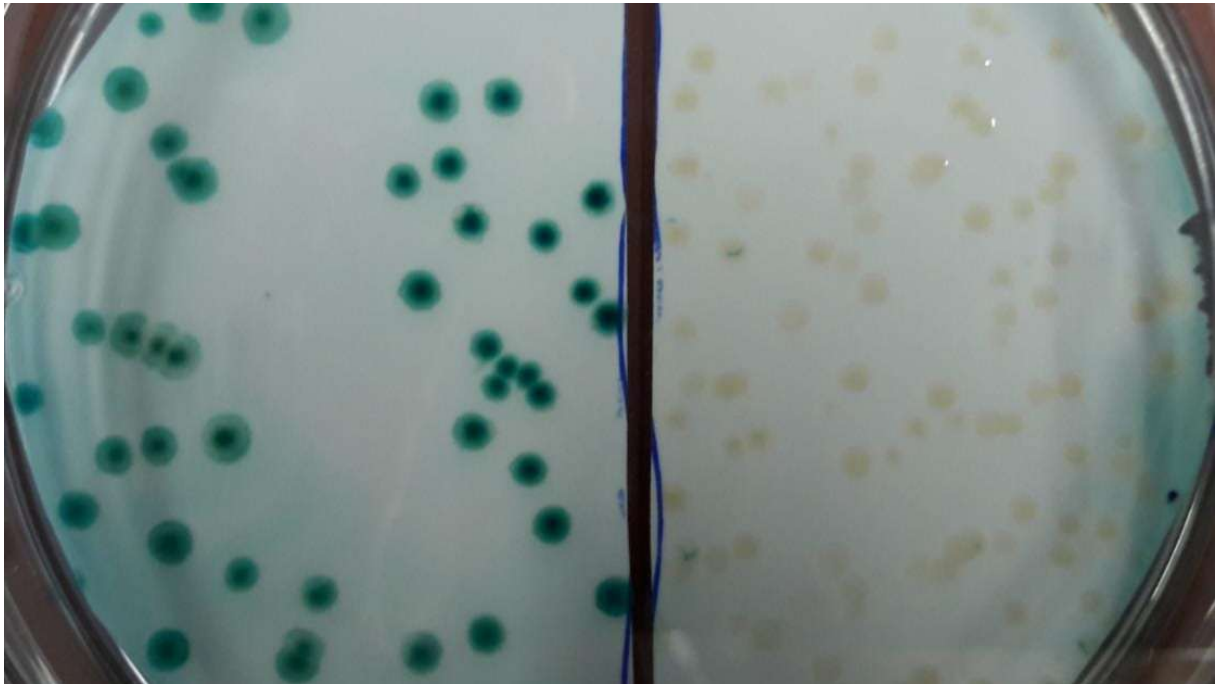


Knock-Out!

Aus Blau mach Weiß



Ein richtiges CRISPR-Cas Experiment

Einordnung

Das CRISPR-Cas Experiment ist für die gymnasiale Oberstufe (Sek 2) geeignet. Abhängig von den jeweiligen Lehrplänen kann das Experiment den Inhaltsfeldern Genetik und Gentechnik, aber auch anderen zugeordnet werden. Wir empfehlen ausdrücklich, auch die folgenden Themen zu integrieren:

- Bedeutung von CRISPR-Cas in der Biomedizin
- Bedeutung von CRISPR-Cas in der Pflanzenzüchtung
- Bedeutung von CRISPR-Cas in der Materialforschung
- Bedeutung von CRISPR-Cas für die Bioethik
- Wissenschaftliches Arbeiten (z.B. Bedeutung von Kontrollexperimenten)
- Sicherheitsvorschriften in der Gentechnik

Materialien und Voraussetzungen

Für die Durchführung des Experiments ist in Deutschland, der Schweiz und Österreich ein angemeldetes Gentechniklabor der Sicherheitsstufe 1 mit entsprechender Ausstattung erforderlich. Es muss ein zertifizierter Projektleiter und ein „Beauftragter für biologische Sicherheit“ zur Verfügung stehen.

Lehrer sollten sich vor der Durchführung sorgfältig mit dem Arbeitsprotokoll beschäftigen. Vor der ersten Anwendung im Unterricht wird ein Testlauf empfohlen. Zur Vorbereitungszeit gehört das Gießen von Agarplatten für Bakterienkulturen, die Verteilung der notwendigen Arbeitsmaterialien auf die Laborplätze und ggf. die Herstellung von Agarosegelen.

Der Zeitbedarf für das Experiment liegt bei ca. vier Stunden, er kann auf zwei Stunden verkürzt werden, wenn die theoretischen Grundlagen im Normalunterricht vermittelt werden. Die Auswertung erfolgt 2-4 Tage nach dem Experiment und benötigt etwa eine Stunde. Teil III (Cracking-Gel) kann in die Auswertung integriert werden, die erforderliche Zeit beträgt dann zwei Stunden. Teil II (PCR-Analyse, ca. zwei Stunden) ist nicht unbedingt erforderlich, kann aber nach der Auswertung, als separate Unterrichtseinheit angeboten werden.

Die Experimente wurden von Science Bridge e.V. entwickelt und hier publiziert: <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.08.009>. Science Bridge hat die Materialien und Protokolle im Rahmen einer Zusammenarbeit an die Firma miniPCR-Bio gegeben. miniPCR-Bio hat unter dem Namen „Knock out!“ ein kommerzielles Kit mit allen erforderlichen Materialien und sehr guten Lehrmaterialien (Englisch) zusammengestellt (<https://www.minipcr.com/product/knockout/>). Man beachte, dass der Preis durch Zoll- und Transportkosten höher als angegeben liegt. Hinzu kommt ein gewisser Aufwand für die Zollabfertigung. In Deutschland, der Schweiz und Österreich kann der Vertrieb über BioWissKomm (www.biowisskomm.de), die Nachfolgeorganisation von Science Bridge, erfolgen. Der Preis kann variieren und wird bei einer Bestellung kalkuliert.

Alternativ können Interessenten gegen eine faire Bearbeitungsgebühr die biologischen Materialien (Plasmide, *E. coli* Stamm) über BioWissKomm und Partner erhalten. Vorteil: bei entsprechender Lagerung können die Materialien für weitere Experimente „ewig“ selbst hergestellt werden. Nachteil: die Präparation der Plasmide und der kompetenten Zellen sowie die jeweilige Qualitätskontrolle erfordern etwas Erfahrung und Arbeitsaufwand.

Weiter Unterrichtshinweise

Unterrichtsanregungen zum Thema CRISPR-Cas (und anderen biologischen Themen) finden Sie in unserem Blog <https://www.biowisskomm.de/category/neues/>. Auf Wunsch bietet BioWissKomm auch einen ein- bis zweistündigen Vortrag (in Präsenz oder online) zu CRISPR-Cas an (Anwendungen, Grundlagenforschung, Bioethik, weitere CRISPR-Cas Werkzeuge usw.). Unverbindliche Anfragen unter info@biowisskomm.de.

Auf unserem YouTube Kanal gibt es fünf kurze Stopp-Motion Videos zu CRISPR-Cas: <https://www.youtube.com/channel/UCUP3bBYAh9kYK1d8hd9mBTg/about>. Wir verweisen auch auf das kostenlose CRISPR-Cas Sonderheft der Zeitschrift „Biologie in unserer Zeit“ (2024)

<https://www.biuz.de/index.php/biuz/issue/view/486>. Darin sind Artikel zur Anwendung in der Medizin und in Pflanzen, zur Grundlagenforschung, zur Bioethik und zu Schulversuchen. Auf unserer Seite <https://www.biowisskomm.de/glossar/> stellen wir ein ausführliches Glossar zu über 100 Begriffen aus der „CRISPR-Cas – Welt“ zur Verfügung.

Was ist CRISPR-Cas?

CRISPR-Cas ist ein bakterielles Immunsystem zur Abwehr von Viren. Bakterien haben ein „molekulares Gedächtnis“ für frühere Infektionen entwickelt. Sie erkennen den Angriff eines Virus und können ihn abwehren, indem sie seine Erbinformation zerschneiden.

2012 haben Jennifer Doudna und Emmanuelle Charpentier dieses Immunsystem so angepasst, dass es in Pflanzen, Tieren und Menschen eingesetzt werden kann, um Gene gezielt zu verändern. Die sogenannte „Genschere“ kann so programmiert werden, dass sie mit großer Genauigkeit ein bestimmtes Gen findet und schneidet. Doudna und Charpentier erhielten dafür 2020 den Nobelpreis.

Die „Genschere“ wurde seitdem weiterentwickelt und hat vielfache Anwendung in der Medizin, der Pflanzenzucht und anderen Bereichen gefunden: man kann damit Mutationen „reparieren“, einzelne Gene ausschalten, einschalten oder neue Gene einfügen.

In dem Kursexperiment benutzen wir das Darmbakterium *Escherichia coli* und führen ein zusätzliches, programmiertes CRISPR-Cas System ein. Damit „zielen“ wir auf ein Gen, dessen Funktion eine Blaufärbung des Bakteriums erlaubt. Wenn das Experiment wie gewünscht funktioniert, sollten die ursprünglich blauen Bakterien ihre Färbung verlieren und weiß erscheinen.

Ein wichtiger Aspekt von Experimenten sind Kontrollen. Wie können wir wissen, dass der Verlust der Farbe wirklich durch CRISPR-Cas stattgefunden hat? Wie können wir überprüfen, ob tatsächlich das Gen, das für die Blaufärbung zuständig ist, zerschnitten wurde?

Solche Kontrollen und Überprüfungen sind in der Forschung essentiell und wir werden auch darüber einiges lernen.

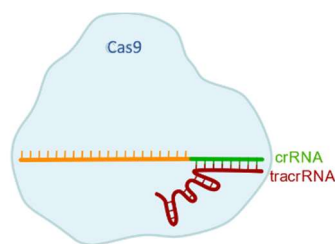
Warum sind manche Bakterien blau?

Einige Bakterien, wie z.B. das Darmbakterium *Escherichia coli*, können das Protein β -Galactosidase (Lactase) herstellen. Es ist ein Enzym, das den Milchzucker Lactose für die Bakterien nutzbar macht. Im Experiment kann Lactase auch die farblose Substanz X-Gal zu einem blauen Indigofarbstoff umsetzen. In Anwesenheit von X-Gal bilden die Bakterien blaue Kolonien. Das Gen, das für die Lactase codiert und damit für die Blaufärbung verantwortlich ist, heißt *lacZ*.



CRISPR-Cas9

Mit Hilfe von CRISPR-Cas9 ist es nun möglich, exakt dieses *lacZ*-Gen in den Bakterien anzusteuern und abzuschalten. Die Bakterien bilden daraufhin in Anwesenheit von X-Gal weiße Kolonien.



Die Komponenten des CRISPR-Cas9-Systems (das ist zum einen das „Schneideprotein“ Cas9 und zum anderen die crRNA zusammen mit der tracrRNA, welche das Cas9-Protein sequenzgenau zum *lacZ*-Gen führen) bringen wir in Form eines Plasmids in die Zellen ein.

Plasmide sind kleine ringförmige DNA-Moleküle, die in Bakterien relativ häufig vorkommen. Wir haben im Labor ein Plasmid hergestellt, das sowohl das Gen für Cas9 als auch die Gene für die beiden RNAs (crRNA und tracrRNA) trägt. Wenn wir dieses Plasmid in die Zellen einbringen, ein Prozess, den wir *Transformation* nennen, werden die CRISPR-Cas9-Komponenten hergestellt – also *exprimiert*.

Transformation

Als Transformation wird ein Vorgang bezeichnet, bei dem gezielt „fremde“ (heterologe) DNA, z.B. ein Plasmid, das ein gewünschtes Gen trägt, in einen Organismus (z.B. das Bakterium *E. coli*) eingebracht wird. Dabei entsteht ein gentechnisch veränderter Organismus (GVO). Die gentechnische Veränderung verleiht einem Organismus neue Eigenschaften – er ist *transformiert*.

In unserem Fall trägt das verwendete Plasmid die Gene für Cas9 und für die gegen *lacZ*-gerichtete gRNA. Mit speziellen Methoden kann auch in höhere Organismen, z.B. Pflanzen- oder Säugetierzellen, „Fremd“-DNA eingebracht werden.

Kompetente Zellen

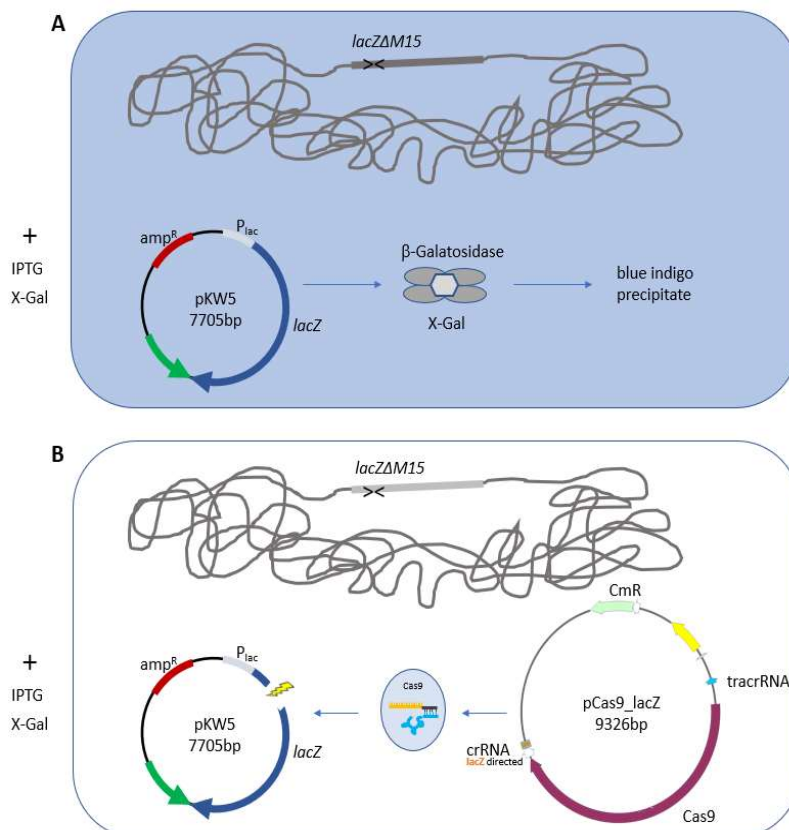
Organismen nehmen unter normalen Bedingungen sehr selten DNA aus der Umgebung auf. Damit im Labor erfolgreich transformiert werden kann, werden „kompetente Bakterienzellen“ verwendet, die leichter Fremd-DNA aufnehmen. Diese Zellen werden zuvor mit einer Calciumchloridlösung behandelt, die die Zellwand „löchrig“ und das Eindringen fremder DNA wahrscheinlicher macht. Um die Aufnahme noch effektiver zu machen, werden zusätzlich extreme Bedingungen (*Hitzeschock*) verwendet.

Selektion durch Antibiotikaresistenzen

Bei der Transformation nehmen nur sehr wenige Zellen die Fremd-DNA auf. Um erfolgreich transformierte Zellen von solchen zu unterscheiden, die keine Plasmid-DNA aufgenommen haben, wird eine Selektion verwendet.

Das Plasmid trägt nicht nur die gewünschten Gene sondern kodiert gleichzeitig für eine Antibiotikaresistenz (Chloramphenicol; Cam^R). Nur die Bakterienzellen, die das Plasmid aufgenommen haben, können auf einem chloramphenicolhaltigen Nährboden wachsen. Alle anderen Zellen sterben durch das Antibiotikum ab.

Zusammenfassung des Experiments



- a) Die Bakterien mit denen wir anfangen, haben ein defektes lacZ-Gen (lacZdM15). Sie enthalten aber ein Plasmid (pKW5 bzw. die neuere Version pSB20HIII), auf dem ein funktionsfähiges lacZ-Gen liegt. Davon wird β -Galaktosidase abgelesen, die sowohl Milchzucker als auch das künstliche Substrat X-Gal spalten kann. Aus X-Gal entsteht dabei ein Indigo-Farbstoff, der die Bakterien blau anfärbt.
- b) In diese Zellen bringen wir zusätzlich das Plasmid pCas9_lacZ ein. Auf diesem Plasmid ist das Cas9-Protein codiert und eine crRNA, die das LacZ-Gen erkennt. Zusammen mit der crRNA schneidet Cas9 das lacZ-Gen. Es wird keine β -Galaktosidase produziert, das Substrat X-Gal kann nicht gespalten werden, die Zellen sind weiß. In einem zweiten Ansatz wird als Kontrolle anstatt pCas9_lacZ, das Plasmid pCas9_K zugegeben. Die beiden Plasmide sind bis auf die crRNA identisch. pCas9_K enthält eine crRNA Sequenz, die keine Entsprechung im lacZ-Gen oder an einer anderen Stelle im *E. coli* Genom hat.

TEIL I: *lacZ* CRISPRn - Transformation

Schritt 1: Vorbereitung der Zellen



Bakteriensuspension (kompetente Bakterienzellen Dh5 alpha mit pSB20HIII) auf Eis auftauen und zwei Eppis beschriften („K“ = Kontrolle, „lacZ“ = CRISPR-Cas9 mit lacZ spezifischer crRNA). In jedes Eppi nun **80 µl (oder vom Kursleiter angegebene Menge)** der aufgetauten Bakteriensuspension überführen.

2 µL Kontroll-Plasmid-DNA („pCas9-K“) zu der Zellsuspension „K“ geben und **2 µl** pCas9-lacZ zur Zellsuspension „lacZ“ geben, vorsichtig mischen und **20 min** auf Eis inkubieren!

Parallel etwa die gleiche Menge kompetenter Zellen OHNE Zugabe von DNA mit behandeln.

Schritt 2: Hitzeschock



Gefäß mit den Zellen für genau **90 s** im Heizblock auf **42°C** erhitzen und danach sofort wieder auf Eis stellen! 1 – 2 min auf Eis stehen lassen.

Was bewirkt der Hitzeschock?



Stelle Vermutungen auf, warum die Zellen nicht länger als 90 s auf 42°C erhitzt werden dürfen? Was könnte in den Zellen passieren?



Organismen nehmen normalerweise „freiwillig“ sehr selten fremde DNA aus der Umgebung auf.

Überlege, warum Zellen (meistens) möglichst vermeiden sollten Fremd-DNA aufzunehmen?



Was könnte der Grund dafür sein, dass die Bakterien unter extremen Bedingungen aber doch fremde DNA aufnehmen?



Gibt es ein Phänomen, bei dem fremde DNA in menschliche Zellen gelangt ist? Wie kommt die DNA in diesem Fall in Zellen?

Schritt 3: Regeneration der Zellen



Dann gibt man möglichst zügig **1 mL (oder entspr. Angabe der Kursleiter)** Nähr-Medium zu den Zellen (LB, 2YT oder was im jeweiligen Labor in der Routine benutzt wird) und inkubiert den Ansatz für **30 min** bei **37°C** im Brutschrank.

Wozu dient dieser Regenerationsschritt?

Schritt 4: Zentrifugation



Im Anschluss werden die Zellen für **3 min** bei **1700 x g** (1700 x Erdbeschleunigung) zentrifugiert. Danach wird der Überstand in den Abfall verworfen indem man das Gefäß zügig ausgießt (es bleibt immer genug drin, um die Zellen zu resuspendieren. Alternativ kann man den Überstand vorsichtig (!) bis auf ca. 100µL abpipettieren (vorsichtig! Nicht das Pellet aufwirbeln!) Das Zellpellet wird in dem Rest des Mediums resuspendiert, dazu vorsichtig auf und ab pipettieren.

Schritt 5: Ausplattieren der Zellen



Beschriften der Platten:

Nimm dir zwei Platten 2YT bzw. LB, IPTG, XGal, Cam

Beschrifte sie auf dem Boden (nicht auf dem Deckel!) am Rand mit

a) - Kontrolle, Datum, Name/Gruppennummer

b) - LacZ, Datum, Name/Gruppennummer

Nimm dir eine Platte 2YT, IPTG, XGal, Amp

Beschrifte sie auf dem Boden am Rand mit

- Ausgangsstamm, Datum, Name/Gruppennummer



Mit Hilfe eines sterilen Drygalski-Spatels (oder Glaskugeln) werden nun die resuspendierten Zellen auf den Agarplatten ausplattiert:

Cam -Platten: Zellen „Kontrolle“ und „LacZ“

Amp-Platte: „pSB20HIII“ = Ausgangsstamm

Die Zellsuspension wird in den Agar „einmassiert“ bis die Platte fast trocken ist – es sollte keine Flüssigkeit mehr sichtbar sein, die über die Platte laufen kann.

Die Platten werden verschlossen und **über Nacht** bei **37°C** im Brutschrank inkubiert (auf dem Deckel stehend).

Cam ist die Abkürzung für das Antibiotikum Chloramphenicol. Wozu dient es?

IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert die Expression von

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) wird von _____

gespalten, wobei ein _____ entsteht.

**Die im Protokoll angegebenen Mengen können manchmal etwas unterschiedlich sein!
Bitte richtet euch nach den Angaben der Betreuer!**

In seltenen Fällen gibt es auf der Agar-Platte „LacZ“ ein oder zwei blaue Kolonien. Wer wissen möchte, was da passiert ist, kann auf unserer Webseite <https://www.crispr-whisper.de/category/laborleben/> die Geschichte „**Pauline und die Ausreißer**“ nachlesen (acht Teile). Das ist ein kleines Forschungsprojekt, bei dem wir uns gefragt haben, warum diese unerwarteten „Ausreißer“ entstanden sind.

Pauline Kanngießer hat überlegt, welche Gründe das haben könnte – sie hat eine Hypothese aufgestellt. Danach hat sie Experimente gemacht, um die Hypothese zu bestätigen oder zu verwerfen.

Konnte die Hypothese nicht bestätigt werden, wurden neue Überlegungen angestellt und weitere Experimente gemacht – bis schließlich ein Grund gefunden wurde! Das ist ein sehr gutes Beispiel dafür, wie wissenschaftlich gearbeitet wird.

Die Arbeit von Pauline Kanngießer ist auch im CRISPR-Sonderheft der Zeitschrift „Biologie in unserer Zeit“ publiziert (www.vbio.de/biuz-crispr).

TEIL II: Kolonie-PCR (dieser Teil erfordert zusätzlich ca. 2 Stunden)

Mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR = polymerase-chain-reaction) kann gezielt ein gewünschtes DNA-Stück milliardenfach kopiert und damit nachgewiesen werden. In unserem Fall wollen wir die Anwesenheit des lacZ-Gens nachweisen. Wir machen die PCR direkt mit der Bakterienkolonien.

- ☐  Mit einer Impföse (oder einer gelben Spitze) wird ein Bruchteil einer Bakterienkolonie in **25 µl** UV-H₂O, in einem Eppi überführt und für **10 min** bei **95°C** auf dem Heizblock gekocht. Die Bakterien werden dabei zerstört. Dann wird kurz runterzentrifugieren (30 sec pulse). Der Überstand („Bakteriensud“) enthält u.a. die Plasmide.
- ☐  In einem speziellen Reaktionsgefäß („PCR-tube“) wird der **Mastermix (25 µl)** vorgelegt, er enthält alle für die PCR-Reaktion notwendigen Komponenten. Pipettiere **25 µl** der gekochten Bakterienlösung zum Mastermix.

Mastermix		
UV-Wasser	11 µL	
PCR-Puffer mit MgCl ₂	5 µL	Der Inkubationspuffer schafft eine „angenehme“ Umgebung für die Taq-Polymerase.
dNTP-Mix	5 µL	Der dNTP-Mix enthält alle Einzelbausteine, also die vier Nukleotide, die für die DNA-Synthese notwendig sind.
lacZ Primer-Mix	2 µL	Der Primer-Mix enthält zwei Primer* (kurze einzelsträngige DNA-Stücke), die der Taq-Polymerase beim Kopieren des gewünschten DNA-Abschnitts als Startpunkt dienen.
Taq-Polymerase	2 µL	Die hitzestabile Taq-Polymerase ist das Enzym, das an Primern ansetzt und entsprechend der Vorlage einen neuen DNA-Strang synthetisiert. Sie kopiert also die DNA.
„Bakteriensud“	25 µL	Enthält die bakterielle DNA (Template-DNA)
Gesamtvolumen	50 µL	

* Die verwendeten Primer haben die folgenden Sequenzen:

- o primer for-5'-TAAATGCATGCCGCTTCGCCTTCGAAAGCGG-3'
- o primer rev-5'-TCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGG-3'



Stellt eure PCR-tubes nun in die PCR-Maschine.



PCR Programm:

28 Zyklen

Schritt	Temperatur	Zeit	Bemerkung
Denaturierung	95°C	3 min	Durch die lange Zeit der Denaturierung soll sichergestellt werden, dass die Ziel-DNA einzelsträngig ist.
Denaturierung	95°C	30 sec	Die doppelsträngige DNA wird einzelsträngig, weil die Wasserstoffbrückenbindungen gespalten werden.
Annealing	55°C	15 sec	Bei dieser Temperatur lagern sich die Primer an.
Elongation	72°C	15 sec	Die Taq-Polymerase wird aktiv und synthetisiert einen neuen DNA-Strang anhand des vorliegenden Einzelstrangs. Das 3'OH-Ende eines Primers dient als Start.
Elongation	72°C	2 min	Die endgültige Elongation der PCR-Produkte soll durch diesen Schritt sichergestellt werden.

Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach auftrennen und sichtbar gemacht werden.

Schritt 1: Vorbereitung des 2%igen Agarosegel



Für ein Gel werden **2 g** Agarose in ein Gefäß gegeben und mit 1x TBE-Puffer auf **100 ml** aufgefüllt und gekocht. Damit nichts anbrennt, wird die Lösung mit einem „Rührfisch“ gerührt.

Agarose ist ein Pulver aus einer Rotalge, mit dem man ein Gel herstellen kann. Den Puffer brauchen wir, um den pH-Wert konstant zu halten. Die Agarose löst sich beim Erhitzen im Wasser.



Die Lösung leicht abkühlen lassen, **5 µl** Midori Green (oder Ethidiumbromid) zufügen und die Lösung ins Gelbett füllen, danach den Kamm einstecken. Nach dem Erstarren (ca. **30 min**) den Kamm herauslösen und das Gel mit 1x TBE-Puffer übergießen, bis es vollkommen bedeckt ist.

Mit Hilfe eines „Kammes“ werden Taschen im Gel hinterlassen, in die ihr später eure DNA einfüllen könnt.

Midori Green (oder Ethidiumbromid) sind Farbstoffe, die während des Gellaufs die DNA anfärben (s.u.).

In manchen Laboren wird der Farbstoff nicht in das ganze Gel, sondern eine kleine Menge direkt in die DNA Probe gegeben.

Schritt 2: Beladen des Gel



Mischt **10 µl** des PCR-Produkts in einem neuen Eppi mit **5 µl** Auftragspuffer.

*Der **Auftragspuffer** enthält:*

- **Glycerin** zum Beschweren der Lösung, die sich dann leichter in die Geltaschen pipettieren lässt.
- Einen **blauen Farbstoff** (Bromphenolblau), der das korrekte Pipettieren der Probe in die Geltasche erleichtert. WICHTIG: Dieser Farbstoff färbt **nicht** die DNA!



Pipettiere nun je **15 µL** der mit Auftragspuffer versetzten PCR-Produkte in die Geltaschen. Reihenfolge notieren! Restliche PCR Produkte aufheben!

*In die erste Tasche wird ein **Marker** (Größenstandard) aufgetragen, der uns nachher dabei hilft unseren Fragmenten eine Größe zuzuordnen!*

Schritt 3: Starten der Gelelektrophorese



Zum Starten der Gelelektrophorese wird eine Spannung von **100 Volt** angelegt. Nach **30 - 45 min** nehmen wir das Gel aus dem Puffer und legen es auf den „Dark-Reader (oder einen UV-Tisch)“. So können wir die DNA-Banden sichtbar machen.

***Midori Green** (oder **Ethidiumbromid**) sind bei Tageslicht unsichtbare Farbstoffe, die sich an bzw. in die DNA einlagern (sie anfärben) und bei Blaugrün bzw. UV-Licht fluoreszieren.*

Beachte:

Das PCR-Experiment ist wissenschaftlich unvollständig! Wir erwarten ein PCR-Produkt von den Kolonien, die das lacZ-Plasmid enthalten, wir erwarten **kein** PCR-Produkt, wenn im lacZ-Gen geschnitten wurde. **Kein** Produkt kann aber nicht alleine als Beweis gelten. **Kein** Produkt erhält man z.B. auch, wenn die Taq-Polymerase oder eine andere wesentliche Zutat zur PCR-Reaktion vergessen wurde.

Man könnte im selben PCR-Ansatz ein Primerpaar einsetzen, das auf ein anderes *E. coli* Gen passt, das in allen verwendeten Bakterien vorhanden ist. Dieses PCR-Produkt muss in allen Proben auftreten und belegt damit, dass die PCR grundsätzlich funktioniert hat. Ein solches Primerpaar, das unter den gleichen Bedingungen in einer Multiplex-PCR funktioniert, haben wir bisher nicht erstellt (Multiplex-PCR: PCR Reaktion, bei der mit vier oder mehr Primern mehrere DNA-Stücke gleichzeitig amplifiziert werden).

TEIL III: Kolonie-Cracking Gel

CRISPR-Cas9 verursacht einen Doppelstrangbruch im *lacZ* Gen, wodurch das gesamte Plasmid, ausgehend vom Schnitt im *lacZ* Gen, abgebaut wird. Der Verlust des Plasmids kann ganz schnell und einfach gezeigt werden, in dem „gecrackte“ (aufgebrochene) Bakterienzellen im Agarosegel analysiert werden.

Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente der Größe nach auftrennen und sichtbar gemacht werden.

Schritt 1: Vorbereitung des 0,8 %igen Agarosegel (das Gel wird meistens vorher von den Betreuern vorbereitet)

- ☐  Für ein Gel werden **0,8 g** Agarose in ein Gefäß gegeben und mit 1x TBE-Puffer auf **100 ml** aufgefüllt und gekocht. Damit nichts anbrennt, wird die Lösung mit einem „Rührfisch“ gerührt. Das Kochen kann auch in einer Mikrowelle durchgeführt werden (Vorsicht! Kocht leicht über!)

Agarose kennt man als Geliermittel Agar-Agar in der Küche.

- ☐  Die Lösung leicht abkühlen lassen, **5 µl** Midori Green (oder GelRed, Ethidiumbromid oder anderen DNA bindenden Farbstoff) zufügen und die Lösung ins Gelbett füllen, danach den Kamm einstecken. Nach dem Erstarren (ca. **30 min** später) den Kamm herauslösen und das Gel mit 1x TBE-Puffer übergießen, bis es vollkommen bedeckt ist.

Mit Hilfe eines „Kammes“ werden Taschen im Gel hinterlassen, in die ihr später eure DNA einfüllen könnt.

Midori Green (oder Ethidiumbromid) sind Farbstoffe, die während des Gellaufs die DNA anfärben (s.u.).

Schritt 2: Probenvorbereitung: Kolonie-Cracking

- ☐  Mit einer Impföse (oder einer gelben Spitze) wird eine Bakterienkolonie in **20 µl** Cracking-Puffer überführt und für **30 min** bei **55°C** auf dem Heizblock erhitzt. Dann **1 min** vortexen. Wenn zeitlich möglich, sollten die Proben danach noch einige Zeit (30 bis 60 Minuten) bei Raumtemperatur stehen. Sie können auch in den Kühlschrank gestellt und am nächsten Tag verarbeitet werden.

Schritt 3: Beladen des Gel

- ☐  Gebt zu der „gecrackten“ Bakterienlösung **5 µl** Auftragspuffer.

*Der **Auftragspuffer** enthält:*

- **Glycerin** (macht es leichter in die Geltaschen zu pipettieren).
- **blauen Farbstoff** um besser zu sehen, wohin man pipettiert.. WICHTIG: Dieser Farbstoff färbt **nicht** die DNA!

- ☐  Pipettiere nun je **20 µL** der mit Auftragspuffer versetzten Lösung in die Geltaschen. Reihenfolge im Gel notieren!

*In die erste Tasche wird ein **Marker** (Größenstandard) aufgetragen, der uns nachher dabei hilft unseren Fragmenten eine Größe zuzuordnen!*

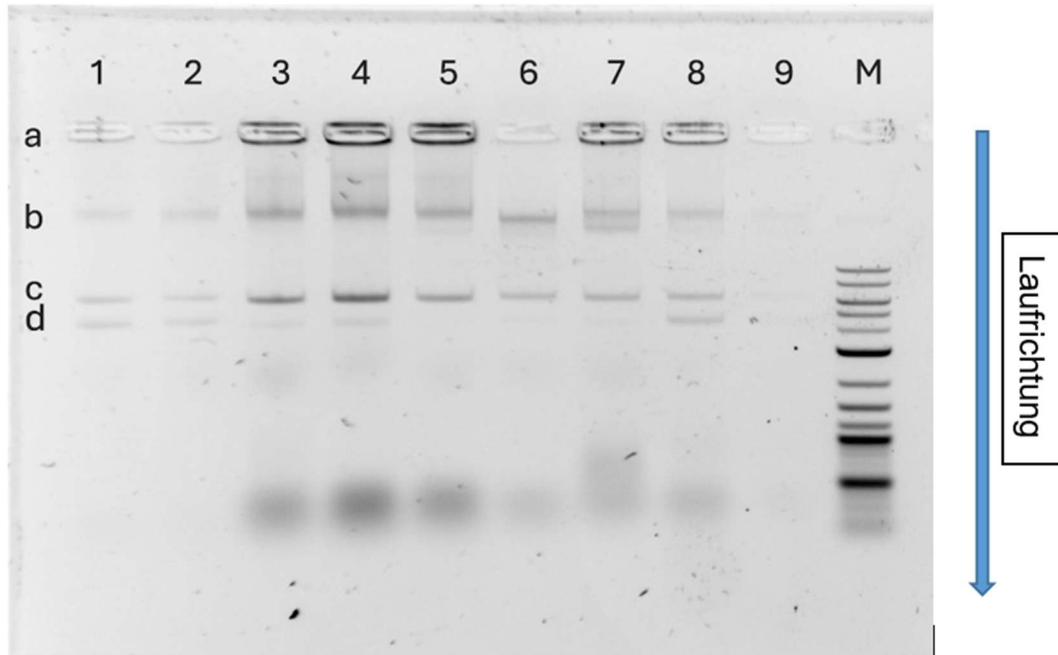
Schritt 4: Starten der Gelelektrophorese



Zum Starten der Gelelektrophorese wird eine Spannung von **100 Volt** angelegt. Nach **45 min** nehmen wir das Gel aus dem Puffer und legen es auf den „Dark-Reader (oder einen UV-Tisch)“. So können wir die DNA-Banden sichtbar machen.

***Midori Green** (oder **Ethidiumbromid**) sind bei Tageslicht unsichtbare Farbstoffe, die sich an bzw. in die DNA einlagern (sie anfärben) und bei Blaugrün-/UV-Licht fluoreszieren.*

Beispiel für ein Cracking-Gel:



In den Spuren 1 – 8 wurden Proben aus verschiedenen Kolonien aufgetragen. Spur M enthält einen Größenstandard, der hier aber keine Rolle spielt.

a: Taschen, in denen die DNA aufgetragen wurde

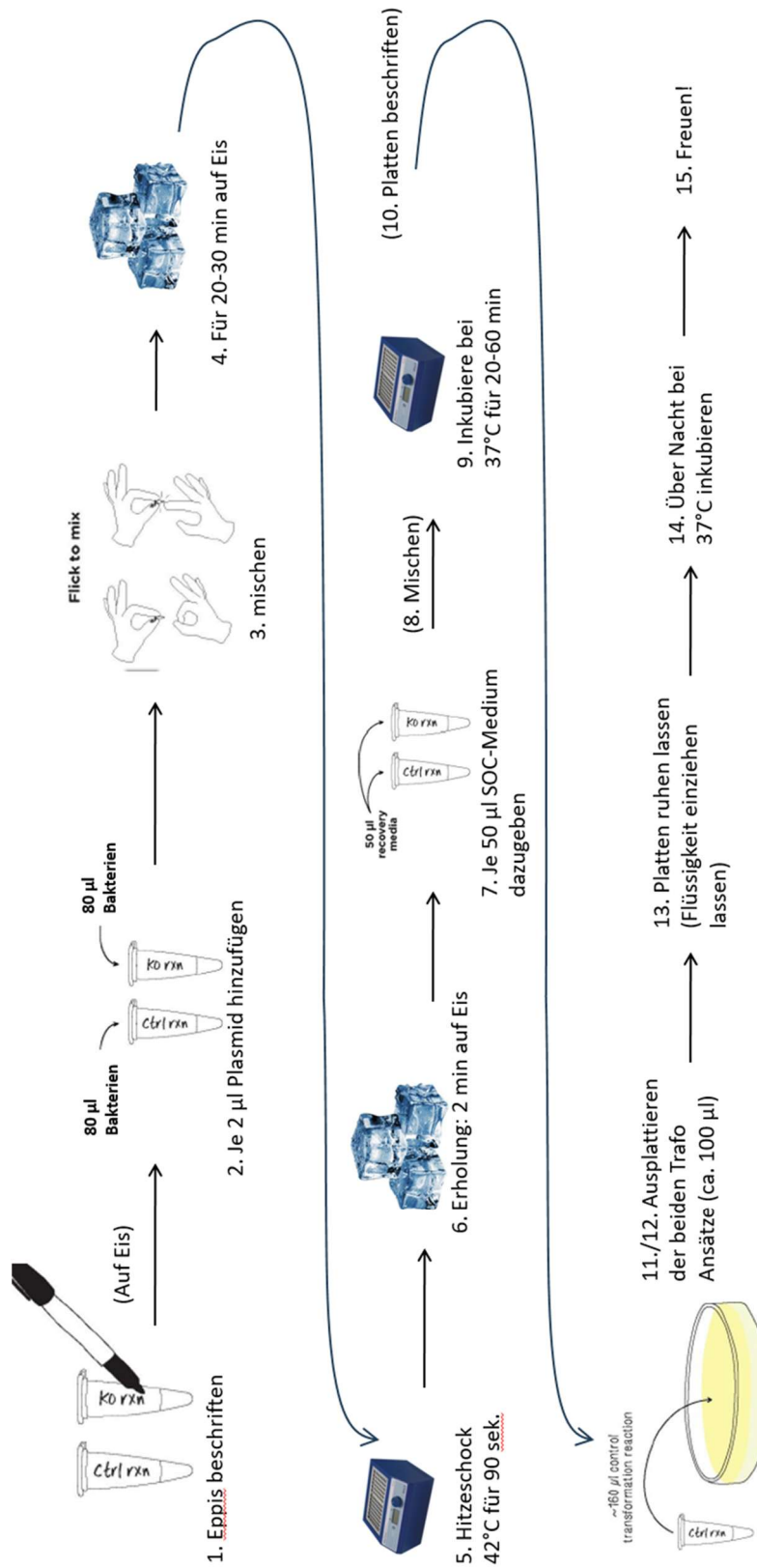
b: genomische DNA von *E. coli*

c: Plasmid pCas9-lacZ oder pCas9-K (die beiden sind in der Größe nicht unterscheidbar)

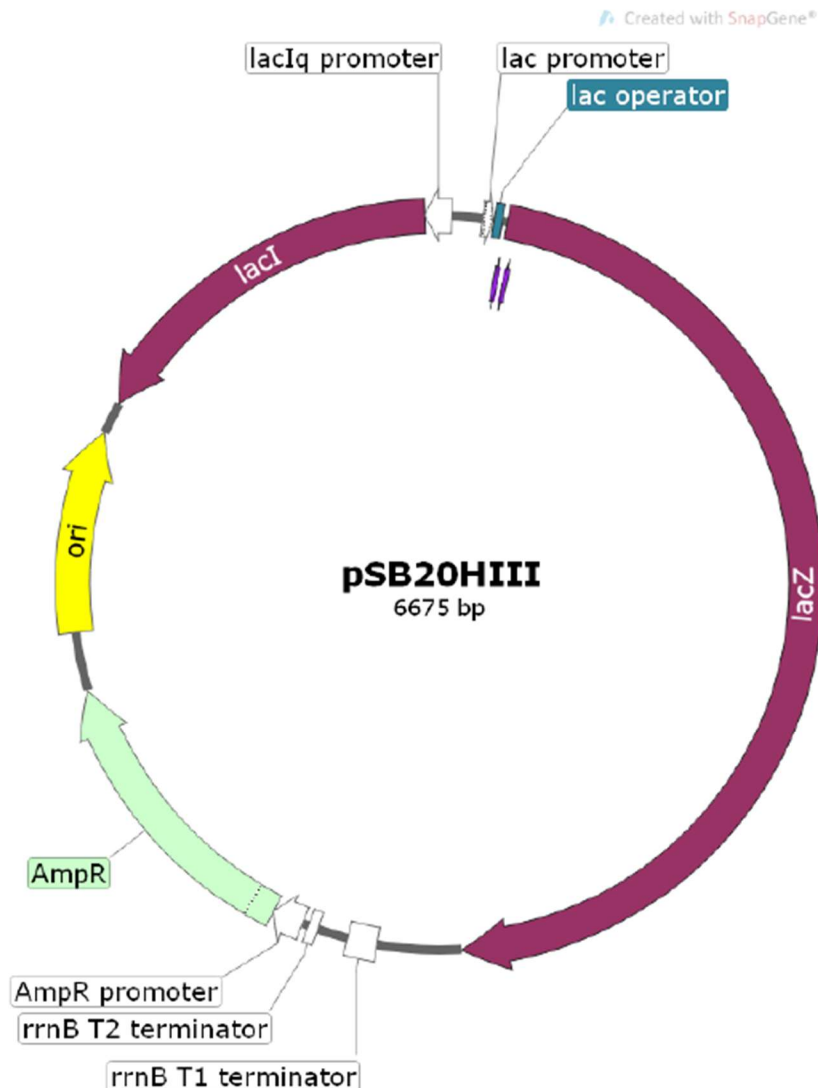
d: Plasmid pSB20HIII

Es ist zu erwarten, dass nicht alle Experimente funktionieren! Seid nicht enttäuscht! Das Cracken der Zellen ist eine sehr grobe, schnelle Methode, die nicht immer optimal gelingt. Zudem kann die Menge an DNA, die aus den Zellen gewonnen wird, stark variieren. Im „richtigen Laborleben“ funktionieren auch nicht alle Experimente – deshalb nennt man sie auch „Versuche“!

Ablaufplan



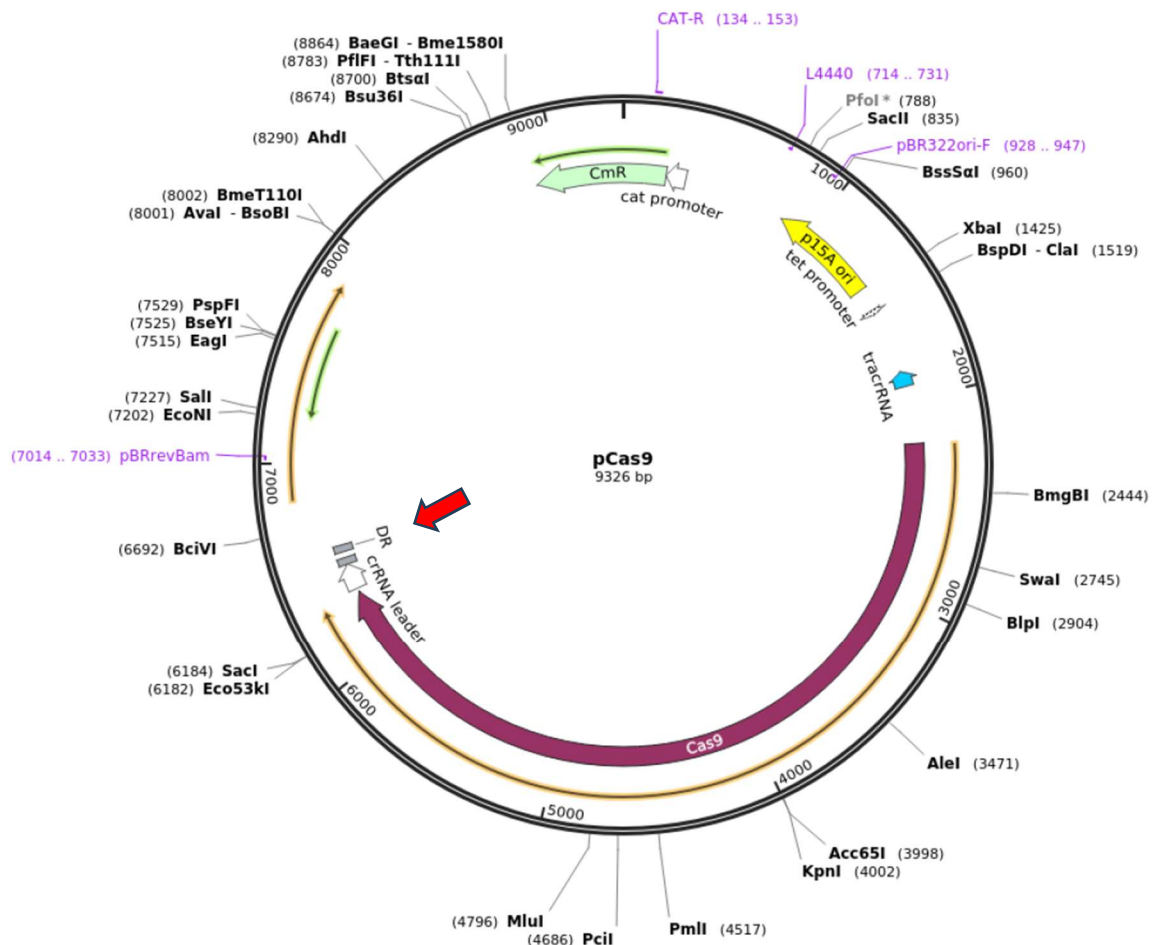
Für Fortgeschrittene zeigen wir hier noch die Karten zum Aufbau der verwendeten Plasmide. Sie werden im Labor zusammengesetzt, in Bakterien vermehrt und dann isoliert.



pSB20HIII enthält das lacZ-Gen, das für β -Galaktosidase codiert und normalerweise Laktose spaltet. Im Experiment wird X-Gal als Substrat gegeben, das von der β -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff umgesetzt wird.

Zusätzlich ist ein Gen für Resistenz gegen das Antibiotikum Ampicillin vorhanden (AmpR). Die Resistenz ermöglicht die Selektion von Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben. Auf einem Medium, das Ampicillin enthält, sterben alle Bakterien, die kein Plasmid aufgenommen haben.

Das Plasmid hat eine Größe von 6675 Basenpaaren.



Das Plasmid pCas9 enthält das Cas9-Gen und gleich dahinter die Region für die crRNA mit dem crRNA Leader (roter Pfeil). Die beiden grauen Blöcke zeigen die Repeats an. In dem weißen Streifen sitzt entweder die crRNA Sequenz, die auf das lacZ Gen passt oder (als Kontrolle) eine andere Sequenz.

Oben rechts (blauer Pfeil) ist die tracrRNA codiert, die zusammen mit der crRNA an das Cas9 Protein bindet.

Zusätzlich liegt ganz oben noch das Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Chloramphenicol (Cm^R) vermittelt.

Das Plasmid hat eine Größe von 9326 Basenpaaren.

Die Bezeichnungen am äußeren Rand geben Restriktionsschnittstellen an, die zur Überprüfung des Plasmids verwendet werden können.

Das Protokoll wurde in Anlehnung an die Originalpublikation von Ziegler & Nellen (<https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.08.009>) mit geringfügigen Änderungen erstellt. Eine Garantie für die Richtigkeit aller Angaben wird nicht übernommen.

Baunatal, 28.8.2025

BioWissKomm

W. Nellen

Geschwister Scholl Platz 5

34225 Baunatal

info@biowisskomm.de