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAC. To zaporedje predstavlja del ogrodja sgRNA, ki tvori zanke in omogoča povezavo s proteinom Cas9.

Naročili smo gensko specifične začetne oligonukleotide za *in vitro* sintezo DNA matric ter konstanten oz. univerzalni oligonukleotid (preglednica 7).

Preglednica 7: Sekvence oligonukleotidov za sintezo DNA matric.

| Tip oligonukleotid a | Zaporedje |
|----------------------------|---|
| Konstanten | AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTT ATTAACTTGCTATTCTAGCTCTAAC |
| 1.1 | GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>(G)</u> TGTGTTGGGAATGTTCCGGTTTA GAGCTAGAAATAGCAAG |
| 1.2 | GAAATTAATACGACTCACTATAGGAGGAGTGCTGGCCTTGCCTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG |
| 6.1 | GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>CGGAGGT</u> CAGGCTATGTTGGTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG |
| 8.1 | GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>GGG</u> CAGGCTTGTATGCCAATAGGTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG |
| 8.2 | GAAATTAATACGACTCACTATAG <u>GGC</u> CATACAAAGCCTCTCCGGTTTAGA GCTAGAAATAGCAAG |

* Pri sgRNA 1.1 sta opciji z enim in z dvema dodatnima gvaninoma (podčrtano) za zaporedjem promotorja T7. Vodilno zaporedje sgRNA (20 nt) je označeno s krepkim tiskom.

3.6.7 Sinteza matrične DNA

Gensko specifične in konstantne oligonukleotide smo najprej redčili do 500 µM raztopine v 1x TE pufru brez nukleaz (IDT), ti založni raztopini pa smo nato uporabili za nadaljnjo redčenje do 100 µM raztopine v vodi brez nukleaz (IDT).

In-vitro sintezo sgRNA smo delali v brezprašni komori, uporabljali smo filter nastavke brez nukleaz, ves uporabljen material je bil brez nukleaz, vse pa smo tudi očisti z odstranjevalcem ribonukleaz, RNAZapp (Sigma). Uporabljali smo komplet reagentov HiScribe™ T7 High

Yield RNA Synthesis Kit (NEB, 2015). Sintezo smo delali po Gagnon in sod. (2014), upoštevali pa smo tudi nekatera navodila proizvajalca kompleta reagentov za sintezo RNA. Začetni postopek pridobivanja DNA smo izvedli na dva različna načina. Prvi je bil preko prileganja oligonukleotidov in nadaljnje podaljševanja s T4 DNA polimerazo. Pri drugem načinu pa smo za pridobitev DNA naredili PCR.

1. Za prileganje oligonukleotidov smo zmešali:

| | |
|---|------------|
| Gensko specifičen oligonukleotid (100 µM) | 1 µl |
| Konstanten oligonukleotid (100 µM) | 1 µl |
| <u>Voda brez nukleaz (IDT)</u> | <u>8µl</u> |
| Skupaj | 10 µl |

V cikličnem termostatu TGradient Biometra® smo naredili prileganje po naslednjih parametrih:

| | |
|-----------|----------|
| 95°C | 5min |
| 95°C→85°C | -2°C/s |
| 85°C→25°C | -0,1°C/s |
| 4°C | ∞ |

Za podaljševanje smo nato dodali tej mešanici še:

| | |
|------------------------------|---------------|
| dNTP (10mM) | 2,5 µl |
| 10x NEB pufer 2 | 2 µl |
| 100x NEB BSA | 0,2 µl |
| <u>T4 NEB DNA polimeraza</u> | <u>4,8 µl</u> |
| Skupaj | 10 µl |

To smo inkubirali 20 minut na 12°C v cikličnem termostatu 2720 Thermal cycler Applied Biosystems.

2. Za pripravo DNA s PCR pa smo naredili 100 µl reakcijo (preglednica 8).

Preglednica 8: Sestava PCR mešanic za sintezo DNA matric s polimerazo Q5 High-fidelity.

| Komponente | Končna koncentracija | Volumni za 100 µl reakcijo |
|---|----------------------|----------------------------|
| Voda brez nukleaz (IDT) | | 76 µl |
| 5X Q5 Reakcijski pufer (z MgCl ₂) | 1X | 20 µl |
| 10 mM dNTP | 200 µM vsakega | 2 µl |
| 100 µM specifični oligonukleotid | 0.5 µM | 0,5 µl |
| 100 µM konstanten oligonukleotid | 0.5 µM | 0,5 µl |
| Q5 High-Fidelity DNA polimeraza (2U/ µl) | 0.02 enot/µl | 1 µl |

Vzorce smo dobro premešali in kratko centrifugirali ter jih inkubirali v cikličnem termostatu po temperaturnem profilu (preglednica 9).

Preglednica 9: Temperaturni profil za sintezo DNA matric s polimerazo Q5 High-fidelity.

| Koraki | Temperatura | Čas | Št. ponovitev |
|--------------------------------------|-------------|-------|---------------|
| Začetna denaturacija | 98 °C | 30 s | 1x |
| Denaturacija | 98 °C | 5 s | |
| Prileganje začetnih oligonukleotidov | 55 °C | 10 s | 35x |
| Sinteza fragmentov DNA | 72 °C | 20 s | |
| Zaključno podaljševanje verige | 72 °C | 2 min | 1x |
| Ohlajanje | 10 °C | ∞ | |

DNA po prileganju in podaljševanju ter po PCR smo očistili. Za čiščenje produktov smo uporabljali dva načina, čistili smo po kloroform-izoamilalkohol ekstrakciji in etanolnemobarjanju ali s kompletom reagentov **GFX™ PCR DNA and Gel Band purification Kit** (GE healthcare lifesciences).

Ta dva načina smo primerjali z merjenjem koncentracije na NanoVue in s pregledom z agarozno gelsko elektroforezo, da bi ugotovili katera kombinacija čiščenja je bolj učinkovita.

Kloroform izoamilalkohol ekstrakcija je potekala tako, da smo DNA vzorcu dodali 300 µl vode brez nukleaz, tako smo potem lažje odpipetirali vodno fazo, in 500 µl topila kloroform: izoamilalkohol v razmerju 24:1. To smo močno premešali in centrifugirali 10 minut na 16000 g in 4 °C v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5810R. Vodno fazo smo odpipetirali in jo prenesli v novo mikrocentrifugirko. Dodali smo 1/10 volumna 3M natrijevega acetata (pH 5,2) in 1 volumen izopropanola, ohlajenega na -20 °C. Po močnem mešanju smo vzorce za 20 minut postavili na led. Nato smo centrifugirali 10 minut na 16000g in 4 °C. Odlili smo supernatant in sprali pelet z dodatkom 500 µl 70 % etanola. Ponovno smo centrifugirali 10 minut na 16000 g in 4 °C, nato smo odstranili etanol in DNA osušili v Eppendorf Concentrator plus na 30 °C do osušitve. Dodali smo 30 µl vode brez nukleaz (IDT) in raztopljalji čez noč v hladilniku na 4 °C.

3.6.8 Sinteza sgRNA

Očiščeno DNA smo nadaljnje uporabili za transkripcijo v RNA z **HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit** po naslednjem protokolu:

| | |
|------------------------------|----------|
| Voda brez nukleaz | 7 µl |
| NTP buffer mix | 3 µl |
| ATP, GTP, CTP, UTP | 4 x 2 µl |
| Očiščena DNA | 10 µl |
| Mešanica s T7 RNA-polimerazo | 2 µl |
| Skupaj | 30 µl |

Mešanico smo inkubirali na 37 °C čez noč v cikličnem termostatu 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems.

Po celonočni inkubaciji smo z deoksiribonukleazo razgradili DNA z dodatkom 10 µl 10x DNase pufra, 2 µl DNaze I in 20 µl vode brez nukleaz. To smo inkubirali 15 minut na 37 °C v cikličnem termostatu.

Dobljeno RNA smo očistili na dva različna načina, s kompletom reagntov MEGAclear™ Transcription Clean-Up Kit (Ambion, ThermoFisher scientific) po navodilih proizvajalca, in s fenol-kloroform ekstrakcijo.

Fenol-kloroform ekstrakcija je potekala v digestoriju tako, da smo vzorcu RNA dodali vodo brez nukleaz do volumna 180 µl. Nato smo dodali 20 µl 3M natrijevega acetata (pH 5,2) in premešali. Dodali smo 1 volumen (200 µl) fenol:kloroform mešanice v razmerju 1:1, premešali in odpipetirali vodno fazo v novo mikrocentrifugirko brez nukleaz. Nato smo ga še dvakrat očistili z dodatkom 1 volumna kloroforma, to smo premešali in odpipetirali vodno fazo. Vodni fazi z RNA smo dodali 2 volumna 100 % etanola in mikrocentrifugirko dali za vsaj 30 minut v zamrzovalnik na -20 °C, da se je RNA oborila. Nato smo centrifugirali 30 minut na 16000g in 4 °C. Previdno smo odstranili supernatant in pelet sprali z dodatkom 500 µl hladnega 70 % etanola. Centrifugirali smo 30 minut na 16000g in 4 °C in etanol odstranili z nastavkom, pelet pa zračno posušili in ga raztopili v 30 µl vode brez nukleaz. RNA smo topili čez noč v hladilniku na 4 °C nato pa smo zmerili koncentracijo na NanoVue spekprofotometru ter naredili analizo razgrajenosti na mikročipu proizvajalca Agilent.

3.6.9 Merjenje koncentracije RNA in DNA

Merjenje koncentracij DNA matric, sgRNA in očiščenih produktov PCR smo izvajali na spektrofotometru NanoVue (GE Healthcare Lifesciences). Pri posameznem vzorcu smo izbrali opcijo merjenja, DNA ali RNA, očistili površino za merjenje, nato pa dvakrat umerili spektrofotometer z ddH₂O na nič. Za meritev smo odpipetirali 3 µl dobro premešanega vzorca in pomerili absorbanco pri različnih valovnih dolžinah. Naprava meri absorbanco pri 260 nm in 280 nm, za dodatne informacije o čistosti in ozadju pa meri tudi pri 230 nm in 320 nm.

3.6.10 Analiza z bioanalizatorjem Agilent 2100

Za določanje koncentracije in razgrajenost sgRNA smo uporabili Agilent RNA 6000 Nano Kit in aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer. Analizo smo izvedli po navodilih proizvajalca. Najprej smo 1 µl posameznega vzorca sgRNA in dolžinski standard denaturirali 2 minuti na 70 °C in jih takoj dali na led. Nato smo na čip nanesli 9 µl mešanice gela in barvila, ki je bilo pripravljeno vnaprej. V vdolbinice za vzorce smo dodali 5 µl markerja ter nato naložili

v posamezno vdolbinico 1 µl standarda velikost in 1 µl vzorca. Čip smo nato z vrtenjem pomešali in ga vstavili v aparaturo Agilent 2100 Bioanalyzer. Po 30 minutah smo podatke v obliki elektroferogramov in gelskih slik pregledali s programom 2100 Expert Software.

3.6.11 *In vitro* testiranje delovanja kompleksa sgRNA in Cas9

Pred elektroporacijo je bilo potrebno preveriti delovanje proteina Cas9 in sgRNA. To smo naredili tako, da smo pripravili ribonukleoproteinski kompleks (RNP) in mu dodali očiščen produkt PCR tarčne DNA. Preverjali smo aktivnost sgRNA 1.1 in sgRNA 1.2. DNA s tarčno sekvenco smo pripravili s PCR, za katero smo uporabili izolirano DNA iz listov oljne ogrščice.

3.6.11.1 Priprava DNA

Dvostopenjski PCR delov smo naredili z DNA polimerazo Q5 high fidelity (NEB). Najprej smo naredili reakcijo s paroma začetnih oligonukleotidov BnPDS 1.4 in BnPDS 1.6. Drugi del pa z BnPDS 1.3 in BnPDS 1.5 (preglednica 10).

Preglednica 10: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje prvega eksona gena *pds*.

| Ime | Zaporedje | Dolžina PCR produkta (bp) |
|---------------|----------------------|---------------------------|
| BnPDS 1.3-For | ATCCTCATCCTTCATGCAG | 930 |
| BnPDS 1.3-Rev | CTCCATTGGGATTGGCTA | |
| BnPDS 1.4-For | GGAGGAGCAACGGAGAGATT | 1056 |
| BnPDS 1.4-Rev | CGAAACCAAAGAACGTGGTC | |
| BnPDS 1.5-For | CCGAGAGCCAGAAAACACA | 969 |
| BnPDS 1.5-Rev | GAATTGCACCGTAGAGTGA | |
| BnPDS 1.6-For | CCATCTCATCCTCCATGC | 1199 |
| BnPDS 1.6-Rev | GTGGTGGACCTGGTGGTAAT | |

Za prvi del PCR reakcije smo uporabili para začetnih oligonukleotidov BnPDS 1.4 in BnPDS 1.6. Naredili smo 10 µl reakcijo PCR (preglednica 11).

Preglednica 11: Sestava PCR mešanice za verižno reakcijo s polimerazo Q5 High-fidelity.

| Komponente | Končna koncentracija | Volumni za 10 µl reakcijo | Volumni za 25 µl reakcijo |
|---|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Voda brez nukleaz (IDT) | | do 10 µl | do 25 µl |
| 5X Q5 Reakcijski pufer (z MgCl ₂) | 1X | 2 µl | 5 µl |
| 10 mM dNTP | 200 µM vsakega | 0,8 µl | 2 µl |
| 10 µM For začetni oligonukleotid | 0,5 µM | 0,5 µl | 1,25 µl |
| 10 µM Rev začetni oligonukleotid | 0,5 µM | 0,5 µl | 1,25 µl |
| DNA | 1 ng – 1 µg genomske DNA | variabilno | variabilno |
| Q5 High-Fidelity DNA polimeraza (2U/µl) | 0.02 enot/µl | 0,1 µl | 0,25 µl |

To smo dobro zmešali in kratko centrifugirali ter dali v ciklični termostat 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems po temperaturnem profilu v preglednici 12 za 20 ciklov.

Preglednica 12: Temperaturni profil za verižno reakcijo s polimerazo Q5 High-fidelity.

| Koraki | Temperatura | Čas | Št. ponovitev |
|--------------------------------------|-------------|-------|---------------|
| Začetna denaturacija | 98 °C | 30 s | 1x |
| Denaturacija | 98 °C | 5 s | |
| Prileganje začetnih oligonukleotidov | 64 °C | 10 s | 20/34x |
| Sinteza fragmentov DNA | 72 °C | 20 s | |
| Zaključno podaljševanje verige | 72 °C | 2 min | 1x |
| Ohlajanje | 10 °C | ∞ | |

Produkta PCR smo 1000x redčili in to uporabili za drugi del reakcije s paroma začetnih nukleotidov BnPDS 1.3, kjer smo uporabili produkt PCR BnPDS 1.4, in BnPDS 1.5, kjer smo uporabili produkt PCR reakcije s BnPDS 1.6.

Te reakcije so imele volumen 25 µl (preglednica 11). Zmešali smo jih po vrstnem redu na ledu in jih nato dali v ciklični termostat 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems po temperaturnem profilu v preglednici 12 s 34 cikli.

Produkt PCR smo nato očistili na enak način kot matrice DNA (glej 3.6.7 Sinteza matrične DNA), mu izmerili koncentracijo in določili molarnost DNA.

3.6.11.2 *In vitro* razrez

Za *in vitro* razrez smo imeli molarno razmerje med Cas9: sgRNA: DNA, 10:10:1 . Za poskus smo uporabljali material, ki je bil brez nukleaz, očistili smo delovne površine, da ne bi prišlo do kontaminacije z ribonukleazami. Pripravili smo tudi 10x Cas9 Nuclease reaction pufer

(200 mM HEPES, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 6.5). Uporabili smo očiščene produkte PCR BnPDS 1.3 in 1.5.

Za 60 µl reakcijo smo odpipetirali:

| | |
|----------------------------------|---------------|
| Voda brez nukleaz | 24 µl |
| 10x Cas9 Nuclease reaction pufer | 6 µl |
| sgRNA (1.1; 1.2) | 8 µl (1,5 mM) |
| Cas9 | 8 µl (1,5 mM) |

Inkubirali smo 10 minut na 25 °C in dodali:

| | |
|-----------------------------|-----------------|
| DNA (očiščeni produkti PCR) | 14 µl (0,15 mM) |
| Skupaj | 60 µl |

Vse smo dobro premešali in na kratko centrifugirali, nato pa inkubirali za 1 uro na 37 °C v cikličnem termostatu 2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems. Po inkubaciji smo opravili analizo razreza z agarozno elektroforezo tako, da smo vzorcu dodali 12 µl nanašalnega barvila za agarozni gel, premešali, kratko centrifugirali in nanesli na gel 25 µl mešanice (1,2 % agaroha, debelina 1 cm, 120V, 1,5h).

3.6.12 Vnos kompleksa sgRNA in Cas9 z elektroporacijo

Elektroporirali smo na elektroporatorju Gene Pulser Xcell™ Electroporation System (Bio Rad) z opcijo kvadratnega pulza. Za elektroporacijo smo uporabili mikrospore izolirane iz brstov velikosti 3-4 mm. Mikrospore so bile pred elektroporacijo hranjene na ledu in tudi kivete so bile predhodno ohlajene.

Pri elektroporaciji za neposreden vnos proteina Cas9 in sgRNA smo poskusili več načinov za optimizacijo te metode.

Pred elektroporacijo smo pripravili mešanico proteina Cas9 in sgRNA, da sta tvorila RNP kompleks. Uporabili smo 10 µl proteina Cas9 s koncentracijo 1,88 µg µl⁻¹ in med 0,9 µg do 40 µg različnih sgRNA. Za pripravo mešanice smo uporabljali 2 različna pufra, pufer A (20 µM HEPES (pH 7,5), 150 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 % glicerol, 1 mM TCEP (Sigma)) in pufer NEB3 (1M NaCl, 0,5M Tris-HCl, 100mM MgCl₂, 10 mM DTT, pH 7,9) (NEB). Molarno razmerje med Cas9 in sgRNA je bilo med 1: 0,20 in 1: 10. Mešanico Cas9 in sgRNA smo pred elektroporacijo inkubirali na 37 °C za 10 minut.

Za elektroporacijo smo uporabljali 20000 celic (v 50 µl), ki smo jih elektroporirali pri pogojih 1, 2, 5, 6 (preglednica 2) takoj po dodatku RNP kompleksa. Po elektroporaciji smo dodali 2 ml gojišča NLN-13 in po dveh urah na sobni temperaturi prestavili v 55mm petrijevke ter dodali gojišče NLN-13 do končnega volumena 5 ml. Inkubirali smo jih za 1 dan na 32°C v temi, nato pa jim izolirali DNA.

3.7 IDENTIFIKACIJA MUTACIJ

Po 24 urah inkubacije po elektroporaciji smo začeli z identifikacijo mutacij tako, da smo celice centrifugirali in izolirali DNA. Identifikacijo tarčne mutageneze smo izvajali z endonukleazo T7EI, PCR-RFLP z uporabo restriktijskih encimov za tarčno mesto in s preverjanjem sekvenc po Sangerju.

3.7.1 Izolacija DNA iz mikrospor

Celokupno DNA smo izolirali iz mikrospor 24 ur po vsaki elektroporaciji. Najprej smo jih centrifugirali 3 min na 1500 obratov min^{-1} in 4 °C, v centrifugi Eppendorf Centrifuge 5810 R, da smo odstranili večino gojišča, tako da nam je ostalo 300 µl suspenzije mikrospor v gojišču za izolacijo. Celicam smo dodali 700 µl ekstrakcijskega pufra CTAB (2 % (w/v) CTAB, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8,0, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 % (v/v) merkaptoetanol) in 150 mg steklenih kroglic premera 0,5 mm (Sigma) ter 5 minut vrtinčili. Mešanico smo inkubirali 1 uro na 68°C in vmes večkrat premešali. Po inkubaciji smo dodali 700 µl topila kloroform-izoamilalkohol v razmerju 24:1, dobro premešali in vzorce centrifugirali 12 min pri 15000g in 4 °C. S tem smo ločili vodno in organsko fazo. Vodno fazo, ki je vsebovala DNA, smo nato previdno odpipetirali v novo mikrocentrifugirko. Zaobarjanje smo dodali 1/10 volumna 3M natrijevega acetata (NaOAc) (pH 5,2) in 1 volumen izopropanola, ki je bil ohlajen na -20 °C. Mešanico smo dobro premešali in za 30-60 minut mikrocentrifugirke postavili v zamrzovalnik na -20 °C. Nato smo centrifugirali 10 min pri 15000g in 4°C. Supernatant smo odlili, pelet pa sprali z 1 ml 70 % etanola. Ponovno smo centrifugirali 10 min pri 15000g in 4°C, nato smo odstanili ves etanol in pelet posušili v evaporatorju Eppendorf Concentrator plus, na 30 °C. Peletu smo dodali 10-50 µl ddH₂O in pustili DNA na raztplavljanju čez noč pri 4°C.

3.7.2 Merjenje koncentracije izolirane DNA

Koncentracijo izolirane DNA smo merili s pomočjo DNA fluorometra DyNA Quant™ 200 (Amersham Biosciences, Amersham, VB) po protokolu proizvajalca. Najprej smo 15 minut pred uporabo prižgali DNA fluorometer, nato pa smo pripravili 1x TNE pufer (0,1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,0), fluorescentno barvilo Hoechts 33258 (1 µl ml⁻¹) in ddH₂O. Za kalibracijo smo uporabili standard, DNA telečjega timusa (1 mg ml⁻¹ DNA v 1x TNE pufru). Ko je bil DNA fluorometer umerjen, smo v kiveto odpipetirali 2 ml pufra in 2 µl DNA vzorca in pomerili koncentracijo.

3.7.3 Pomnoževanje tarčnih eksonov

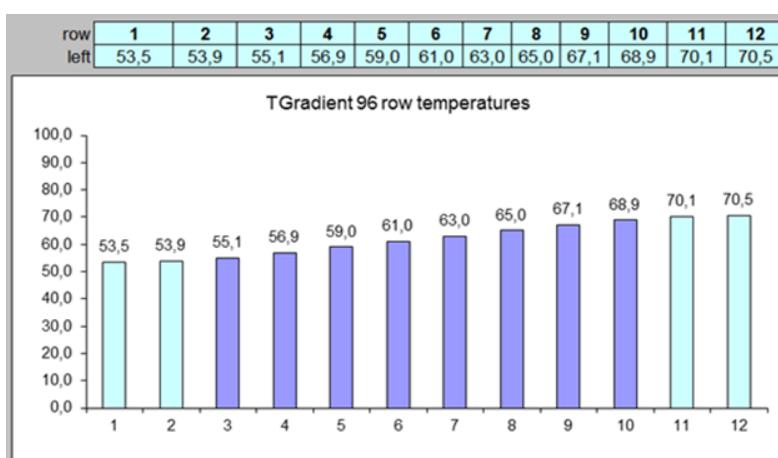
Za identifikacijo mutacij smo uporabljali začetne oligonukleotide iz preglednice 13. Pred njihovo uporabo za identifikacijo mutacij smo naredili PCR s temperaturnim gradientom, da smo določili čim višjo temperaturo prileganja začetnih oligonukleotidov na DNA in s tem

zagotovili, da je začetni oligonukleotid pomnoževal le en alel. To je bilo ključno za nadaljnjo identifikacijo.

Za posamezni začetni nukleotid smo naredili 10 µl reakcije, uporabili smo DNA izolirano iz listov oljne ogrščice. Deset mikrolitrskih reakcij PCR smo pripravili po navodilih iz preglednice 11, dobro premešali, centrifugirali in dali v ciklični termostat TGradient Biometra®, s temperaturnim profilom prikazanim v preglednici 12, le da je bila v različnih stolpcih različna temperatura (slika 4). Vzorce za vsak začetni oligonukleotid smo dali v stolpce od 4 do 9, tako da smo pokrili območje med 56,9 °C in 67,1 °C. Produktom PCR s temperaturnim gradientom smo dodali 2 µl nanašalnega barvila 6x loading dye (Promega) in jih nanesli na agarozni gel (1,2 % agarozna, debelina 0,75 cm, 120V, 1,5 ure).

Preglednica 13: Nukleotidna zaporedja začetnih oligonukleotidov za identifikacijo tarčnih mutacij.

| Začetni oligonukleotid | Zaporedje | Dolžina (bp) | Pomnožujeta | Za identifikacijo sgRNA |
|------------------------|--------------------------|--------------|-------------|-------------------------|
| BnDET.1.34-For | GGGCTCTTTGATCACCAAT | | | |
| BnDET.1.34-Rev | TCAGATTCTTGAAAGCAGTTAGG | 257 | 1. ekson | sg RNA 1.1, 1.2 |
| BnDET.1.56-For | CTGGCCTTGGTATATCCACAC | | | |
| BnDET.1.56-Rev | TCCTTGAAGCAGTTGGTGA | 300 | 1. ekson | sg RNA 1.1, 1.2 |
| BnDET.6.1-For | TATGGGCTATATTGAGGAACAACG | | | |
| BnDET.6.1-Rev | CTGCTTCATCCATTGTTCAA | 146 | 6. ekson | sgRNA 6.1 |
| BnDET.6.4-For | TTGGAGAACTTGGGATCAATG | | | |
| BnDET.6.4-Rev | GGATCCCTAACATGAAATGTAAA | 953 | 6. ekson | sgRNA 6.1 |
| BnDET.8.2-For | GATGGTAATCCACCGGAGAG | | | |
| BnDET.8.2-Rev | AGCGTCTCCTGGATAGTGG | 165 | 8. ekson | sgRNA 8.1, 8.2 |



Slika 4: Prikaz temperatur v stolpcih za PCR s temperaturnim gradientom.

3.7.4 Testiranje z endonukleazo T7EI

Endonukleaza T7EI prepozna nepopolno hibridizirano DNA, ki jo nato prereže. Uporabili smo protokol proizvajalca NEB.

Očiščen produkt PCR, ki smo ga pridobili z verižno reakcijo s polimerazo Q5 High-fidelity (preglednici 11 in 12), smo očistili po enakem postopku kot DNA matrice (glej 3.6.7 Sinteza matrične DNA). Očiščene produkte smo uporabili za reakcijo z endonukleazno razgradnjo.

Reakcija je potekala po naslednjem protokolu:

| | |
|-------------------------|-------------|
| ddH ₂ O | do 19 µl |
| očiščenega PCR produkta | 100 ng |
| <u>10x NEB2 puffer</u> | <u>2 µl</u> |
| Skupaj | 19 µl |

1x NEB pufer 2 vsebuje 50mM NaCl, 10 mM TRIS-HCl, 10 mM MgCl₂, 10mM ditiotreitol (DTT) pH 7,9.

V cikličnem termostatu TGradient Biometra® smo naredili prileganje po naslednjih parametrih:

| | |
|-----------|----------------|
| 95°C | 5min |
| 95°C→85°C | -2°C/sekundo |
| 85°C→25°C | -0,1°C/sekundo |
| 4°C | ∞ |

Nato smo 19 µl dodali 1 µl T7E1 endonukleaze in inkubirali 1 uro na 37°C. Reakcijo smo ustavili z 1,5 µl 0,25 M EDTA in fragmente analizirali na agarozni elektroforezi (1,5 % agaroza, debelina gela 1cm, 120 V, 1,5 ure).

3.7.5 Testiranje s PCR-RFLP

Uporabili smo tudi restrikcijske encime, katerih prepoznavna mesta sovpadajo s tarčnim mestom delovanja Cas9 po principu metode PCR-RFLP, polimorfizmu dolžin restrikcijskih fragmentov. Zaporedja, ki vsebujejo mutacijo, izgubijo prepoznavno mesto za restrikcijski encim in zato jih encim ne more več razrezati. Za reakcijo smo uporabili enako pripravljeno DNA kot pri reakciji z endonukleazo T7E1.

Uporabili smo BtgI, ki je produkt *BtgI* gena iz *Bacillus thermoglucosidasius*. Encim BsaWI izhaja iz gena *BsaWI* iz *Bacillus stearothermophilus* W1718. Uporabili smo tudi HpyCH4V encim, ta izvira *HpyCH4V* gena iz *Helicobacter pylori* CH4.

Za reakcijo smo zmešali:

| | |
|---------------------------|----------|
| DNA vzorec | 200 ng |
| 10x CutSmart® pufer (NEB) | 2,1 µl |
| BtgI/BsaWI/HpyCH4V | 5 enot |
| ddH ₂ O | do 21 µl |

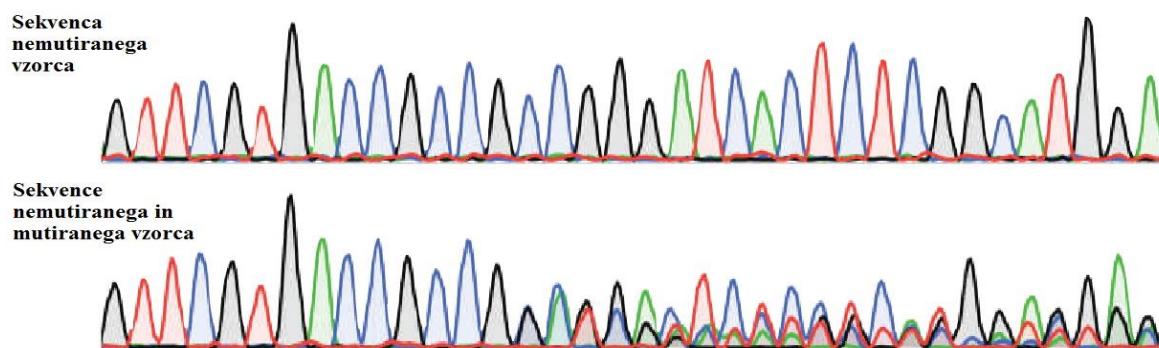
Premešali smo in kratko centrifugirali, nato pa inkubirali pri uporabi encimov BtgI in HpyCH4V za 1 uro na 37 °C, pri BsaWI pa eno uro na 60 °C. Za inaktivacijo encimov smo za BtgI in BsaWI temperaturo dvignili na 80 °C za 20 minut, pri HpyCH4V pa smo inaktivacijo encima opravili na 65 °C za 20 minut. Vzorcem smo nato dodali 3,5 µl nanašalnega barvila 6x loading dye (Promega) in jih nanesli na agarozni gel za analizo fragmentov po elektroforezi.

3.7.6 Testiranje s sekvenciranjem po Sangerju

Za identifikacijo mutacij smo uporabljali tudi metodo sekvenciranja po Sangerju (glej 3.6.5 Sekvenčna reakcija).

Za sekvenčno reakcijo smo najprej očistili produkte PCR s polimerazo Q5 high-fidelity (preglednici 11 in 12) z dodatkom alkalne fosfataze FAST AP in eksonukleaze ExoI.

Nato smo pripravili dve mešanici za sekvenčno reakcijo. Eno z začetnim oligonukleotidom forward, drugo pa z reverse. Uporabili smo enake BnDET začetne oligonukleotide, kot v PCR (preglednica 13). Podatke, ki smo jih pridobili v obliki kromatografskih datotek, smo najprej ročno pregledali, nato pa uporabili spletno orodje TIDE, kjer smo preverjali razlike med DNA mikrospor kontrole in DNA mikrospor, ki smo jih elektroporirali z dodatkom ribonukleoproteinskega kompleksa sgRNA in Cas9. Orodje TIDE primerja sekvene okoli tarčnega mesta in določi delež delečij in insercij zaradi tarčne mutacije (slika 5).

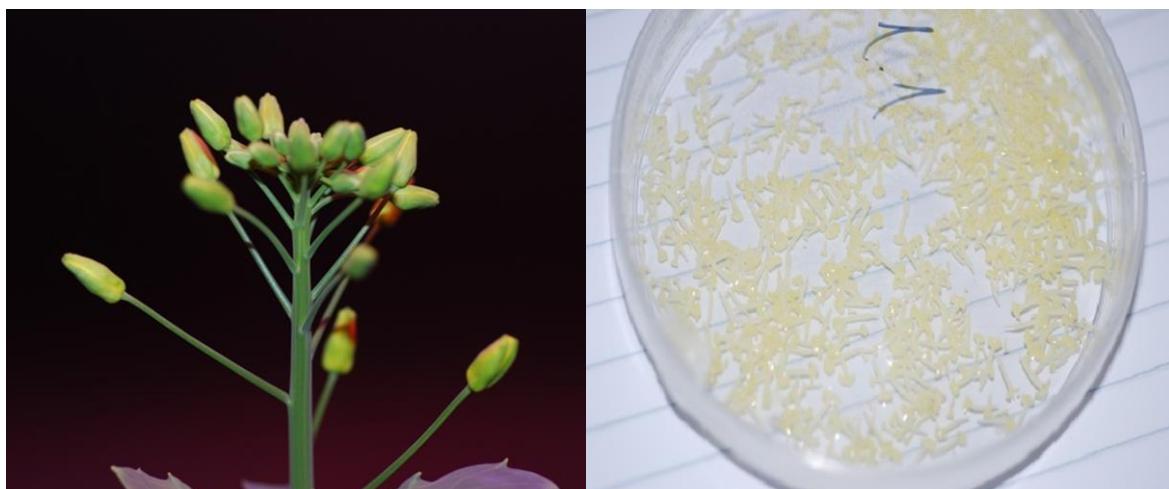


Slika 5: Način delovanja spletnega orodja TIDE za zaznavanje tarčnih mutacij preko primerjave kromatografov DNA sekven mutiranih in nemutiranih vzorcev (prirejeno po TIDE, 2016).

4 REZULTATI

4.1 GOJENJE RASTLIN IN IZOLACIJA MIKROSPOR

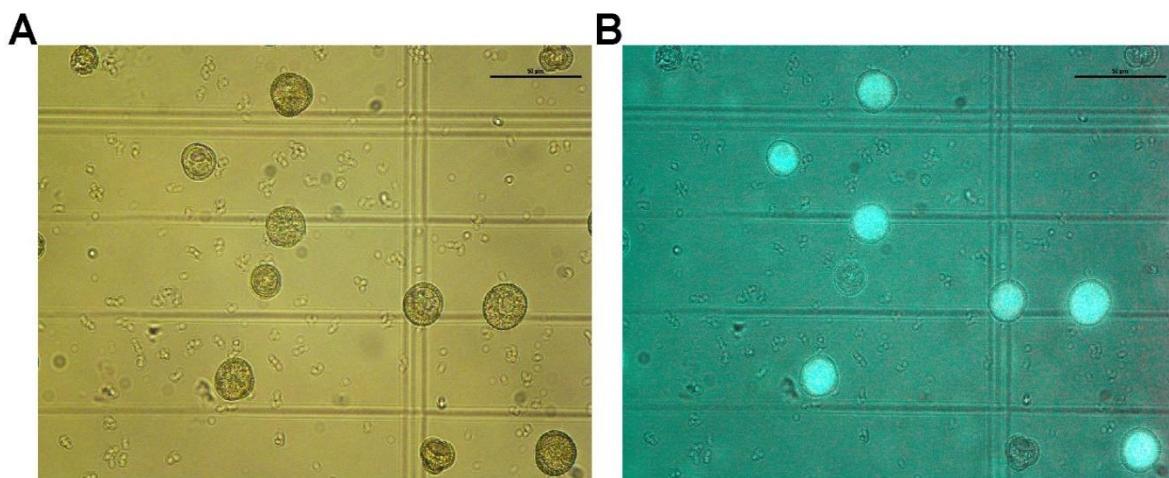
Da bi zagotovili uspešno androgenezo mikrospor, smo morali zagotoviti konstantne pogoje rasti in upoštevati mnoge dejavnike. Semena smo posejali v lonce s substratom, ki smo mu dodali gnojilo Osmocote (Substral). Rastline so skalile v 4-6 dneh in rastle nadaljnjih 4-5 tednov na 18 °C in 16 urni fotoperiodi. Ko so začele formirati socvetja (slika 6), smo temperaturo znižali na 10 °C. Po Custers (2003) smo za izolacijo mikrospor pobirali cvetne brste iz socvetij z 1 do 3 odprtimi cvetovi. Na rastlino smo dobili okoli 10 cvetnih brstov velikost 3-4, ki vsebuje mikrospore v pozni enojedrni fazi. Z nežno maceracijo smo dobili iz enega cvetnega brsta v povprečju 80000 mikrospor. Za nadaljnje gojenje smo uporabljali koncentracijo 4×10^4 mikrospor ml⁻¹, gojili pa smo jih v 5 ml suspenzijah v 55 mm petrijevkah. S to metodo nam je uspelo vzpostaviti uspešno izolacijo mikrospor in androgenezo v embrije.



Slika 6: Levo socvetje oljne ogrščice in desno petrijevka z embriji mikrospor.

4.2 ŽIVOST MIKROSPOR PO IZOLACIJI

Živost mikrospor smo preverjali z metodo s FDA, ki smo ga dodali mikrosporam in jih inkubirali za 10 minut v temi. Rezultate smo opazovali pod modro svetlobo, saj FDA ob vzbujanju s fluorescenčno svetlobo sveti. Na sliki 7 lahko vidimo primer testa živosti na hemocitometru. Prešteli smo celice, ki smo jih videli pod navadno svetlobo in tiste, ki so svetile pod modro svetlobo. Po izolaciji je bila živost mikrospor okoli 75 %.



Slika 7: Mikrospore pobarvane s FDA pri 40x povečavi. A- mikrospore pod navadno lučjo, B- mikrospore pod ustreznim filtrom za detekcijo zelene fluorescence. Žive celice fluorescirajo, mrtve pa ne.

4.3 ŽIVOST MIKROSPOR PO ELEKTROPORACIJI

Da bi ugotovili, kakšen vpliv imajo posamezni elektroporacijski pogoji (EP) na živost mikrospor, smo preverjali živost mikrospor s FDA takoj po elektroporaciji in 24 ur po elektroporaciji. Mikrospore smo elektroporirali pri različnih elektroporacijskih pogojih (preglednica 2) in nato določili delež živih.

Ugotovili smo (preglednica 14), da imajo EP 2 (ki vključujejo 8 pulzov po 5 ms pri jakosti polja 1000 V cm^{-1}), 6 (en pulz dolžine 0,5 ms pri 1000 V cm^{-1}) in EP 10 (ki traja 10 ms pri 1000 V cm^{-1}) najbolj destruktiven učinek na živost. Kar 80 % celic ni preživelno. Najmanj destruktivna sta bila EP 3 in 7, ki imata jakost električnega polja 250 V cm^{-1} s trajanjem 0,5 ms in 10 ms. Delež preživetja je bil več kot 80 %. Elektroporacijska pogoja 1 in 5 sta v istem rangu, kjer je bilo preživetje skoraj 60 %. Kljub temu, da so ostali EP z jakostjo električnega polja 1000 V cm^{-1} bili najbolj destruktivni za mikrospore, pa je morda EP 1 zaradi kratkih pulzov deloval manj uničujoče na preživetje celic.

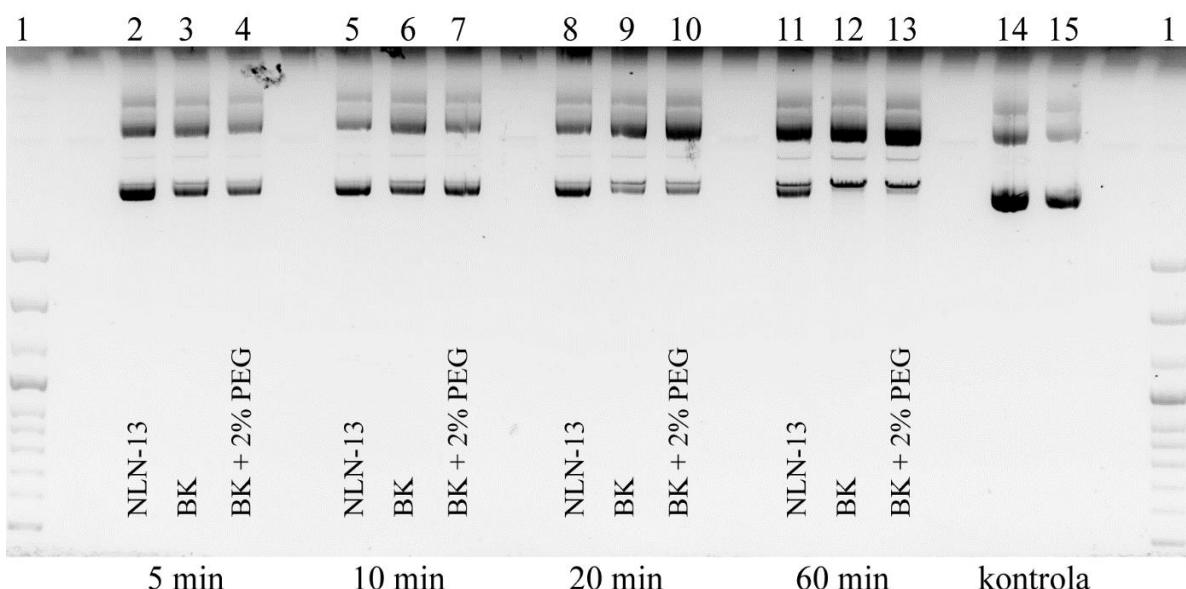
Celice smo po elektroporaciji imeli še 2 uri na sobni temperaturi, nato pa smo jim dodali gojišče NLN-13 do 2,5 ml skupnega volumna in jih inkubirali na 32°C v temi. Visoka temperatura spodbudi pri mikrosporah embriogenezo. Živost se je pri nekaterih zmanjšala le nekoliko, pri nekaterih pa je bila precejšnja, največ pri EP 5, kjer se je zmanjšala za več kot 80 % v primerjavi z živostjo takoj po elektroporaciji. Glede na te rezultate in rezultate, ko smo ugotavljali preživelost embrijev z in brez dodatka proteina Cas9, smo se odločili za izbiro nekaterih EP 1, 2, 5 in 6 za nadaljnje delo.

Preglednica 14: Vpliv elektroporacije na živost mikrospor.

| Elektroporacijski pogoj | Živost po izolaciji | Živost po elektroporaciji | Živost 24 ur po elektroporaciji |
|--|---------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Kontrola | 75 % | 75 % | 70 % |
| EP1 (4 x 200 µs, 1000 V cm ⁻¹) | 75 % | 43,3 % | 40 % |
| EP2 (8 x 5 ms, 600 V cm ⁻¹) | 75 % | 13,2 % | 13 % |
| EP3 (0,5 ms, 250 V cm ⁻¹) | 75 % | 62 % | 61 % |
| EP5 (0,5 ms, 750 V cm ⁻¹) | 75 % | 44,5 % | 7,15 % |
| EP6 (0,5ms, 1000 V cm ⁻¹) | 75 % | 10 % | 5,75 % |
| EP7 (10ms, 250 V cm ⁻¹) | 75 % | 67,8 % | 49 % |
| EP 9 (10ms, 1000 V cm ⁻¹) | 75 % | 13,5 % | 7 % |

4.4 NUKLEAZNA AKTIVNOST IZOLIRANIH MIKROSPOR

Za mikrospore je znano, da posedujejo nukleazno aktivnost (Jardinaud in sod, 1993; Vischi in Marchetti, 1997). Da bi se prepričali kako je z nukleazno aktivnostjo mikrospor pri *Brassica napus* L. cv. Topas, smo naredili test z dodatkom plazmida SF-16. Uporabili smo dve različni gojišči NLN-13 in BK, enako kot pri elektroporaciji, da bi videli kako nukleaze vplivajo na plazmidno DNA. Mikrospore smo zmešali s plazmidom in jih inkubirali za 5, 10, 20 in 60 minut, nato pa naredili analizo fragmentov na agarozni elektroforezi. Na sliki 8 vidimo pod stolpcema 14 in 15 kontrolo, plazmid v vodi brez nukleaz, 1 µg plazmida (stolpec 14) in 0,5 µg plazmida (stolpec 15). V ostalih vzorcih pa je masa plazmida okoli 0,5 µg. Pri 5 in 10 minutah lahko opazimo, da pri vzorcih ni nobene razlike v primerjavi s kontrolo. Pri 20 in 60 minutah pa lahko vidimo rahle spremembe v spodnjih fragmentih, ki nakazujejo na zunaj celično nukleazno aktivnost mikrospor. Pri NLN-13 gojišču so te razlike v primerjavi s kontrolo najmanj opazne, pri BK gojišču in BK gojišču z dodatkom 2 % PEG pa so bolj očitne. Dodatek 2 % PEG naj bi zmanjšal aktivnost nukleaz, vendar na podlagi naših rezultatov primerjave z gojiščem BK tega ne moremo trditi. Tekom naših poskusov, so bile mikrospore v stiku s plazmidom ali s kompleksom RNP manj kot 5 minut pred elektroporacijo, tako da sklepamo, da nukleazna aktivnost ne bi smela imeti bistvenega vpliva na uspešnost transformacije.

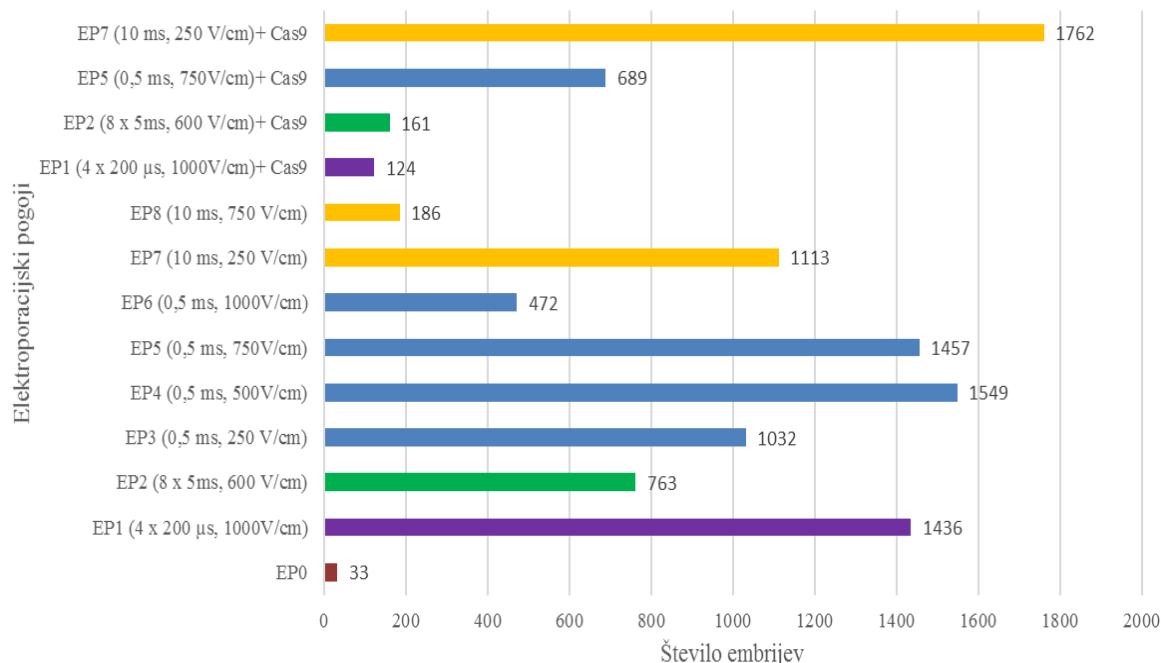


Slika 8: Agarozni gel plazmida po inkubaciji v suspenziji izoliranih mikrospor za preverjanje zunaj celične nukleazne aktivnosti mikrospor. 1- Dolžinski standard 100 bp; 2-13- Mikrospore v gojiščih NLN-13, BK, BK + 2 % PEG po 5-60 minutni inkubaciji;14- pozitivna kontrola- 1 µg plazmida. 15: pozitivna kontrola- 0,5 µg plazmida.

4.5 VPLIV ELEKTROPORACIJE IN VNOSA PROTEINA Cas9 NA EMBRIOGENEZO

Preden smo začeli s transformacijo z RNP kompleksom smo hoteli preveriti kako vpliva elektroporacija na embriogenezo, oziroma koliko embrijev lahko dobimo za nadaljnjo potencialno uporabo. Poleg tega pa smo preverili še kako vpliva na regeneracijo mikrospor v embrije elektroporacija z vnosom proteina Cas9.

Uporabili smo 2×10^5 celic v 100 µl in jim dodali 6 µl oz. 11,3 µg proteina Cas9 ter jih elektroporirali pri pogojih 1, 2, 5 in 7 (preglednica 2). Celice smo elektroporirali tudi brez dodatka Cas9, pri elektroporacijskih pogojih 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 in 9 (preglednica 2). Za vsakega smo naredili 3 tehnične ponovitve. Nato smo jih inkubirali v stresnih pogojih, za 2 dni v temi na 32 °C, da smo spodbudili embriogenezo, nato pa smo jih prestavili na 25 °C. V nadalnjem razvoju smo jih dvakrat redčili, tako da so bile skupno redčene 15x ter tako zagotovili karseda optimalne pogoje za androgenetski razvoj. Po cca 40 dneh od elektroporacije smo prešteli število nastalih embrijev. Od treh ponovitev za vsak pogoj smo izračunali povprečje za 2×10^5 celic.



Slika 9: Vpliv elektroporacije in vnosa proteina Cas9 na regeneracijo embrijev iz mikrospor. Na osi y so prikazani različni elektroporacijski pogoji, na osi x pa število regeneriranih embrijev iz 200000 mikrospor. Rdeča - kontrola; vijolična – EP 1; zelena - EP 2; modra - EP s pulzi dolžine 0,5 ms; rumena- EP s pulzi dolžine 10 ms.

Na sliki 9 lahko vidimo, da je prišlo do regeneracije embrijev v največjem številu pri EP 7, 10ms, 250 V cm^{-1} , z dodatkom Cas9. Najnižja pa je bila regeneracija pri kontroli. Od 200.000 celic se jih je regeneriralo samo 33.

Pri EP1 je bilo 1436 embrijev, pri EP 1 z dodatkom Cas9 pa le 124, kar 90 % manj. Podobno lahko opazimo tudi pri EP 2, kjer se je število embrijev ob dodatku Cas9 za 80 % manjše. Pri EP 5 pa z dodatkom Cas9 približno za pol manjše. Pri EP 7 pa vidimo spremembo v trendu, število embrijev ob dodatku Cas9 je za 6x večje kot pri različici brez proteina.

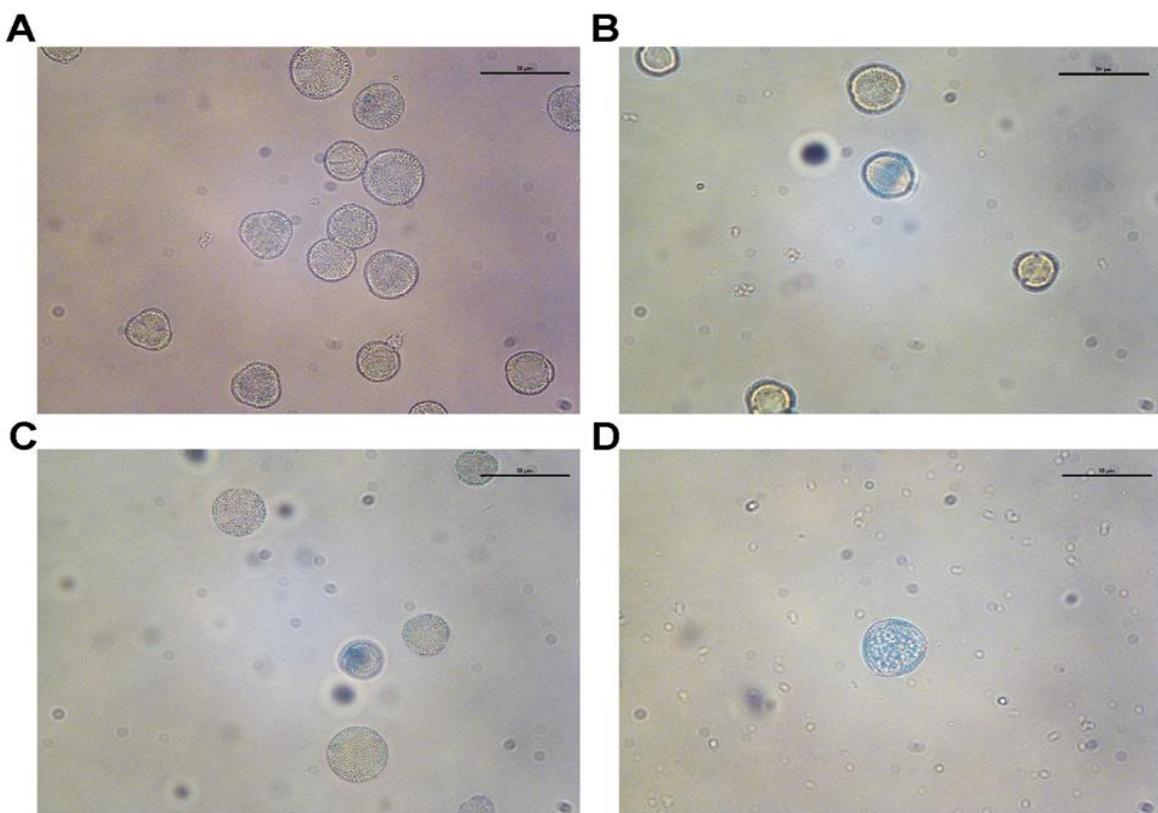
Če upoštevamo dolžino pulza, lahko vidimo, da je pri pogojih z 0,5 ms pulzom in isti jakosti električnega polja večje število regeneriranih embrijev pri EP 5, kot pri pulzu 10 ms pri EP 8. Ravno obratno pa je pri jakosti pulza 250 V cm^{-1} , kjer je večje število regeneriranih embrijev pri EP 7, ki ima 10 ms trajajoč pulz, v primerjavi s EP 3, ki ima pulz dolg le 0,5 ms.

Glede na te rezultate smo se nadaljnjo odločili za uporabo EP 1, 2, 5, 7 za vnos RNP-jev v celice. Ker smo želeli tako parametre, ki ohranjajo visoko živost in zmožnost embriogeneze, kot tiste, ki znižajo živost, vendar je zato večja možnost za večjo permeabilnost celic.

4.6 USPEŠNOST VNOSA PLAZMIDA Z ELEKTROPORACIJO

Za namene nadaljnega dela nas je zanimalo, kako uspešen je vnos plazmida v mikrospore pri različnih elektroporacijskih pogojih. Poskuse smo izvedli po protokolu Jardinaud in sod. (1993), v katerih so prehodno transformirali mikrospore z dvema različnima plazmidoma, ki sta nosila zapis za *gus*. 1×10^5 celicam v treh različnih elektroporacijskih gojiščih smo dodali $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ plazmida SF-16 in jih elektroporirali pri pogojih 1, 3, 5 in 7 (preglednica 2).

Po 24 urni inkubaciji smo preverili aktivnost vnesenih genov, saj plazmid nosi sekvenco za *gus* gen, ki kodira encim β -glukoronidazo. Zato smo naredili histokemični test za aktivnost encima po Jefferson (1987). To smo naredili tako, da smo celicam dodali substrat X-Gluc, ki ga β -glukoronidaza razgradi in produkt se obarva modro. Pod svetlobnim mikroskopom smo določevali uspešnost elektroporacije. Uspešnost transformacije s plazmidom GUS je bila precej nizka. Pri NLN-13 gojišču in elektroporacijskemu pogoju 1 ($4 \times 200 \mu\text{s}$, 1000 V cm^{-1}) smo opazili 2,5 % transformiranih celic, pri BK gojišču pri elektroporacijskem pogoju 7 (10 ms , 250 V cm^{-1}) 1 % transformiranih celic. Pri gojišču BK + 2 % PEG pa 4 % pri pogoju 3 ($0,5 \text{ ms}$, 250 V cm^{-1}) in 2 % pri pogoju 7 (10 ms , 250 V cm^{-1}). Na sliki 10 lahko vidimo pod A kontrolo, kjer nismo opazili modre obarvanosti, v slikah B, C in D pa lahko opazimo modro obarvane celice, kar potrjuje prisotnost plazmida in izražanje *gus* gena, pri 40x povečavi.

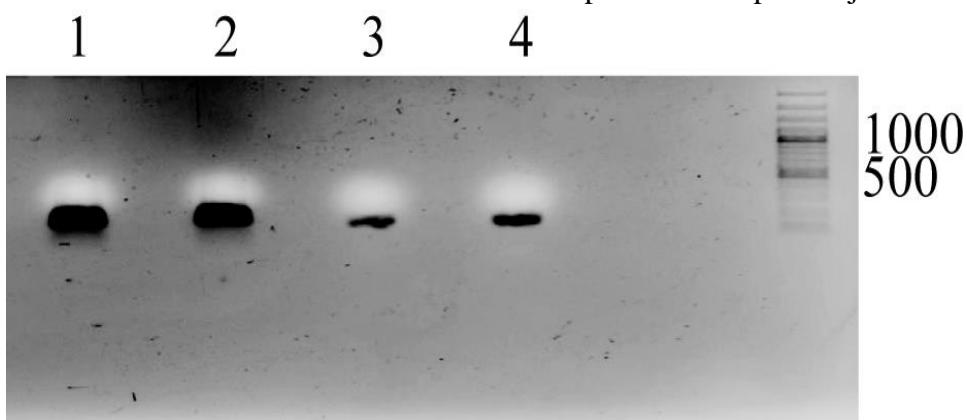


Slika 10: Rezultat histokemičnega GUS-testa izražanja gena *gus* v transformiranih mikrosporah pri 40 x povečavi. A: kontrola v NLN-13, B: Modra celica pri NLN-13, EP 1, C, D: modre celice pri BK + 2 % PEG, EP 3.

4.7 *In vitro* SINTEZA sgRNA

Pri načrtovanju sgRNA smo uporabljali lastne sekvene, ki smo jih dobili preko kloniranja PCR produktov v vektorje. Za sintezo sgRNA smo uporabili gensko specifične oligonukleotide, ki vsebujejo sekenco za promotor T7, sekenco za tarčo in sekenco za prileganje na drug oligonukleotid, konstanten oligonukleotid, ki nosi sekenco za ogrodje sgRNA. Matrično DNA smo sintetizirali na dva različna načina, s prileganjem oligonukleotidov in s PCR. Pri prileganju oligonukleotidov smo dobili povprečne koncentracije 16 ng μl^{-1} matrične DNA, s PCR pa 15 ng μl^{-1} po enakem načinu čiščenja. Za nadaljnjo uporabo za pridobivanje matrične DNA, smo se odločili za način s prileganjem oligonukleotidov, saj je hitrejši.

Sintetizirali smo sgRNA z različnimi tarčnimi zaporedji na genu *pds*. Za nekatere tarče smo po priporočilu proizvajalca kita za sintezo sgRNA uporabili dve različni opciji, z enim ali dvema dodatnima nukleotidoma gvanina za promotorsko regijo T7 za večji izkoristek pri sintezi. Pri sintezi smo naredili tudi kontrolo po navodilih proizvajalca NEB.



Slika 11: Agarozni gel matrične DNA 1.1 in 1.2 po PCR pred in po čiščenju. 1, 3- DNA 1.1. 2, 4- DNA 1.2. 1,2- neočiščena matrična DNA, 3,4- očiščena matrična DNA.

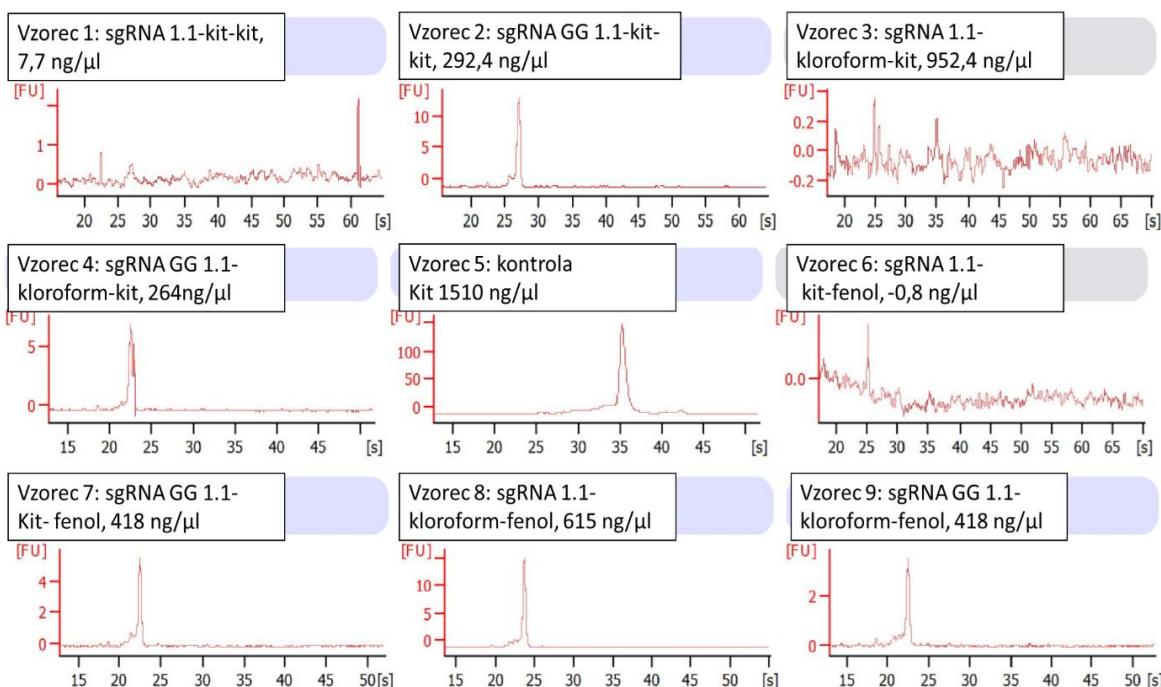
Na sliki 11 lahko vidimo agarozni gel s fragmenti očiščene in neočiščene matrične DNA različnih konstruktov sgRNA. Sinteza matrične DNA je potekala s PCR, čiščenje pa je bilo opravljeno s kitom. Na sliki lahko vidimo močne lise fragmentov neočiščene DNA pri številkah 1 in 2, pri 3 in 4 pa fragmente očiščene DNA, ki so precej šibkejši, kot pri neočiščeni, saj se je med postopkom čiščenja precej PCR produktov izgubilo.

Poleg tega smo preverili še, kako se obnesejo različne kombinacije čiščenj matričnih DNA in sgRNA. Poskusili smo s kompletom reagentov za čiščenje DNA GFXTM PCR DNA and Gel Band purification Kit (GE healthcare lifesciences) in s klasično metodo za čiščenje DNA z kloroform izoamilalkohol ekstrakcijo. Za čiščenje sgRNA pa smo uporabili metodo s kompletom reagentov MEGAClearTM Transcription Clean-Up Kit in s fenol-kloroform ekstrakcijo, tako da smo na koncu dobili 4 različne kombinacije.

Preglednica 15: Rezultati *in vitro* sinteze sgRNA po različnih načinih čiščenja. Koncentracije RNA so bile izmerjene na spektrofotometru NanoVue.

| sgRNA | Čiščenje DNA | Čiščenje RNA | Končna koncentracija sgRNA (ng μl^{-1}) |
|-----------------------|--------------|--------------|---|
| sgRNA 1.1 (1x gvanin) | Kit | Kit | 5,6 |
| | Kit | Fenol | 15,8 |
| | Kloroform | Kit | 1197 |
| | Kloroform | Fenol | 833 |
| sgRNA 1.1 (2x gvanin) | Kit | Kit | 358 |
| | Kit | Fenol | 1090 |
| | Kloroform | Kit | 321,5 |
| | Kloroform | Fenol | 927,5 |
| Kontrola | | Kit | 1748 |

Da bi preverili še razgrajenost sintetizirane sgRNA, smo uporabili bioanalizator Agilent, kjer smo dobili podatke za koncentracijo in razgrajenost RNA v obliki elektroforograma in gelskih slik.



Slika 12: Elektroforogrami za preverjanje razgrajenosti RNA po *in vitro* sintezi in čiščenju. Vzoreci z enim dodatnim gvaninom so označeni kot sgRNA, z dvema dodatnima gvaninoma pa sgRNA GG.

Koncentracije sgRNA izmerjene na NanoVue so bile med 5,6 in 1200 ng μl^{-1} (preglednica 15), na Agilent pa med 8 in 953 (slika 12). Pri razgrajenosti RNA, pa smo lahko na elektroforogramu (slika 12) opazili malo razgrajeno RNA pri vzorcih 2, 4, 7, 8 in 9. Vzorce,

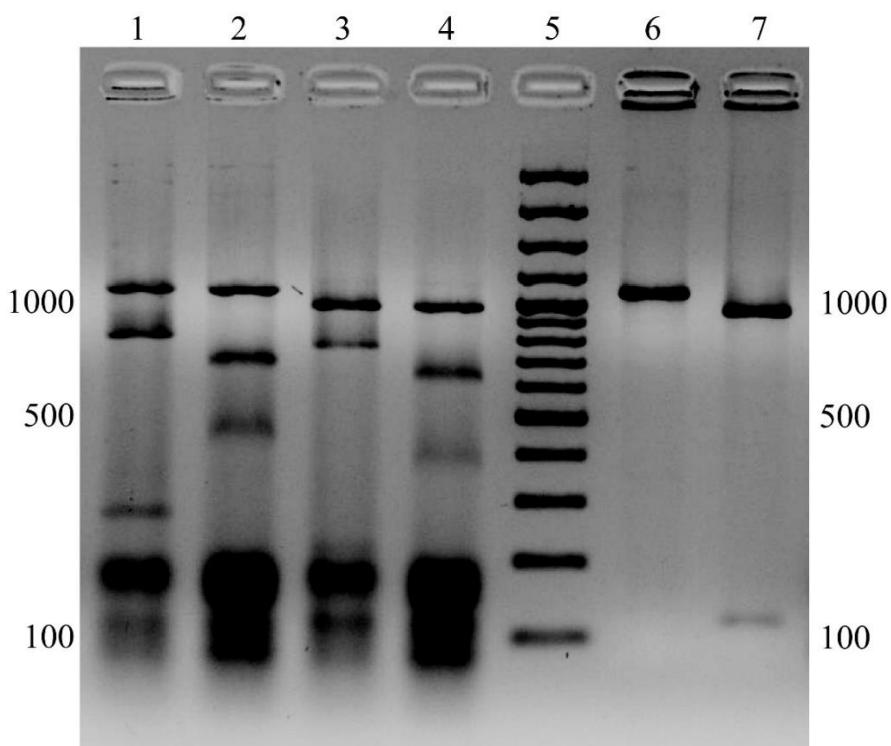
kjer je bila sgRNA celovita, oz. zelo malo razgrajena in z visokimi koncentracijami, smo uporabljali za vnos v mikrospore.

Glede na rezultate nismo mogli določiti kateri način čiščenja je najbolj primeren, pri čiščenju s kiti namreč ni bilo opaziti bistveno boljših rezultatov. Vzorca 8 in 9, ki vsebujeta po en in dva dodatna gvanina, sta bila čiščena po metodi kloroform izoamilalkohol v fazi DNA in s fenol kloroform metodo v fazi sgRNA. Ker sta bila ta dva manj razgrajena in s primerno koncentracijo, smo se za nadaljnje sinteze odločili za čiščenje s kloroform izoamilalkoholom in fenol kloroform metodo. Pri nadaljnji uporabi za določanje molarnega razmerja smo upoštevali koncentracije, ki smo jih dobili z merjenjem na NanoVue.

4.8 *In vitro* TESTIRANJE DELOVANJA RNP KOMPLEKSA

Pred transformacijo mikrospor z RNP-ji smo naredili *in vitro* test njihovega delovanja. Za ta namen smo uporabili DNA iz listov *Brassica napus* in del prvega eksona gena *pds* pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo Q5, ki je 100x bolj natančna kot Taq-polimeraza (NEB, 2016). To je pomembno zato, ker je s tem zmanjšana možnost napake pri pomnoževanju na tarčnem mestu za sgRNA.

Na sliki 13 lahko vidimo rezultate razreza z RNP na agaroznem gelu. Kontrolna, nerazrezana fragmenta sta pod številko 6 in 7, oba sta dolžine okoli 1000 bp. Pod številko 1 in 3 lahko vidimo razrez obeh fragmentov s sgRNA 1.1 v kompleksu z Cas9, pod številko 2 in 4 pa razrez s sgRNA 1.2 v kompleksu s Cas9. Pod 1 sgRNA 1.1 razreže DNA 1.3 na dolžine 650 bp in 280 bp, najvišji fragment pa je nerazrezana DNA (930 bp). Pri 2 sgRNA 1.2 razreže DNA na približno 512 bp in 418 bp. Pri 3 sgRNA 1.1 razreže DNA 1.5. na fragmenta dolžine 747 bp in 222 bp, sgRNA 1.2 pa DNA 1.5 razreže na fragmenta 609 bp in 360 bp. V primerjavi s kontrolo lahko potrdimo, da sta obe sgRNA primerni za vezavo na prvi ekson gena *pds* in da kompleks RNP uspešno razreže tarčno DNA.



Slika 13: Agarozni gel in vitro razreza DNA s Cas9 in sgRNA. 1. sgRNA 1.1 + produkt PCR BnPDS 1.3; 2. sgRNA 1.2 + produkt PCR BnPDS 1.3; 3. sgRNA 1.1 + produkt PCR BnPDS 1.5; 4. sgRNA 1.2 + produkt PCR BnPDS 1.5; 5. dolžinski standard 100 bp; 6. produkt PCR BnPDS.

4.9 IDENTIFIKACIJA MUTACIJ

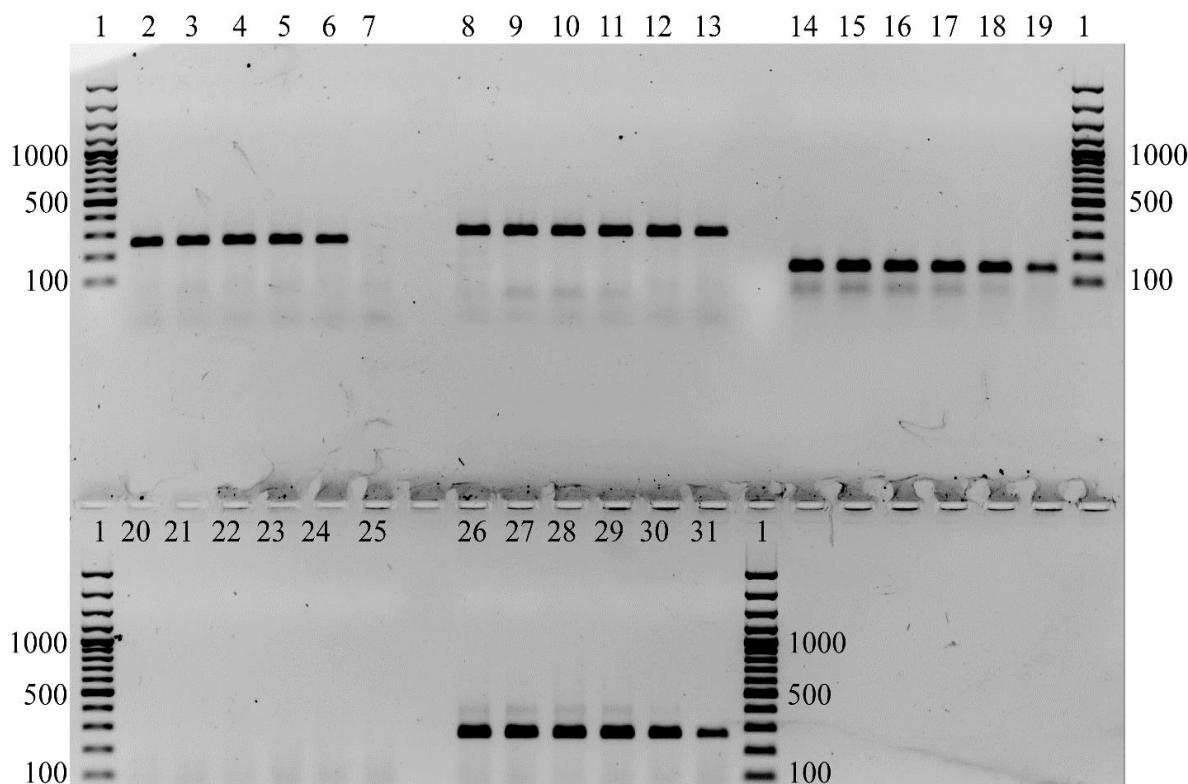
Tarčna mutageneza mikrospor je potekala s šestimi različnimi sgRNA, ki so imele tarčo na eksonih gena *pds* 1, 6 in 8, v kompleksu s proteinom Cas9, ki je bil izoliran iz kompetentnih celic Rosetta *E. coli*. Uporabljali smo EP 1, 2, 5 in 7 z opcijo kvadratnega pulza. Vnašali smo 18,8 µg proteina Cas9 in sgRNA v razponu med 0,9 µg in 40 µg za 2×10^5 celic s povprečno 75 % živostjo. Tako smo dosegli velik razpon elektroporacijskih pogojev in molarnih razmerji, ki so bila med Cas9: sgRNA od 1:0,20 do 1:10. En dan po elektroporaciji smo izolirali DNA in identificirali morebitne tarčne mutacije z uporabo endonukleaze T7, z metodo PCR-RFLP in z metodo sekvenciranja po Sangerju.

4.9.1 PCR reakcija s temperaturnim gradientom

Brassica napus je allotetraploid, zato smo morali za potrebe identifikacije mutacij uporabiti začetne oligonukleotide, ki so pomnoževali dva različna alela gena *pds*. Aleli se med sabo razlikujejo po polimorfizmu posameznih nukleotidov SNP (angl. *single nucleotide polymorphism*) in s krajšimi insercijami/delecijami, zato smo za zagotovitev specifične vezave med začetnim oligonukleotidom in DNA, preverili temperature za specifično prileganje.

Na sliki 14 je agarozni gel s produkti PCR s temperaturnim profilom. Preverjali smo temperature prileganja 56,9 °C, 59 °C, 61 °C, 63 °C, 64 °C in 67,1 °C v cikličnem termostatu TGradient Biometra®. Reakcija PCR pri BnDET 6.4 ni uspela, ker je bil čas prileganja prekratek za pomnoževanje 953 bp, zato smo ga pripravili pozneje. Na gelu lahko vidimo, da so začetni oligonukleotidi uspešno pomnoževali lokuse na *pds* genu. Pri temperaturi 67 °C je bilo pri kombinacijah začetnih oligonukleotidov BnDET 6.1 in BnDET 8 možno opaziti manj uspešno pomnoževanje, pri kombinaciji BnDET 1.34 pa sploh ni prišlo do pomnožitve.

Za začetne oligonukleotide smo tako določili temperature prileganja, ki smo jih nato uporabljali za pripravo reakcij PCR: 59 °C za BnDET 6.4 in 63 °C za ostale pare začetnih oligonukleotidov iz preglednice 13.



Slika 14: Optimizacija PCR s temperaturnim gradientom. A: 2-7, 8-13, 14-19, 20-25 in od 26-31 si temperature sledijo: 56,9 °C, 59 °C, 61 °C, 63 °C, 65 °C, 67,1 °C. 2-7- začetni oligonukleotid BnDET 1.34, 8-13- BnDET 1.56, 14-19- BnDET 6.1, 20-25- BnDET 6.4, 26-31- BnDET 8.

4.9.2 Endonukleaza T7EI

Za identifikacijo mutacij z endonukleazo smo najprej izolirano DNA iz elektoporiranih mikrospor pomnožili ter jo očistili. Nato pa smo naredili prileganje verig. Šele po prileganju smo dodali endonukleazo in mešanico inkubirali 1 uro pri 37 °C. V primeru mutacije, se verigi ne prilegata popolnoma, endonukleaza ta heterodupleks prepozna in razreže DNA.

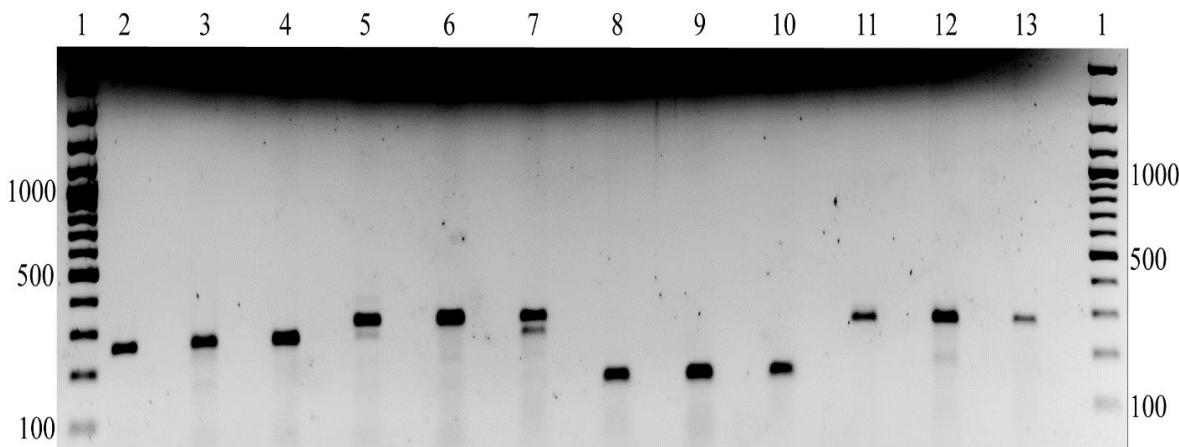
Tako dobimo fragmente različnih dolžin. Pri tej tehniki je bilo ključno, da smo pri reakciji PCR pomnožili samo en alel, da smo lahko spremljali dolžino razrezanih fragmentov na agaroznem gelu.

V prvih nekaj poskusih smo delali prileganje z mešanico DNA netretiranih vzorcev in DNA tretiranih vzorcev, vendar nismo dobili pozitivnih rezultatov. Iz tega smo predvidevali, da je delež tarčnih mutacij nižji, zato smo nadaljnje uporabljali le DNA tretiranih vzorcev, ki smo jih prilegali, tako da bi s tem povečali možnosti, da zaznamo mutacijo.

Na sliki 15 lahko vidimo agarozni gel reakcije z endonukleazo. Uporabili smo DNA mikrospor, v katere smo vnašali različne sgRNA, sgRNA 1.1, 1.2, 6.1, 8.1. S prvo dvema smo ciljali prvi ekson gena *pds*, s sgRNA 6.1 šesti ekson gena in s sgRNA 8.1 osmi ekson gena. Nato smo glede na sgRNA uporabili začetne oligonukleotide za ta eksone in jih s PCR pomnožili. Z istimi začetnimi oligonukleotidi smo pomnožili tudi DNA iz listov oljne ogrščice, ki nam je služila kot kontrola. Na gel smo tako naložili po tri vzorce na oligonukleotid, najprej dva tretirana vzorca, nato pa še kontrolo iz listov, ki smo ji prav tako dodali encim T7E1.

Fragmenti 2-4 so bili pomnoženi z BnDET 1.34 in so dolžine 257 bp, mutacija naj bi se pojavila pri 2 ali 3 pri 191 baznem paru, tako da bi po razrezu dobili fragmenta dolžin 191 in 66 bp. Fragmenti 5-7 so pomnoženi z BnDET 1.56 in so dolžine 300 bp, po razrezu heterodupleksa naj bi dobili fragmente dolge 185 bp in 115 bp. Pri kontroli pod 7 in pri vzorcu 5 lahko vidimo dva dodatna fragmenta pod najmočnejšim, kar bi lahko pomenilo, da se je pomnoževal še drugi alel, kljub visoki temperaturi prileganja. Fragmenti 8-10, ki so bili pomnoženi z BnDET 6, in so dolžine 145 bp, bi bili po razrezu z endonukleazo dolžine 98 in 47 bp. Pri fragmentih 11-13 pa smo pomnožili fragmente z BnDET 8, ki so dolžine 268 bp, po razrezu v primeru mutacije pa bi dobili fragmenta dolžine 195 in 73 bp.

Na agaroznem gelu (slika 15) smo zaznali fragmente pri vzorcu 3 in 12 zgoraj navedenih dolžin. To bi lahko nakazovalo na pozitivne rezultate, vendar bi za praktično uporabo metode tarčne mutageneze, za regeneracijo mutant, potrebovali večji odstotek uspešnosti. Pri ostalih vzorcih pa fragmentov ustreznih dolžin nismo opazili, tako da tarčne mutacije mikrospor z RNP nismo mogli potrditi. Delež transformiranih mikrospor je tako majhen, da ta metoda ni dovolj občutljiva za njihovo zaznavo.



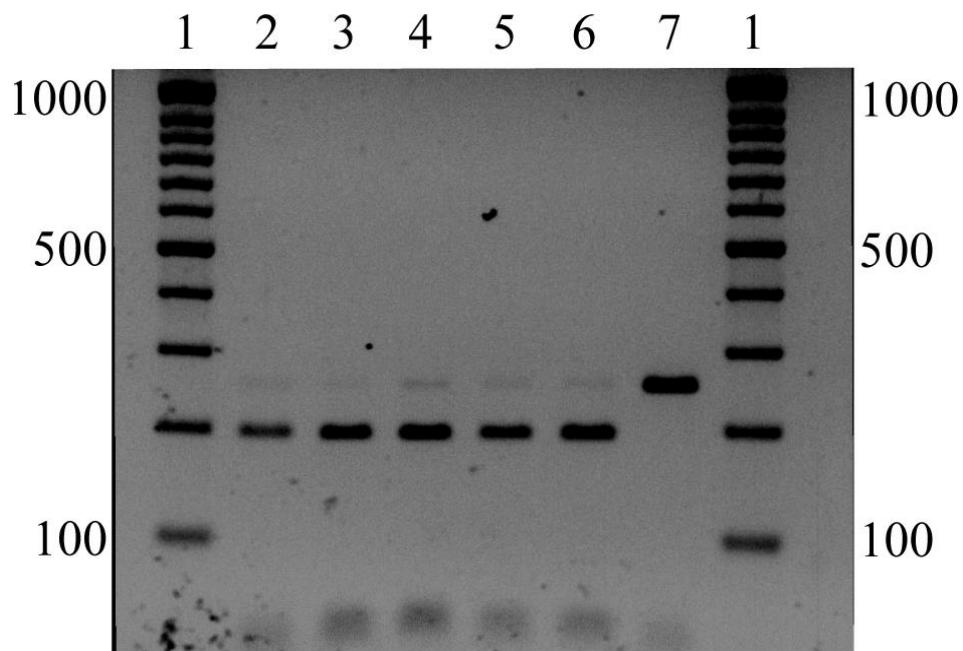
Slika 15: Primer razreza DNA z endonukleazo T7E1. 1. Dolžinski standard; 2, 3, 4- BnDET 1.34; 2, 3: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 1.1, EP 5 in 6; 4: - kontrola; 5, 6, 7, BnDET 1.56; 5, 6: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 1.2, EP 5 in 6; 7: - kontrola; 8, 9, 10- BnDET 6.1; 8, 9: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 6.1, EP 1, 2; 10: - kontrola; 11, 12, 13- BnDET 8; 11, 12: vzorec tretiran s Cas9+sgRNA 8.1, EP 2 in 5; 13: - kontrola.

4.9.3 Restriktični encimi BtgI, BsaWI in HpyCH4V

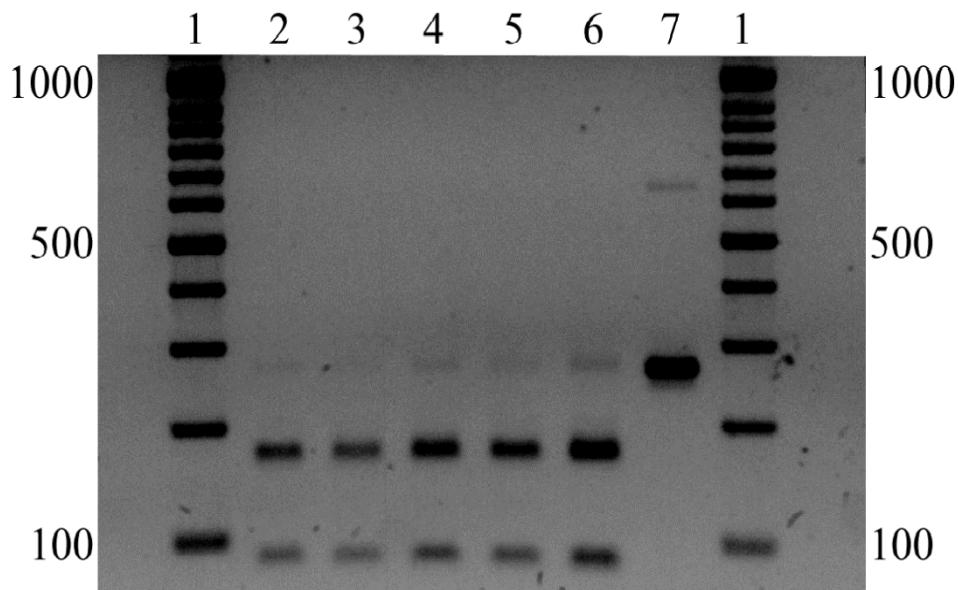
Princip uporabe restriktičnih encimov je znan pod kratico RFLP polimorfizem dolžine restriktičnih fragmentov (angl. *restriction fragment length polymorphism*). Ta princip temelji na uporabi restriktičnih encimov, ki razrežejo DNA na svojem prepoznavnem nukleotidnem zaporedju. Na takšen način je možna hitra identifikacija sprememb na specifičnem delu DNA.

Za naše potrebe smo uporabljali encime, ki imajo vsaj eno prepoznavno mesto na pomnoženi sekvenci. To prepoznavno mesto sovпадa z mestom na sekvenci, kjer Cas9 razreže verigo DNA in se tako ustvari mutacija. Na sekvenci se z mutacijo prepoznavno mesto lahko tako spremeni, da ga restriktični encim ne prepozna več in zato ne pride do razreza te sekvence.

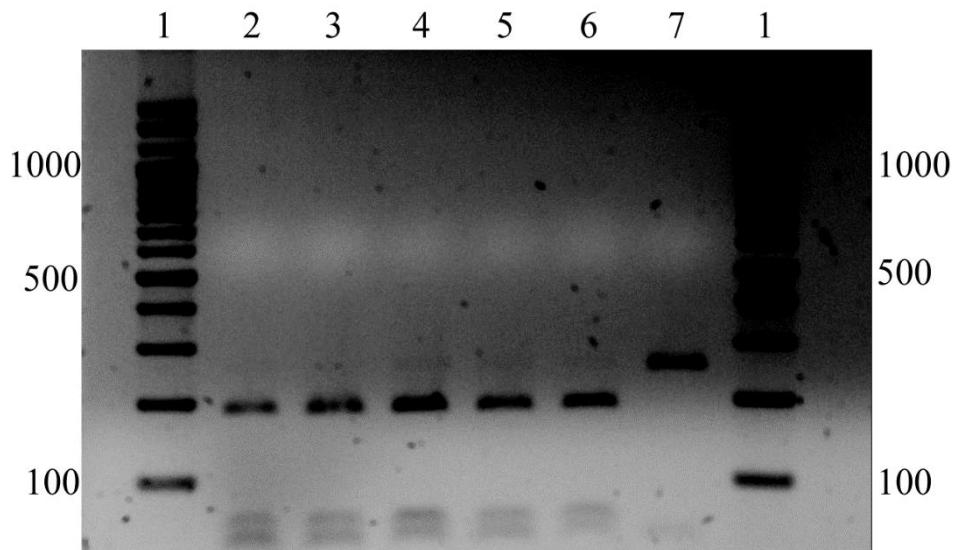
Za kontollo smo vzeli očiščen produkt PCR pomnožen iz DNA ne tretiranih mikrospor. Pomnožen je bil z istimi začetnimi oligonukleotidi kot analizirani vzorci. Na sliki 16 je agarozni gel s fragmenti razrezanimi z restriktičnim encimom BtgI, na sliki 17 pa z BsaWI in na sliki 18 rezultati razreza z HpyCh4V. Pri vseh vidimo pri prvih 4 vzorcih rahle lise fragmentov na isti višini kot nerazrezana kontrola. Vendar pa ima razrezana kontrola pod številko 6 tudi tako liso fragmenta. To bi se lahko zgodilo, če ne bi dodali dovolj encimov, vendar so le-ti bili uporabljeni v prebitku. Druga možnost bi bila napaka pri pomnoževanju PCR, kljub uporabi polimeraze Q5 High-fidelity. Glede na dobljene rezultate ne moremo potrditi uspešnost tarčne mutageneze mikrospor.



Slika 16: Primer analize DNA izoliranih iz mikrospor transformiranih s Cas9+sgRNA 1.1, pomnoženih z BnDET 1.34 in razrezanih z restrikcijskim encimom BtgI. 1- dolžinski standard; 2 do 5 DNA iz tretiranih mikrospor; 6- pozitivna kontrola (DNA iz listov, razrezana z BtgI), 7- negativna kontrola (DNA iz listov, brez dodatka BtgI).



Slika 17: Primer analize DNA izoliranih iz mikrospor transformiranih s Cas9+sgRNA 8.2, pomnoženih z BnDET 8.2 in razrezanih z restrikcijskim encimom BsaWI. 1- dolžinski standard; 2 do 5 DNA iz tretiranih mikrospor; 6- pozitivna kontrola (DNA iz listov, razrezana z BsaWI), 7- negativna kontrola (DNA iz listov, brez dodatka BsaWI).



Slika 18: Primer analize DNA izoliranih iz mikrospor transformiranih s Cas9+sgRNA 1.2, pomnoženih z BnDET 1.56 in razrezanih z restriktičnim encimom HpyCH4V. 1- dolžinski standard; 2 do 5 DNA iz tretiranih mikrospor; 6- pozitivna kontrola (DNA iz listov, razrez z HpyCH4V), 7- negativna kontrola (DNA iz listov, brez dodatka HpyCH4V).

4.9.4 Sekvenciranje po Sangerju

Pri metodi identifikacije tarčne mutageneze s sekvenciranjem po Sangerju prav tako nismo dobili pozitivnih rezultatov z orodjem TIDE. Zaporedja, ki smo ji dobili s sekvenciranjem, niso bila ustrezne kvalitete, da bi lahko algoritmi orodja TIDE zaznali tarčno mutagenezo.

5 RAZPRAVA

Tarčna mutageneza mikrospor, brez vnosa tuje DNA, bi omogočila žlahtniteljem, da se pri pridobivanju hibridov izognejo regulaciji za gensko spremenjene organizme. Za ta namen smo že zeleli vzpostaviti metode vnosa ribonukleoproteinskega kompleksa sgRNA in Cas9 v mikrospore oljne ogrščice *Brassica napus*.

V okviru tega magistrskega dela smo ugotovili, da elektroporacija vpliva na živost mikrospor tako, da z višanjem jakosti električnega polja ($V\text{ cm}^{-1}$) in časa pulza živost mikrospor *Brassica napus* upada. Pri jakosti polja 250 V cm^{-1} pride le do manjših sprememb pri živosti, jakost nad 750 V cm^{-1} pa živost močno zniža. Po 24 urah smo zaznali še dodaten upad živosti (preglednica 14). Jardinaud in sod. (1993) so ugotovili, da $0,5\text{ ms}$ pulzi in jakost polja do 500 V cm^{-1} ne vplivajo na živost. Pri pulzih dolžine 10 ms in jakosti polja nad 500 V cm^{-1} pa živost močno upade, podobno kot pri naših ugotovitvah. Prav tako so ugotovili, da se je živost po 24 urah od elektroporacije še dodatno znižala.

Mikrospore posedujejo nukleazno aktivnost, ki je pri ječmenu močno vplivala na uspešnost vnosa eksogene DNA z elektroporacijo. Vischi in Marchetti, 1997, sta poročala, da mikrospore kljub spiranju posedujejo močno nukleazno aktivnost, ker so sposobne sprotne sinteze nukleaz. Genotipu oljne ogrščice *Brassica napus* L. var. *olifera* cv. Tapidor je bilo nukleazno aktivnost zaznati predvsem pri mladih pelodnih zrnih in tapetumu. Po nekaj zaporednih spiranjih pa je skoraj izginila. Dodatek 1 % PEG ali 10 mM EDTA je pomagal pri zmanjševanju aktivnosti nukleaz (Vischi in Marchetti, 1997; Jardinaud in sod., 1993). Prav tako je na aktivnost nukleaz pri *Brassica napus* ključno vplivala razvojna stopnja celic. Pri celicah v razvojnem stadiju tetrad, iz katerih se razvijejo mikrospore, niso opazili nukleazne aktivnosti, pri enojedernih mikrosporah se je le-ta razvila z daljšim časom inkubacije, pri zrelih pelodnih zrnih pa poročajo o nukleazni aktivnosti ne glede na čas inkubacije (Jardinaud in sod., 1993). V našem primeru smo uporabljali 2 različni gojišči, enemu smo dodali še 2 % PEG, ki naj bi inhibiral delovanje nukleaz. Ugotovili smo, da se manjša sprememba zaradi nukleazne aktivnosti pojavi šele po 20 minutah inkubacije mikrospor s plazmidom in da je po 60 minutah le malo večja ter da smo pri gojišču NLN-13 opazili najmanj sprememb v razgrajenosti fragmentov na agaroznem gelu (slika 8).

V zadnjih 20 letih, ko je pri transformacijah rastlin prevzela glavno vlogo tehnika z uporabo *Agrobacterium tumefaciens*, je bila elektroporacija le redko uporabljen za transformacijo rastlin. Za naše namene neposrednega prenosa RNP-kompleksa brez vnosa tuje DNA metoda z *A. tumefaciens* ni prišla v poštev, zato smo se odločili za uporabo elektroporacije. Po delitvi iz tetrad imajo nastale mikrospore eno jedro in tanjšo celično steno. Nato pa se mikrospora razvije v pelodno zrno s tremi jedri in debelejšo celično steno (Chang in Nueffer, 1989). Zato je transformacija v tej razvojni fazici smiselna, saj ima celica le eno jedro in tanjšo celično steno, ki predstavlja manjšo oviro pri elektroporaciji.

Na embriogenezo moških gamet vpliva mnogo faktorjev, kot so pogoji indukcije, genotip, starost rastline, pogoji gojenja rastlin, razvojna faza celic, sestava gojišča in pH ter koncentracija mikrospor (Murovec, 2013; Rahman in Jimenez, 2016). Med najbolj odzivne genotipe spada *Brassica napus* L. cv. Topas, ki smo jo tudi mi uporabljali. Custers, 2003, poroča, da se pri najboljših kombinacijah pogojev pri temu genotipu rezultati embriogeneze gibajo med 3 in 10 % nastalih embrijev iz kulture mikrospor. V našem primeru je bila uspešnost embriogeneze pri kontroli brez elektroporacije in brez dodatka proteina Cas9 zelo nizka, samo 0,017 %. Najvišja, 0,88 %, pa pri EP 7 z dodatkom proteina Cas9. V treh od štirih pogojev smo videli, da dodatni vnos Cas9 vpliva na zmanjšanje števila embrijev, pri enem primeru pa se je število 6x povečalo. Če izvzamemo vpliv mnogih faktorjev na regeneracijo v embrije in vpliv tehnične izvedbe, bi lahko trdili, da elektroporacija pozitivno vpliva na androgenoze, najbolje pri elektroporacijskih pogojih s trajanjem pulza 0,5 ms. Lahko bi predvidevali, da se z elektroporacijo poveča vsebnost hranil v celici brez potrebnega črpanja preko membranskih črpalk, za to se ne porabi energija, ki pa je v veliki meri potrebna za reprogramiranje mikrospor v embriogenezo. Daleč najmanj odzivne na androgenoze so bile namreč ne-elektroporirane mikrospore. Pri Ochatt in sod. (2009) so ugotovili, da pri mikrosporah treh različnih sort graha, elektroporacija pozitivno vpliva na androgenetsko kompetenco, uporabljali so večkratne pulze z jakostjo 1000 in 1500 V cm⁻¹ v kombinaciji z različnimi osmotskimi šoki.

Elektroporacija za vnos plazmidne DNA v mikrospore in protoplaste je bila uspešna za transformacijo različnih rastlinskih vrst, npr. riža, koruze, oljne ogrščice in soje. Pri elektroporaciji mikrospor so bili uspešni za vnos plazmidov pri koruzi in oljni ogrščici (Fennell in Hauptmann, 1992; Jardinaud in sod., 1993). Pri Jardinaud in sod. (1993) so zaznali tudi do tridesetkrat večjo ekspresijo *gus* gena, z metodo identifikacije proteinov, v primerjavi s kontrolo ozadja pri pogojih elektroporacije 10 ms in 250 V cm⁻¹ s plazmidom Zmg 13, pri pogoju 0,5 ms in 750 V cm⁻¹ pa do 7x večjo v primerjavi s kontrolo. Pri uporabi gojišča BK brez dodatka PEG pa aktivnosti niso zaznali. Naši rezultati, pridobljeni s histokemičnim testom za določanje aktivnosti glukoronidaze, so se razlikovali od rezultatov Jardinaud in sod. (1993) in niso pokazali nobene aktivnosti pri kontroli. Transformacija je bila uspešna pri elektroporacijskih pogojih 1, 3 in 7. Pri EP 7 (10 ms, 250 V cm⁻¹) smo jo zaznali tako v gojišču BK kot BK + 2 % PEG, v prvem primeru je bil delež transformiranih celic 1 %, v drugem pa 2 %. Najvišji delež je bil 4 % transformiranih celic pri gojišču BK+ 2 % PEG, pri EP 3 (0,5 ms, 250 V cm⁻¹). Kljub uspešnem vnosu plazmida pa ne moremo sklepati o uspešnosti vnosa RNP, saj gre za vnos 2 različnih makromolekul in za različno puferско okolje. Pri vnosu RNP v mikrospore smo se tako odločili za uporabo elektroporacijskih parametrov 1, 2, 5 in 7 (preglednica 2), ker zajemajo območje visoke živosti in nizke permeabilizacije in nizke živosti ter visoke permeabilizacije membrane, hkrati pa sta elektroporacijska parametra 1 in 7 vodila tudi v uspešno transformacijo z genom *gus*.

Himera crRNA in tracrRNA je sgRNA, ki smo jo *in vitro* sintetizirali sami. Pripravljali smo jo na dva različna načina in preverjali kateri način čiščenja med koraki sinteze da najboljše rezultate. Pri dveh načinih priprave matrične DNA, preko prileganja oligonukleotidov in s PCR, smo dobili skoraj enake koncentracije. Glede na to, smo se odločili za nadaljnjo uporabo sinteze matrice preko prileganja oligonukleotidov, saj je metoda nekoliko hitrejša.

Postopek sinteze sgRNA je zelo občutljiv, ker pride ob prisotnosti ribonukleaz do takojšnje razgradnje RNA. Tekom celotne sinteze smo tako morali paziti, da smo uporabljali materiale in tekočine brez nukleaz. Proizvajalec kita, ki smo ga uporabljali za sintezo sgRNA, priporoča čiščenje matrične DNA za večje izkoristke sinteze in čiščenje sgRNA z DNazo I za odstranitev DNA matrice in nadaljnje čiščenje za odstranitev proteinov in prostih nukleotidov. Čiščenje je zelo pomembno za samo uspešnost sinteze in za nadaljnjo uporabo, vendar je negativno predvsem to, da se velike količine produktov pri tem izgubijo, kar smo prikazali tudi na agaroznem gelu (slika 11).

Za čiščenje v posameznih korakih smo uporabljali različne metode in jih primerjali med sabo. Ugotovili smo, da je čiščenje po klasični metodi s kloroform izoamilalkoholom za DNA in s fenol kloroform metodo za sgRNA bilo v našem primeru najuspešnejše, saj smo dobili primerljive koncentracije pri dveh različnih tipih sgRNA, ena z dodatkom enega gvanina za zaporedjem promotorja, in druga z dvema gvaninoma. Čiščenje s kiti ni pokazalo bistveno boljših rezultatov. Kontrola pri sintezi je bila DNA lineariziranega plazmida FLuc dolžine 1,8 kbp. Kontrola je doseгла najvišjo koncentracijo, za kar je lahko vzrok predvsem dolžina 1,8 kbp v primerjavi z vzorci, ki so dolžine okoli 100bp. Prav tako pa ima na 5' koncu T7 promotorja še dodanih okoli 20 bp, ki omogočajo boljše prileganje RNA polimeraze in za T7 promotorjem še dodatne 3 gvanine, ki izboljšajo izkoristek sinteze.

Za velike razlike med koncentracijami (preglednica 15) bi lahko bile vzrok nečistoče, ki negativno vplivajo na delovanje polimeraze, pri različnih načinu čiščenja. Za boljše izkoristke sinteze bi bilo morda potrebno dodatno čiščenje. Glede na velike razlike med koncentracijami istih vzorcev pri merjenju z NanoVue in bioanalizatorjem Agilent, pa gre predvsem za razliko v točnosti meritev pri posamezni napravi in prav tako tehnični izvedbi obeh. Vzorce sgRNA, ki so imeli visoko koncentracijo in manjšo razgrajenost, smo nadaljnje uporabljali za *in vitro* razreze in vnos RNP v mikrospore. Razgrajenost je bila po analizi na Agilentu najmanjša pri tistih sgRNA, ki so imele dva gvanina za zaporedjem promotorja T7.

Pred uporabo sgRNA in proteina Cas9 v mikrosporah smo naredili še *in vitro* test, da smo ugotovili, če pride do razreza tarčnega zaporedja. Ugotovili smo, da sta sgRNA 1.1 in sgRNA 1.2, ki imata komplementarni zaporedji na prvem eksonu gena *pds*, primerni za uporabo. Vezava v kompleks s Cas9 je bila uspešna, zato sta lahko nukleazni domeni proteina razrezali tarčno DNA.

Woo in sod. (2015), so uspeli v protoplaste s pomočjo transformacije s PEG vnesti RNP. Uporabljali so protoplaste navadnega repnjakovca *Arabidopsis thailana*, riža *Oryza sativa*, solate *Lactuca sativa* in tobaka *Nicotiana attenuata*. Za transfekcijo so uporabili med 2- 20 µg Cas9 in 20- 120 µg sgRNA za 1×10^5 protoplastov, predhodno so ju inkubirali 10 minut na sobni temperaturi. 24 ur po transfekciji so začeli z identifikacijo mutacij, saj RNP deluje takoj ob vstopu v celico in povzroči mutacije še pred zaključkom celotnega celičnega cikla delitve. S pomočjo endonukleaze T7 in NGS so potrdili prisotnost tarčnih mutacij v deležih med 17 in 23 %, pri regeneriranih pa do 46 %. S pomočjo sekvenciranja so preverjali tudi netarčne razreze DNA in ugotovili, da se so ti pojavljali na mestih, kjer so se zaporedja razlikovala od tarčnega za 2 do 5 nukleotidov. Z regeneracijo solate so potrdili, da so vnesli tarčne mutacije, ki se dedujejo v naslednje generacije.

Za vnos RNP v mikrospore smo uporabljali različne pogoje elektroporacije, ter vsaj 2 tehnični ponovitvi za vsak pogoj. Uporabljali smo različna molarna razmerja med proteinom in sgRNA ter različne pufre. Po identifikaciji mutacij z endonukleazo T7, PCR-RFPL metodo z različnimi restriktijskimi encimi in sekvenciranjem, mutacij nismo mogli potrditi pri nobeni izmed preizkušenih kombinacij. Pri vzorcih 3 in 12 (slika 15) smo dobili fragmente, ki bi glede na dolžino lahko nakazovali na pozitiven rezultat. Za praktično uporabnost te metode, za regeneracijo mutant, pa bi potrebovali bistveno večji odstotek uspešnosti in zato nadaljnjo optimizacijo.

Uspešnost vnosa plazmida z genom *cat* z elektroporacijo je bila pri mikrosporah koruze 7 % (Fennell in Hauptmann, 1992). Pri ječmenu pa so potrdili uspešnost elektroporacije za vnos propidijevega iodida v 5 do 17 % mikrospor ječmena (Joersbo in sod., 1990). Pri mikrosporah oljne ogrščice so potrdili uspešnost elektroporacije, vendar le kot aktivnost encima, ki ga je plazmid kodiral, ne pa glede na število mikrospor (Jardinaud in sod., 1993). Glede na nizko uspešnost elektroporacije pri mikrosporah, lahko sklepamo, da je bila tudi v našem primeru, če je do uspešnega vnosa RNP prišlo, ta delež zelo nizek.

Pri mikroalgi *Chlamydomonas reinhardtii*, ki ima celično steno, so z elektroporacijo uspeli vnesti mutacije s CRISPR/Cas9 preko RNP za povečanje fotosintetske aktivnosti in konstitutivno izražanje zeaksantina. Za 5×10^5 celic so uporabili 200 µg proteina Cas9 in 140 µg sgRNA. Cas9 je bil raztopljen v pufru (20 mM HEPES pH 7.5, 150 mM KCl, 1 mM DTT, in 10 % glicerol), ki so mu dodali sgRNA, raztopljeno v vodi brez nukleaz ter ju inkubirali 10 minut na sobni temperaturi, nato pa elektroporirali po ustaljenem protokolu. Mutacije so identificirali z NGS na platformi Illumina MiSeq in ugotovili 0,56 % uspešnost mutacij pri genu *cpfts* in 0,46 % uspešnost mutacij pri genu *zep* (Baek in sod., 2016).

Kolikor nam je znano, vnos RNP še ni bil uspešen pri mikrosporah. Mikrospore so zaradi možnosti razvoja v embrije zelo zanimive za genski inženiring na takšen način, vendar je

potrebno metodo vnosa RNP dodatno optimizirati. Elektroporacija omogoča vnos le pri majhnem deležu mikrospor, v našem primeru smo dosegli 4 % vnos plazmida GUS. Največji znan vnos preko celične stene in membrane je bil pri mikrosporah ječmena 17 %, kjer s vnašali molekule propidijevega jodida (Joersbo in sod., 1990). Pri mikroalgi, ki ima celično steno, je bila uspešnost vnosa RNP z optimiziranimi pogoji največ le 0,56 % (Baek in sod., 2016). Uspešnost vnosa v protoplaste s transfekcijo s PEG pa težko primerjamo, saj gre za drugačen način vnosa in celice brez celične stene.

Metode, ki smo jih uporabljali za detekcijo, niso najbolj občutljive in nimajo sposobnosti zaznavanja tako nizkih deležev tarčnih mutacij, kot so jih zasledili pri mikroalgi. Pri dveh vzorcih po razrezu z endonukleazo T7EI smo opazili fragmente ustreznih dolžin, ki bi lahko nakazovali na tarčno mutagenezo mikrospor. Vnos RNP bi lahko z gotovostjo potrdili in ga kvantificirali z drugimi, bolj občutljivi tehnikami, kot so analiza talilne krivulje visoke ločljivosti HRM (angl. *high resolution melt*), ki zazna mutacije in polimorfizme na podlagi talilne krivulje dvoverižne DNA, ali z NGS, ki omogoča branje zaporedja posameznih molekul DNA.

6 SKLEPI

Cilj magistrske naloge je bil vzpostavitev metode vnosa ribonukleoproteinskega kompleksa sgRNA in Cas9 v mikrospore oljne ogrščice *Brassica napus*. Na takšen način smo želeli vzpostaviti način tarčne mutageneze brez vnosa tujih DNA v celice. V ta namen smo vzpostavili konstantne pogoje za gojenje rastlin in optimizirali izolacijo mikrospor ter preverili nukleazno aktivnost. Z vnosom plazmida in identifikacijo aktivnosti njegovega izražanja z elektroporacijo smo pridobili ustrezne elektroporacijske pogoje, ki so bile uporabne za nadaljnjo uporabo pri vnosu RNP. Preverili smo tudi vpliv elektroporacijskih pogojev na živost, z ali brez dodatka proteina Cas9, ter prišli do nepričakovanih zaključkov, da elektroporacija stimulativno deluje na embriogenezo.

Pri pripravi sgRNA smo določili najustreznejše načine čiščenja in vzpostavili način preverjanja aktivnosti RNP *in vitro* pred uporabo v mikrosporah. Cilj našega dela je bila vzpostavitev metode za vnos RNP za tarčno mutagenezo, vendar uspešnosti transformacije ne moremo z gotovostjo potrditi. Za potrditev tarčne mutageneze bi bila potrebna identifikacija mutacij z bolj občutljivimi metodami. Za praktično uporabnost te metode, za regeneracijo mutant, bi potrebovali višji odstotek uspešnosti in zato nadaljnjo optimizacijo elektroporacije.

7 POVZETEK

Oljna ogrščica spada v skupino najpomembnejših oljnic sveta. Poleg tega je modelna rastlina za raziskovanje androgeneze, ki omogoča pridobivanje haploidov in podvojenih haploidov. Rastline nastale iz moških gamet predstavljajo homozigotne linije, ki se uporabljajo za pridobivanje hibridov in v druge namene žlahtnjenja rastlin.

Vnos sprememb v genom je pri rastlinah vedno pomembnejši zaradi mnogih rastlinski škodljivci, bolezni, ki jih pestijo in predvsem zaradi naraščanja svetovnega prebivalstva in s tem naraščanje potreb po večji pridelavi in izboljšanih lastnosti rastlin. V zadnji letih se je razvila nova metoda vnosa genskih mutacij CRISPR/Cas9, ki je zaradi svoje natančnosti, hitrosti in ekonomske ugodnosti, vedno bolj zanimiva za uporabo. Novi načini za spremenjanje genov rastlin so potrebni predvsem zaradi negativnega pogleda na gensko spremenjene rastline, zato so začeli razvijati alternativni način vnosa čistega proteina Cas9 in sgRNA. Ker pri tem postopku ni vnosa tuje DNA v obliki plazmidov, je tarčna mutageneze enaka tisti v naravi, zato naj ne bi te rastline sodile v kategorijo gensko spremenjenih rastlin.

Vzpostavitev metode vnosa sistema CRISPR/Cas9 v mikrospore bi žlahnjiteljem omogočila, da bi na hitrejši in ekonomsko ugodnejši način pridobivali rastline s spremenjenimi lastnostmi, in se poleg tega izognili strogim predpisom za gensko spremenjene organizme. Pri tej metodi vnosa tarčnih mutacij brez tuje DNA je potrebna nadaljnja optimizacija metod vnosa in uporaba občutljivih metod detekcije, ki pa ekonomsko ugoden sistem precej podražijo.

8 VIRI

- Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. 2014. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 513: 569–573
- Baek K., Kim D. K., Jeong J., Sim S. J., Melis A., Kim J., Jin E. O., Bae S. 2016. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Science Report*, 6: e30620, doi:10.1038/srep30620: 7 str.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D. A., Horvath P. 2007. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315: 1709–1712
- Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S., Patron N. J., Nekrasov V. 2015. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Current Opinion in Biotechnology*, 32: 76-84
- Bibikova M., Golic M., Golic K. G., Carroll D. 2002. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics*, 161: 1169–1175
- Bortesi L., Fischer R. 2015. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances*, 33: 41-52
- Brewbaker J. L., Kwack B. H. 1963. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth. *American Journal of Botany*, 50: 859-865
- Cavanagh P., Garrity A. 2014. CRISPR Mechanism, CRISPR/Cas9. Medford, Tufts University.
<https://sites.tufts.edu/crispr/crispr-mechanism/>(15.11.2016)
- Chang M. T., Neuffer M. G. 1989. Maize microsporogenesis. *Genome*, 32: 232-244
- Cho S. W., Lee J., Carroll D., Kim J. S. 2013. Heritable gene knock out in *Caenorhabditis elegans* by direct injection of Cas9-sgRNA ribonucleoproteins. *Genetics*, 195, 3: 1177–1180
- Custers J. 2003. Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). V: Doubled haploid production in crop plants. Maluszynski M., Kasha K. J., Forster B. P., Szarejko I. (ur.). Dordrecht, Kluwer Academic Publishers: 185–193
- Custers, J. B. M., Cordewener J. H. G., Fiers M. A., Maassen B. T. H., Van Lookeren Campagne M. M., Liu C. M. 2001. Androgenesis in Brassica: a model system to study the initiation of plant embryogenesis. V: Current trends in the embryology of angiosperms. Bhojwani S. S., Soh W. Y. (ur.). Amsterdam, Kluwer Academic Publisher: 451-470
- Custers J. B. M., Cordewener J. H. G., Nöllen Y., Dons J. J., Van Lookeren-Campagne M. M. 1994. Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of *Brassica napus*. *Plant Cell Reports*, 13: 267–271
- Doudna J. A., Charpentier E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346, 6213: e1258096, doi: 10.1126/science.1258096: 11 str.
- FAO: Food outlook, Biannual report on global food markets. 2016. Food and agriculture Organization of the United Nations.
www.fao.org/publicatons (2. nov. 2016)

- Fennell A., Hauptmann R. 1992. Electroporation and PEG delivery of DNA into maize microspores. *Plant Cell Reports*, 11: 567-70
- Gagnon, J. A., Valen E., Thyme S. B., Huang P., Akhmetova L., Pauli A., Montague T. G., Zimmerman S., Richter C., Schier A. F. 2014. Efficient mutagenesis by Cas9 protein-mediated oligonucleotide insertion and large-scale assessment of single-guide RNAs. *PLoS One*, 9, 8: e98186, doi: 10.1371/journal.pone.0106396: 8 str.
- Gaj T., Gersbach C. A., Barbas C. F. 2013. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology*, 31: 397-405
- Gao J., Wang G., Ma S., Xie X., Wu X., Zhang X., Wu Y., Zhao P., Xia Q. 2014. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 87: 99, doi:10.1007/s11103-014-0263-0: 12 str.
- Guha S., Maheshwari S. C. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature*, 204, 4957: 497
- Guha S., Maheshwari S. C. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. *Nature*, 212: 97-98
- Gunstone F. D. 2004. Rapeseed and canola oil: Production, processing, properties and uses. London, Blackwell Publishing: 240 str.
- Harrison M. M., Jenkins B. V., O'Connor-Giles K. M., Wildonger J. 2014. A CRISPR view of development. *Genes & Development*, 28: 1859–1872
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. 1987. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of Bacteriology*, 169: 5429–5433
- Jardinaud M. F., Souvrer A., Alibert G. 1993. Transient GUS gene expression in *Brassica napus* electroporated microspores. *Plant Science*, 93, 1-2: 117-184
- Jefferson J. A. 1987. Assaying chimeric genes in plants - The GUS gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 4: 387-405
- Jiang W., Zhou H., Bi H., Fromm M., Yang B., Weeks D. P. 2013. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research*, 41: e188, doi: 10.1093/nar/gkt780: 12 str.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337: 816–821
- Jinek M., Jiang F., Taylor D. W., Sternberg S. H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A. T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J. A. 2014. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation. *Science*, 343, 1247997, doi: 10.1126/science.1247997: 28 str.
- Joersbo M., Jørgensen R. B., Olesen P. 1990. Transient electropermeabilization of barley (*Hordeum vulgare* L.) microspores to propidium iodide. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 23: 125-129

- Joosen R., Cordewener J., Supena E. D., Vorst O., Lammers M., Maliepaard C., Zeilmaker T., Miki B., America T., Custers J., Boutilier K. 2007. Combined transcriptome and proteome analysis identifies pathways and markers associated with the establishment of rapeseed microspore-derived embryo development. *Plant Physiology*, 144: 155-172
- Kanchiswamy C. N. 2016. DNA-free genome editing methods for targeted crop improvement. *Plant Cell Reports*, 35: 1469-1474
- Kanchiswamy C. N., Malnoy M., Velasco R., Kim J. S., Viola R. 2015. Non-GMO genetically edited crop plants. *Trends in Biotechnology*, 33, 9: 489-491
- Kim S., Kim D., Cho S. W., Kim J., Kim J. S. 2014. Highly efficient RNA guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Research*, 24, 6: 1012–1019
- Lee J. S., Kwak S. J., Kim J., Kim A. K., Noh H. M., Kim J. S., Yu K. 2014. RNA-guided genome editing in *Drosophila* with the purified Cas9 protein. *Genes | Genomes | Genetics*, 4, 7: 1291–1295
- Li J. F., Norville J. E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G. M., Sheen J. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nature Biotechnology*, 31: 688–691
- Liang X., Potter J., Kumar S., Zou Y., Quintanilla R., Sridharan M., Carte J., Chen W., Roark N., Ranganathan S., Ravinder N., Chesnut J. D. 2015. Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *Journal of Biotechnology*, 208: 44–53
- Liang Z., Zhang K., Chen K., Gao C. 2014. Targeted mutagenesis in *Zea mays* using TALENs and the CRISPR/Cas system. *The Journal of Genetics and Genomics*, 41: 63-68
- Lichter R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 105: 427-434
- Maček-Lebar A., Serša G., Čemažar M., Miklavčič D. 1998. Elektroporacija. Medicinski Razgledi, 37: 339-354
- Martin-Ortigosa S., Peterson D. J., Valenstein J. S., Victor S.-Y. Lin, Brian G. Trewyn L. Alexander Lyznik, and Kan Wang. (2014) Mesoporous silica nanoparticle-mediated intracellular cre protein delivery for maize genome editing via loxP site excision. *Plant Physiology*, 164: 537–547
- Mojica F. J., Diez-Villasenor C., Soria E., Juez G. 2000. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Molecular Microbiology*, 36, 1: 244-246
- Montague T. G., Cruz J. M., Gagnon J. A., Church G. M., Valen E. 2014. CHOPCHOP: a CRISPR/Cas9 and TALEN web tool for genome editing. *Nucleic Acids Research*, 42: 401-407
- Murovec J. 2013. Techniques for haploid and doubled haploid production. *Acta Agriculturae Slovenica*, 101: 293-307

NEB #E2050. sgRNA synthesis using the HiScribe™ quick T7 high yield RNA synthesis kit. New England Biolabs.

<https://www.neb.com/protocols> (november, 2015)

NEB #M0419. Q5® High-Fidelity DNA polymerases. New England Biolabs.

<https://www.neb.com/protocols> (november, 2016)

Nekrasov V., Staskawicz B., Weigel D., Jones J. D., Kamoun S., 2013. Targeted mutagenesis in the model plant *Nicotiana benthamiana* using Cas9 RNA-guided endonuclease. *Nature Biotechnology*, 31: 691-693

Nishimasu H., Ran, F. A., Hsu, P. D., Konermann S., Shehata S. I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 156, 5: 935–949

Ochatt S., Pech C., Grewal R., Conreux C., Lulsdorf M., Jacas L. 2009. Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legumes species (*Fabaceae*). *Journal of Plant Physiology*, 166: 1314-1328

Prem D., Solís M. T., Bárány I., Rodríguez-Sanz H., Risueño M. C., Testillano P. S. 2012. A new microspore embryogenesis system under low temperature which mimics zygotic embryogenesis initials, expresses auxin and efficiently regenerates doubled-haploid plants in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, 12: e127, doi:10.1186/1471-2229-12-127: 19 str.

Qin G., Gu H., Ma L., Peng Y., Deng X. W., Chen Z., Qu L. J. 2007. Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 17: 471-482

Rahman M., Jiménez M.. 2016. Behind the scenes of microspore-based double haploid development in *Brassica napus*: A review. *Journal of Plant Science and Molecular Breeding*, 5: 1, doi: 10.7243/2050-2389-5-1: 9 str.

Schaeffer S. M., Nakata P. A. 2015. CRISPR/Cas9-mediated genome editing and gene replacement in plants: Transitioning from lab to field. *Plant Science*, 240: 130-142

Schiml S., Fauser F., Puchta H. 2014. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *The Plant Journal*, 80, 6: 1139-1150

Shan Q., Wang Y., Li J., Zhang Y., Chen K., Liang Z., Zhang K., Liu J., Xi J. J., Qiu J. L. Gao C., 2013. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 31: 686-688

Song K. M. , Osborn T. C., Williams P.H. 1988. Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theoretical and Applied Genetics*, 75: 784-794

Soriano M., Li H., Boutilier K. 2013. Microspore embryogenesis: establishment of embryo identity and pattern in culture. *Plant Reproduction*, 26: 181-196

Sternberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, 507, 7490: 62–67

- Subburaj S., Chung S. J., Lee C., Ryu S. M., Kim D. H., Kim J. S., Bae S., Lee G. J. 2016. Site-directed mutagenesis in *Petunia x hybrida* protoplast system using direct delivery of purified recombinant Cas9 ribonucleoproteins. *Plant Cell Reports*, 35: 1535-1544
- Sung Y. H., Kim J. M., Kim H. T., Lee J., Jeon J., Jin Y., Choi J. H., Ban Y. H., Ha S. J., Kim, C. H., Lee H. W., Kim J. S. 2014. Highly efficient gene knockout in mice and zebra fish with RNA-guided endonucleases. *Genome Research*, 24, 1: 125–131
- Thomas E., Wenzel G. 1975. Embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. *Pflanzenzüchtung*, 74: 77-81
- TIDE. Tracking of indels by Decomposition. Amsterdam, Netherlands cancer institute. <https://tide.nki.nl/> (25.okt.2016)
- Touraev A., Fink C.S., Stoger E., Heberle-Bors E. 1995. Pollen selection: a transgenic reconstruction approach. *Plant Biology*, 92: 12165-12169
- Vischi M., Marchetti S. 1997. Strong extracellular nuclease activity displayed by barley (*Hordeum vulgare* L.) uninucleate microspores. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 185-190
- Woo J. W., Kim J., Kwon S. I., Corvalan C., Cho S. W., Kim H., Kim S. G., Kim S. T., Choe S., Kim J. S. 2015. DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nature Biotechnology*, 33, 11: 1162–1164
- Xie K., Yang Y. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*, 6: 1975–1983
- Xu L., Najeeb U., Tang G. X., Gu H. H., Zhang G. Q., He Y., Zhou W. J. 2007. Haploid and doubled haploid technology. V: Advances in botanical research: Rapeseed breeding. Gupta S.K. (ur.). San Diego, Academic Press/Elsevier: 181-216

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici dr. Jani Murovec, ki me je tekom celotnega magistrskega dela usmerjala, tako pri delu v laboratorju kot pri prenosu rezulatov v pisno obliko. Zelo sem ji hvaležna tudi za razumevanje, prijaznost in vse življenske nasvete.

Zahvaljujem se tudi recenzentki dr. Kristini Gruden za temeljit pregled in konstruktivne predloge.

Zahvala gre Odseku za sintezno biologijo in imunologijo Kemijskega inštituta v Ljubljani, še posebej Dušku Lainščku, ker so mi omogočili narediti del naloge pri njih.

Zahvaljujem se vsem iz Katedre za genetiko, biotehnologijo, statistiko in žlahtnjenje rastlin, ker ste mi tekom magistrskega dela pomagali in bili vedno odlična družba.

Posebej pa bi se rada zahvalila moji družini, fantu in prijateljem, saj mi vedno stojite ob strani in me spodbujate.