

## Technologia CRISPR/Cas9 w edycji genomu

### Informacje ogólne:

|                      |  |
|----------------------|--|
| Prowadzący           | Dr Weronika Sura (Zakład Patologii Molekularnej, Instytut Genetyki Człowieka PAN w Poznaniu) |
| Liczba / formy zajęć | 30 godzin lekcyjnych (wykłady i ćwiczenia)   |
| Semestr              | wiosna-lato 2020   |
| Język                | j. angielski   |
| Punkty ECTS          | 2  |

### Cel kursu

Poznanie możliwości, jakie niesie technologia CRISPR/Cas9, oraz praktyczne jej zastosowanie do uzyskania linii mutantów rośliny *Arabidopsis thaliana*

### Zakres tematyczny

1. Technologie edytowania genomów (nukleazy z palcami cynkowymi, TALENy)
2. Naturalne systemy CRISPR
  - a) występowanie
  - b) składowe
  - c) mechanizm działania
3. System CRISPR/Cas9 zaadoptowany do użycia w laboratorium
  - a) niezbędne elementy
  - b) etapy użycia (projektowanie gRNA, tworzenie konstruktyw genetycznych, techniki klonowania, transformacja organizmu docelowego, metody sprawdzenia efektywności systemu, identyfikacja mutacji, wyprowadzenie mutantów) – praktyczna nauka
  - c) mechanizm działania
  - d) możliwe zastosowania
  - e) dotychczasowe osiągnięcia
  - f) perspektywy rozwoju
  - g) zagrożenia i obawy związane z użyciem technologii
4. Transformacja roślin
  - a) metody
  - b) zastosowanie bakterii *Agrobacterium tumefaciens*
  - c) technika floral dip
  - d) mechanizm selekcji herbicydem BASTA

## **Efekty (wiedza i umiejętności uzyskane podczas kursu)**

### **Doktorant:**

- Zna technologie edytowania genomów takie jak nukleazy z palcami cynkowymi i TALENy
- Zna pochodzenie, elementy i rolę naturalnie występujących systemów typu CRISPR
- Rozumie mechanizm działania naturalnych systemów typu CRISPR w obronie przed infekcjami
- Wie, do jakich badawczych i terapeutycznych można użyć technologii CRISPR/Cas9
- Zna wady i zalety tej technologii (również w stosunku do innych technologii edycji genomu)
- Jest świadomy zagrożeń etycznych wynikających z możliwości użycia tej techniki
- Potrafi użyć system CRISPR/Cas9 w celu uzyskania mutacji w konkretnych genach *Arabidopsis thaliana*, a w szczególności:
  - Wie, jakie elementy systemu muszą (w konstrukcjach genetycznych) zostać wprowadzone do roślin
  - Umie użyć baz danych w celu wyszukania możliwych do użycia gRNA i potrafi wybrać optymalne z nich
  - Zna i może samodzielnie przeprowadzić etapy uzyskiwania potrzebnych linii mutantów *A. thaliana* począwszy od uzyskania wektorów binarnych (klonowanie do wektora binarnego, transformacja i selekcja *E.coli*, namnożenie plazmidu i jego izolacja, transformacja i selekcja *A. tumefaciens*, namnożenie *A. tumefaciens*, hodowla i transformacja *Arabidopsis* metodą floral dip, selekcja nasion herbicydem BASTA, izolacja DNA z materiału roślinnego, amplifikacja określonych loci metodą PCR oraz obserwacja powstałych mutacji po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR)
- Zna techniki transformacji roślin, a zwłaszcza użycie bakterii *Agrobacterium tumefaciens*
- Wie, na czym polega metoda floral dip
- Rozumie podstawy mechanizmu selekcji transformantów z użyciem herbicydu BASTA

### **Zawartość merytoryczna kursu:**

1. Wprowadzenie do tematyki zajęć (wykład) i omówienie ich przebiegu. (2,5 h) Wysianie roślin Col-0 do transformacji oraz roślin pokolenia T1 do selekcji. Trawienie restrykcyjne plazmidu zawierającego kasetę do ekspresji gRNA oraz wektora binarnego. (2,5 h)
2. Defosforylacja wektora binarnego. Rozdział elektroforetyczny strawionych fragmentów DNA, ich oczyszczenie i ligacja. Transformacja bakterii *E. coli*. Przygotowanie szalek z pożywką selekcyjną i wysianie na nie bakterii. (5 h)
3. PCR kolonijny na wyrosłych koloniach i rozdział elektroforetyczny ich produktów. Identyfikacja kolonii zawierających poprawny produkt ligacji i zaszczepienie nimi pożywek płynnych w celu namnożenia bakterii. Selekcja BASTA roślin T1 wysianych na pierwszych zajęciach. (5 h)
4. Izolacja plazmidów. Transformacja *A. tumefaciens*. Przygotowanie pożywek selekcyjnych dla *Agrobacterium* i wysianie ich na nie. Praca na komputerach –

projektowanie gRNA. (5 h)

5. PCR kolonijny na *Agrobacterium* i rozdział elektroforetyczny produktów, wybór kolonii do namnożenia na transformację floral dip (zaszczerpienie pożywki). Obserwacja wyników selekcji roślin herbicydem BASTA. Izolacja DNA z roślin po selekcji. (5 h)
6. Genotypowanie odpornych roślin (PCR, elektroforeza) i interpretacja wyników. Transformacja roślin Col-0 metodą floral dip. Egzamin. (5 h)

**Techniki/metody nauczania:**

- wykłady w języku angielskim z wykorzystaniem technik multimedialnych
- ćwiczenia laboratoryjne

**Ocena efektów uczenia się:**

- egzamin ustny