

**Matej Skočaj**



**NAVODILA ZA  
LABORATORIJSKE VAJE**



**UČNO GRADIVO ZA ŠTUDENTE ODDELKA ZA  
BIOLOGIJO BIOTEHNIŠKE FAKULTETE  
UNIVERZE V LJUBLJANI PRI PREDMETU  
UPORABNOST ZNANJ GENETIKE**

**Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,  
Oddelek za biologijo**



**Ljubljana, 2018**

Naslov: Navodila za laboratorijske vaje

Podnaslov: Učno gradivo za študente Oddelka za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani pri predmetu uporabnost znanj genetike

Avtor: Matej Skočaj

Recenzent: Uroš Petrovič

Založnik: Oddelek za biologijo, Biotehniške fakultete, Univerze v Ljubljani

Kraj izida: Ljubljana

Leto izida: 2018

Navedba izdaje: Elektronska izdaja

ISBN: 978-961-6822-50-3 (pdf)

Katalogni zapis o publikaciji (CIP) pripravili v Narodni in univerzitetni knjižnici v Ljubljani

[COBISS.SI-ID=296345344](https://nuk.ub.uni-lj.si/COBISS.SI-ID=296345344)

ISBN 978-961-6822-50-3 (pdf)

## Kazalo vsebine

1. Vaja: Izolacija DNA iz bioloških sledi velikih zveri.....	4
1.1. Teoretične osnove .....	4
1.2. Izvedba vaje 1.....	4
2. Vaja: Izolacija polimeraze <i>Taq</i> .....	7
2.1. Teoretične osnove .....	7
2.2. Izvedba vaje 2.....	7
3. Vaja: Delecija gena <i>HIS3</i> kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> z uporabo CRISPR/Cas9	10
3.1. Teoretične osnove .....	10
3.2. Izvedba vaje 3.....	11

## 1. Vaja: Izolacija DNA iz bioloških sledi velikih zveri

### 1.1. Teoretične osnove

Neinvazivno vzorčenje je dobro uveljavljena metoda za preučevanje in identifikacijo posameznih osebkov, skupin ali populacij živali. S tem pristopom živali ne vznemirjamo v njihovem naravnem okolju, lahko pa jim tudi sledimo skozi prostor in čas, ne da bi nam jih bilo potrebno ujeti, opazovati ali poškodovati. V neinvazivno odvzetih bioloških vzorcih (biološke sledi, ki jih živali puščajo za seboj – dlaka, slina, urin, iztrebki, perje) se količina DNA tipično nahaja v zelo nizkih koncentracijah, zato je pomembna pazljivost pri vzorčenju, shranjevanju vzorcev, delu v laboratoriju ter analizi podatkov [1,2].

Mikrosateliti ali STR (ang. *short tandem repeats*) so genetski markerji, ki se v varstveni genetiki najpogosteje uporabljajo za ločevanje in identifikacijo osebkov. Mikrosateliti so kratka ponavljajoča se zaporedja v nekodirajočih delih DNA. Aleli na posameznem mikrosatelitnem lokusu se med seboj razlikujejo v številu ponovitev – motiva, ki ga sestavlja od dva do šest baznih parov, ki se v tandemu ponovijo od 5 do 50-krat [3]. Pomnoževanje mikrosatelitov poteka z reakcijo PCR, pri čemer uporabimo pare specifičnih začetnih oligonukleotidov, kjer je eden od para označen s fluorescenčnim barvilom. To nam omogoča, da v isti reakciji PCR pomnožimo več mikrosatelitov hkrati. Specifična fluorescenčna označba ampikonov nam v nadaljevanju omogoča njihovo zaznavanje s pomočjo kapilarnega sekvenatorja.

V Skupini za ekologijo živali Oddelka za biologijo BF so se za določanje dolžin posameznih pomnoženih fragmentov po končani reakciji PCR do nedavnega posluževali kapilarne elektroforeze v povezavi s kapilarnim sekvenatorjem. Tovrstno določanje dolžin alelov je subjektivno ter zamudno, saj je potrebno preveriti vsak vzorec posebej. Subjektivnost pri določanju dolžin alelov je tudi poglavitni razlog, da je pridobljene rezultate skoraj nemogoče primerjati med laboratoriji. Zato so kolegi iz Skupine za ekologijo živali, v sklopu projekta Life DinAlp Bear, začeli uporabljati metodo sekvenciranja novejših generacij (NGS), ki omogoča hitrejšo, zanesljivejšo in cenejšo analizo več tisoč vzorcev. Z matematičnim modelom CMR (capture-mark-recapture) so kolegi iz Skupine za ekologije živali iz nabranih vzorcev iztrebkov ocenili velikost populacije medvedov na območju Slovenije in Hrvaške za leto 2015. Pri tem so prišli do zaključka, da je populacija medvedov v Sloveniji sestavljena iz 711 (oziroma, med 657 in 767), na Hrvaškem pa iz 937 (oziroma, med 846 in 1072) osebkov [4].

### 1.2. Izvedba vaje 1

Na vaji bomo izolirali DNA iz medvedjih iztrebkov. Izolacijo DNA bomo izvajali s komercialnim kompletom (QIAGEN). Ključni del kompleta so posebne kolone s silikatno membrano, na katero se veže DNA. Po koncu izolacije pričakujemo, da bomo pridobili 5-250 ng/ $\mu$ l DNA. V predhodno pripravljeno reakcijsko mešanico boste dodali izolirano DNA in tarčne fragmente pomnožili z reakcijo PCR. Rezultate (elektroferogram – izpis iz kapilarnega sekvenatorja) si boste v nadaljevanju ogledali in primerjali na enem izmed prihodnjih predavanj.

### 1.2.1. Materiali

Pufri in raztopine: pufer InhibitEX, pufer AL, pufer AW1, Pufer AW2, proteinaza K (20 mg/ml), 96% etanol, voda UHQ, Reakcijska mešanica Qiagen, Raztopina Q, Iztrebki Primer MM 25×

### 1.2.2. Postopek

Vsa centrifugiranja, ki so navedeno v protokolu, izvedemo na sobni temperaturi in pri maksimalnem številu obratov, to je 13.200 obratov na minuto, razen če je napisano drugače.

#### a) Izolacija DNA

1. V 2 ml mikrocentrifugirko odpipetirajte 1 ml pufera InhibitEX in s pinceto ali pipeto dodajte iztrebek (približno 400  $\mu$ l).
  - Iztrebek s plastično žličko iz posodice prestavimo na petrijevko in s površine s pinceto pobereмо čim več materiala v mikrocentrifugirko. Pazimo, da res pobereмо zgolj površino. V kolikor je iztrebek v posodici homogen, ga odpipetirajte.
2. Vzorec mešajte 1 min na vibracijskem mešalu. Pri tem koraku je pomembno, da sta vzorec in pufer zelo dobro premešana, saj tako zagotovimo, da se bo sprostila največja možna količina DNA.
3. Centrifugirajte 1 min in prenesite 600  $\mu$ l vzorca v svežo mikrocentrifugirko ter pri tem pazite, da v mikrocentrifugirko ne prenesete delcev biološkega materiala. Če delčki iztrebka še vedno plavajo v supernatantu, centrifugiranje ponovimo.
4. V isto mikrocentrifugirko, v katero ste prenesli 600  $\mu$ l supernatanta, odpipetirajte 25  $\mu$ l proteinaze K. Vzorec mešajte na vibracijskem mešalu in kratko centrifugirajte.
5. V mikrocentrifugirko odpipetirajte 600  $\mu$ l pufera AL in premešajte na vibracijskem mešalniku 15 s.
6. Inkubirajte 10 min pri 70 °C.
7. Dodajte 600  $\mu$ l 96 % etanola in nežno mešajte. Vzorec kratko centrifugirajte.
8. Na sredino kolone odpipetirajte 600  $\mu$ l pripravljenega lizata. Zaprite pokrovček in centrifugirajte 1 min. Po centrifugiranju prenesite kolono v novo 2-mililitrsko zbirno mikrocentrifugirko.
9. Ponovite korak 8, dokler vsega lizata ne spustite skozi kolono.
10. Previdno odprite kolono in dodajte 500  $\mu$ l pufera AW1. Centrifugirajte 1 min. Po centrifugiranju prenesite kolono v novo zbirno mikrocentrifugirko.
11. Previdno odprite kolono in dodajte 500  $\mu$ l pufera AW2. Centrifugirajte 3 min. Po centrifugiranju prenesite kolono v novo zbirno mikrocentrifugirko.
12. Centrifugirajte 3 min. Po centrifugiranju prenesite kolono v novo, sterilno 1,5-mililitrsko mikrocentrifugirko. Na membrano kolone odpipetirajte 200  $\mu$ l pufera ATE. Inkubirajte 1 min na sobni T in nato centrifugirajte 1 min.
13. Kolono po centrifugiranju zavržite, vzorec DNA v 1,5-mililitrski mikrocentrifugirki pa označite. Vzorec lahko dlje časa shranite pri -20 °C.

## b) Verižna reakcija s polimerazo (PCR)

Za pomnoževanje tarčnih zaporedij bomo uporabili komercialni komplet QIAGEN Multiplex PCR Kit. Reakcijsko mešanico za PCR boste dobili predhodno pripravljeno (**Preglednica 1**). V mešanici bo tudi kombinacija 11 parov specifičnih začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje avtosomskih mikrosatelitnih lokusov (G10H, Mu50, G10D, G10X, Mu09, G10C, G10P, Mu23, Mu59, G10L, Mu15) in en par začetnih oligonukleotidov za pomnoževanje SRY mikrosatelitnega lokusa za določitev spola. Pripravili bomo 10 µl reakcijo: v 8 µl reakcijske mešanice bomo dodali 2 µl izolirane DNA. Poleg vzorcev bomo pomnožili tudi negativne kontrole.

**Preglednica 1: Reakcijska mešanica za en vzorec.**

Voda UHQ	1,6 µl
Reakcijska mešanica Qiagen	5,0 µl
Raztopina Q	1,0 µl
Iztrebki Primer MM 25×	0,4 µl

PCR bo potekal v aparaturi PCR Eppendorf MasterCycler EP Gradient, po programu, ki je predstavljen v **Preglednici 2**.

**Preglednica 2: Program za PCR.**

Začetna denaturacija	95°C	15 min
Število ciklov	38	
Denaturacija	94°C	30 sec
Prileganje	58°C	1:30 min
Podaljševanje	72°C	1 min
Končno podaljševanje	60°C	30 min

Po končanem PCR za vsak vzorec pripravimo mešanico formamida (8,75 µl), dolžinskega standarda (0,25 µl) in produkta PCR (1 µl). Fragmentna analiza bo narejena na avtomatskem sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Rezultate in izpise iz sekvenatorja za vaše vzorce si bomo ogledali na enem izmed prihodnjih predavanj.

## 2. Vaja: Izolacija polimeraze *Taq*

### 2.1. Teoretične osnove

Polimeraza *Taq* je termostabilna DNA polimeraza, ki je bila prvič izolirana leta 1976 in sicer iz termofilne bakterije *Thermus aquaticus*, ki živi v vročih izviroh v nacionalnem parku Yellowstone v Združenih državah Amerike [5]. Je ena izmed najpogosteje uporabljenih polimeraz, ki se jo uporablja pri verižni reakciji s polimerazo (PCR). Ker so količine izolirane nativne polimeraze dokaj nizke, se polimerazo *Taq* tipično pridobiva v heterolognih ekspresijskih sistemih, kot je tudi *E. coli*. Polimeraza *Taq* je termostabilna, kar pomeni, da je odporna na visoke temperature, ki so sicer značilne za reakcijo PCR. Reakcijo PCR je v zgodnjih 80-ih letih prejšnjega stoletja izumil Kary Mullis [6]. Problem prvih reakcij PCR je bil v tem, da so za podaljševanje verige DNA uporabljali Klenow fragment polimeraze I iz *E. coli*, ki ni bil termostabilen, zato so ga morali po vsakem ciklu denaturacije v reakcijo PCR dodati ponovno. Optimalna temperatura za delovanje polimeraza *Taq* je med 75°C in 80°C. Pri 72°C lahko doseže hitrost polimerizacije do 1000 baznih parov na 10 sekund [7]. Ena izmed pomanjkljivosti polimeraze *Taq* je manjkajoče eksonukleazno 3'-5' kontrolno branje (*proofreading* aktivnost), kar vodi v višje kopičenje napak pri sintezi komplementarne verige DNA [7]. Posledično naj bi polimeraza *Taq* naredila eno napako na vsakih 9000 dodanih nukleotidov [8]. Za polimerazo *Taq* je značilno, da na 3' konce dodaja nukleotid adenin, kar se lahko uporablja pri tako imenovanem kloniranju TA. Reakcija PCR predstavlja tudi osnovo za testiranje prisotnosti specifičnih zaporedij DNA ali RNA, kar imenujemo molekularna diagnostika. Pridobljeno polimerazo *Taq* in reakcijo PCR bomo uporabili tudi pri vaji 3, kjer bomo preverili, kako uspešni smo bili pri izvedbi delecije gena *HIS3* na genomu kvasovke, z uporabo tehnologije CRISPR/Cas9.

### 2.2. Izvedba vaje 2

Vaja 2 bo razdeljena v dva termina. V prvem terminu bomo iz predhodno transformiranih celic DH5 $\alpha$  BL21 izolirali rekombinantno polimerazo *Taq*, ki jo bomo v naslednjem terminu nanesli na poliakrilamidno elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata (NaDS-PAGE) in tako preverili, ali smo izolirali proteine z ustrezno molekulsko maso. Izolirano polimerazo *Taq* bomo uporabili tudi pri vaji 3 (Delecija gena *HIS3* z uporabo CRISPR/Cas9).

#### 2.2.1. Materiali

Sev: *E. coli* DH5 $\alpha$

Plazmid: pTTQ18

Gojišča: 5 ml LBAp, 50 ml LBAp

Pufri, raztopine: Ampicilin (100 mg/ml); 1M IPTG; pufer A = 50 mM Tris-HCl, 50 mM dekstroza, 1 mM EDTA, pH 7,9–8,0; pufer B = pufer za lizo = 10 mM Tris – HCl, 50 mM KCl, 0,5% Tween 20, 0,5% NP40, pH 7,9; pufer C = pufer A + 4

mg/ml lizocima; pufer D = 50 mM Tris – HCl, 50 mM NaCl, 0,5 mM DTT, 50% glicerol; 6-kratni nanašali pufer za poliakrilamidno elektroforezo v prisotnosti NaDS; 40 % akrilamid; 1,5 M Tris, pH 8,8; 0,5 M Tris, pH 6,8; 10 % NaDS; 10% APS, TEMED

### **Izolacija polimeraze *Taq***

Protokol za izolacijo polimeraze *Taq* je prilagojen delu v naših laboratorijih, izhaja pa iz že opisanih protokolov [9,10].

#### **Že pripravljeno**

Eno kolonijo *E. coli* DH5 $\alpha$ , predhodno transformirano s plazmidom pTTQ18, ki kodira za polimerazo *Taq* in katere izražanje je pod vplivom inducibilnega promotorja, ki ga lahko induciramo z IPTG, inokuliramo v 5 ml gojišča LB z dodanimi 20  $\mu$ L ampicilina (100 mg/ml). Bakterije gojimo preko noči pri 37°C in neprestanem stresanju (180 obratov/min). Naslednji dan pripravimo v 200 ml erlenmajerici 50 ml svežega gojišča LB, z dodanim ampicilinom in 1% inokulumom. Tako pripravljeno kulturo se ob konstantnem mešanju (180 obratov/min) goji še nadaljnjih 12-16 h na 37°C. Ko celice dosežejo zeleno optično gostoto ( $OD_{600} = 0,5-1,0$ ), dodamo v gojišče IPTG (končna koncentracija 0,2 mM) in nato bakterije gojimo še nadaljnjih 12-16 ur. Do izolacije lahko bakterijska kultura počaka na ledu. 50 ml tako pripravljene bakterijske brozge je dovolj za 25 študentov.

#### **Postopek**

1. Prenesite 2 ml suspenzije bakterij v 2 ml mikrocentrifugirko in centrifugirajte 10 min pri 4.500 obratih/min in 4°C. Odstranite supernatant in usedlino resuspendirajte v 0,2 ml pufru C.
2. Inkubirajte 15 min na sobni T.
3. Dodajte 0,2 ml pufru B (pufer za lizo) in vsebino mikrocentrifugirke dobro premešajte z obračanjem.
4. Inkubirajte 30-60 min pri 75°C. Vsebino mikrocentrifugirke vsake 10 min premešajte z obračanjem.
5. Centrifugirajte 10 min, pri 15.000 obratih/min in 4°C.
6. Po centrifugiranju prenesite supernatant v svežo mikrocentrifugirko in dodajte isti volumen pufru D ter shranite na -20°C.

#### **Preverjanje uspešnosti izolacije polimeraze *Taq***

Uspešnost izolacije bomo preverili s **poliakrilamidno gelsko elektroforezo v prisotnosti natrijevega dodecilsulfata** (NaDS-PAGE), s katero bomo preverili, ali je izolirana polimeraza prave velikosti (94 kDa).

Pripravili bomo dva 12,5 %-na poliakrilamidna gela za ločevanje proteinov, na katere bomo nanесли svoje vzorce. V mikrocentrifugirki bomo zamešali 10  $\mu$ l izolirane polimeraze in 2  $\mu$ l



6-kratnega nanašalnega pufra ter kuhali 2 min in nanesli na gel. Reagenti za pripravo poliakrilamidnih gelov so navedeni v **Preglednici 3**.

**Preglednica 3: Reagenti za pripravo poliakrilamidnih gelov.**

	Ločevalni gel	Nanašalni gel
% poliakrilamida	12,5%	4%
dH <sub>2</sub> O	4,225 ml	1,27 ml
1,5 M Tris, pH 8,8	2,5 ml	/
0,5 M Tris, pH 6,8	/	0,5 ml
40% akrilamid	3,125 ml	0,2 ml
10% NaDS	0,1 ml	0,02 ml
10% APS	0,05 ml	0,01 ml
TEMED	0,005 ml	0,002 ml

### 3. Vaja: Delecija gena *HIS3* kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* z uporabo CRISPR/Cas9

#### 3.1. Teoretične osnove

Zaporedje celotnega genoma običajne kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* je bilo določeno leta 1996 [11,12]. Vsaka haploidna celica kvasovk *S. cerevisiae* vsebuje 16 kromosomov. S sekvenciranjem so ugotovili, da je njen genom zavzema 12.068 kbp, ki zapisujejo za 6604 domnevnih genov oziroma odprtih bralnih okvirjev (ORF), od tega je potrjenih 5159, kar pa nujno ne drži za druge seve. Danes je več kot polovica genov anotiranih, kar pomeni, da je (i) znana njihova molekulska funkcija, (ii) subcelična lokalizacija ali (iii) biološki proces, v katerem sodelujejo [13]. V ugodnih pogojih se običajna kvasovka razmnožuje nespolno, z brstenjem kot haploid ali diploid. V neugodnih razmerah lahko običajna kvasovka preide na spolno razmnoževanje, pri čemer iz diploidnih nastanejo haploidne celice (sporulacija). Poznanih je veliko sevov običajne kvasovke, ki se med seboj tako fenotipsko kot genotipsko kar precej razlikujejo [12].

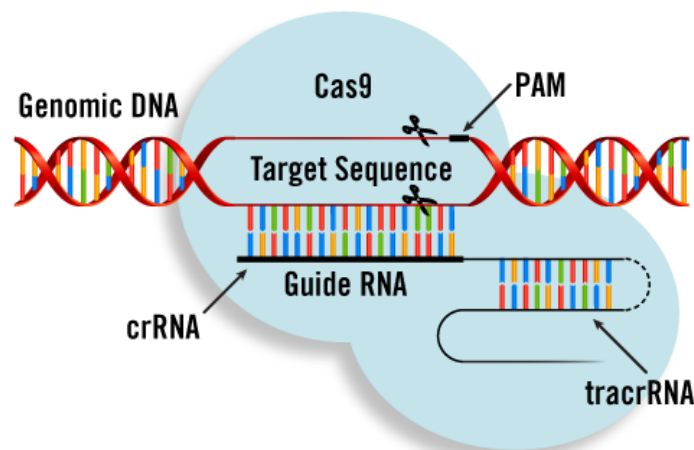
Na laboratorijskih vajah bomo uporabili specifično izpeljanko seva CEN.PK, ki je v osnovi prototrofni sev, kar pomeni, da lahko preživi v gojišču, v katerem je le vir ogljika (npr. sladkorji) z dodanimi preprostimi spojinami (mikroelementi, makroelementi in vitamini). Sevi CEN.PK so zanimivi predvsem pri študijah metabolnega inženirstva in študijah sistemske biologije, uporabljajo pa ga tudi v biotehnologiji [14]. Specifične laboratorijski sev CEN.PK-133.5D je avksotrof za uracil. Za avksotrofne seve je značilno, da imajo okvarjene gene za sintezo aminokislin ali nukleotidov, kar se izkorišča kot selekcijski označevalec (marker) (podobno, kot se pri bakterijah kot selekcijski marker izkorišča gene, ki posredujejo odpornost za antibiotike).

Gen *HIS3* kodira za protein imidazolglicerol-fosfo dehidrataza, ki katalizira šesti korak pri biosintezi histidina iz PRPP (5-fosforibozil-1-pirofosfat). Mutacija v genu *HIS3* vodi v avksotrofijo za histidin in občutljivost na bakrove, kobaltove in nikljeve soli [15,16].

CRISPR (gruča enakomerno prekinjenih kratkih palindromnih ponovitev, ang. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) so ponavljajoči se elementi, prisotni pri 40 % bakterijah in pri 90 % arhejah, ki jih je organizem integriral po stiku s tujimi genetskimi elementi. Lokus CRISPR je sestavljen iz gruče CRISPR povezanih genov (ang. *CRISPR associated system*, Cas) in zbirom direktno ponavljajočih se zaporedij, prekinjenih z variabilnimi zaporedji; to so vmesniki (ang. *spacer*), ki ustrezajo zaporedjem tujih genetskih elementov oziroma protivmesnikom (ang. *protospacer*) [17,18]. Geni Cas se prevedejo v proteine, zbiru CRISPR pa se prepisujejo kot ena sama RNA. Ta se nadalje procesira v kratke crRNA, ki usmerjajo proteine Cas s protismiselno vezavo na tarčno zaporedje [17,19]. V encimu Cas9, ki je najpogosteje uporabljan protein Cas za tehnike molekularnega kloniranja, je zasidrana nekodirajoča tracrRNA, ki hibridizira z iskalno crRNA, da nastane dualni RNA hibrid [17,20,21]. Za uporabo v laboratoriju sta tracrRNA in crRNA združeni v eno samo molekulo, ki jo imenujemo vodeča RNA (gRNA, ang. *guide RNA*) (slika 1). Endonukleaza

Cas9, ki jo usmerja gRNA, omogoča natančno in sistematično spreminjanje genoma. Encim Cas9 (slika 1) na ustrezno lokacijo DNA privede gRNA, ki deluje kot specifična iskalna enota, s čimer je omogočeno spreminjanje genoma praktično vsake vrste.

Z uporabo sistema CRISPR/Cas9 lahko med drugim najdemo tudi povezave med genetskimi variacijami in posledičnimi biološkimi fenotipi, tako da tarčno spreminjamo izbrano zaporedje DNA. Cas9 se zaustavi na določenem mestu na genomu zaradi parjenja med vezano gRNA in genomsko DNA. Cas9 nato prepozna zaporedje PAM (ang. *protospacer adjacent motif*) in poleg njega povzroči nastanek dvojnega loma kromosoma.



**Slika 1: Zgradba sistema CRISPR/Cas9.** V encim Cas9 je zasidrana veriga vodeče RNA (gRNA), ki ima na koncu 5' iskalno enoto. Domeni HNH in RuvC sta endonukleazi, ki režeta 3 bazne pare navzgor od PAM.

Po delovanju Cas9 na tarčni DNA nastaneta prosta konca, ki se zaradi dvoverižnega preloma ne moreta neposredno popraviti na podlagi ustrezne informacije komplementarne verige. Popravljalni mehanizmi zato nastali prelom popravijo s homologno rekombinacijo, ali z nehomolognim združevanjem koncev, pri čemer pa v vrzel uvedejo mutacije [22]. Evkariontske celice uporabljajo proces homologne rekombinacije, da v pozni fazi celičnega cikla S oziroma v G2 popravijo nastale dvoverižne prelome. Informacija za popravilo se takrat nahaja na sestrski kromatidi [23]. Pri kvasovki je dolžina potrebne homologne regije okrog 45 baznih parov [24,25].

### 3.2. Izvedba vaje 3

Za želeno spremembo genoma moramo v celice vstaviti zapisa za Cas9 in gRNA. Za usmerjeno popravljanje s homologno rekombinacijo pa moramo vstaviti tudi eksogeno homologno matrico. Vse komponente lahko v celice kvasovk dostavimo s transformacijo. V prvem terminu bomo izvedli brazgotinsko delecijo gena *HIS3* (663 bp) seva CEN.PK133-5D običajne kvasovke z uporabo CRISPR/Cas9. Pojem "brazgotinsko" se tipično nanaša ne neko heterologno zaporedje, ki ga uvedemo kot označevalec (seleksijski marker). Pojem »brez-brazgotinsko« pa je v uporabi tedaj, če uvedemo obstoječi alel (npr. z nesmisleno mutacijo). Naš produkt bo nekje vmes med obema ekstremnima primeroma. Najprej bomo v kodirajočem

zaporedju gena *HIS3* zarezali s CRISPR/Cas9 in nato izvedli homologno rekombinacijo z matrico, ki je sestavljena iz dveh komplementarnih začetnih oligonukleotidov. V drugem terminu bomo iz pridobljenih transformant izolirali genomsko DNA in preverili prisotnost zapisa za *HIS3* z uporabo polimeraze *Taq*, ki smo jo pridobili na prejšnjih vajah. Hkrati bomo tudi testirali rast spremenjenih običajnih kvasovk na gojišču brez histidina in tako dokončno potrdili uspešnost poskusa CRISPR.

### 3.2.1. Materiali

Sev	CEN.PK133-5D <i>MATa MAL2-8c SUC2 ura3-52</i>
Plazmida	p414-Cas9; p426-gRNA-HIS3
Gojišča	YPD, plošče YPD, plošče YPD+Nat, plošče YNB+Nat-ura
Oligonukleotidi	<ul style="list-style-type: none"> <li>Oligonukleotida za matrico za homologno rekombinacijo: HIS3del_f in HIS3del_r</li> <li>Oligonukleotidi za sestavljanje plazmida, ki bo izražal gRNA: p426_Grna_f in p426_gRNA_r ter F2 in R2</li> <li>Oligonukleotida za preverjanje uspešnosti delecije gena <i>HIS3</i> (oligonukleotidi začetniki za sekveniranje): UP_HIS3_2F in DN_HIS3_2R</li> </ul>
Pufri, raztopine	0,1 M Li-acetat; sterilna voda (MQ); 50% PEG 3350; 1 M Li-acetat; 2 mg/ml ss-DNA; pufer za naleganje = 10 μM TRIS, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5-8,0; 200 mM Li-acetat v 1 % NaDS; 96 % etanol; 70 % etanol; 10-kratni pufer <i>Taq</i> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 25 mM MgCl <sub>2</sub> ; 1,25 M dNTP mix; polimeraza <i>Taq</i> 5U/μL; polimeraza Q5, 0,5 in 1-kratni pufer TBE; agaroz; etidijev bromid; DNA lestvica Gene Ruler 1 kb DNA ladder

Preglednica 4: Oligonukleotidi za vajo 3.

HIS3del_f	5'~AAGAATATACTAAAAAATGAGCAGGCAAGATAAACGAAGGC AAAGTGACACCGATTATTTAAAGCTGCAGCATAACGATATATATA CATGT~3'
in HIS3del_r	5'~ACATGTATATATATCGTATGCTGCAGCTTTAAATAATCGGTGT CACTTTCCTTCGTTTATCTTGCCTGCTCATTTTTTAGTATATTCT T~3'
p426_gRNA f	5'~ <b>CCTTGAACGCACTCTCACTA</b> GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA GTTAAAATAA~3'
p426_gRNA	5'~TTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC <b>TAGTGAGAGTG CGTTCAAGG</b> GATCATTATCTTTCCTGCGGAGAAGTTTCG~3'
F2	5'~TTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAA~3'
R2	5'~TTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAA~3'

UP_HIS3_2F	5'~GCATTAGTCAGGGAAGTCAT~3'
DN_HIS3_2R	5'~GAGGAACATAACCATTCTCG~3'

### 3.2.2. Postopek

#### Termin 1: Transformacija *S. cerevisiae* CEN.PK133-5D z litijevim acetatom

Na svojih mizah boste dobili tekočo kulturo *S. cerevisiae* CEN.PK133-5D, ki je že bila transformirana s plazmidom, ki nosi zapis za endonukleazo Cas9 (p414-Cas9) in ki jo boste v prvem terminu transformirali s plazmidom, ki bo izražal gRNA (p426-gRNA-HIS3) ter matrico za homologno rekombinacijo.

Za izražanje Cas9 bomo uporabili izpeljanko plazmida p414-Cas9. Plazmid, ki je velik 10,5 kbp, se standardno namnoži v prekonočni bakterijski kulturi, nato pa v nadaljevanju transformira v kvasovko. Ohranjanje in podvojevanje plazmida v kvasovki omogoča zaporedje CEN/ARS iz pRS. CEN/ARS regija pomeni, da gre za centromerni plazmid, ki se pomnožuje relativno neodvisno od kromosoma v majhnem številu kopij, kar ima za posledico relativno nizko raven izražanja gena za endonukleazo Cas9. CEN regija omogoča tudi relativno stabilen obstanek plazmida v celicah ob celični delitvi tudi ob odsotnosti selekcijskega pritiska. Plazmid p414 vsebuje tudi zapis za gen NatR, ki omogoča rezistenco proti antibiotiku nurseotricin. Gen za endonukleazo Cas9 se izraža pod močnim konstitutivnim promotorjem TEF1, zapis za Cas9 ima dodan jedrni lokalizacijski signal SV40, gen pa zaključuje terminator CYC1.



Slika 2: Karta vektorja p414-Cas9-NST.

## Že pripravljeno

1. Prekonočna kultura *S. cerevisiae* CEN.PK133-5D, ki jo boste transformirali, v gojišču YPD.
2. Celice se ustrezno razredči (20-40x) v svežem gojišču YPD, tako da pride optična gostota pri 600 nm ( $OD_{600}$ ) približno na vrednost 0,1 in razrašča vsaj dva generacijska časa (za gojišče YPD to pomeni ~ 4 ure), da se dobi celice v zgodnji logaritemski fazi rasti. 10 ml kulture celic v logaritemski fazi rasti ( $OD_{600} \sim 0.5$ ) zadostuje za 3-4 transformacije.

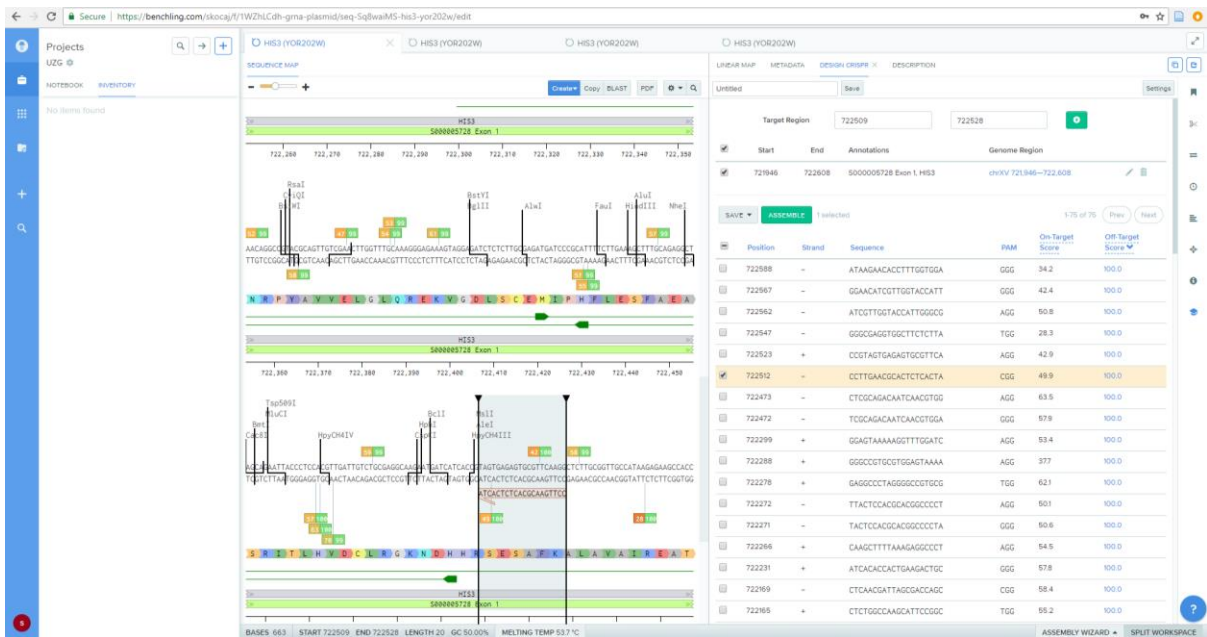
## Praktično delo

Pred transformacijo kvasovk je potrebno imeti pripravljeno **matrico za homologno rekombinacijo in plazmidno DNA z zapisom za gRNA**.

Homologna rekombinacija pri kvasovki poteče le pod pogojem, da imata donorski in akceptorski segment vsaj 40 baznih parov dolgi prekrivajoči se regiji [24], kar je dovolj, da ga kompleks proteina Rad51 prepozna kot ustreznega za rekombinacijo. Za uspešno izvedeno zamenjavo s pomočjo sistema CRISPR/Cas9 je potrebno med 1  $\mu$ g in 5  $\mu$ g linearne matrice [24]. Homologno matrico izberemo tako, da ne vsebuje zaporedja PAM [24,26]. Načrtovanje matrice je torej odvisno od izbire zaporedja PAM; ker tam ne pride do dvoverižnega zloma, mora biti ena od homolognih regij na tem območju, hkrati pa na ekvivalentnem mestu na matrici ni zaporedij NGG. Matrica za homologno rekombinacijo načrtujemo s 45 bp dolgima homolognima regijama. Tista, ki je homologna območju okolice PAM, naj vsebuje spremembo na tem mestu. Matrico za homologno rekombinacijo z delecijo pridobimo tako, da komplementarna začetna oligonukleotida zamešamo v ekvimolarnem razmerju.

3. Postopek za pripravo matrice za homologno rekombinacijo je sestavljen iz dveh delov in sicer iz raztapljanja oligonukleotidov ter njihovega naleganja v aparaturi PCR.
  - Raztapljanje: začetna oligonukleotida His3del\_f in His3del\_r, ki sta pripravljena v 100  $\mu$ M koncentraciji, 10-kratno redčimo v pufru za naleganje (10  $\mu$ M TRIS, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5-8,0). Koncentracija vsakega oligonukleotida mora biti dvakrat višja od želene končne koncentracije dupleksa (matrice), kar v našem primeru pomeni 10  $\mu$ M oligonukleotida.
  - Naleganje oligonukleotidov bo potekalo v aparaturi PCR V 200  $\mu$ l mikrocentrifugirko PCR zamešaj ekvimolarni koncentraciji obeh oligonukleotidov, ki si ju preračunal pri prejšnji točki, in inkubiraj 2 min pri 95°C, nato mikrocentrifugirko PCR počasi kontrolirano ohlajaj tako, da se v roku 45 min ohladi na sobno T.
  - Za eno transformacijo potrebujemo 5  $\mu$ g matrice. Ker je koncentracije matrice po naleganju 278,3  $\mu$ g/ml (5  $\mu$ M), bomo za transformacijo odpipetirali 17,97  $\mu$ l dvoverižne DNA.

Zaporedje za gRNA za oblikovanje delecije gena *HIS3* načrtujemo s pomočjo programa Benchling, ki je prosto dostopen. V programu izberemo zaporedje, katerega želimo spremeniti, pri tem pa dobimo različne variante zaporedja za gRNA. Načeloma izberemo takšno zaporedje, ki ima čim višji vrednosti "on-target score" in »off-target score".



Slika 3: Izbira najbolj ustreznega zaporedja za gRNA.

Na podlagi računalniškega algoritma in na osnovi izkušenj dobimo najbolj ustrezno zaporedje za gRNA, ki bo prepoznalo zaporedje na genomski DNA. V našem primeru smo kot najbolj primerno zaporedje izbrali zaporedje spodaj, ki reže med 566 in 567 nukleotidom v genu *HIS3* (na zaporedju DNA za *HIS3* je cepitveno mesto med 566. in 567. nukleotidom označeno s puščico).

5'-CCTTGAACGCACTCTCACTACGG-3' ... zaporedje za gRNA

3'-GGAAGTTGCGTGAGAGT↓GATGCC-5' ... del zaporedja na genomski DNA, kamor se gRNA komplementarno veže

Izbrano zaporedje za gRNA moramo v naslednjem koraku vključiti v plazmidni vektor p426. Vektor p426, ki ga bomo v postopku uporabljali, ima selekcijski označevalec *URA3*. Vektor p426 namnožimo v celicah *E. coli* DH5 $\alpha$ , kar omogočajo zaporedja ori f1, ori ColE1 in gen, ki posreduje odpornost proti ampicilinu. Transformacijo v kvasovke omogoča zaporedje 2 $\mu$  in komplementacija z genom *URA3*, ki omogoča sicer za uracil avksotrofnemu sevu rast na gojišču brez uracila. Ključna lastnost tega vektorja je zapis za gRNA. Ta je himerna oblika crRNA (20 bp) in tracrRNA (79 bp). Gen za gRNA se prepisuje pod kontrolo promotorja SNR52 in terminatorja CYC1. Variacijo vektorja p426 v delu, ki ustreza crRNA, izvedemo s sestavljanjem po Gibsonu. Za to potrebujemo štiri začetne oligonukleotide, s katerimi bomo plazmid najprej pomnožili v dva ločena linearna fragmenta s prekrivajočima se koncema. Dva začetna oligonukleotida, ki se prilegata med 2  $\mu$  in Amp<sup>R</sup>, sta univerzalna in drug drugemu reverzno komplementarna, druga dva pa se prilegata tik ob promotorju SNR52 in terminatorju CYC1. Ta dva sta specifična, saj bomo z njima v ogrodje novega vektorja vstavili specifično 20 bp dolgo zaporedje, ki ustreza crRNA. S pomočjo dveh parov oligonukleotidnih začetnikov in dveh neodvisnih reakcij PCR pridobimo dva dela (dve zaporedji) bodočega plazmida, ki ju v funkcionalni plazmidni vektor, ki bo izražal gRNA, združimo s sestavljanjem po Gibsonu.



**Slika 4: Plazmidni vektor p426-gRNA-HIS3.** Na karti so označeni funkcionalni deli plazmidnega vektorja. S svetlo modro in rdečo je označeno mesto gRNA. Zaradi preglednosti restrikcijska mesta niso prikazana.

<b>Product Group</b> <input type="text" value="Q5"/>	<b>Anneal at</b> <div style="border: 1px solid black; padding: 5px; text-align: center;">61 °C</div>
<b>Polymerase/Kit</b> <input type="text" value="Q5 High-Fidelity DNA Polymerase"/>	
<b>Primer Concentration (nM)</b> <input type="text" value="100"/> <span style="float: right;">Reset concentration</span>	
<b>Primer 1</b> <input type="text" value="GTTT TAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAA"/>	<b>Primer 1</b> 32 nt 25% GC Tm: 60 °C
<b>Primer 2</b> <input type="text" value="GATCATTATCTTCACTGCGGAGAAGTTTCG"/>	<b>Primer 2</b> 32 nt 41% GC Tm: 67 °C
<a href="#">Switch to batch mode</a>	<a href="#">Clear</a> <a href="#">Use example input</a>

**Slika 5: Temperaturo naleganja oligonukleotidnih začetnikov p426\_gRNA\_f in p426\_gRNA\_r preračunamo le za del, ki se prilega na plazmidni vektor in sicer s prosto dostopnim programom NebTm.**

- 10 ml celic prenesite v 15-ml centrifugirko in centrifugirajte (3.000 obratov/min, 5 min, sobna T). Odstranite supernatant in celice resuspendirajte v polovičnem volumnu sterilne vode (MQ). Ponovno centrifugirajte, odstranite supernatant in resuspendirajte v 1/20 prvotnega volumna in sicer v raztopini 0.1 M Li-acetata ter prenesite v mikrocentrifugirko. Ponovno centrifugirajte (13.200 obratov/min, 1 min, sobna T) in resuspendirajte v 200 µl



- 0.1 M Li-acetata. Celice razdelite v 4 alikvote po 50  $\mu$ l, centrifugirajte, odstranite supernatant in inkubirajte na ledu do transformacije.
5. Tako pripravljenim kompetentnim celicam dodajte predpripravljeno (homogeno premešano) transformacijsko mešanico (komponente morajo biti sterilne):
    - 240  $\mu$ l 50% PEG 3350 (viskozen, pred pipetiranjem najprej omoči pipetni nastavek)
    - 36  $\mu$ l 1 M Li-acetat
    - 50  $\mu$ l 2 mg/ml ss-DNA (predhodno 2 min kuhana in prenesena/premešana na vibracijskem mešalu na led)
    - 5  $\mu$ l plazmida p426-gRNA-HIS3 in 17,97  $\mu$ l matrice za homologno rekombinacijo
    - Dopolni z MQ do 360  $\mu$ l
  6. Premešajte na vibracijskem mešalu, nato inkubirajte 30 min pri 30°C in nadaljnjih 30 min pri 42°C.
  7. Celicam dodajte 700  $\mu$ l MQ, premešajte na vibracijskem mešalu in centrifugirajte (maksimalno 6.000 obratov/min), odstranite supernatant in celice resuspendirajte v 50  $\mu$ l MQ.
  8. Eden izmed para naj selekcijske plošče z gojiščem YNB-ura razmaže 5  $\mu$ l, drugi izmed para pa preostanek transformiranih celic.
  9. Celice gojimo 3 dni na 30°C.

## Termin 2

Na ploščah s sintetičnim gojiščem brez uracila (YNB+Nat-ura) pričakujemo transformante, ki imajo v genomu delecijo gena *HIS3*. Te bomo prepoznali tako, da bomo najprej izolirali genomsko DNA *S. cerevisiae* in nato z reakcijo PCR in s pomočjo para ustreznih oligonukleotidov ter polimerazo *Taq*, ki smo jo pridobili na prejšnjih vajah, preverili velikost pomnoženega zaporedja. Če je prišlo do delecije ustreznega gena, pričakujemo pomnožek dolg 629 bp, če nam delecija ni uspela, pa pričakujemo velikost pomnoženega zaporedja 1292 bp.

Genomsko kvasno DNA izoliramo iz posamezne kolonije, zrasle na plošči. Sledimo protokolu, nekoliko spremenjenemu glede na [27].

## Postopek

1. S sterilno cepilno zanko poberite celični material iz ene kolonije in ga resuspendirajte v 100  $\mu$ l raztopine 200 mM Li-acetat v 1 % NaDS ter premešajte z vibracijskim mešalnikom.
2. Tako pripravljeno raztopino inkubirajte vsaj 5 min pri 70 °C.
3. Dodajte 300  $\mu$ l 96 % etanola in premešajte z vibracijskim mešalnikom. Na tak način se raztopijo manj polarne komponente, polarni proteini in DNA pa se ne raztopijo.
4. Centrifugirajte 3 min pri 13.200 obratih/min.
5. Supernatant odlijte in usedlino sperite s 500  $\mu$ l 70 %-nega etanola. Premešajte z vibracijskim mešalnikom. Polarne komponente se v etanolu ne raztopijo.
6. Centrifugirajte 3 min pri 13.200 obratih/min.

7. Supernatant odlijete in odstranite preostali etanol. Odprto mikrocentrifugirko sušite pri sobni T nekaj minut.
8. Usedlino raztopite v 20  $\mu\text{l}$  MQ; volumen zavisi od količine začetnega celičnega materiala. DNA se v vodi raztopi, preostali celični material pa le slabo, zato je potrebno dobro premešati z vibracijskim mešalnikom. Topnost je boljša, če poprej osušimo preostali etanol.
9. Centrifugirajte 15 s pri 13.200 obratih/min. Celični preostanek se posede, DNA ostane raztopljena v vodi.
10. Genomsko DNA odpipetiraj v svežo mikrocentrifugirko in po potrebi shrani pri  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Izolirana genomsko DNA nam bo služila kot matrica za preverjanje prisotnosti ali delecije gena *HIS3*. V preglednici 5 so podane vrednosti posameznih komponent, ki so potrebne za uspešno izvedbo reakcije PCR. Preračunajte si, koliko posamezne komponente boste potrebovali za uspešno izvedeno reakcijo z volumnom 20  $\mu\text{l}$ .

**Preglednica 5: Reagenti za PCR.**

Reagent	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]	Začetna koncentracija	Končna koncentracija
<i>Taq</i> pufer $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		10x	1x
$\text{MgCl}_2$		25 mM	2 mM
dNTP mix		1,25 M vsakega	100 $\mu\text{M}$ vsakega
MQ			
Primer F		10 $\mu\text{M}$	200 nM
Primer R		10 $\mu\text{M}$	200 nM
matrica		gDNA app. 50 ng/ $\mu\text{l}$ , pDNA app. 1 ng/ $\mu\text{l}$	gDNA app. 0,5 ng/ $\mu\text{l}$ , pDNA app. 0,01 ng/ $\mu\text{l}$
Polimeraza <i>Taq</i>	0,2	5 U/ $\mu\text{l}$	0,05 U/ $\mu\text{L}$

Mikrocentrifugirke PCR dajte v aparaturo PCR in izvedite PCR po programu:

**Preglednica 6: Program za PCR za vajo 3.**

Denaturacija DNA	94 $^{\circ}\text{C}$ , 3 min	
Denaturacija DNA	94 $^{\circ}\text{C}$ , 30 sek	25 ciklov
Prileganje	52 $^{\circ}\text{C}$ , 30 sek	
Podaljševanje DNA	72 $^{\circ}\text{C}$ , 90 sek	
Podaljševanje DNA	72 $^{\circ}\text{C}$ , 5 min	
Konec	4 $^{\circ}\text{C}$	

Po reakciji PCR, bomo pomnožena zaporedja nanesti na agarozni gel in preverili uspešnost delecije gena *HIS3*.

1. Zatehtajte 1 %-no agarozo in jo dodajte k 40 ml 0,5-kratnega pufra TBE. Agarozna naj se raztopi s segrevanjem v mikrovalovni pečici.
2. Medtem, ko se erlenmajerica z raztopljenim gelom ohlaja, pripravite nosilec za gel s primernim glavničkom. Nekoliko ohlajeni agarozni dodajte 1,5  $\mu$ l etidijevega bromida in jo vlijte v nosilec. Obvezno je delo z rokavicami.
3. Po 30 min strjeni agarozni gel prenesite v elektroforezni sistem in vanjo nalijte 1-kratni puffer TBE. Gel mora biti prekrit s pufrom. Zamenjajte rokavice.
4. Pripravite vzorce za nanos na gel tako, da iz reakcijske mešanice PCR odpipetirate 8  $\mu$ l vzorca v 1,5 ml mikrocentrifugirko in mu dodajte 2  $\mu$ l 5-kratnega nanašalnega barvila. Vse vzorce nanesite na gel. V prvi žepki gela nanesite 4  $\mu$ l mešanice fragmentov DNA znane velikosti.
5. Izvedite elektroforezo pri 120 V (30-45 min). Po koncu elektroforeze gel osvetlite z UV transiluminatorjem in ga fotografirajte.

## Literatura

- [1] Ghatak S, Muthukumaran RB, Nachimuthu SK. A Simple Method of Genomic DNA Extraction from Human Samples for PCR-RFLP Analysis. *J Biomol Tech JBT* 2013;24:224–31. doi:10.7171/jbt.13-2404-001.
- [2] Taberlet P, Luikart G. Non-invasive genetic sampling and individual identification. *Biol J Linn Soc* 1999;68:41–55. doi:10.1006/bijl.1999.0329.
- [3] Goodwin W, Linacre A, Hadi S. *An Introduction to Forensic Genetics* 2007:172.
- [4] Skrbinišek T, Jelenčič M, Luštrik R, Konec M, Boljte B, Jerina K, et al. GENETIC ESTIMATES OF CENSUS AND EFFECTIVE POPULATION SIZES OF BROWN BEARS IN NORTHERN DINARIC MOUNTAINS AND SOUTH- EASTERN ALPS n.d.:65.
- [5] Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 1976;127:1550–7.
- [6] Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 1990;262:56–61, 64–5.
- [7] Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Chang SY, Landre PA, Abramson RD, et al. High-level expression, purification, and enzymatic characterization of full-length *Thermus aquaticus* DNA polymerase and a truncated form deficient in 5' to 3' exonuclease activity. *Genome Res* 1993;2:275–87. doi:10.1101/gr.2.4.275.
- [8] Tindall KR, Kunkel TA. Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* 1988;27:6008–13. doi:10.1021/bi00416a027.
- [9] Ferralli P, Egan JD, Erickson FL. Making Taq DNA Polymerase in the Undergraduate Biology Laboratory. *Bios* 2007;78:69–74.
- [10] Engelke DR, Krikos A, Bruck ME, Ginsburg D. Purification of *Thermus aquaticus* DNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *Anal Biochem* 1990;191:396–400.
- [11] Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. Life with 6000 genes. *Science* 1996;274:546, 563–7.
- [12] Landry CR, Townsend JP, Hartl DL, Cavalieri D. Ecological and evolutionary genomics of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Ecol* 2006;15:575–91. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02778.x.
- [13] Cherry JM, Hong EL, Amundsen C, Balakrishnan R, Binkley G, Chan ET, et al. *Saccharomyces Genome Database: the genomics resource of budding yeast*. *Nucleic Acids Res* 2012;40:D700-705. doi:10.1093/nar/gkr1029.
- [14] Nijkamp JF, van den Broek M, Datema E, de Kok S, Bosman L, Luttk MA, et al. De novo sequencing, assembly and analysis of the genome of the laboratory strain *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-7D, a model for modern industrial biotechnology. *Microb Cell Factories* 2012;11:36. doi:10.1186/1475-2859-11-36.
- [15] Fink GR. GENE-ENZYME RELATIONS IN HISTIDINE BIOSYNTHESIS IN YEAST. *Science* 1964;146:525–7.
- [16] Alifano P, Fani R, Liò P, Lazcano A, Bazzicalupo M, Carlomagno MS, et al. Histidine biosynthetic pathway and genes: structure, regulation, and evolution. *Microbiol Rev* 1996;60:44–69.

- [17] Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 2014;157:1262–78. doi:10.1016/j.cell.2014.05.010.
- [18] Lim Y, Bak SY, Sung K, Jeong E, Lee SH, Kim J-S, et al. Structural roles of guide RNAs in the nuclease activity of Cas9 endonuclease. *Nat Commun* 2016;7:13350. doi:10.1038/ncomms13350.
- [19] Nelles DA, Fang MY, Aigner S, Yeo GW. Applications of Cas9 as an RNA-programmed RNA-binding protein. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2015;37:732–9. doi:10.1002/bies.201500001.
- [20] Mekler V, Minakhin L, Semenova E, Kuznedelov K, Severinov K. Kinetics of the CRISPR-Cas9 effector complex assembly and the role of 3'-terminal segment of guide RNA. *Nucleic Acids Res* 2016;44:2837–45. doi:10.1093/nar/gkw138.
- [21] Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys* 2017;46:505–29. doi:10.1146/annurev-biophys-062215-010822.
- [22] Principles of Molecular Biology: Burton E. Tropp: 9781449689179: Knjiga | Emka.si n.d. <https://www.emka.si/principles-of-molecular-biology/PR/1253674> (accessed August 16, 2018).
- [23] Mating-Type Genes and MAT Switching in *Saccharomyces cerevisiae* n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3338269/> (accessed August 16, 2018).
- [24] DiCarlo JE, Norville JE, Mali P, Rios X, Aach J, Church GM. Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res* 2013;41:4336–43. doi:10.1093/nar/gkt135.
- [25] Gueldener U, Heinisch J, Koehler GJ, Voss D, Hegemann JH. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res* 2002;30:e23.
- [26] Lamb AM, Walker EA, Wittkopp PJ. Tools and strategies for scarless allele replacement in *Drosophila* using CRISPR/Cas9. *Fly (Austin)* 2017;11:53–64. doi:10.1080/19336934.2016.1220463.
- [27] EXTRACTION OF GENOMIC DNA FROM YEASTS FOR PCR-BASED APPLICATIONS n.d. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182553/> (accessed August 20, 2018).