

Optimalizacja metod detekcji mutacji w genie *Nud* indukowanej przez technologię CRISPR/Cas9 w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare* L.)

Optimization of mutation detection methods in the *NUD* gene induced by CRISPR / CAS9 technology in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Mateusz Przyborowski¹✉, Sebastian Gasparis¹, Wacław Orczyk²,
Anna Nadolska-Orczyk¹

¹Zakład Genomiki Funkcjonalnej, ²Zakład inżynierii Genetycznej
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

✉ e-mail: m.przyborowski@ihar.edu.pl

Celem pracy był wybór optymalnej metody detekcji mutacji w genie *Nud* indukowanej z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9 w jęczmieniu zwyczajnym. Testowano cztery powszechnie wykorzystywane techniki genotypowania: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), trawienie enzymatyczne przy użyciu endonukleazy I z bakteriofaga T7, wysokorozdzielczą krzywą topnienia produktu reakcji łańcuchowej polimerazy (HRM-PCR) oraz sondy molekularne. W toku prowadzonych prac stwierdzono, że najkorzystniejszym sposobem wykrywania mutacji indukowanej techniką CRISPR/Cas9 jest metoda oparta o sondy molekularne. Daje ona jednoznaczne i powtarzalne wyniki ale jednocześnie wymaga użycia zaawansowanej aparatury.

Słowa kluczowe: CRISPR / Cas9, edytowanie genomu, gen *Nud*, jęczmień zwyczajny, sondy molekularne

The aim of the study was to select the optimal method for mutation detection in the *Nud* gene induced by using the CRISPR / Cas9 technology in barley. Four commonly used genotyping techniques were tested: restriction fragment length polymorphism (RFLP), enzymatic digestion using endonuclease I from T7 bacteriophage, high resolution melting curve of polymerase chain reaction product (HRM-PCR) and molecular probes. Findings in the current study suggest that the most favorable way for detecting mutations induced by the CRISPR / Cas9 technique is a method based on molecular probes. It enables to receive clear and repeatable results but at the same time requires the use of advanced equipment.

Key words: CRISPR / Cas9, genome editing, *Nud* gene, barley, molecular probes

CRISPR/Cas9 jest jedną z biotechnologicznych technik edytowania genomu wykorzystywaną w strategii polegającej na inaktywacji genu poprzez indukcję mutacji, a w efekcie końcowym na zahamowaniu powstawania funkcjonalnego białka kodowanego przez badany gen.

W celu wyboru optymalnej metody detekcji mutacji w genie *Nud* indukowanej z wykorzystaniem technologii CRISPR/Cas9 w jęczmieniu zwyczajnym testowano cztery powszechnie wykorzystywane techniki genotypowania: polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP), trawienie enzymatyczne przy użyciu endonukleazy I z bakteriofaga T7, wysokorozdzielczą krzywą topnienia produktu reakcji łańcuchowej polimerazy (HRM-PCR) oraz sondy molekularne.

W celu ostatecznego potwierdzenia oraz określenia rodzaju mutacji wykonano sekwencjono-

wanie metodą Sanger. Z każdej rośliny T₀ sekwencjonowano co najmniej 5 klonów bakteryjnych zawierających amplikon genu *Nud*.

Najkorzystniejszą techniką wykrywania mutacji indukowanej technologią CRISPR/Cas9 jest metoda oparta o sondy molekularne. Daje ona jednoznaczne i powtarzalne wyniki ale jednocześnie wymaga użycia zaawansowanej aparatury. Do metod o wysokiej przepustowości oraz wymagających tylko podstawowej aparatury laboratoryjnej należą techniki wykorzystujące enzymy restrykcyjne (technika RFLP) oraz endonukleazę I z bakteriofaga T7. Najtrudniejszą technicznie, a zarazem najbardziej problematyczną w interpretacji wyników okazała się wysokorozdzielcza krzywa topnienia produktu reakcji łańcuchowej polimerazy (HRM-PCR).

Sponsorzy konferencji Dzień Młodego Naukowca 2018



