

Úloha 3: Editace septa u *E.coli* pomocí systému CRISPR/Cas9 – seznámení s vektorem pdCas, úprava vektoru pro editaci septa v *E.coli*

1. Jaká je funkce genu *ftsZ* u *E. coli*, a jaký fenotypový projev očekáváte po vyřazení jeho funkce?
2. Popište jednotlivé komponenty, které jsou nutné pro vytvoření fungujícího CRISPR/Cas9 vektoru pro editaci prokaryotických genomů.
3. Z jakých funkčních domén se skládá Cas9 endonukleáza?
4. Navrhněte oliga pro vložení mezerníku do upraveného vektoru pdCas tak, aby mezerník cílil na gen *ftsZ*. V sekvenci genu *ftsZ* barevně znázorněte: a. sekvenční oblast na kterou cílí vámi navržený mezerník, b. PAM sekvenci.

>NC_000913.3:105305-106456 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome

```
ATGTTTGAACCAATGGAACCTACCAATGACGCGGTGATTAAGTCATCGGCGTCGGCGGGCGGGCGGTAATGCTGTTG
AACACATGGTGCAGCGAGCGCATGGAAGGTGTTGAATTCCTTCGCGGTAAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAAACAGC
GGTTGGACAGACGATTCAAATCGGTAGCGGTATCACCAAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAAT
GCGGCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGCAGGCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTATTGCTGCGGGTATGGGTG
GTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCTGCTGCTGAAGTGGCAAAAAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTCGTCAC
TAAGCCTTTCAACTTTGAAGGCAAGAAGCGTATGGCATTCGCGGAGCAGGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGAC
TCTCTGATCACTATCCCGAACGACAAACTGCTGAAAGTCTGGGCCGCGGTATCTCCCTGCTGGATGCGTTTGGCGCAG
CGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGCAAGGTATCGCTGAACTGATTACTCGTCCGGGTTTGGATGAACGTGGACTTTGC
AGACGTACGCACCGTAATGTCTGAGATGGGCTACGCAATGATGGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGC GGAA
GAAGCTGCTGAAATGGCTATCTCTTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGTCTGGCGCGCGCGGGCGTGGTTAACA
TCACGGCGGGCTTCGACCTGCGTCTGGATGAGTTCGAAACGGTAGGTAACACCATCCGTGCATTTGCTTCCGACAACGC
GACTGTGGTTATCGGTAATCTCTTGTGACCCGGATATGAATGACGAGCTGCGCGTAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGC
ATGGACAAAACGTCTGAAATCACTCTGGTGACCAATAAGCAGGTTTCAGCAGCCAGTGATGGATCGCTACCAGCAGCATG
GGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCGTGAATGACAATGCGCCGCAAACCTGCGAAAAGAGCC
GGATTATCTGGATATCCCAGCATTCCTGCGTAAGCAAGCTGATTAA
```

5. V bodech popište další kroky klonování až po funkční test pdCas.
6. V laboratoři máte 2 vektory pCasSA a pΔCas_bakteria, které jste používaly na jiné experimenty. Vytvořte jeden vektor, který by obsahoval ΔCas9 protein a gRNA, která by cílila na libovolný gen *E. coli*. Využijte k sestavení Vašeho vektoru informace, které jste obdržely v teoretické části úlohy a které jsou uvedeny níže.

Rozepište v jednotlivých krocích, jak budete při vytváření vektoru postupovat. Cílem je vytvořit plazmid, který bude schopný replikace a exprese v *E. coli* a bude obsahovat místo pro začlenění mezerníkové sekvence pro gRNA (aby se dalo měnit), dCas9 a další komponenty nezbytné pro správnou funkci vektoru. Promyslete, co je vhodnější přesunout do kterého vektoru a zda všechny expresní prvky patří organizmu, v kterém se bude celý systém exprimovat. Pro vizualizaci můžete využít volně dostupný program *SnapGene Viewer* (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>)

Využijte k úpravě tyto dva plazmidy:

pdCas9-bacteria: <https://www.addgene.org/44249/>

pCasSA: <https://www.addgene.org/98211/>

Sekvence oblasti plazmidu pro vkládání CRISPR mezeríkové sekvence (vkládá se restriktázou *BsaI*) má tyto hlavní části:

promotor.....**ATGGAAACGAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAA**.....sgRNA

kompletní sekvence námi vložené kazety do našeho vektoru **pdCas9_bact_T7p**, následně byl pomocí *BsaI* restriktázy vložen mezerík cílící na gen *ftsZ* (oblast žlutě).

Kazeta ve směru 5-3:

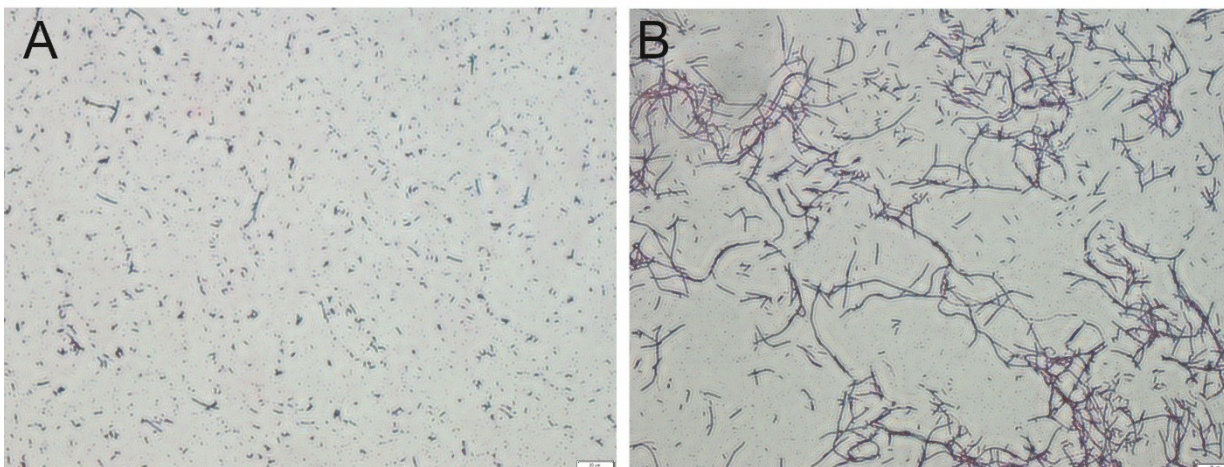
TCAT**CCTAGG**TAATACGACTCACTATAGGGAATATACAGGGGATTATATATA**ATGGAAACGAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAA**TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTTGGAGATCTGTCCATACCCATGGTCTAGAATGCTCGAGTCAGAAA**CCGCGG**
GAGA

Na koncích jsou restriktční místa *AvrII* CCTAGG a *SacII* CCGCGG, kterými byla kazeta vložena do původního vektoru. Do kazety byl následně vložen mezerík pomocí *BsaI* restriktázy cílící na gen *ftsZ*.

----- otázky k praktické části -----

7. Uveďte koncentrace DNA stanovené na Nanodropu
 - a. Koncentrace izolovaného vektoru
 - b. Koncentrace štěpeného vektoru po defosforylaci a purifikaci z gelu
8. Doložte a popište foto ploten s transformovanými expresními *E. coli* příslušnými kontrolami.
9. Doložte a popište foto z mikroskopu.
 - a. Buňky *E. coli* s vyřazeným genem *ftsZ*
 - b. Buňky *E. coli* wt

Úloha č. 3: editace tvorby septa u *E.coli* pomocí CRISPR/Cas9



A. buňky *E. coli* bez editace septa, B. buňky *E. coli* po umlčení genu *ftsZ* (světelný mikroskop, barveno bazickým fuchsinem).