

Taina Hakso

# CRISPR/Cas9-ohjattu *Arabidopsis thaliana* genomimuokkaus

Metropolia Ammattikorkeakoulu

Laboratorioanalyttikko (AMK)

Laboratorioanalytiikka

Opinnäytetyö

16.10.2017

Tekijä(t) Otsikko	Taina Hakso CRISPR/Cas9-ohjattu <i>Arabidopsis thaliana</i> genomimuokaus
Sivumäärä Aika	33 sivua + 3 liitettä 16.10.2017
Tutkinto	Laboratorioanalytikko (AMK)
Koulutusohjelma	Laboratorioanalytiikka
Ohjaaja(t)	Tohtorikoulutettava Iris Sevilem Lehtori Tiina Soininen
<p>Kasvien geenimuuntelun turvallisuus jakaa mielipiteitä terveysvaikutustensa ja ympäristöriskiensä vuoksi. Aiemmin käytössä olleet geenimuuntelukeinot ovat osoittautuneet melko sattumanvaraisiksi, mutta CRISPR/Cas9-tekniikka voi tarkkuutensa ja nopeutensa ansiosta mullistaa koko kasvien geenimuuntelun. Siinä kasviin ei siirretä vieraita geenejä, vaan tarkoitus on muokata kasvin omia geenejä.</p> <p>Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistolla Biotekniikan instituutissa. Työn tavoitteena oli CRISPR/Cas9-menetelmää käyttämällä muokata <i>Arabidopsis thaliana</i> eli lituruohon genomia aiheuttaen siihen mutaatio, jonka tyypistä ei etukäteen ollut varmuutta. Tarkoituksena oli, että koko kasvi – sekä lehdet että juuret – oli mutatoitunut. Tämä opinnäytetyö on osa isompaa tutkimuskokonaisuutta, jossa pyritään selvittämään transkriptiofaktorin X tehtävä. Hypoteesi on, että kyseinen transkriptiofaktori säätelee solunjakautumista tietyissä soluissa.</p> <p>CRISPR-nimitys tulee englanninkielisistä sanoista Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, mikä tarkoittaa bakteerien DNA-segmenttejä, jotka koostuvat lyhyistä, toistuvista emäsjaksoista ja niiden välissä sijaitsevista lyhyistä DNA-välikappaleista. CRISPR on tärkeä osa monien bakteerien ja useimpien arkkien immuunijärjestelmää, jonka avulla ne puolustautuvat virusten hyökkäyksiä vastaan. Cas on CRISPR:iin liittyvä endonukleaasientsyymi, jolla on kyky katkaista DNA-molekyylit.</p> <p>Työ toteutettiin osittain kasvihuoneella ja osittain laboratoriossa. Kasvihuoneella istutettiin valokaapissa MS-maljalla etukäteen kasvatetut kasvit multa ja annettiin niiden kasvaa muutaman viikon ajan. Laboratoriossa valmistettiin CRISPR-konstruktin PCR-reaktioiden, digestioiden sekä ligationin avulla. Transformaatiot sekä <i>Escherichia coli</i> -bakteeriin että agrobakteeriin tehtiin elektroporaatiolla. Transformaatio <i>Arabidopsis thaliana</i> n tehtiin <i>in planta</i> -menetelmällä agrobakteerivälitteisesti dipaamalla.</p> <p>CRISPR-konstruktin tekeminen ja transformaatiot sekä <i>E. coli</i> n että agrobakteeriin onnistuivat. Kasvihuoneella kasvit saatiin kasvamaan ja tuottamaan kukkia. Ligaatioreaktio osoittautui erittäin vaikeaksi ja vaatii vielä paljon optimointia, jotta transformaatiotehokkuus ja siten koko työn onnistumisprosentti paranee. Ajanpuutteen vuoksi jäi selvittämättä, oliko CRISPR/Cas9-mutanteja syntynyt ja minkä tyyppisistä mutaatioista oli kysymys.</p>	
Avainsanat	<i>Arabidopsis thaliana</i> , CRISPR/Cas9, mutaatio, kasvien transformatio

Author(s) Title	Taina Hakso CRISPR/Cas9-guided Modification of the <i>Arabidopsis thaliana</i> Genome
Number of Pages Date	33 pages + 3 appendices 16 October 2017
Degree	Bachelor of Laboratory Services
Degree Programme	Laboratory Sciences
Instructor(s)	Iris Sevilem, Doctoral Student Tiina Soininen, Senior Lecturer
<p>Safety of the genetic modification of plants divides opinions about health effects and risks for the environment. Genetic modification methods used in the past have proved to work in a haphazard manner. Due to its accuracy and rapidity, CRISPR/Cas9-method can revolutionize the genetic modification of plants. In this method, foreign genes are not transferred to the plant but the aim is to modify plant's own genes.</p> <p>This study was made at the Institute of Biotechnology at the University of Helsinki. The aim was to modify the genome of <i>Arabidopsis thaliana</i> by the CRISPR/Cas9-method and thus cause a mutation, the type of which was not certain in advance. The aim was that the entire plant – both the leaves and the roots – had mutated. This study is part of a larger study to determine the function of transcription factor X. The hypothesis is that this transcription factor regulates cell division in certain cells.</p> <p>The term CRISPR is an abbreviation for Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, meaning bacterial DNA segments consisting of short, repetitive base sequences and short DNA spacers between them. CRISPR is an essential part of the immune system of many bacteria and most of the archaea, which these use to protect against viral attacks. Cas is a CRISPR-associated endonuclease enzyme which can cut the DNA molecule.</p> <p>The work was carried out partly in a greenhouse and partly in a laboratory. Plants, which were grown in MS-medium plates in the light cabinet in advance, were planted to soil in the greenhouse and allowed to grow for a few weeks. The CRISPR-construct was made in the laboratory with PCR-reactions, restrictions and ligation. The transformations to both <i>Escherichia coli</i> and agrobacterium were made by electroporation. The transformation to <i>Arabidopsis thaliana</i> was made <i>in planta</i> by agrobacterium-mediated floral dip -method.</p> <p>Making the CRISPR-construct and transformations to both <i>E. coli</i> and agrobacterium were successful. Plants were grown and produced flowers in a greenhouse. The ligation reaction proved to be very difficult and requires much optimization to increase the transformation efficiency and in that way the success rate of entire work. Due to lack of time, it remained unclear whether the plants were mutated and what types of CRISPR/Cas9-mutations had been formed.</p>	
Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , CRISPR/Cas9, mutation, plant transformation

# Sisällys

## Lyhenteet

1	Johdanto	1
2	Teoriaa	2
2.1	Arabidopsis thaliana	2
2.2	Kasvien transformaatio	4
2.2.1	Agrobakteerivälitteinen geeninsiirto	4
2.2.2	Biolistinen transformaatio	6
2.2.3	Elektroporaatio	7
2.2.4	Muita kasvisolujen transformaatiomenetelmiä	8
2.3	CRISPR/Cas	8
2.3.1	Tyypin II CRISPR-menetelmä	10
2.3.2	Kaksoissäiekatkoksen korjausmekanismit	12
2.3.3	CRISPR/Cas9:n käyttö geenitekniikassa	13
3	Työn suoritus	15
3.1	Lähtötilanne	15
3.2	CRISPR-konstruktin valmistus	16
3.2.1	Ensimmäisen vaiheen PCR	16
3.2.2	Toisen vaiheen PCR	18
3.2.3	Digestio	18
3.2.4	Ligaatio	19
3.3	Transformaatio E. coli -bakteeriin	20
3.4	Transformaatio agrobakteeriin	21
3.5	Arabidopsis thalianan transformaatio dippaamalla	22
4	Työn tulokset	23
5	Johtopäätökset	29
	Lähteet	31

## Liitteet

Liite 1. PCR(AD)-tuotteen DNA-pitoisuus ja puhtaus  $A_{260} / A_{280}$  NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna

Liite 2. Digestoidun PCR-tuotteen eli insertin DNA-pitoisuus ja puhtaus  $A_{260} / A_{280}$  NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna

Liite 3. Digestoidun plasmidivektori Y:n DNA-pitoisuus ja puhtaus  $A_{260} / A_{280}$  NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna

## Lyhenteet

Cas-proteiini	<i>CRISPR associated protein</i> . CRISPR-järjestelmään liittyvä proteiini.
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat</i> . Alue bakteerien genomissa, jota käytetään puolustauduttaessa taudinaiheuttajia vastaan.
crRNA	<i>CRISPR RNA</i> . RNA, joka muodostuu immuunijärjestelmässä.
dNTP	Yleisnimi deoksiribonukleosiditriposfaateille. dNTP voi olla joko dATP, dCTP, dGTP, dTTP tai kaikkien niiden seos.
DSB	<i>Double-stranded break</i> . Kaksoisäiekatkos. Katkos molemmissa DNA-juosteissa.
dsRNA	<i>Double-stranded RNA</i> . Kaksijuosteinen RNA.
gRNA	<i>Guide RNA</i> . Ohjain-RNA. Endogeenisen bakteeri-crRNA:n ja tracrRNA:n synteettinen fuusio.
HDR	<i>Homology-directed repair</i> . DNA:n korjausmekanismi, jossa korjaus tehdään templaatin avulla.
HNH	Cas9:n endonukleaasidomeeni, joka katkaisee DNA-juosteen, joka on komplementaarinen sgRNA:n kanssa.
MS-malja	<i>Murashige and Skoog</i> . Kasvualusta, jota käytetään laboratoriossa sekä kasvien kasvattamiseen että kasvisoluviljelmille.
NHEJ	<i>Non-Homologous End Joining</i> . DNA:n korjausmenetelmä, jossa katkenneet päät liitetään yhteen.
PAM-jakso	<i>Protospacer adjacent motif</i> . Lyhyt DNA-sekvenssi välittömästi kohdesekvenssin perässä, joka tarvitaan, jotta Cas9 voi sitoutua kohde-DNA:han.

RuvC	Cas9:n endonukleaasidomeeni, joka pilkkoo DNA-juosteen, joka ei ole komplementaarinen sgRNA:n kanssa.
sgRNA	<i>Single guide RNA</i> . Synteettinen RNA-ohjausjakso, joka kohdesekvenssin avulla ohjaa Cas9:n haluttuun kohtaan organismin genomissa.
T-DNA	Transfer DNA. Siirtäjä-DNA. Osa Agrobakteerin Ti-plasmidia, jolla on kyky siirtää geneettistä materiaalia osaksi kasvin genomia.
Ti-plasmidi	<i>Tumor-inducing</i> . Geeninsiirrossa käytetty vektori, joka on eristetty <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -bakteerista.
TMV	<i>Tobacco Mosaic Virus</i> . Tupakan mosaiikkivirus. Kasvivirus, jota käytetään virusvektorina.
tracrRNA	<i>Trans-activating crRNA</i> . Transaktiivinen crRNA, jonka avulla crRNA saadaan liitettyä Cas-entsyymiin.
TRV	<i>Tobacco Rattle Virus</i> . Kasvivirus, jota käytetään virusvektorina.
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i> . Virusvälitteinen geenien hiljentäminen.

## 1 Johdanto

Kasvien geenimuuntelu jakaa mielipiteitä terveysvaikutustensa ja ympäristöriskiensä vuoksi. Tietyllä tasolla geenimuuntelua on tapahtunut jo tuhansien vuosien ajan esimerkiksi risteytys- ja mutaatiojalostuksen muodossa. Nämä aiemmin käytetyt geenimuuntelukeinot ovat kuitenkin osoittautuneet melko sattumanvaraisiksi.

CRISPR/Cas9-tekniikka, joka on julistettu biologian vuosisadan keksinnöksi, voi tarkkuutensa ja nopeutensa ansiosta mullistaa koko kasvien geenimuuntelun. Siinä kasviin ei siirretä vieraita geenejä, vaan muokataan kasvin omia geenejä esimerkiksi hiljentämällä niitä. Kasvien genomeja CRISPR-tekniikalla muokkaamalla voidaan kasvien ravinnekoostumusta sekä niiden maku-, säilyvyys- ja viljelyominaisuuksia parantaa. Kasvit saadaan kestävämpään paremmin kuivuutta, kylmyyttä, kuumuutta tai tauteja ja ne voidaan lisäksi saada vastustuskykyisiksi tuhohyönteisille, mikä vähentäisi torjunta-aineiden käyttöä. Yhdysvalloissa CRISPR/Cas9-tekniikalla jalostettuja kasveja – appelsiineja, perunoita, vehnää, riisiä ja tomaatteja – ei ole määritelty geenimuunnelluiksi ja ne saadaan markkinoille lähivuosina. Tulevaisuus näyttää, miten EU asiaan suhtautuu. [1.]

Opinnäytetyö tehtiin Helsingin yliopistolla Biotekniikan instituutissa. Työn tavoitteena oli CRISPR/Cas9-menetelmää käyttämällä muokata *Arabidopsis thaliana* eli lituruohon genomia aiheuttaen siihen mutaatio. Etukäteen ei tiedetty varmasti, millaisesta mutaatiosta on kyse. Todennäköisesti sgRNA:n (englanniksi single guide RNA) eli synteettisen RNA-ohjausjakson sekvenssin alkupäässä tapahtuu yhden nukleotidin muutos, jolloin aminohapot muuttuvat ja syntyy mutantti, jossa useampi geeni on knokattuna pois eli ei toimi. Tarkoituksena on, että koko kasvi – sekä lehdet että juuret – on mutatoitunut.

Tämä opinnäytetyö on osa isompaa tutkimuskokonaisuutta, jossa pyritään selvittämään transkriptiofaktorin X tehtävä. Hypoteesi on, että kyseinen transkriptiofaktori säätelee solunjakautumista tietyissä soluissa.



## 2 Teoriaa

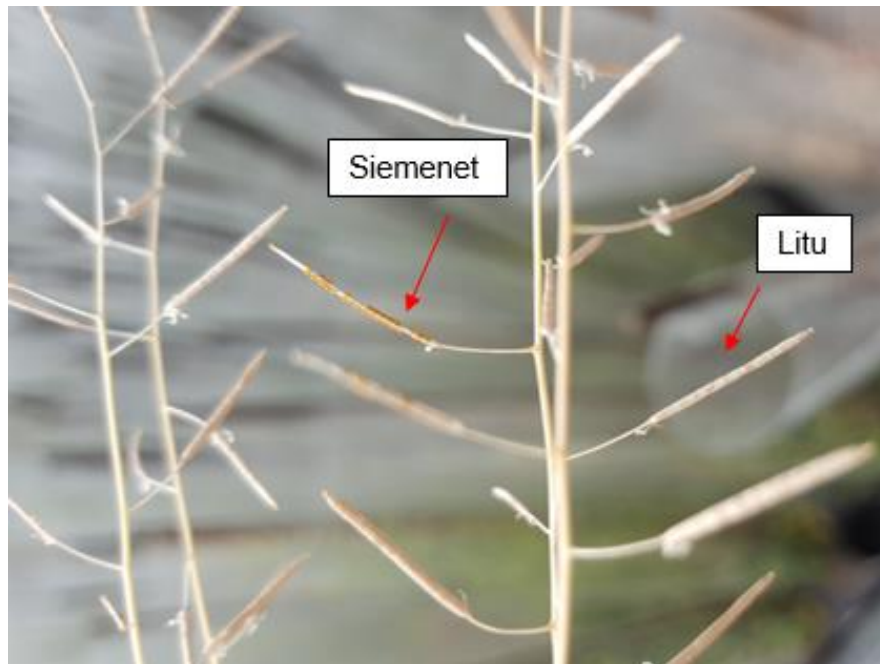
### 2.1 *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* eli lituruoho on yksivuotinen, touko–kesäkuussa kukkiva ruohokasvi, joka kuuluu ristikukkaiskasvien heimoon (kuva 1). Hentovartinen lituruoho kasvaa 10–30 cm:n korkuiseksi ja voi olla joko yksi- tai monivartinen. Sen valkoisessa kukassa on neljä 2–4 mm pitkää terälehteä ja tavallisesti neljä sinipunertavaa verholehteä. [2.]



Kuva 1. *Arabidopsis thaliana* eli lituruoho [3].

Itsepölytys on hyvän siementuotannon ehto, koska pienet kukat houkuttelevat huonosti hyönteisiä. Lituruohon kaareva, monisiemeninen hedelmä eli litu on yleensä 10–15 mm pitkä (kuva 2). *Arabidopsis thaliana* viihtyy kuivahkoilla kasvupaikoilla kuten kallioilla, kedoilla, pientareilla, luodoilla ulkosaaristossa ja jopa ratapihoilla tai satamissa. [2.]



Kuva 2. *Arabidopsis thaliana* litu ja siemenet.

*Arabidopsis thaliana* on ensimmäinen kasvilaji, jonka koko genomi on sekvensoitu. Tuolloin, vuonna 2000, saadun DNA-sekvensointidatan perusteella sen genomin koon arvioitiin olevan 125 Mb. Myöhemmät tutkimukset ovat osoittaneet sen genomin kuitenkin olevan noin 25 % oletettua suurempi eli noin 157 Mb. [4; 5.]

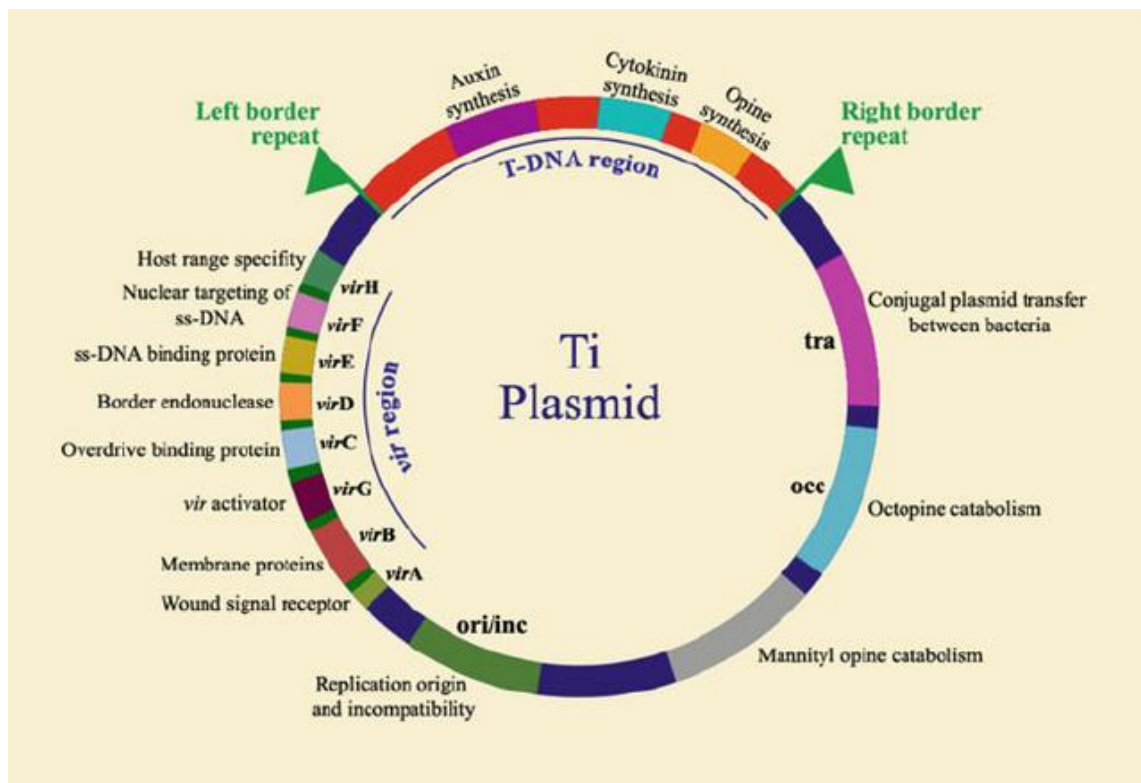
*Arabidopsis thaliana* käytetään maailmanlaajuisesti malliorganismina kasvikunnan geneettisissä perustutkimuksissa sekä molekyylibiologiassa useista syistä. Se on pienikokoinen ja helppohoitoinen, joten se soveltuu hyvin laboratoriokasvatukseen. Se on lisäksi nopeakasvuinen ja sillä on lyhyt elinkaari eli siementen itämisestä uusien siementen tuottamiseen kuluu aikaa vain noin kuusi viikkoa. Yksi kasvi voi tuottaa jopa 10 000 siementä. *Arabidopsis thaliana*lla on 27 400 geeniä viidessä kromosomissa eli sen genomi on yksi kasvikunnan pienimmistä. Siihen on lisäksi helppo siirtää genejä muista monimutkaisemmista kasveista käyttämällä *Agrobacterium tumefaciens* -bakteeria vektorina. Itsepölytyksen ansiosta resessiiviset eli peittyvät mutaatiot tulevat nopeasti homotsygotteiksi ja siten ilmenevät. [2; 6.]

## 2.2 Kasvien transformaatio

Transformaatio on geneettisen materiaalin siirtymistä solusta toiseen paljaan plasmidi-DNA:n välityksellä. Kasvisolujen transformaatioon on olemassa useita keinoja riippuen siitä, käytetäänkö *in vivo*- vai *in vitro* -menetelmää. [7, s. 140–144.]

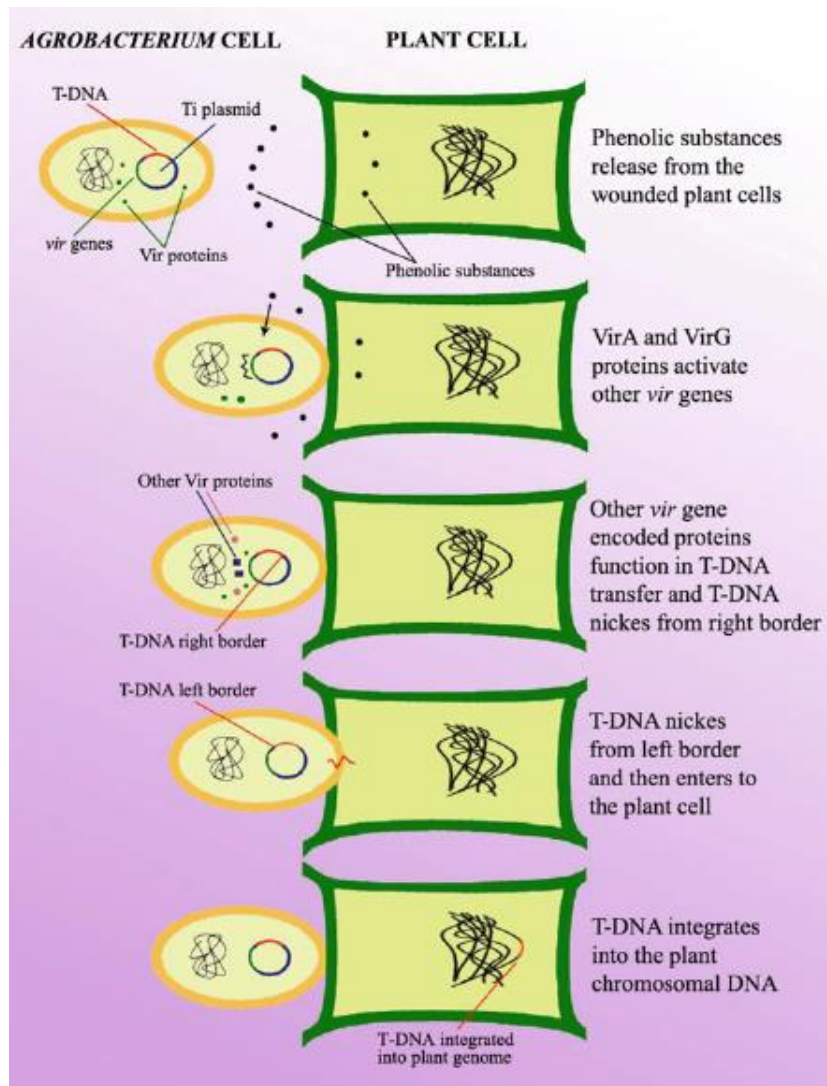
### 2.2.1 Agrobakteerivälitteinen geeninsiirto

Agrobakteerivälitteinen geeninsiirto on käytetyin transformaatiomenetelmä useimmilla lehtipuilla ja kaksisirkkaisilla kasveilla, joihin myös *Arabidopsis thaliana* kuuluu. Menetelmän on todettu toimivan myös joillakin yksisirkkaisilla kasveilla, kuten esimerkiksi maisilla, riisillä ja jopa vehnällä. [8; 9; 10.] Agrobakteerit ovat maaperässä esiintyviä kasvien tuholaisia ja taudinaiheuttajia, joilla on kyky siirtää geneettistä materiaalia kasvisoluun. Geeninsiirrossa käytetään vektoreina *Agrobacterium tumefaciens* -bakteerista eristettyjä Ti-plasmideja (englanniksi tumor-inducing), jotka luonnossa aiheuttavat kasveihin syöpäkasvaimia (kuva 3). Geeninsiirtoa varten Ti-plasmidista on poistettu kasvaimia aiheuttava geeni. [11, s. 235; 12.]



Kuva 3. Ti-plasmidi [13, s. 323].

Agrobakteerivälitteisessä geeninsiirrossa siirrettävä DNA liitetään restriktioentsyymien avulla Ti-plasmidin siirtäjä DNA:han eli T-DNA:han (englanniksi transfer-DNA). Vahingoittuneesta kasvisolusta vapautuu fenolisia aineita ja bakteerin virulenssisysteemi aktivoituu. Kun kasvisolukko infektoidaan plasmideja sisältävillä bakteerisolulla, siirrettävän DNA:n sisältävä T-DNA siirtyy kasvisolun tumaan ja integroituu genomiin. [12; 13, s. 326.] Agrobakteerivälitteisen geeninsiirron vaiheet on esitetty kuvassa 4.



Kuva 4. Agrobakteerivälitteisen geeninsiirron vaiheet [13, s. 326].

Joitakin sekä yksi- että kaksisirkkaisia kasvilajeja voidaan transformoida myös ilman aikaa vieviä solukkoviljelmiä tai regeneraatiota ns. *in planta* -menetelmällä joko vakuumisuodatuksen avulla tai dippaamalla. Erityisesti *Arabidopsis thaliana* transformaatiomenetelmänä dippaus on lähes korvannut kaikki muut tekniikat yksinkertaisuutensa, tehokkuutensa, nopeutensa ja edullisuutensa vuoksi. [14, s. 11085.]

Vakuumisuodatuksessa muutaman viikon ikäiset kasvit irrotetaan kasvualustastaan varovasti juurineen ja laitetaan agrobakteeriliuoksessa tyhjiökammioon. Vakuumin vaikutuksesta ilma kuplii pois kasveista ja korvautuu agrobakteeriliuoksella. Vakuumisuodatuksen jälkeen kasvit istutetaan välittömästi uudelleen multaan ja suojataan muovilla kosteuden säilyttämiseksi. [15, s. 560–561.]

Käyttämällä surfaktanttia eli pinta-aktiivista ainetta (Silwet) vakuumisuodatus voidaan korvata dippauksella. Dippauksessa kukkivat kasvit kastetaan liuokseen, joka sisältää agrobakteeria, sakkaroosia ja Silwetiä. Sakkaroosi ja Silwet ovat välttämättömiä transformaation onnistumisen kannalta. Kosteuden säilyttämiseksi kasvit peitetään vuorokauden ajaksi dippauksen jälkeen, mikä parantaa transformaatioastetta. Sekä vakuumisuodatuksessa että dippauksessa infektoidaan vielä hedelmöittymätön siemenaihe, minkä jälkeen kasvien annetaan kasvaa normaalisti ja tuottaa siemeniä, jotka myöhemmin kerätään. Transformanttien selektiomenetelmänä käytetään joko herbisidi- tai antibiootiresistenssiä. Herbisidit ovat rikkakasvien torjunta-aineita. [14, s. 11087–11088; 15, s. 561–562.]

### 2.2.2 Biolistinen transformaatio

Yksisirkkaisten kasvien transformaatioissa solut ovat usein protoplasteina eli niiden solukalvoa ympäröivä soluseinä on entsyymaattisesti poistettu. Käsittelyn jälkeen solujen on helpompi ottaa DNA:ta sisäänsä. Protoplastit regeneroidaan transformaation jälkeen ja niistä kasvatetaan kasvihormonikäsittelyn avulla uusia taimia. [7, s. 144.]

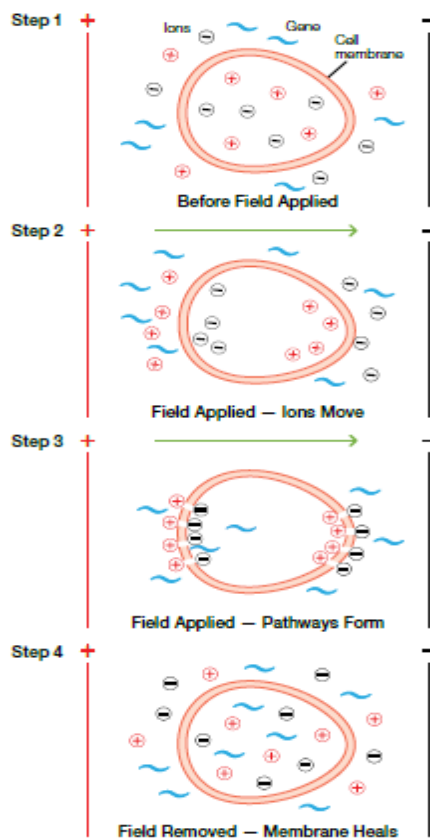
Havupuut ja yksisirkkaiset kasvit, kuten yleisimmät viljakasvit, eivät ole luontaisia isäntäkasveja agrobakteerille, joten Ti-plasmidivektorit eivät yleensä sellaisenaan sovellu kyseisille kasveille. Tällöin voidaan käyttää esimerkiksi biolistista transformaatiota, jossa kasvisolukkoa pommitetaan pienillä kulta- tai volframahiukkasilla, joiden pinnalle on saostettu siirrettävää DNA:ta. Hiukkaset kiihdytetään partikkelipommitimesta riippuen joko sähkövarauksen tai kaasunpaineen purkauksella. Hiukkasista, jotka ovat tunkeutuneet sisälle soluun, liukenee DNA:ta, joka kulkeutuu kasvisolun tumaan ja integroituu osaksi kasvisolun tumassa olevaa DNA:ta. [7, s. 144; 11, s. 235–236.]

Biolistisen transformaation etuja ovat sen nopeus, helppous ja monipuolisuus. DNA:ta tarvitaan vain pieniä määriä, mutta käytetyt DNA-fragmentit voivat olla isojakin. Menetelmällä saavutetaan hyvä toistettavuus. Haittapuolena voidaan pitää sitä, että laitteet ovat

kalliita. Lisäksi näytteiden valmistus vie aikaa, eikä menetelmä ole yhtä tehokas kuin esimerkiksi elektroporaatio. [16, s. 34.]

### 2.2.3 Elektroporaatio

Elektroporaatio on yleisesti käytetty transformaatiomenetelmä, jota voidaan käyttää sekä yksi- että kaksisirkkaisille kasveille. Siinä soluille annetaan tarkoitukseen sopivalla laitteella korkeajännitteinen, vain muutamasta mikrosekunnista millisekuntiin kestävä sähköpulsssi, joka vaurioittaa soluseinää aiheuttaen siihen lyhytikäisiä reikiä, joiden kautta vieras DNA saadaan siirtymään solun sisään. Kun sähkökenttä suljetaan, reiät umpeutuvat sulkien vieraan DNA:n solun sisään (kuva 5). Jännitepulssein voimakkuutta ja kestoa muutetaan solutyypin mukaan. [7, s. 143; 16, s. 27; 17.]



Kuva 5. Elektroporaation vaiheet [16, s. 27].

Elektroporaatiolla saavutetaan yleensä nopeasti ja helposti erittäin hyvä transformaatitehokkuus. Lisäksi se soveltuu monille solutyypeille, eikä näytä muuttavan kohdesolujen biologista rakennetta tai toimintaa. Menetelmän suurin haittapuoli on solukuolleisuus,

joka aiheutuu korkeaajännitteisestä pulssista ja vain osittain onnistuneesta soluseinän reikien umpeutumisesta. [16, s. 29; 17.]

#### 2.2.4 Muita kasvisolujen transformaatiomenetelmiä

Kasvisoluja voidaan transformoida myös mikroinjektiolla, liposomien ja polyetyleeniglykolin (PEG) avulla tai virus-välitteisesti geenejä hiljentämällä eli ns. VIGS-menetelmällä (englanniksi Virus-induced Gene Silencing).

Mikroinjektiossa siirretään ohuen neulan avulla paljasta DNA:ta suoraan kohdekasvin tumaan. Menetelmä on tarkka, eikä se vahingoita soluja. Sen käyttö on kuitenkin kallista, teknisesti vaativaa, hidasta ja työlästä, koska solut tai protoplastit käsitellään yksi kerrallaan. [16, s. 35.]

Geneettistä materiaalia voidaan siirtää kasvisoluun myös liposomien avulla. Liposomit ovat rakkuloita, jotka muodostuvat fosfolipidikalvosta. Sähköisten vuorovaikutusten avulla liposomi ympäröi plasmidi-DNA:n. Solukalvon ja liposomin kalvon sulautuessa toisiinsa liposomi voi luovuttaa sisältönsä soluun. [16, s. 12–13.]

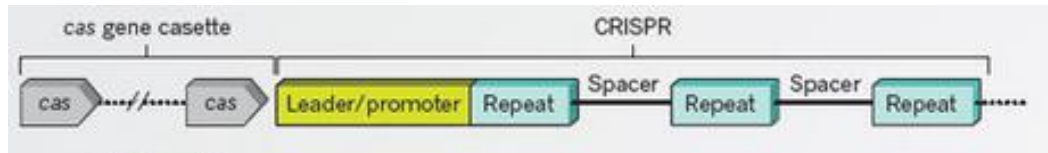
Polyetyleeniglykoli (PEG) on kemikaali, jota käytetään helpottamaan DNA:n siirtymistä protoplasteihin. Sen teho perustuu sen kykyyn lisätä solukalvon läpäisevyyttä. Sitä käytetään usein yhdessä magnesiumin ( $Mg^{2+}$ ) tai kalsiumin ( $Ca^{2+}$ ) kanssa. [18, s. 22.]

VIGS on kustannustehokas, nopea ja helppokäyttöinen menetelmä. Halutun geenifragmentin sisältävät virusvektorit infektoivat kohdesolun, jolloin alkaa muodostua kaksijuosteista RNA:ta (dsRNA), mikä aloittaa kohdegeenin hiljentämisen kasvissa. VIGS-menetelmässä voidaan käyttää useita eri virusvektoreita, joita ovat esimerkiksi TRV (englanniksi Tobacco Rattle Virus) ja tupakan mosaiikkivirus TMV (englanniksi Tobacco Mosaic Virus). [18, s. 26; 19, s. 21.]

### 2.3 CRISPR/Cas

CRISPR-nimitys tulee englanninkielisistä sanoista Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, mikä tarkoittaa bakteerien DNA-segmenttejä, jotka koostu-

vat lyhyistä toistuvista emäsjaksoista ja niiden välissä sijaitsevista lyhyistä, eksogeenisistä DNA-välikappaleista (kuva 6). Toistojaksojen koot vaihtelevat yleensä 28 ja 37 emäsparin välillä ja välikkeiden 32 ja 38 emäsparin välillä. [20, s. 234.]



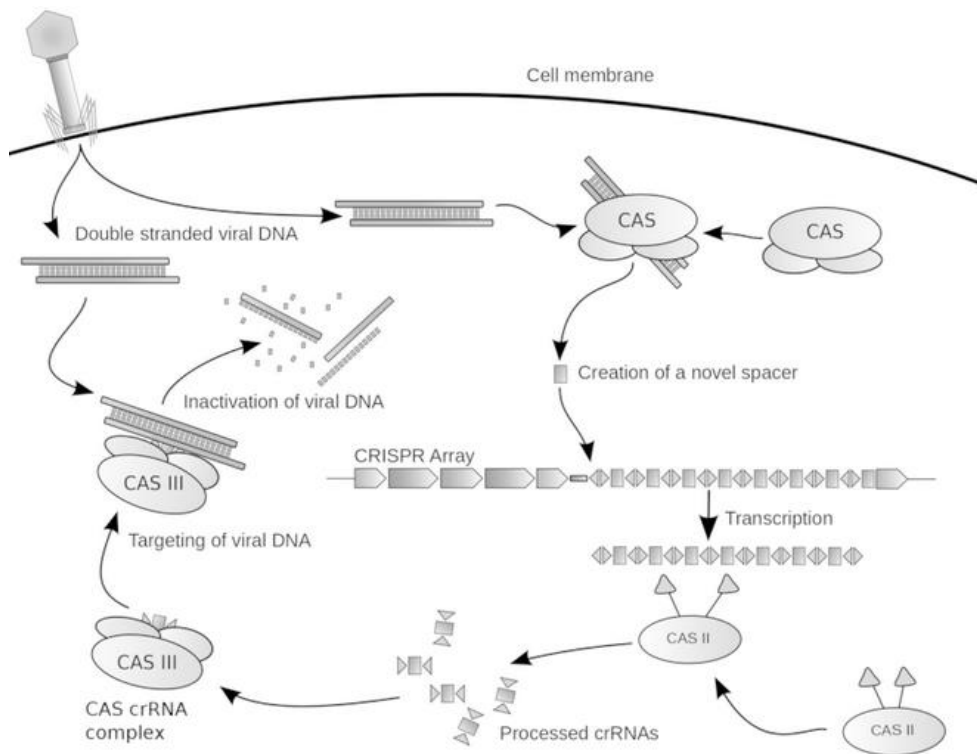
Kuva 6. Yksinkertaistettu esimerkki CRISPR-lokuksesta [21, s. 332, muokattu].

Cas (CRISPR associated protein) on CRISPR:iin liittyvä endonukleaasientsyymi, jolla on kyky katkaista DNA-molekyyli. CRISPR/Cas-systeemit ja niihin liittyvät elementit vaihtelevat suuresti riippuen esimerkiksi genomien koosta, geeneistä ja sekvensseistä. Yhdessä genomissa voi olla useita CRISPR:tä, joista vain yksi liittyy Cas-geeneihin. [20, s. 234.]

CRISPR-sekvenssit löydettiin *Escherichia coli* -bakteerin genomista jo vuonna 1987, mutta niiden toiminta selvitettiin vasta vuonna 2007, jolloin havaittiin, että *Streptococcus thermophilus* -bakteeri voi tulla vastustuskykyiseksi bakteriofageille integroimalla viruksen genomifragmentin CRISPR-alueeseensa. CRISPR on tärkeä osa monien bakteerien ja useimpien arkkien immuunijärjestelmää, jonka avulla ne puolustautuvat virusten hyökkäyksiä vastaan. [22, s.167–168; 23, s. 13.]

Luonnossa CRISPR-mekanismien toiminta vaihtelee sen mukaan, kohtaako bakteeri uuden viruksen vai tunnistaako jo aiemmin kohtaamansa viruksen (kuva 7). Bakteerin kohdatessa sellaisen viruksen DNA:ta, jolle se ei ennestään ole immuuni, alkaa se tuottaa Cas-nukleaasia, joka katkaisee viruksen DNA:sta sopivan pituisen palan. Pala liitetään pysyväksi välikappaleeksi bakteerin DNA:n CRISPR-alueeseen, jolloin bakteeri pystyy seuraavalla kerralla tunnistamaan kyseisen viruksen ja puolustautumaan infektiolta. [22, s.167–168; 23, s. 12–13.]





Kuva 7. CRISPR:n toiminta luonnossa [22, s. 168].

Kuvasta 7 voidaan nähdä myös, miten CRISPR-mekanismi toimii luonnossa silloin, kun bakteeriin tunkeutuu sellaisen viruksen DNA:ta, jolle bakteeri on jo immuuni. Aiemman kohtaamisen perusteella saatu CRISPR-alueen DNA:n informaatio välitetään transkription avulla RNA:lle. Tuotettu RNA pilkkoutuu crRNA:ksi (CRISPR RNA). Cas ja crRNA yhdistyvät ja muodostavat kompleksin, joka crRNA:n komplementaarisen sekvenssin avulla sitoo viruksen DNA:n, jolloin Cas katkaisee ja tuhoaa sen. [22, s.167–168; 23, s. 12–13.]

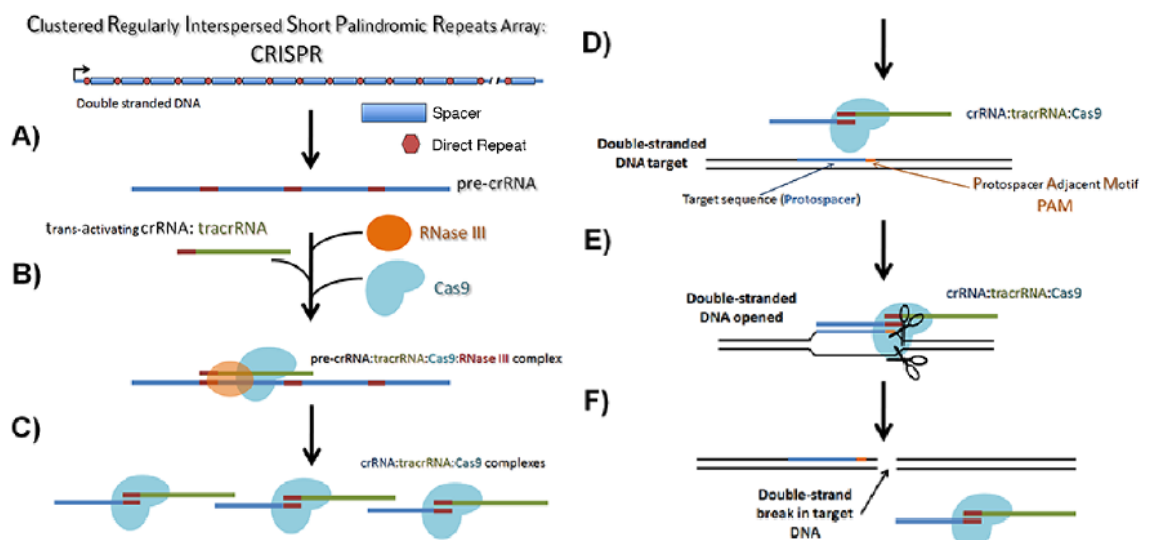
CRISPR-mekanismeja on tähän mennessä löydetty kolmenlaisia, joista jokaisesta on olemassa myös useita alatyyppejä. Mekanismit eroavat toisistaan sen perusteella, mikä Cas-endonukleaasi niihin liittyy. [24.]

### 2.3.1 Tyypin II CRISPR-menetelmä

Tyypin II CRISPR-menetelmää on eniten tutkittu ja se on ainutlaatuinen muihin CRISPR-mekanismeihin verrattuna, koska siinä geenien hiljentämiseen tarvitaan vain yksi endonukleaasientsyymi (Cas9), joka löydettiin *Streptococcus pyogenes* -bakteerista [24].

CRISPR/Cas9-systeemi koostuu lyhyestä koodaamattomasta ohjain-RNA:sta (gRNA), joka puolestaan on kahden komponentin eli endogeenisen, kohdespesifisen CRISPR RNA:n (crRNA) sekä erillisen pienen transaktiivisen crRNA:n (tracrRNA) synteettinen fuusio. TracrRNA:lla on kaksi funktiota: hybridisoituminen crRNA:n toistosekvenssin kanssa ja Cas-proteiinin sitominen. TracrRNA sisältää sekvenssin, joka on komplementaarinen transkription avulla tuotetun crRNA:n palindromisen toistokohdan kanssa. [23, s. 12–14.]

Bakteeriin tunkeutuvasta vieraasta DNA:sta katkaistu pala liitetään bakteerin genomien CRISPR-alueeseen, minkä jälkeen transkription avulla tuotetaan pre-crRNA:ta eli CRISPR RNA:n esimuotoa. RNAasi III, Cas9, pre-crRNA ja tracrRNA muodostavat kompleksin, joka pilkkoo tuotetun pre-crRNA:n crRNA:ksi. crRNA, joka on sitoutuneena Cas9/tracrRNA-kompleksiin, tunnistaa kohdesekvenssin, jos sen 3'-päässä on tietty PAM-jakso (Protospacer Adjacent Motif) ja ohjaa Cas9-endonukleaasin PAM-alueelle kohdesekvenssin kohdalle. Jokaisella CRISPR/Cas-variantilla on oma spesifinen PAM-jaksonsa, joka määrittää variantin kohdesekvenssin. II-tyyppin menetelmässä *S. pyogenes* käyttämä PAM-jakso on 5'NGG3' eli alussa 5'-päässä mitä tahansa nukleotideja ja lopussa 3'-päässä kaksi guaniiniemästä. PAM löytyy kohde-DNA:sta, mutta ei crRNA:sta. Cas9/crRNA/tracrRNA-kompleksi katkaisee vieraan DNA:n noin 3–4 nukleotidin päästä PAM-sekvenssistä ylävirtaan. II-tyyppin CRISPR-menetelmän toiminta on esitetty kuvassa 8. [24; 25, s. 29.]

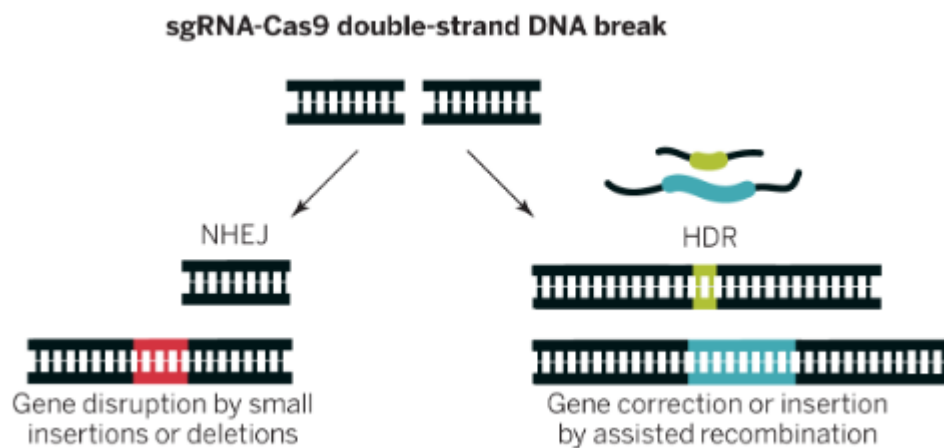


Kuva 8. Tyyppin II CRISPR-menetelmä [23, s. 21].

Cas9:n toiminta DNA-säikeiden katkaisussa perustuu kahden endonukleasidomeenin, RuvC:n ja HNH:n olemassaoloon. HNH-domeeni katkaisee komplementaarisen säikeen, kun taas RuvC-domeeni pilkkoo ei-komplementaarisen säikeen aiheuttaen DSB:n (double-stranded break) eli kaksoissäiekatkoksen. [24.]

### 2.3.2 Kaksoissäiekatkoksen korjausmekanismit

DNA:n kaksoisjuosteen katkeaminen aktivoi kaksoisjuosteen korjausmekanismin. Pääasiallisia kaksoissäiekatkoksen korjaustapoja on kaksi: homologinen HDR-systeemi (homology-directed repair) ja ei-homologinen NHEJ-systeemi (Non-Homologous End Joining) (kuva 9). HDR-välitteisessä korjauksessa soluun viedään korjaustemplaatti, joka sitoutuu katkoksen kohdalle. NHEJ-menetelmässä dimeerinen proteiinikompleksi tunnistaa katkenneet päät, jotka saadaan liitettyä yhteen kinaasi-entsyymien ja DNA-ligaasien avulla. [24.]

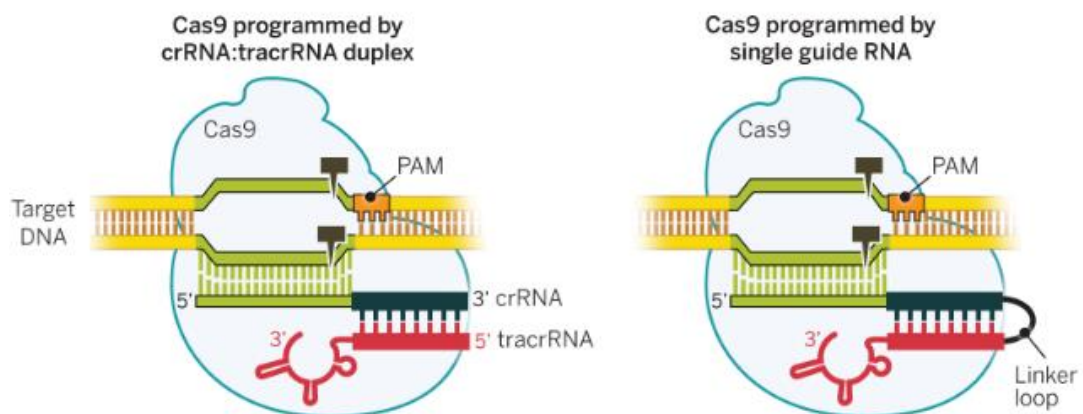


Kuva 9. Yleisimmät kaksoissäiekatkoksen korjausmekanismit [26, s. 1082].

NHEJ-välitteinen korjaus on nopea ja tehokas, mutta herkkä virheille, koska sitä käytettäessä syntyy katkosalueelle usein pieniä muutaman nukleotidin insertioita tai deleetioita, jotka häiritsevät sekvenssiä ja aiheuttavat mutaatioita. Kyseinen tapa on hyödyllinen esimerkiksi silloin, kun tarkoituksena on aikaansaada "knock-out" kohdegeenissä eli tarkastella geenin poiston vaikutusta soluun. HDR-menetelmä ei ole yhtä tehokas kuin NHEJ-menetelmä, mutta sillä saadaan aikaan tarkkoja nukleotidimuutoksia ja mutaatioita. [23, s. 47–51; 27.]

### 2.3.3 CRISPR/Cas9:n käyttö geenitekniikassa

CRISPR/Cas9 on yksi tehokkaimmista viime vuosina kehitetyistä genomien muokkaustekniikoista. Lisäksi menetelmä on edullinen, laajasti sovellettavissa ja sen käyttö on yksinkertaista. II-tyyppin CRISPR-mekanismista kehitettiin muutama vuosi sitten vieläkin käytännöllisempi versio, joka on laajasti käytössä geenitekniikassa monissa solulinjoissa ja organismeissa, kuten bakteereissa, kasveissa, eläimissä ja ihmisissä. [27.] Siinä luonnossa normaalisti erillään olevat tracrRNA ja crRNA on yhdistetty yhtenäiseksi synteettiseksi RNA-ohjausjaksoksi sgRNA:ksi kuvan 10 mukaisesti [26, s. 1081].

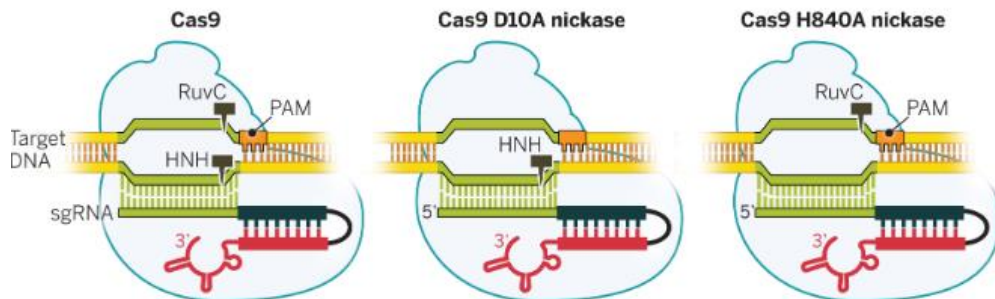


Kuva 10. Luonnossa normaalisti erillään olevat tracrRNA ja crRNA on yhdistetty yhtenäiseksi synteettiseksi RNA-ohjausjaksoksi sgRNA:ksi [26, s. 1081].

Kun CRISPR-segmentti ja Cas9-proteiini on plasmidivektorin avulla viety solun sisään, sgRNA ohjaa Cas9:n haluttuun kohtaan organismin genomissa kohdesekvenssin avulla. Tämän jälkeen kyseistä genomien kohtaa voidaan muokata halutulla tavalla. [23, s. 20; 24.]

CRISPR/Cas9 on erittäin täsmällinen ja tarkka genomimuokkaustekniikka, kun sgRNA on suunniteltu oikein, mutta kliinisessä käytössä sen spesifisyys on edelleen suuri huolenaihe. Spesifisyys määräytyy sen mukaan, kuinka spesifinen sgRNA:n kohdesekvenssi on verrattuna muuhun perimään. Ihanteellisessa tilanteessa sgRNA:n sekvenssi on genomissa täydellisesti homologinen ainoastaan kohde-DNA:n kanssa, mutta todellisuudessa sgRNA:n kohdesekvenssissä on koko genomien alueella ns. "off-target" -alueita, joissa homologia on vain osittaista. Sitoutumisen tapahtuessa "off-target" -alueelle DNA katkeaa väärästä kohdasta. CRISPR-järjestelmän spesifisyyttä voidaan lisätä optimoimalla sgRNA:n suunnittelu sekä muokkaamalla Cas9-entsyymiä. [23, s. 56.]

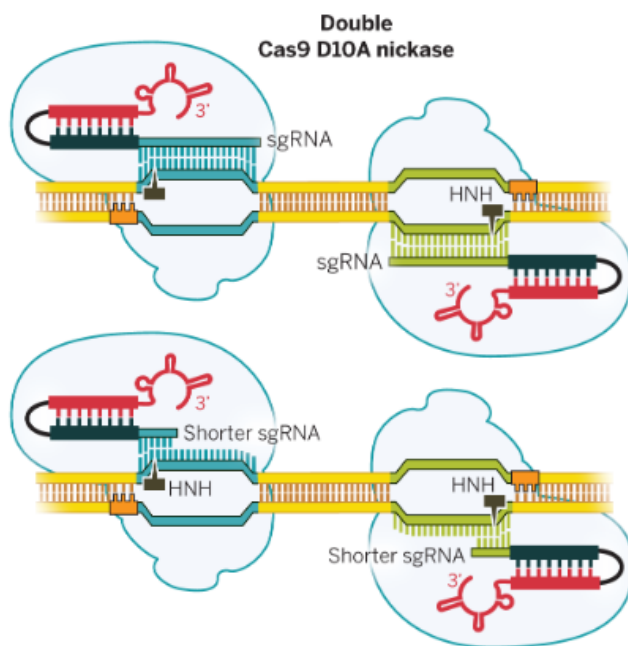
Cas9-entsyymiä voidaan muokata esimerkiksi siten, että se sisältää vain yhden endonukleasidomeenin, joko RuvC:n tai HNH:n, jolloin vain yksi DNA-juoste katkeaa, eikä NHEJ-korjausmekanismi aktivoidu. Muokattua entsyymiä kutsutaan Cas9 nickase:ksi (nCas9) (kuva 11). [23, s. 56.]



Kuva 11. Cas9 nickase [26, s. 1082].

Yhden juosteen katkettua korjaus tapahtuu HDR-välitteisesti käyttämällä ehjää DNA-juostetta templaattina, ja mutaatioilta välttyään [23, s. 56].

Jos nCas9-entsyymiä käytetään kahden sgRNA:n kanssa, jotka tunnistavat DNA:n vastakkaiset juosteet, muodostuu porrastettu kaksoissäiekatkos, josta käytetään nimitystä double nickase (kuva 12) [23, s. 56; 26, s. 1082].



Kuva 12. Double Cas9 nickase [26, s. 1082].

Double Cas9 nickase lisää CRISPR:n kohdespesifisyyttä huomattavasti, koska on epätodennäköistä, että "off-target"-alueelle muodostuisi kaksi katkosta niin lähekkäin, että niistä muodostuisi kaksoissäiekatkos [23, s. 56].

### 3 Työn suoritus

#### 3.1 Lähtötilanne

Ennen opinnäytetyön aloittamista *Arabidopsis thaliana* siemenet, jotka olivat ekotyypiltään villityyppi Columbiaa, oli steriloitu ja viljelty laminaarissa steriileille 0,5 x MS-maljoille (Murashige and Skoog) eli maljoilla oli vain puolet tavallisesta MS-vahvuudesta. Kasveja oli kasvatettu maljoilla valokaapissa parin viikon ajan.

Kasvit irrotettiin maljalta varovasti juurineen pinsettien avulla ja istutettiin multa. Yhteensä ruukkuun istutettiin kuusi kasvia. Ruukut laitettiin muoviselle tarjottimelle kuvan 13 mukaisesti siten, että yhdelle tarjottimelle tuli aina 15 ruukkua.



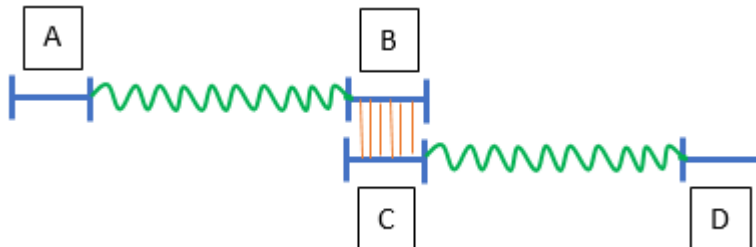
Kuva 13. Istutetut kasvit ruukuissa tarjottimella.

Kasveja istutettiin 45 ruukullista eli yhteensä 270 kasvia. Kasveja kasvatettiin kasvihuoneessa noin neljä viikkoa, jonka aikana tehtiin laboratoriotyöt. Kasvatuksen aikana kasvit leikattiin kerran alas, jotta ne saatiin tekemään enemmän kukkia.

### 3.2 CRISPR-konstruktin valmistus

#### 3.2.1 Ensimmäisen vaiheen PCR

Ensimmäisessä vaiheessa tehtiin kaksi polymeraasiketjureaktiota (PCR), joissa molemmissa templaattina käytettiin plasmidia Y. Ensimmäisen vaiheen PCR-reaktioiden tarkoituksena oli saada lisättyä plasmidiin siitä puuttunut sgRNA. Tästä syystä monistettiin plasmidin kahta eri osaa, joiden väliin sgRNA lisättiin. Ensimmäisessä reaktiossa monistettiin alukkeiden A ja B ja toisessa alukkeiden C ja D välistä DNA-jaksoa. Aluke C oli ns. etualuke (englanniksi forward primer), joka sisälsi transkriptiofaktori X:n 20:n emäsparin pituisen sgRNA-sekvenssin. Aluke B oli ns. taka-aluke (englanniksi reverse primer), joka oli komplementaarinen transkriptiofaktori X:n sgRNA-sekvenssin kanssa. A ja D alukkeisiin oli lisätty restriktioentsyymien leikkauskohdat (kuva 14).



Kuva 14. Ensimmäisen vaiheen PCR.

Templaattina käytetyn plasmidin pitoisuus oli 269 ng/μl. Taulukossa 1 on esitetty ensimmäisen vaiheen PCR-reaktioissa käytetyt komponentit, pipetoidut määrät sekä pitoisuudet.

Taulukko 1. Ensimmäisen vaiheen PCR-reaktioissa käytetyt komponentit, pipetoidut määrät ja pitoisuudet.

	Pipetoitu tilavuus [ $\mu$ l]	Lopullinen pitoisuus
H <sub>2</sub> O	136	
5 x Phusion HF Puskuri (Thermo Scientific)	40	1 x
10 mM dNTP Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (BioNordika)	4	0,2 mM jokaista
5 $\mu$ M aluke (Sigma-Aldrich)	8	0,2 $\mu$ M
5 $\mu$ M aluke (Sigma-Aldrich)	8	0,2 $\mu$ M
Templaatti DNA: plasmidivektori 269 ng/ $\mu$ l	2	538 ng
2 U/ $\mu$ l Phusion DNA-polymeraasi (Thermo Scientific)	2	0,02 U/ $\mu$ l
	<b>Reaktion tilavuus 200 <math>\mu</math>l</b>	

Molemmat reaktiot jaettiin kuoppalevyllä neljään kuoppaan eli jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 50  $\mu$ l. PCR-ajo tehtiin Bio-Radin C1000 Thermal Cycler -laitteella.

Reaktion alussa oli minuutin pituinen DNA-juosteiden erotus eli denaturaatio (98 °C), jonka jälkeen toistettiin 32 kertaa normaalisykli eli

- denaturaatio, 18 s, 98 °C
- alukkeiden kiinnittyminen eli annealing-reaktio, 30 s, 59 °C
- templaatin pidennysreaktio eli ekstensio, 3 min, 72 °C.

Ajon lopussa oli vielä viiden minuutin pituinen varmistava pidennysreaktio eli ylimääräinen ekstensio (72 °C), jonka avulla varmistettiin juosteiden kiinnittyminen toisiinsa.

PCR-ajon jälkeen tarkistettiin 1-prosenttisella agarosigeelielektroforeesilla (AGE) DNA-fragmenttien koot. Näytteet ja 15  $\mu$ l kokostandardia (GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder, Thermo Scientific) pipetoitiin kaivoihin ja ajettiin 80 V:n jännitteellä 45 minuuttia.

Ajon jälkeen geeli kuvattiin Bio-Radin Molecular Imager -laitteella. Oikeankokoiset näytevyöhykkeet leikattiin geeliltä UV-valon avulla ja niistä eristettiin DNA Thermo Scientificin GeneJET Gel Extraction kitin ohjeen mukaan. Eristyksen jälkeen mitattiin DNA-pitoisuudet NanoDrop-1000 -spektrofotometrillä (Thermo Fisher Scientific).



### 3.2.2 Toisen vaiheen PCR

Toisessa vaiheessa tehtiin yksi PCR-reaktio, jossa monistettiin alukkeiden A ja D välistä DNA-jaksoa. Molempiin alukkeisiin oli lisätty restriktioentsyymien leikkauskohdat. Templaatteina käytettiin geeliltä eristettyjä ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteita. Toisen vaiheen PCR-reaktion tarkoituksena oli yhdistää ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteet, jotka sitoutuvat toisiinsa, koska niissä on komplementaariset sgRNA-sekvenssit. Taulukossa 2 on esitetty toisen vaiheen PCR-reaktiossa käytetyt komponentit sekä niiden tilavuudet ja pitoisuudet.

Taulukko 2. Toisen vaiheen PCR-reaktiossa käytetyt komponentit, pipetoidut määrät ja pitoisuudet.

	Pipetoitu tilavuus [ $\mu$ l]	Lopullinen pitoisuus
H <sub>2</sub> O	132,17	
5 x Phusion HF Puskuri (Thermo Scientific)	40	1 x
10 mM dNTP Mix: dATP, dCTP, dGTP, dTTP (BioNordika)	4	0,2 mM jokaista
5 $\mu$ M aluke A (Sigma-Aldrich)	8	0,2 $\mu$ M
5 $\mu$ M aluke D (Sigma-Aldrich)	8	0,2 $\mu$ M
Templaatti DNA: PCR-tuote 135 ng/ $\mu$ l	3,26	440 ng
Templaatti DNA: PCR-tuote 207 ng/ $\mu$ l	2,57	532 ng
2 U/ $\mu$ l Phusion DNA-polymeraasi (Thermo Scientific)	2	0,02 U/ $\mu$ l
	<b>Reaktion tilavuus 200 <math>\mu</math>l</b>	

Reaktio jaettiin kuoppalevyllä neljään kuoppaan eli jokaiseen kuoppaan pipetoitiin 50  $\mu$ l. Ajo-ohjelma oli sama kuin ensimmäisen vaiheen PCR-reaktioissa. Ajon jälkeen tarkistettiin 1-prosenttisella geelillä, että monistus oli onnistunut. AGE-ajo ja geelin kuvaus tehtiin kuten aiemminkin. Oikean kokoinen näytevyöhyke leikattiin UV-valon avulla geeliltä, siitä eristettiin DNA Thermo Scientificin GeneJET Gel Extraction kitin avulla ja DNA-pitoisuus mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä.

### 3.2.3 Digestio

PCR-reaktioiden jälkeen sekä plasmidivektorille Y että PCR-tuotteelle tehtiin digestiot. Käytetyt restriktioentsyymit olivat

- *Hind*III: FastDigest, Thermo Scientific, 5' A ↓ A G C T T 3'
- *Nco*I: FastDigest, Thermo Scientific, 5' C ↓ C A T G G 3'.

Digestioissa käytettiin kahta restriktioentsyymiä, jotta saatiin sekä vektorille että PCR-tuotteelle eli insertille toiseen päähän *HindIII*:n ja toiseen päähän *NcoI*:n jättämä kohesiivinen pää. Digestiot tehtiin taulukon 3 mukaisesti.

Taulukko 3. Digestioissa käytetyt komponentit.

	$\mu\text{l}$		$\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	20,8	H <sub>2</sub> O	32,6
PCR-tuote (104 ng/ $\mu\text{l}$ )	19,2	Plasmidivektori (269 ng/ $\mu\text{l}$ )	7,40
10 x FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific)	5	10 x FastDigest Green Buffer (Thermo Scientific)	5
<i>HindIII</i> (1,25 $\mu\text{l}$ entsyymiä/1 $\mu\text{g}$ DNA:ta)	2,5	<i>HindIII</i> (1,25 $\mu\text{l}$ entsyymiä/1 $\mu\text{g}$ DNA:ta)	2,5
<i>NcoI</i> (1,25 $\mu\text{l}$ entsyymiä/1 $\mu\text{g}$ DNA:ta)	2,5	<i>NcoI</i> (1,25 $\mu\text{l}$ entsyymiä/1 $\mu\text{g}$ DNA:ta)	2,5
<b>Reaktion tilavuus</b>	<b>50</b>	<b>Reaktion tilavuus</b>	<b>50</b>

Reaktioita digestoititiin +37 °C:ssa tunnin ajan ja digestioiden onnistuminen todettiin 1-prosenttisella agarosigeelillä. Koska FastDigest-entsyymipuskurissa oli näytepuskuri valmiina, voitiin näytteet pipetoida suoraan geelille. Ajon jälkeen geeli kuvattiin ja oikeankokoiset näytevyöhykkeet leikattiin geeliltä ja niistä eristettiin DNA Thermo Scientificin GeneJET Gel Extraction kitin avulla. DNA-pitoisuudet mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä.

### 3.2.4 Ligaatio

Ligaation teki toisen tutkimusryhmän tutkija Xin Wang taulukon 4 mukaisesti. Käytetty massasuhde oli 1:20 (vektori:insertti).

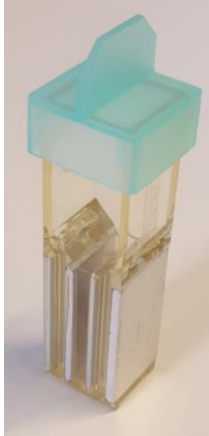
Taulukko 4. Ligaatiossa käytetyt komponentit.

	$\mu\text{l}$	Lopullinen pitoisuus
Vektori-DNA ~16 000 bp (6 ng/ $\mu\text{l}$ )	2	12 ng
Insertti-DNA ~1000 bp (32 ng/ $\mu\text{l}$ )	8	256 ng
10 x T4 DNA Ligase Buffer (Thermo Scientific)	1,3	1 x
5 U/ $\mu\text{l}$ T4 DNA Ligase (Thermo Scientific)	2	0,75 U/ $\mu\text{l}$
<b>Reaktion tilavuus</b>	<b>13,3</b>	

Näytteitä inkuboititiin huoneenlämmössä neljä tuntia.

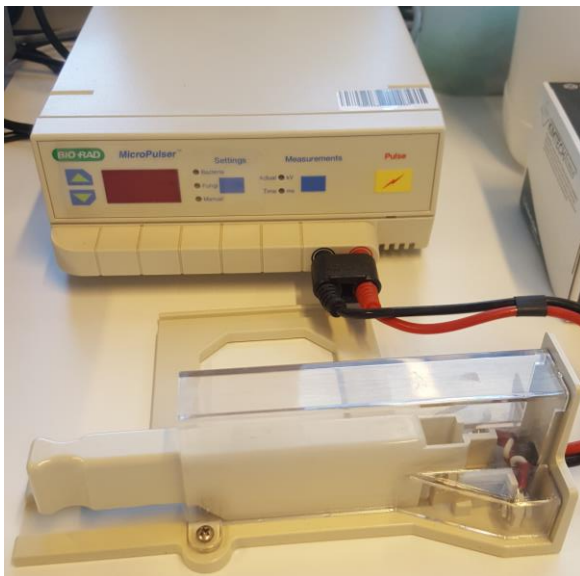
### 3.3 Transformaatio *E. coli*-bakteeriin

Jotta konstruktia saatiin lisää, inkuboinnin jälkeen tehtiin transformaatio *E. coliin* elektroporaatiolla. Otettiin kompetentit *E. coli*t (DH5 $\alpha$ ) ja Bio-Radin elektroporaatiokyvetit (kuva 15) jälle.



Kuva 15. Elektroporaatiokyveti, jossa sivuilla elektrodit sähkövirran johtamista varten.

Ligaatioseosta pipetoitiin 2  $\mu$ l eppendorf-putkeen, jossa oli kompetentit *E. coli*t. Eppendorf-putken sisältö siirrettiin kokonaisuudessaan elektroporaatiokyvetiin, joka laitettiin Bio-Radin Micro Pulser -elektroporaattoriin (kuva 16) ja annettiin shokki laitteeseen etukäteen ohjemoitujen *E. coli*lle sopivien asetusten mukaisesti.



Kuva 16. Bio-Radin Micro Pulser -elektroporaattori.

Kyvettiin lisättiin 250 µl SOC-lientä, sekoitettiin nopeasti pipetoimalla liuosta edestakaisin ja siirrettiin seos eppendorf-putkeen. Putkea inkuboitii ravistuksessa +37 °C:ssa tunnin ajan ennen maljausta, jotta antibioottiresistenssigeenille annettiin aikaa ekspressoitua. Solut maljatiin selektiivisille LB-maljoille, joiden kanamysiinipitoisuus oli 50 µg/ml. Maljoja inkuboitii +37 °C:ssa yön yli.

Plasmidi-DNA eristettiin Thermo Scientificin GeneJET Plasmid Miniprep kitin ohjeen mukaan nesteviljelmästä (5 ml LB-lientä + 5 µl kanamysiiniä, jonka pitoisuus oli 100 mg/ml), jota oli inkuboitu ravistuksessa +37 °C:ssa yön yli. DNA-konsentraatiot mitattiin NanoDrop-spektrofotometrillä, minkä jälkeen näytteet lähetettiin sekvensoitaviksi.

### 3.4 Transformaatio agrobakteeriin

Koska tässä työssä *Arabidopsis thaliana* transformaatiomenetelmänä käytettiin agrobakteerivälitteistä dipausta, tehtiin seuraavaksi transformaatio agrobakteeriin elektroporaatiolla. Otettiin kompetentit agrobakteerit ja elektroporaatiokyvetit jälle. Pipetoitiin näytteestä, jonka sekvenssi oli oikea, 2 µl (390 ng DNA:ta) eppendorf-putkeen, jossa oli kompetentit agrobakteerit. Eppendorf-putken sisältö siirrettiin kokonaisuudessaan elektroporaatiokyvettiin, joka laitettiin Bio-Radin Micro Pulser -elektroporaattoriin ja annettiin shokki laitteeseen etukäteen ohjemoitujen agrobakteerille sopivien asetusten mukaisesti. Kyvettiin lisättiin 250 µl SOC-lientä, sekoitettiin nopeasti pipetoimalla liuosta edestakaisin ja siirrettiin seos eppendorf-putkeen.

Valmistettiin selektiomalja, jonka lopullinen kanamysiinipitoisuus oli 50 µg/ml, gentamysiinipitoisuus 10 µg/ml ja rifampisiinipitoisuus 50 µg/ml. Eppendorf-putkea inkuboitii ravistuksessa +28 °C:ssa kaksi tuntia, minkä jälkeen seos pipetoitiin selektiomaljalle ja levitettiin lasikolmiolla. Maljaa inkuboitii +28 °C:ssa 2,5 vuorokautta.

Agrobakteerista tehtiin nesteviljelmä. Erlenmeyeriin laitettiin 100 ml LB-lientä ja lisättiin 50 µl kanamysiiniä (100 mg/ml) ja 100 µl gentamysiiniä (10 mg/ml), sekoitettiin ja lisättiin pipetinkärjen avulla kaikki pesäkkeet maljalta, jotta saatiin tarpeeksi transformantteja. Nesteviljelmää inkuboitii ravistuksessa +28 °C:ssa 22 tuntia.

### 3.5 *Arabidopsis thaliana* transformaatio dippaamalla

*Arabidopsis thaliana* transformaatio tehtiin agrobakteerivälitteisesti *in planta* -menetelmällä dippaamalla. Agrobakteeriliemi siirrettiin inkubaation jälkeen kahteen falcon-putkeen, joita sentrifugoitiin 15 minuuttia Centrifuge 5810R -laitteella (Eppendorf) 4000 kierrosta minuutissa (rpm), minkä jälkeen supernatantti kaadettiin pois. Dippausneste valmistettiin taulukon 5 mukaisesti.

Taulukko 5. Dippausnesteen valmistuksessa käytetyt komponentit.

MQ-H <sub>2</sub> O	200 ml
Sakkarosi	10 g
Silwet L-77 (LEHLE SEEDS, Cat. No. VIS-02)	50 µl

Kasvihuoneella lisättiin falcon-putkiin 25 ml dippausnestettä ja sekoitettiin, jotta saatiin bakteeripelletti liukenemaan. Falcon-putkien sisältö kaadettiin muoviselle alustalle, jossa kukat kasteltiin (kuva 17).



Kuva 17. Kukkien dippaus.

Kasvi kuivattiin paperilla, ruukun kulmiin laitettiin tueksi tikut ja ruukku laitettiin suojamuoviin. Suojamuovi teipattiin ylhäältä kiinni vuorokaudeksi kuvan 18 mukaisesti.

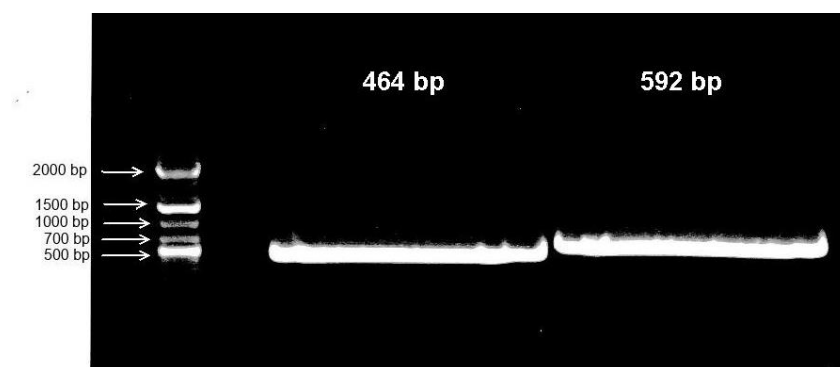


Kuva 18. Dipatut kasvit suojamuovissa.

Vuorokauden kuluttua teipit poistettiin ja pussit avattiin. Kasveja kasteltiin normaalisti, kunnes kukkiminen ja siementuotanto loppuivat, minkä jälkeen kasvien annettiin kuivua muutaman viikon ajan.

#### 4 Työn tulokset

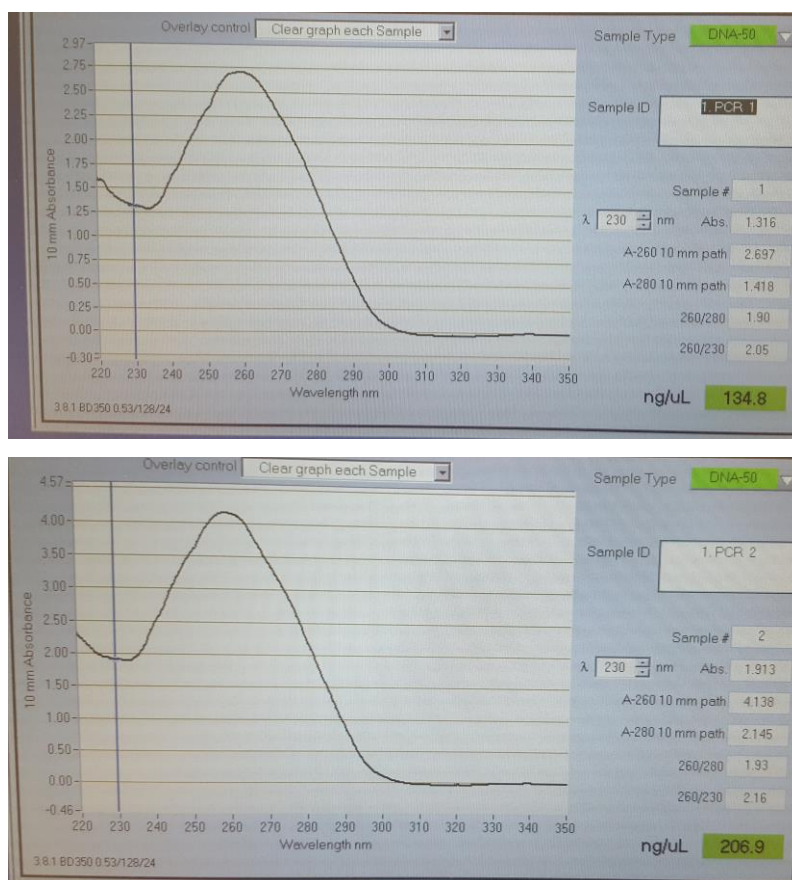
Ensimmäisen vaiheen PCR-ajon tulokset on esitetty kuvassa 19.



Kuva 19. 1-prosenttinen agarosigeeli kuvattuna Bio-Radin Molecular Imager -laitteella. Vasemalla PCR(AB)-tuote ja oikealla PCR(CD)-tuote.

Näytevyöhykkeet näyttivät odotetun kokoisilta eli 464 bp (PCR(AB)-tuote) ja 592 bp (PCR(CD)-tuote).

NanoDrop-1000 -spektrofotometrillä mitatut geeliltä eristetyt näytevyöhykkeiden DNA-pitoisuudet ja puhtaudet  $A_{260} / A_{280}$  on esitetty kuvassa 20.



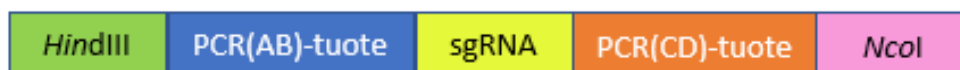
Kuva 20. DNA-pitoisuudet NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuina. Yläpuolella PCR(AB)-tuote ja alapuolella PCR(CD)-tuote.

PCR(AB)-tuotteen pitoisuudeksi saatiin 135 ng/ $\mu$ l ja puhtaudeksi  $A_{260} / A_{280}$  1,90. PCR(CD)-tuotteen pitoisuudeksi saatiin 207 ng/ $\mu$ l ja puhtaudeksi  $A_{260} / A_{280}$  1,93. Puhtaalle DNA:lle absorbanssien suhde on  $A_{260} / A_{280} = 1,8$ . Saadut pitoisuudet ja puhtaudet olivat suhteellisen hyviä.

Toisen vaiheen PCR-reaktion tuloksena saatiin PCR(AD)-tuote (kuva 21), joka sisälsi 5' päästä lähtien

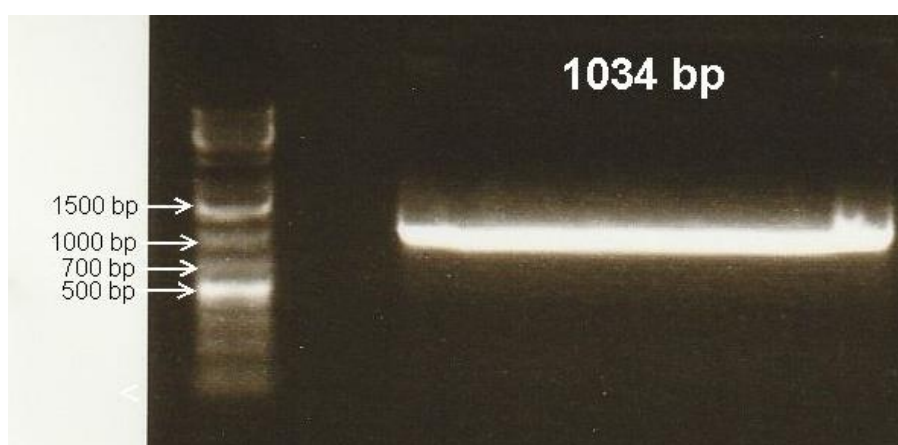
- 1. restriktiokohdan: *HindIII*
- 1. fragmentin: PCR(AB)-tuote
- sgRNA:n: 20 bp

- 2. fragmentin: PCR(CD)-tuote
- 2. restriktiokohdan: *NcoI*.



Kuva 21. PCR(AD)-tuote.

Kuvassa 22 on esitetty toisen vaiheen PCR-reaktion tulos, jossa monistettiin alukkeiden A ja D välistä DNA-jaksoa ja templaatteina käytettiin geeliltä eristettyjä ensimmäisen vaiheen PCR-tuotteita.

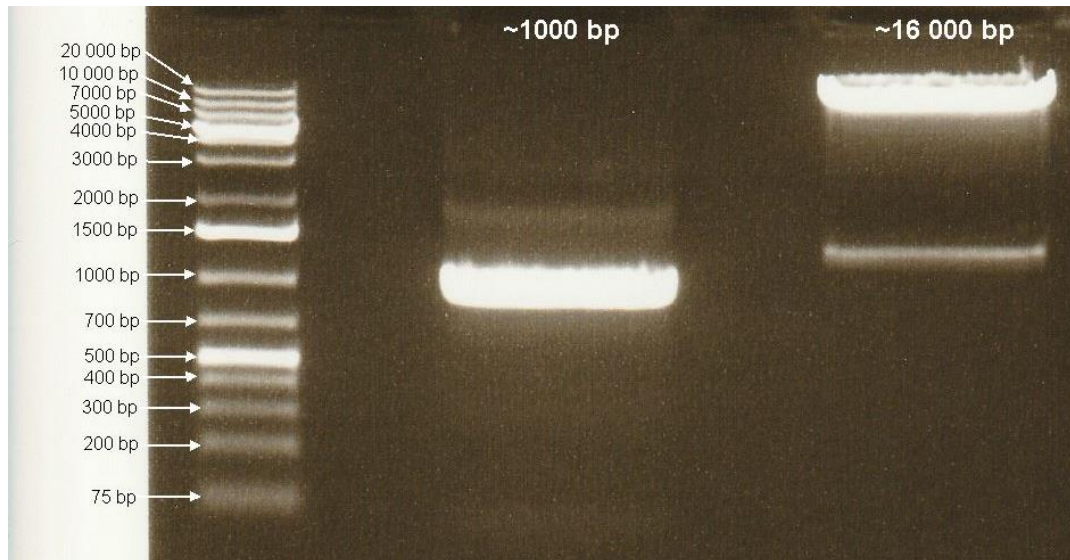


Kuva 22. 1-prosenttinen agarosigeeli kuvattuna Bio-Radin Molecular Imager -laitteella.

Näytevyöhyke näytti odotetun eli 1034:n emäsparin kokoiselta. NanoDrop-spektrofotometrillä mitatun geeliltä eristetyyn näytevyöhykkeen DNA-pitoisuudeksi saatiin 104 ng/μl ja puhtaudeksi  $A_{260} / A_{280}$  1,91 (liite 1). Sekä saatu pitoisuus että puhtaus olivat suhteellisen hyviä.

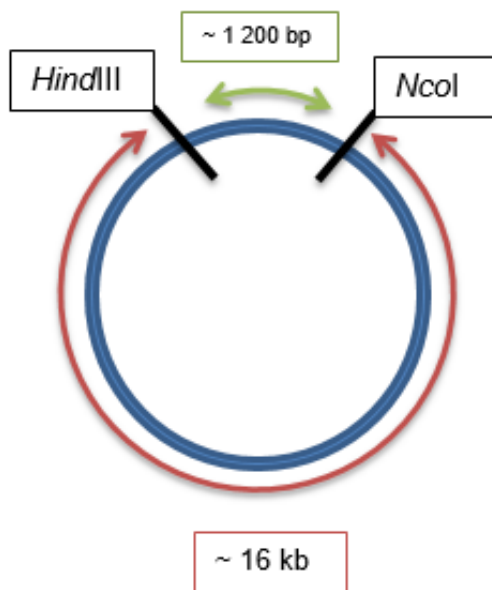
Digestiot sekä plasmidivektorille Y että PCR-tuotteelle eli insertille tehtiin käyttäen kahta restriktioentsyymiä: *HindIII* ja *NcoI*. Digestioiden tulokset on esitetty kuvassa 23.





Kuva 23. 1-prosenttinen agarosigeeli kuvattuna Bio-Radin Molecular Imager -laitteella. Vasemmalla PCR-tuote eli insertti ~1000 bp ja oikealla plasmidivektori Y ~16 000 bp.

Digestiopalojen koot näyttivät odotetun kokoisilta. PCR-tuote eli insertti oli kooltaan noin 1000 emäsparia ja plasmidivektori noin 16 kiloemäsparia. Plasmidivektori Y:n kohdalla geelillä näkyy himmeästi myös toinen näytevyöhyke. Tämä johtuu siitä, että digestiossa käytettiin kahta restriktioentsyymiä, minkä johdosta plasmidin MCS-alueesta (multiple cloning site) eli monikloonauskohdasta irtosi noin 1200 bp:n kokoinen DNA-jakso katkaisukohtien välistä (kuva 24).

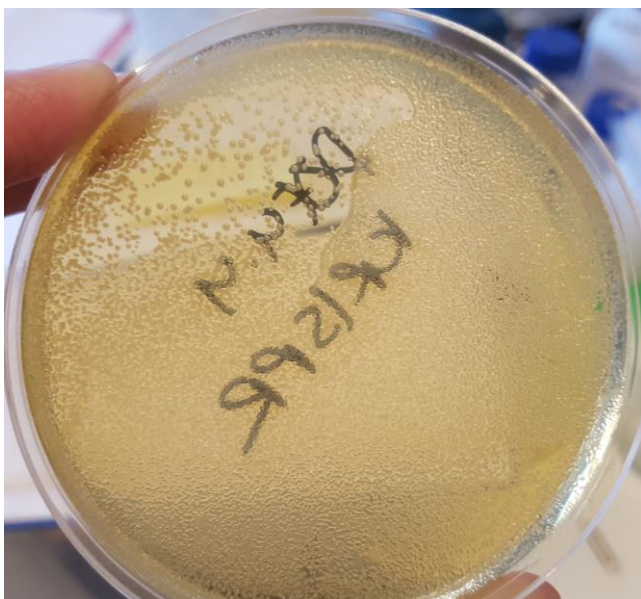


Kuva 24. Plasmidivektori Y.

PCR-tuotteen eli insertin DNA-pitoisuudeksi saatiin NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna 42 ng/μl ja puhtaudeksi  $A_{260} / A_{280}$  1,92. Plasmidivektorin Y pitoisuudeksi saatiin vain 21 ng/μl ja puhtaudeksi  $A_{260} / A_{280}$  2,30 (liitteet 2 ja 3). Puhtaus on huono. Absorbanssisuhteen suureneminen johtuu RNA-jäämistä, oligonukleotideistä ja vapaista nukleotideistä.

Ligaation ja *E. coli* -bakteeriin transformaation jälkeen maljalla kasvoi vain kaksi pesäkettä. NanoDrop-spektrofotometrillä nesteviljelmien puhdistusten jälkeen mitatut DNA-pitoisuudet olivat 168 ng/μl ja 195 ng/μl. Molemmat näytteet lähetettiin sekvensoitaviksi. Sekvensoinnista saatuja tuloksia verrattiin odotettuun sekvenssiin ja todettiin vain näytteen, jonka pitoisuus oli 195 ng/μl, sekvenssin olevan oikea.

Transformaatio agrobakteeriin onnistui ja pesäkkeitä saatiin runsaasti. Kuvassa 25 nähdään selektiomaljalla (kanamysiinipitoisuus 50 μg/ml, gentamysiinipitoisuus 10 μg/ml ja rifampisiinipitoisuus 50 μg/ml) kasvavat pesäkkeet 2,5 vuorokauden inkuboinnin jälkeen.



Kuva 25. Pesäkkeet selektiomaljalla inkuboinnin jälkeen.

Kuvassa 26 on esitetty, miltä kasvit näyttivät lähtötilanteessa MS-maljalla parin viikon valokaappikasvatuksen jälkeen.



Kuva 26. Kasvit MS-maljalla parin viikon valokaappikasvatuksen jälkeen.

Kasvien istutus multaan onnistui. Yhteen ruukkuun istutettiin kuusi kasvia kuvan 27 mukaisesti. Yhteensä istutettiin 270 kasvia.



Kuva 27. Kasvit istutettuina multaan.

Kasvit kasvoivat hyvin kasvihuoneessa ja ne saatiin tuottamaan kukkia. Kuvassa 28 nähdään, miltä kasvit näyttivät neljän viikon kasvihuonekasvatuksen jälkeen juuri ennen dippausta ja kuivuttuaan muutaman viikon dippauksen jälkeen.



Kuva 28. Vasemmalla kasvit neljän viikon kasvatuksen jälkeen juuri ennen dippausta ja oikealla kasvit, jotka ovat kuivuneet muutaman viikon dippauksen jälkeen.

## 5 Johtopäätökset

CRISPR-konstruktin tekeminen ja transformaatiot sekä *E. coliin* että agrobakteeriin onnistuivat. Kasvihuoneella kasvit saatiin istutettua multaan, kasvamaan ja tuottamaan kukkia.

Opinnäytetyön tavoitteena oli CRISPR/Cas9-menetelmää käyttämällä muokata *Arabidopsis thalianan* genomia aiheuttaen siihen mutaatio. Ajanpuutteen vuoksi työ jäi keskeneräiseksi ja se jatkuu muiden toimesta seuraavasti:

- Muutaman viikon päästä kuivuneet kasvit kerätään ja siemenet steriloidaan.
- Steriloidut siemenet maljataan hygromysiini-maljoille ja annetaan transformanttien kasvaa valokaapissa.
- Koska tavoitteena oli, että koko kasvi on mutatoitunut, otetaan näyte sekä lehdistä että juuresta ja eristetään niistä DNA.

- DNA-näytteet genotyyppataan PCR:llä, puhdistetaan ja lähetetään sekvensoitaviksi.
- Kasvi risteytetään takaisin villityyppiin ja saadaan ulos konstrukti.

Ligaatiota ja sitä seurannutta transformaatiota *E. coliin* yritettiin tehdä useita kertoja useilla eri tavoilla siinä onnistumatta. Vektori-DNA:n ja insertti-DNA:n määriä ja massasuhteita muutettiin monella eri tavalla. Ligaatiota yritettiin massasuhteilla 1:20, 1:10, 1:7, 1:6, 1:5, 1:3 (vektori:insertti). T4 DNA-Ligaasi-entsyymien erää vaihdettiin, koska haluttiin selvittää, onko vika entsyymissä. Myös selektiomaljan kanamysiinipitoisuutta (50 µg/ml) pienennettiin siten, että maljan lopullinen kanamysiinipitoisuus oli 25 µg/ml. Ligaatiota yritettiin tehdä myös lisäämällä reaktioon ATP:tä (10 mM), mutta jostain tuntemattomasta syystä ligaatiota ei saatu ilman apua onnistumaan. Vektorin suuri koko verrattuna insertin kokoon saattaa olla yksi ligaatiota vaikeuttava tekijä. Oletus on, että ongelma on juuri ligaatiossa eikä transformaatiossa, koska kokemus on osoittanut, että transformatio *E. coliin* elektroporaatiolla onnistuu lähes poikkeuksetta.

Kun ligaatio viimein saatiin tehtyä, oli transformaation jälkeen maljalle muodostunut vain kaksi pesäkettä. Sekvensoinnin tuloksena selvisi, että vain toisesta pesäkkeestä tehdystä nesteviljelmästä puhdistettu näyte oli sekvenssiltään oikea. Ligaatioreaktio vaatii siis vielä paljon optimointia, jotta transformaatiotehokkuus ja siten koko työn onnistumisprosentti paranee.

## Lähteet

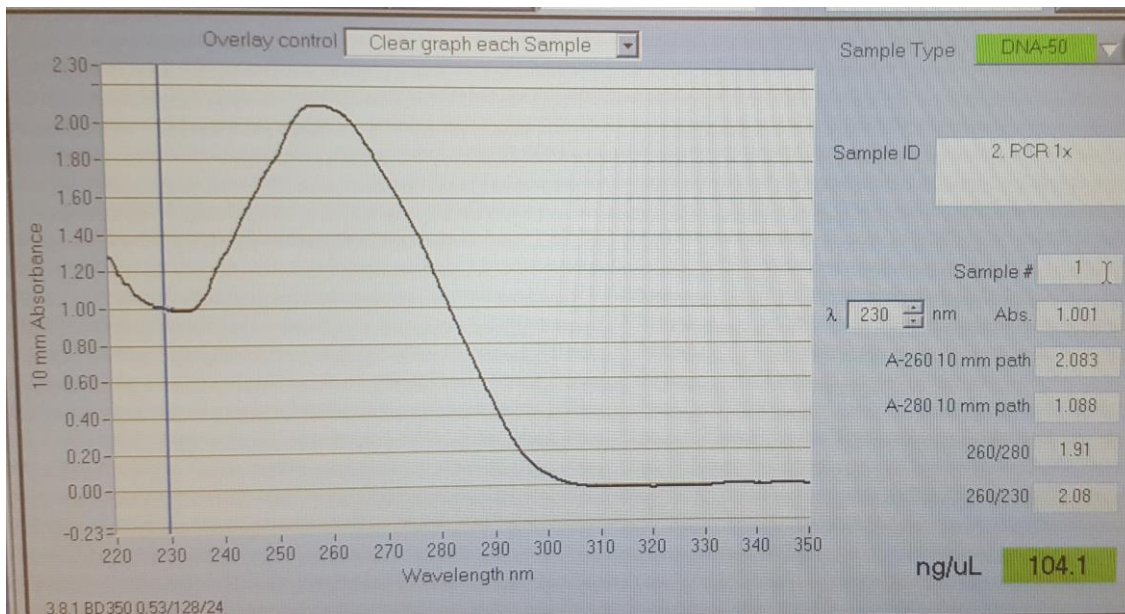
- 1 Leino, Raili. 2016. Pian geenimuuntelusta ei jää enää kiinni – Crispr on geeniteknii-  
niikan hae-korvaa-toiminto. Verkkodokumentti. Tekniikka ja talous.  
<<http://www.tekniikkatalous.fi/tiede/pian-geenimuuntelusta-ei-jaa-ena-kiinni-crispr-on-geenitekniikan-hae-korvaa-toiminto-6590396>>. Luettu 7.8.2017.
- 2 Luontoportti. 2017. Verkkodokumentti. <<http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kuk-kakasvit/lituruoho>>. Luettu 8.7.2017.
- 3 Verkkodokumentti. <<https://www.flickr.com/photos/33465428@N02/5621746997>>. Luettu 10.7.2017.
- 4 Plants of the World online. Verkkodokumentti. Kewscience.  
<<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:277970-1>>. Luettu 10.7.2017.
- 5 Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.  
2000. Verkkodokumentti. Nature 408. <<http://www.nature.com/nature/journal/v408/n6814/full/408796a0.html>>. Luettu 10.7.2017.
- 6 *Arabidopsis thaliana*: another "model organism". 2014. Kimball's Biology Pages.  
Verkkodokumentti. <<http://www.biology-pages.info/A/Arabidopsis.html>>. Luettu 10.7.2017.
- 7 Suominen, Ilari, Pärssinen, Raimo, Haajanen, Kari & Pelkonen, Jani. 2013. Gee-  
nitekniiikka. 2. painos. Saarijärvi: Saarijärven Offset Oy.
- 8 Ishida, Yuji, Hiei, Yukoh & Komari, Toshihiko. 2007. *Agrobacterium*-mediated  
transformation of maize. Nature Protocols. Vol. 2, No. 7, s. 1614–1621.
- 9 Nishimura, Asuka, Aichi, Ikuko & Matsuoka, Makoto. 2006. A protocol for *Agro-  
bacterium*-mediated transformation in rice. Nature Protocols. Vol. 1, No. 6, s.  
2796–2802.
- 10 Zale, M., Agarwal, S., Loar, S. & Steber, C. M. 2009. Evidence for stable transfor-  
mation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, s.  
903–913.
- 11 Häggman, Hely. 1998. Geenitekniikkatutkimus pohjana metsäpuiden molekyylija-  
lostukselle. Metsätieteen aikakauskirja 2/1998, s. 235–240.
- 12 Christie Peter J. & Gordon Jay E. 2014. The *Agrobacterium* Ti Plasmids. Verkkö-  
dokumentti. NCBI. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4292801/>>.  
Luettu 19.7.2017.

- 13 Özyiğit, Ibrahim Ilker. 2012. *Agrobacterium tumefaciens* and its Use in Plant Biotechnology. Verkkodokumentti. ResearchGate, s. 318–361. <[https://www.researchgate.net/publication/259477921\\_Agrobacterium\\_tumefaciens\\_and\\_Its\\_Use\\_in\\_Plant\\_Biotechnology](https://www.researchgate.net/publication/259477921_Agrobacterium_tumefaciens_and_Its_Use_in_Plant_Biotechnology)>. Luettu 16.9.2017.
- 14 Sohail Ahmad Jan, Zabta Khan Shinwari, Sabir Hussain Shah, Armghan Shahzad, Muhammad Amir Zia & Nazir Ahmad. 2016. *In-planta* transformation: recent advances. Romanian Biotechnological Letters. Vol. 21, No. 1, s. 11085–11091.
- 15 Wiktorek-Smagur, Aneta, Hnatuszko-Konka, Katarzyna & Kononowicz, Andrzej. 2009. Flower Bud Dipping or Vacuum Infiltration—Two Methods of *Arabidopsis thaliana* Transformation. Russian Journal of Plant Physiology. Vol. 56, No. 4, s. 560–568.
- 16 Transfection Methods Overview. Verkkodokumentti. Bio-Rad. <[http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826\\_transfection\\_tutorial\\_interactive.pdf](http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10-0826_transfection_tutorial_interactive.pdf)>. Luettu 15.7.2017.
- 17 Electroporation. Verkkodokumentti. ThermoFisher Scientific. <<https://www.thermofisher.com/fi/en/home/references/gibco-cell-culture-basics/transfection-basics/transfection-methods/electroporation.html>>. Luettu 15.7.2017.
- 18 Häikiö, Elina & Kangasjärvi Jaakko. 1999. Biotekniikan riskit. Siirtogeenisten kasvien ympäristövaikutukset Suomessa. Suomen ympäristö 185. Kuopio: Kuopion Liikekirjapaino Oy.
- 19 Burch-Smith, Tessa M., Schiff, Michael, Liu, Yule & Dinesh-Kumar, SP. 2006. Efficient Virus-Induced Gene Silencing in Arabidopsis. Plant Physiology. Vol. 142, s. 21–27.
- 20 Barrangou, Rodolphe & Marraffini, Luciano A. 2014. CRISPR-Cas systems: Prokaryotes Upgrade to Adaptive Immunity. Verkkodokumentti. Molecular Cell. Vol. 54, s. 234–244. <[http://www.cell.com/molecular-cell/pdf/S1097-2765\(14\)00216-0.pdf](http://www.cell.com/molecular-cell/pdf/S1097-2765(14)00216-0.pdf)>. Luettu 16.9.2017.
- 21 Wiedenheft, Blake, Sternberg, Samuel H. & Doudna, Jennifer A. 2012. RNA-guided genetic silencing system in bacteria and archaea. Nature. Vol. 482, s. 331–338.
- 22 Horvath, Philippe & Barrangou, Rodolphe. 2010. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Verkkodokumentti. Science. Vol. 327, s. 167–170. <<http://science.sciencemag.org/content/327/5962/167.full>>. Luettu 31.7.2017.
- 23 CRISPR 101: A Desktop Resource. 2nd Edition. Addgene.
- 24 Reis, Alex, Hornblower Breton, Robb, Brett & Txertzinis, George. 2014. CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology.

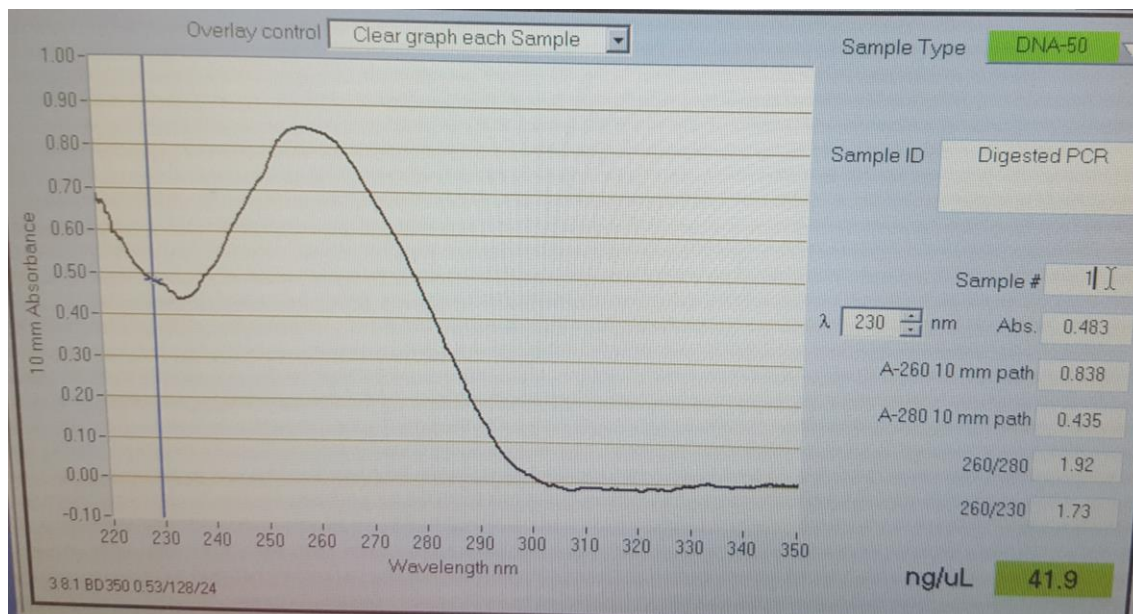
- Verkkodokumentti. New England BioLabs, Inc. <<https://www.neb.com/tools-and-resources/feature-articles/crispr-cas9-and-targeted-genome-editing-a-new-era-in-molecular-biology>>. Luettu 31.7.2017.
- 25 Portin, Petter. 2016. Ihmisen geeniterapiassa avautuu uusia mahdollisuuksia. *Duodecim*. Vol. 132, s. 26–32.
- 26 Doudna, Jennifer A. & Charpentier, Emmanuelle. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*. Vol. 346, s. 1077–1086.
- 27 CRISPR/Cas9 Guide. Verkkodokumentti. Addgene. <<https://www.addgene.org/crispr/guide/>>. Luettu 6.8.2017.
- 28 Osakabe, Y., Watanabe, T., Sugano, S.S., Ueta, R., Ishihara, R., Shinozaki, K. & Osakabe, K. 2016. Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. Verkkodokumentti. *Nature*. <<https://www.nature.com/articles/srep26685>>. Luettu 31.7.2017.



**PCR(AD)-tuotteen DNA-pitoisuus ja puhtaus  $A_{260} / A_{280}$  NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna**



**Digestoidun PCR-tuotteen eli insertin DNA-pitoisuus ja puhtaus  $A_{260} / A_{280}$   
NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna**



**Digestoidun plasmidivektori Y:n DNA-pitoisuus ja puhtaus A<sub>260</sub> / A<sub>280</sub>  
NanoDrop-spektrofotometrillä mitattuna**

