

Protocol for CRISPR/Cas system in medaka | ver. 1.4.1

文責: 安齋 賢
2016.05.09

1. Materials

ベクター

- ・ pCS2+hSpCas9: Cas9 vector, **Amp耐性**, [Addgene Plasmid 51815, Ansai and Kinoshita (2014)]
- ・ pDR274: sgRNA vector, **Kan耐性**, [Addgene Plasmid 42250]

試薬・Kit類

- ・ BsaI-HF (NEB), Dral, NotI, 各種付属バッファー類
- ・ Proteinase K (20 mg/mL)
- ・ 10% SDS溶液
- ・ 大腸菌関係 (培地, 抗生物質, コンピテントセル等) 一式
- ・ 10x annealing buffer (400 mM Tris-HCl [pH 8.0], 200 mM MgCl₂, 500 mM NaCl)
- ・ AmpliScribe T7-flash Transcription Kit (Epicentre, ASF3507)
- ・ mMessage mMachine SP6 Kit (Thermo/Ambion, AM1340)
- ・ RNeasy Plus mini kit (Qiagen, 74136)
- ・ NucleoSpin Plasmid Quick Pure (MACHEREY-NAGEL, 740615)
- ・ NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL, 740609) with Buffer NTB (740595)

2. Design and construction of sgRNA transcription vector

標的配列の選択

PAMによる制限を考慮して、ゲノム中の「5'- N₂₁GG -3'」にsgRNAを設計する。

具体的には3'側がGGで終わる配列を探す (目視で十分)。Reverse側での設計も問題ない (つまり画面上のCCでも設計が可能)。

なお、以下のツールがsgRNA設計に有用である。

1. NBRP medaka (<http://viewer.shigen.info/cgi-bin/crispr/crispr.cgi>)
入力したsequenceから切断配列近傍にmicrohomology (3-5 bp)を持つtarget siteを探すツール。
2. CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html>) Stemmer et al. (2015)
off-target検索を同時に行い、適切なtargetを選ぶツール。オリゴ配列も出力してくれる。
魚ではメダカ, ゼブラフィッシュ, トゲウオ, cavefish対応。

オリゴ設計

「sgRNA design sheet.xls¹」を開き、ゲノム中から探した配列「5'- N₂₁GG -3'」を指定の欄に入力する。

※配列処理に使うので、ファイルを開いた時にマクロを有効にすること。

オリゴ発注

普通のプライマーと同じ要領で発注する (22 mer)。

(オペロンで発注する場合、「スタンダードオリゴ」の「一括入力」を選び、上のExcel sheetからそのままコピーして貼れば良い。10 nmoleスケール, OPC精製。)

¹ ファイル内にマクロを使用しているので、Excel 2008 for macでは使用不可。その場合は「sgRNA design sheet.odc」をApache OpenOfficeで開く。

sgRNA vectorのBsal消化

pDR274は予め精製しておく。必ずスピнкаラム以上の精製をすること(Bsalの切れに癖がある)。

pDR274 (5 µg)	x µL	
NEBuffer #4	5 µL	
0.1% BSA (Takara)	5 µL	
Bsal-HF	2 µL	
DW	up to 50 µL	
Total	50 µL	→ 37°C, o/n

消化産物は、電気泳動後、切り出しゲル精製によって回収 (30 µLで溶出)。※AP処理は厳禁。
回収後の溶液は-20 °Cで保存。特に気を使わなくとも、何回も使用可能。

オリゴのAnnealing (in thermal cycler)

oligo S (100 µM)	1 µL	
oligo AS (100 µM)	1 µL	
10x annealing buffer	1 µL	95°C 2 min
DW	7 µL	↓ 30 minかけて冷却
Total	10 µL	25°C

Ligation

以降は通常のラボプロトコルに従って実験すれば良い。Annealしたoligoとbackbone vectorは、以下のよう
に等量程度使用する。

pDR274 (Bsal cut)	1 µL	
Annealed oligo	1 µL	
Ligation high ver.2	2 µL	
Total	4 µL	→16°C, 30 min

Ligation反応液は、通常の形質転換→回復培養の後、**Kan**プレートにplatingする。37°C o/nで培養。

コロニーPCR/mini prep

制限酵素処理での確認やシーケンスを行わないので一応やる。条件は以下の通り²。

DW	5.85 µL	
10x Reaction Buffer	1 µL	
10 mM dNTP mix	0.8 µL	
50 mM MgCl ₂	0.3 µL	
M13-forward (2 µM)	1 µL	
oligo S (2 µM)	1 µL	95°C 2 min
HybriPol DNA Polymerase	0.05 µL	95°C 20s→55°C 30s→72°C 20s *35 cycles
Total	10 µL	

経験上ほとんど外れたことがないので、各ベクターにつき4-8クローン程度拾えば十分。
当たりのコロニーをつついて液体培養(2mLプラスグロウ+**Kan**)。カラム精製する。

² ただしHybriPol DNA polymeraseは廃番なので、入手不能の場合はTaq系の何かの酵素で代替する

3. Preparation of Cas9 RNA and sgRNA

転写用ベクターの線状化

>Cas9 RNA (NotIによる切断)

精製したpCS2+hSpCas9をNotIで線状化する

pCS2+hSpCas9 (5 µg)	x µL	
10x H buffer	10 µL	
0.1% BSA	10 µL	
Triton X-100	10 µL	
NotI	2 µL	
DW	up to 100 µL	
<hr/>		
Total	100 µL	→ 37°C, o/n

反応後、3 µLを取って電気泳動する。8.3 kbのバンドが見えればOK。

>sgRNA (DraIによる切断)

オリゴをクローニングしたpDR274をDraIで線状化する

sgRNA vector (5 µg)	x µL	
10x M buffer	10 µL	
DraI	2 µL	
DW	up to 100 µL	
<hr/>		
Total	100 µL	→ 37°C, o/n

反応後、3 µLを取って電気泳動する。1.8 kbと692 bpの2つのバンドが見えればOK。

RNA転写用テンプレートの調製 (RNaseの除去及び精製)

5 µLの10%SDSと2 µLのProteinase K (20 mg/mL) を加えて攪拌後、55°Cで30分間消化する (RNaseの残存活性を除去するのに必須)。RNAレベルに持ち込み、フェノール・クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿を行う。沈殿は10 µlのDWに溶解する (~500 ng/µL)。

in vitro RNA transcription

>Cas9 RNA (SP6 RNA polymeraseによる5' Cap付きRNAの転写)

mMessage mMachin SP6 kit中の試薬を使い、以下の反応液をPCR tube中に作る必要量によっては10 µL系か20 µL系かを選択する。

DW	2 µL	4 µL
2x NTP/ARCA	5 µL	10 µL
10x Reaction Buffer	1 µL	2 µL
pCS2+hSpCas9 (NotI digested)	1 µL	2 µL
Enzyme Mix	1 µL	2 µL
<hr/>		
Total	10 µL	20 µL

37°Cで3-4時間程反応させる (Thermal cyclerを使うと良い)。

>sgRNA (T7 RNA polymeraseによる転写)

AmpliScribe T7-flash Transcription Kit中の試薬を使い、PCR tube中に反応液を作る各試薬が少量なのでMaster mixを作ったほうが良い

	(1反応分)	(4反応分)
DW	2.15 µL	8.6 µL
10x Reaction Buffer	1 µL	4 µL
100mM ATP	0.9 µL	3.6 µL
100mM CTP	0.9 µL	3.6 µL
100mM GTP	0.9 µL	3.6 µL

100mM UTP	0.9 μ L	3.6 μ L
100mM DTT	1 μ L	4 μ L
RNase Inhibitor	0.25 μ L	1 μ L
T7 Enzyme Solution	1 μ L	4 μ L

→ 9 μ lずつ分注する

分注した各反応mixにtemplate DNAを1 μ lずつ加え、37°Cで3-4時間程反応させる (Thermal cycler)

RNAの精製

1. 転写反応液 (10 μ L) にBuffer RLT Plus 350 μ l を加え、Vortex でよく混合する。
2. 溶液全量をgDNA Eliminator spin columnに全量流し、遠心分離 (8,000 xg, 30 sec) で溶出する。
3. 溶出液に70% エタノール 350 μ l を加え、加えたチップを使ってそのままピペティングを行い溶液を緩やかに混合した後、溶液全量をRNeasy spin columnに流し入れる。
4. 遠心分離 (8,000 xg, 30 sec) を行い、溶出液を捨てる。
5. Buffer RW1 700 μ l を加え、遠心分離 (8,000 xg, 30 sec) を行った後、溶出液を捨てる。
6. Buffer RPE 500 μ l を加え、遠心分離 (10,000 xg, 30 sec) を行った後、溶出液を捨てる。この洗浄操作を2回繰り返す。
7. カラムを新しい collection tube に移し、遠心乾燥 (10,000 xg, 5 min) を行う。この時、Qiagen RNeasyのスピncラムは、フィルターの「ふち」に溶液が残りがやすいので、Buffer RPE の残存が無いよう、目視で確認する。
8. RNase-free water 30 μ Lを加え、1 分程静置した後、遠心 (10,000 xg, 2 min) によって溶出。

RNAの定量と保存

30 μ L前後のRNA溶液のうち、1-2 μ l は吸光度測定による RNA 濃度測定 (収量はばらつくが、概ね5-50 μ g程度である) に、2 μ l はアガロース電気泳動による産物の確認に回す (sgRNAは1%アガロース電気泳動では200 bp前後に、Cas9は3 kb前後に出ることが多い)。

残りは速やかにディープフリーザーに入れ、-80 °Cで保存。

Injection用溶液の調整

現在はCas9 RNAを100 ng/ μ l、sgRNAを25-50 ng/ μ lとなるように調整している。高効率に変異を導入できる上に、毒性や針の詰まりなどはないので、この濃度設定で妥当か。

4. [opt.] Preparation of RNase-free DNA vectors for co-injection with RNA

スピнкаラム精製で回収したplasmid DNAにはRNase活性が残存する場合がありますので、RNAと共導入を行なうためには以下の手法でmini prepを行うのが良い

準備するもの

Mini prep用buffer (Qiagen Plasmid Kitの組成を参考に自作)

- Buffer P1: 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA (冷蔵保存)
- Buffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS (室温保存, 冬はSDS析出注意)
- Buffer P3: 3M 酢酸カリウム [pH 5.5] (冷蔵保存)

TE+RNaseA: TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) にRNaseAを20 µg/mLになるように加える
10% SDS溶液

Proteinase K (20 mg/mL),

イソプロパノール (2-プロパノール)

70%エタノール

滅菌水 (分子生物学用, 出来ればRNase-freeに使っている専用のものが良い)

NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL, 740609) with Buffer NTB (740595)

作業手順

1. プラスグロウ 2 mL (+抗生物質) 中にコロニーをpickし、37°Cで一晩振盪培養する
2. 培養液全量を2mLチューブに移し、遠心 (12,000 rpm, 2 min) によって集菌し、上清を捨てる
3. 250 µLのP1を加え、Vortexまたは試験管立てを引っ掻くようにして菌を再懸濁させる
4. 250 µLのP2を加え、10回程転倒混和 (Vortex厳禁!) した後、室温で5分間放置する
5. 250 µLのP3及び30µLのクロロホルムを加え、10回程転倒混和 (Vortex厳禁!) する
6. 遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) し、上清を回収する
7. 再度クロロホルム 30 µLを加えた後、遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) し、上清を回収する
8. 750 µLのイソプロパノールを加え、Vortexで良く混合する
9. 遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) し、上清を捨てる
10. 70%エタノール 300 µLを加え、沈殿が浮くまで混和する
11. 遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) し、上清を捨てる
12. 軽くスピンドウンした後、ピペティングで可能な限り上清を除去し、70°Cのブロックインキュベーター上で残存エタノールが飛ぶまで乾燥 (5分くらい, 目視で確認すること, 乾かしすぎ厳禁)
13. 50 µLのTE+RNaseAを加え、37°Cに1時間程度放置 (5-10分程経過した時に一回混ぜる)
14. プラスミド溶液1 µLを使って制限酵素処理/電気泳動を行い、正しく入ったクローンを選ぶ
15. 14で選んだ溶液に2.5 µLの10%SDS及び1 µLのProteinase K (20 mg/mL)を加え、軽く混和した後、55°Cで30-60分間消化する
16. 250 µLのBuffer NTBを加え、よく混合した後、NucleoSpinカラムに通す
17. Buffer NT3による2回の洗浄、空遠心 (11,000 xg, 3 min) による乾燥後、30 µLの滅菌水で溶出する
18. 溶出液の濃度を吸光度計で決定し、ProK処理済みプラスミド溶液としてインジェクションに使用する