

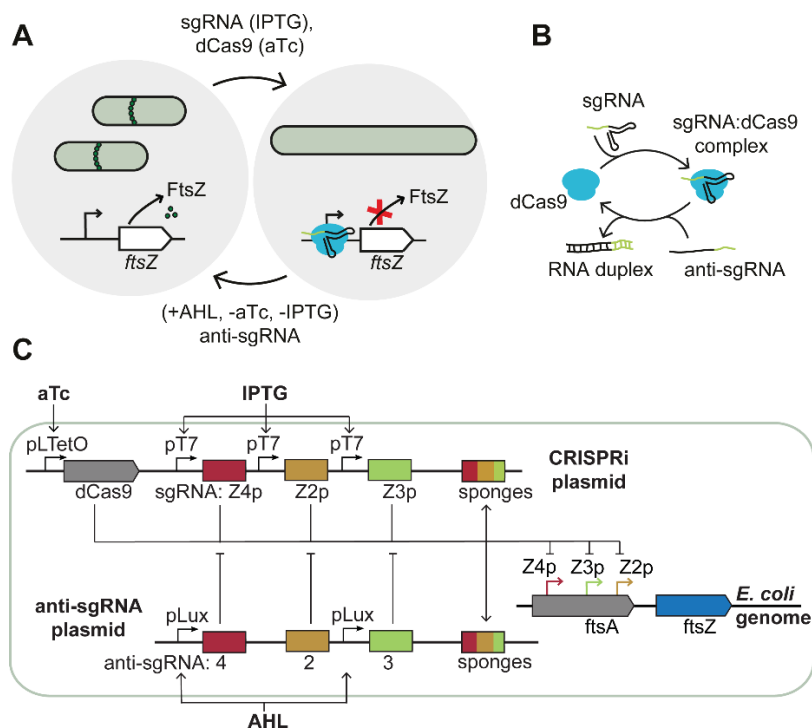
Úloha 3: Blokování tvorby septa u *E. coli* pomocí CRISPR-Cas9

Teoretický úvod

Cílem úlohy je umlčení genu *ftsZ* pro tvorbu septa u *E. coli* pomocí systému CRISPR-Cas9 (Obr. 1). CRISPR interference (CRISPRi) využívající dCas9-sgRNA je účinným nástrojem genetického inženýrství. V této úloze demonstrujeme úpravu klíčového procesu v bakteriálním buněčném cyklu pomocí CRISPRi.

Experiment vychází z publikace Muckl et al., 2018 (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0198058>).

Článek pro samostudium.



Obrázek 1: Schématické znázornění interference gRNA a umlčení exprese genu *ftsZ* vedoucí k defektu ve tvorbě septa.

MATERIÁL:

Bakteriální kultury: *Escherichia coli* BL21 DE3 (pΔCas9_T7_ftsZ) – expresní systém obsahující vektor s mezerníkem cílícím na gen *ftsZ*, pozitivní kontrola; *Escherichia coli* DH5α – příprava kompetentních buněk; *Escherichia coli* BL21 - příprava kompetentních buněk

Plazmidová DNA: pΔCas9_T7_ztfs), *Escherichia coli* DH5α (pΔCas9_T7) - vektor odvozen dle Chen et al., 2017 - <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jacs.6b13317>

Antibiotika: Chloramfenikol (výsl. konc. 25 µg/ml); Tetracyklin (výsl. konc. 10 µg/ml)

PCR primery, oliga: CRISPR Spacer FtsZ: Oligo1_F: **GAACTGGAAGATATCGACCTGTC**; Oligo2_R: **AAACGACAGGTCGATATCTTCCAG**

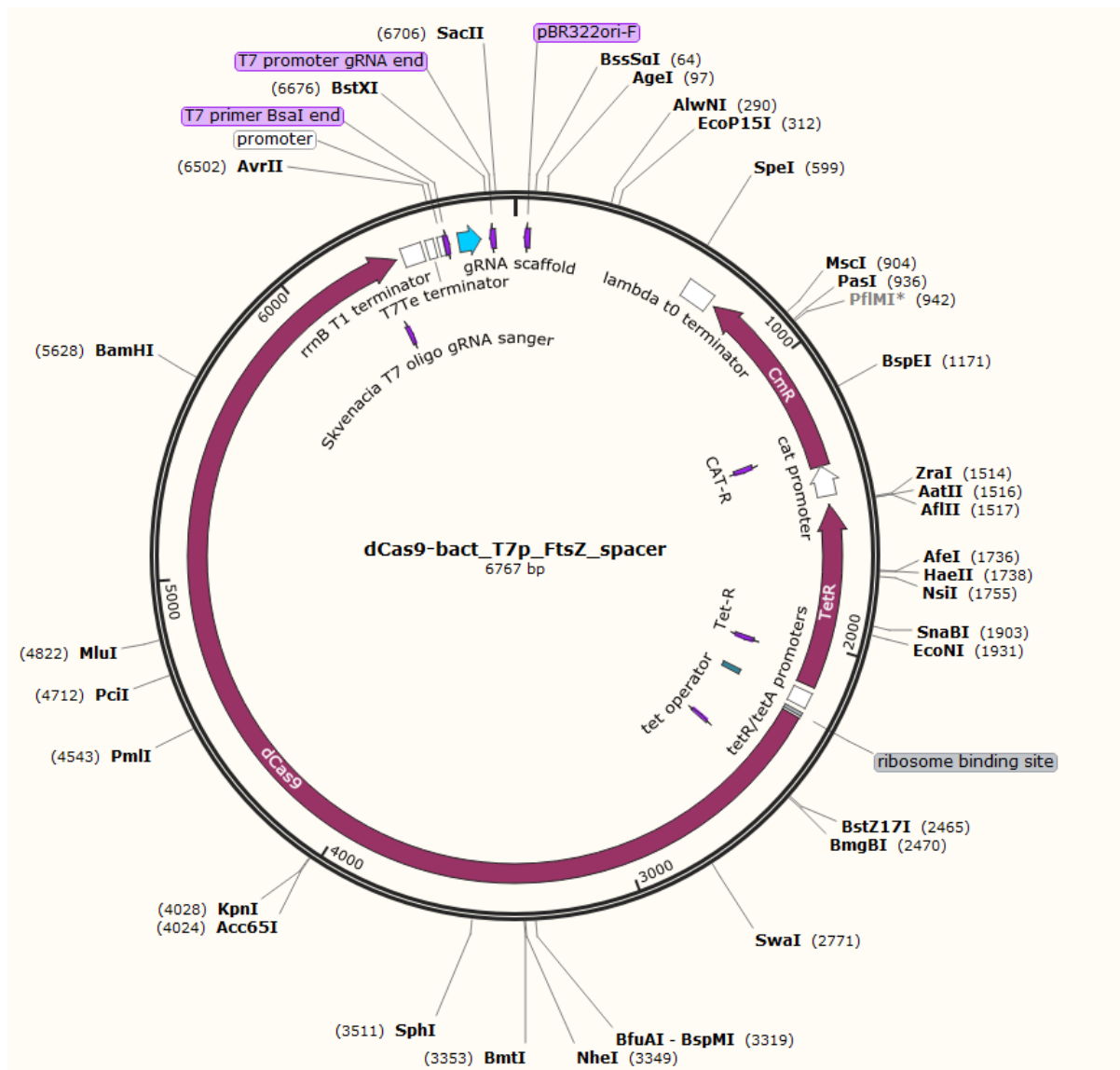
Média: 5×25 ml LB

Postup práce v bodech:

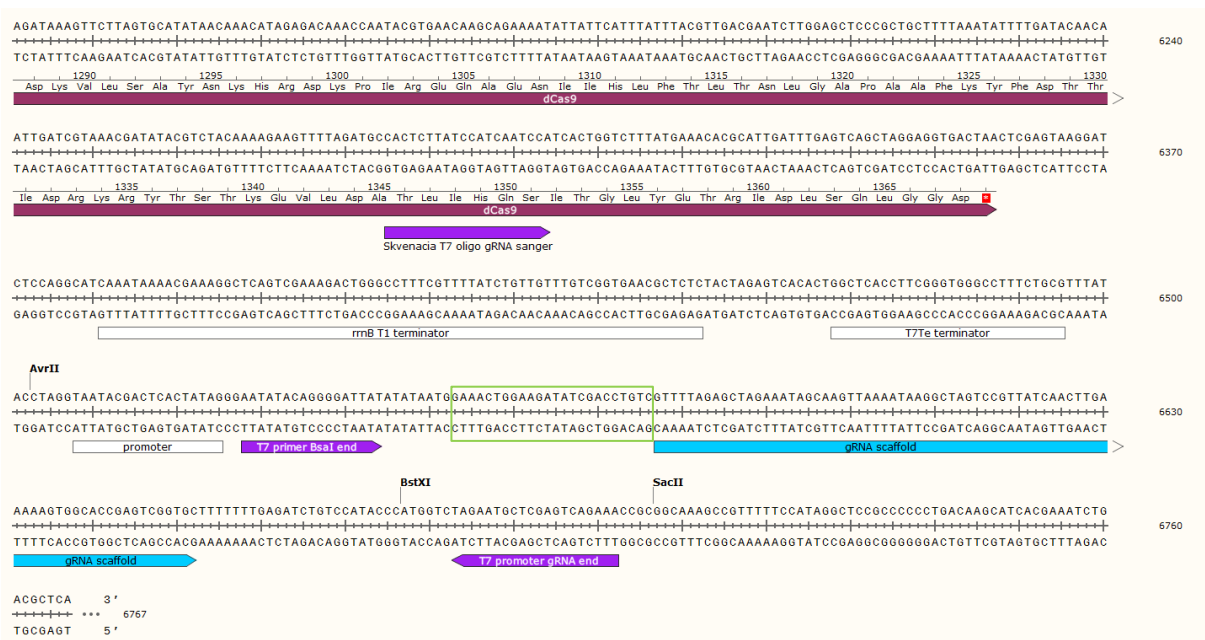
- I. Výchozím materiálem je plazmidová DNA **pΔCas9_T7** (vektor pro Cas9 editaci bez mezerníku, **Obr. 2**), kompetentní buňky *E. coli* **DH5α** a *E. coli* **BL21**.
- II. Vložení mezerníku do **pΔCas9_T7**: štěpení vektoru, vyřezání z gelu, spojení olig (mezerník), ligace
- III. Transformace upraveného vektoru (pΔCas9_T7_ztfs) do *E. coli* BL21, selekce na chloramfenikolu
- IV. Ověření transformant pomocí „colony PCR“
- V. Indukce exprese
- VI. Mikroskopie

Obr. 2: Vektoru pΔCas9_T7 s naklonovaným mezerníkem pro editaci tvorby septa cílic na gen *ftsZ*. A. Schématická mapa vektoru s hlavními funkčními částmi. **B.** Detail sekvence vkládaného mezerníku (zelený obdélník) a gRNA.

A.



B.



I. Příprava kompetentních buněk *E. coli*

- 25 ml LB zaočkujeme 1/10 objemu startovací přes noční kultury (2,5 ml), necháme růst do $OD_{600} = 0,27-0,33$ při třepání a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 – 2 hodiny).
- Necháme na ledu cca 10 min.
Od tohoto bodu pracujeme při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifugační zkumavky i rotory centrifug předchladíme.
- Centrifugujeme 10 min/3000g/4°C.
- Odstraníme supernatant, sediment resuspendujeme vortexováním v polovičním objemu (12,5 ml) vychlazeného 0,05M CaCl_2 , přes noc necháme při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Centrifugujeme 10 min/3000g/4°C.
- Supernatant slijeme, sediment resuspendujeme vortexováním v desetině původního objemu (2,5 ml) vychlazeného 0,05M CaCl_2 .
- Ihned používáme, nebo přidáme desetinu finálního objemu (0,25 ml) glycerolu a rozpipetujeme po 200 μl a uchovááme při $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Takto připravené buňky fungují více než rok.

II. Vložení mezerníku do pΔCas9_T7

a. NAŠTĚPENÍ VEKTORU RESTRIKTÁZAMI

Složení reakce	
DNA (vektor)	2 µg
RE (<i>Bsa</i> I)	0,5 - 1 µl, do reakce 5-10 U
Pufř pro RE	3 µl
H ₂ O	X µl
Celkem	30 µl

Postup:

1. Smíchat reagenty dle složení pracovní směsi, RE přidáváme jako poslední. Restriktční směs promícháme.
2. Inkubujeme 37°C/16 h.
3. Deaktivace zahřátím dle manuálu výrobce RE.
4. Ověření pomocí ELFO.

Poznámky k práci:

Během práce uchováváme restriktázu v chladicím stojánku, ihned vracíme do -20 °C. Optimální pufř pro restriktázy zjistíme z katalogu výrobce. Vybíráme ten, kde má enzym 100% účinnost. Při použití dvou restriktáz současně usilujeme o co největší procento účinnosti obou enzymů. Pokud chceme vektor použít pro klonovací účely, restriktázu nedeaktivujeme, ale vektor buď ihned defosforylujeme, popřípadě přečistíme vyřezáním z gelu (pro odstranění nenaštěpených fragmentů).

Tabulka počtu nukleotidů na 5' konci potřebných pro naštěpení linalizované DNA (viz manuál k restriktčním endonukleázám NEB v úloze č. 1).

b. VYŘEZÁNÍ Z GELU

Kit: QIAEX Gel Extraction Kit (manuál ve studijních materiálech).

Postup:

1. Nachystání 1,2% gelu z low melting agarózy SeaKem na vyřezání štěpených vektorů v TAE pufřu.

Pozn. Použít hřeben se širokými nebo slepenými zuby. Jako negativní kontrola štěpení se používá neštěpený vektor. Při vyřezávání fragmentů z gelu pracujeme s ochrannými pomůckami, rukavice, obličejový štít nebo ochranné brýle - UV záření, Ethidium Bromid (EtBr).

2. Elektroforézu provedeme při 5 V/cm 40 min. Gel barvíme v lázni s EtBr cca 20-30 min.
3. Na analytických vahách zvážíme Eppendorf zkumavky. Nutné pro další práci s vyřezaným fragmentem z gelu.

4. Po ELFO na transluminátoru se ozáří gel UV zářením a fragmenty viditelné na gelu se označí sterilními špičkami/nebo skalpelem. Následně se vypne UV záření (nechává se puštěné jen na dobu nezbytně nutnou) a označené fragmenty se z gelu vyřezou pomocí sterilního skalpelu. Vyřezané fragmenty se přenesou do sterilních Eppendorf zkumavek. Na analytických vahách se zváží vyřezané fragmenty.

Dále se postupuje podle protokolu výrobce:

Pozn. veškeré centrifugační kroky se provádí při 14 500 rpm / 1 min.

1. Předehřát „heatblock“ na 50°C a předehřát dostatečný objem EB (Eluční pufr) v Eppendorf zkumavce.
2. Přidat 3 objemy QG pufru k jednomu objemu gelu. (100 mg gelu ~ 100 µl QG pufru)
3. Inkubace 50 °C / 10 min. Každé 2-3 min vortexovat pro lepší rozpuštění gelu.
4. Přidat příslušný objem isopropanolu ke vzorku, promíchat. (100 mg gelu ~ 100 µl isopropanolu)
5. Umístit kolonu do sběrné zkumavky a napipetovat vzorek do kolonu. *Objem kolony je 800 µl.* Centrifugovat / odstranit roztok ze sběrné zkumavky.
6. Promýt 750 µl PE pufru. (pokud budeme používat produkt na sekvenaci nebo blunt end ligaci nechat stát s PE pufrům 2-5 min.) Centrifugovat / odstranit roztok ze sběrné zkumavky.
7. Kolonu po centrifugaci vložit do nové sterilní Eppendorf zkumavky.
8. Přidat 50 µl EB pufru předehřátého na 50 °C.
9. Změřit koncentraci na NanoDropu.

c. SPOJENÍ OLIG + LIGACE

Přiložení mezerníků:

Reagenční směs:

1 µl oligo I (100 µM)

1 µl oligo II (100 µM)

5 µl 10X T4 Ligační pufr (NEB)

1 µl T4 Polynukleotid kináza (NEB)

42 µl ddH₂O

Finální objem = 50 µl

Inkubace 37°C/1 h. v termocykleru

Zastavit běh, přidat 0,5 µl 5M NaCl, jemně promíchat pipetou

Inkubovat 5 min v termobloku nebo termocykleru při 95 °C. Vypnout termoblok a nechat pomalu postupně zchladnout až na laboratorní teplotu (*několik hodin!*), nebo pomalu ochlazovat v termocykleru na 25 °C s rychlostí poklesu teploty o 1 °C/min. Přidat 1µl do ligační směsi.

Ligační reakce:

2µl ligační pufr

0.25 µl NEB ligáza

50-75 ng vektor

1µl spárované oligo

Doplnit do 20 µl H₂O

Promícháme, necháme inkubovat při pokojové teplotě 1-1,5 hodiny. Inaktivujeme zahřátím na 65°C/10 min.

Pozor – ligační pufr obsahuje BSA, zkontrolovat, zda je úplně rozpuštěný. Pokud ne, zahřát v ruce nebo krátce na 50°C, promíchat.

III. TRANSFORMACE KOMPETENTNÍCH BUNĚK

1. Kompetentní buňky necháme rozmraznout na ledu
2. 5 μ l ligační směsi promícháme s 5 μ l TE pufru (pH = 8.0) a přidáme ke kompetentním buňkám.
3. Promícháme poklepáním na epinku, nemícháme špičkami a nevortexujeme!
4. Necháme 30 min na ledu.
5. Epinky vložíme do plováku, umístíme do vodní lázně vytemperované na 42°C na 1 min.
6. Ochladíme 2 min na ledu.
7. Přidáme 1 ml LB na kompetentní buňky a lehce promícháme.
8. Inkubujeme 1 hod / 37 °C / 390 rpm.
9. Centrifugace 6000g / 4min
10. Odlijeme supernatant – na dně zkumavky zůstane vlivem povrchového napětí – asi 100 μ l – v tomto objemu pelet resuspendujeme pipetou.
11. Vysejeme na selekční misky se selekční půdou.
12. Druhý den pozorujeme jednotlivé kolonie transformant, několik vybereme a přečárkujeme na nové selekční misky.

Kontroly:

Pozitivní kontrola – vektor bez inzertu, kontrolujeme, zda funguje transformace a kompetentní buňky.

Negativní kontrola – ligační směs s vektorem bez inzertu.

Kontrola ligace – ligační směs s vektorem naštěpeným jen jednou restriktázou. Tento vektor by měl lehce ligovat a měli by vznikat transformanty s vysokou frekvencí. Pokud nevyrostou kolonie transformant, pravděpodobně nefunguje ligace.

IV. Ověření transformant pomocí „colony PCR“

COLONY PCR

Používáme, pokud máme primery na amplifikaci klonovaného inzertu. Používáme Taq polymerázu. Připravíme jednu mastermix pro více vzorků, potom rozpipetujeme po 25/50 μ l na reakci. Templát se v každé reakci liší, přidáváme až po rozpipetování.

Reagencie na 25 μ l reakci:

10x Taq buffer (without MgCl₂) – 2,5 μ l

25mM MgCl₂ solution – 1,5-2,5 μ l

10 mM dNTPs – 0,5 μ l (ze zásobních roztoků NTP ředěním v nuclease-free H₂O)

10 uM Forward primer – 0,5 μ l

10 uM Reverse primer – 0,5 μ l

Taq DNA pol (5U/ μ l) - 1,25 U (0,25 μ l)

DMSO (pokud GC poměr primerů > 60%, jinak nepřidáváme) – 0,75 μ l

Nuclease-free H₂O doplnit do 25 μ l

Jako templát použijeme kolonii transformant. Sterilní 100 μ l špičkou se jemně dotkneme kolonie (nenabrat agar) a resuspendujeme v reakční směsi.

Thermocycling conditions:

1. Počáteční denaturace 95 °C/10 min (nutné, varem dojde k lyzi buněk)
2. Denaturace 94 °C/1 min
3. Annealing $T_m(\text{primers}) - 5\text{ °C}$ (45-72 °C)/30 s
4. Extension 72 °C – 1 min/kb

Kroky 2 až 4 opakujeme 30-35 krát

5. Final extension 72 °C/5 min
6. Hold 4 °C

Vždy použijeme pozitivní kontrolu (templátová DNA pro originální amplifikaci inzertu, pro ověření účinnosti PCR). Jako negativní kontrolu můžeme použít transformantu prázdného vektoru, pokud jsme používali prázdný vektor jako kontrolu transformace.

Pokud nevychází colony PCR, použijeme na izolaci plazmidu kit.

Přítomnost plazmidu a naklonovaného inzertu se ověří na ELFO.

V. Indukce exprese

Potvrzené transformanty se po přečárkování přenesou do 1 ml LB bujónu a chloramfenikolem o koncentraci 25µg/ml a kultivují se při 37°C 1 hodinu. Pro indukci se přidá tetracyklin do výsledné koncentrace 10 µg/ml s kterým se kultivují další hodinu.

VI. MIKROSKOPIE

Na sklíčko se nanese 2 kapky kultury v spodních 2/3 sklíčka a roztáhnou se po ploše sklíčka sterilní špičkou. Kapky se nechají uschnout, jinak by se během fixace plamenem buňky zničily.

Gramovo farbenie:

1. Fixace nad plamenem – sklíčko se protáhne přes plamen 3 × a nechá se vychladnout.
2. Sklíčko se vloží do nádoby s krystalovou violetí na 30 s, oplach vodou.
3. Sklíčko se vloží do nádoby s Lugolovým roztokem na 30 s, oplach vodou.
4. Buňky se odbarví nakapáním roztoku EtOH/acetón na 10 s, oplach vodou.
5. Sklíčko se vloží do nádoby s bazickým fuchsinem na 60 s, oplach vodou.

Osušení spodní strany sklíčka pomocí papírové utěrky.

Pro zvýraznění pouze buněčných kontur stačí buňky obarvit pouze bazickým fuchsinem (5. krok).

Pro pozorování buněk použijte zvětšení 20× a 40×. Popište rozdíl mezi indukovanou kulturou, která obsahuje vektor bez spaceru a kulturou s vektorem, který cílí na gen ftsZ.