

AJACSオンライン8 「ウェブツールを使ってゲノム編集の標的サイトを検索する」

PDFの資料を参照されている方へ

講義資料はリンク先のウェブページを元にしています。ウェブページでは画像なども交えていますのでこちらを参考されながら受講いただくことをオススメいたします。

講義資料リンク：<https://github.com/KazukiNakamae/AJACS-training>

プラチナバイオ株式会社 兼 広島大学 ゲノム編集イノベーションセンター
中前和恭 nakamae@pt-bio.com 2021年8月19日（木） AJACSオンライン8

これは統合データベース講習会 AJACSオンライン8 「ウェブツールを使ってゲノム編集の標的サイトを検索する」 の講習資料です。

講習会全体のプログラムは[こちら](#)です。 © 2021 中前 和恭, CC-BY-4.0

自己紹介

- 中前 和恭
 - プラチナバイオ主任研究員 兼 広島大学ゲノム編集イノベーションセンター研究員
 - 研究分野：ヒト培養細胞を用いたゲノム編集実験・解析・インフォツールの開発
 - 開発ソフト
 - MMEJノックイン設計支援ソフトPITCh designer
 - [サイトリンク](#)
 - 変異プロファイリングツールMaChiAto
 - ゲノム編集専用データ基盤Genome Editing Cloud(プラチナバイオ・広島大学・凸版印刷による共同開発中)
 - [プレスリリース](#)
 - 講師歴
 - 第2・3・4・5回ゲノム編集講習会（日本ゲノム編集学会主催）
 - [日本ゲノム編集学会](#)
 - [researchmap](#)
 - [Twitter](#)

概要

本講習では、だれでも無償かつ自由に使うことができるウェブツールを活用して、適切なゲノム編集を行うための標的検索とその考え方について学びます。

また、さまざまな目的に特化した標的選定やゲノム編集後の解析に活用できるツールについてもできる限りご紹介します。

講習の流れ

今回の講習では、以下の内容について説明します。

- 1章. ゲノム編集を使ってノックアウトのための標的を設計する
 - CRISPR-Cas9を使ったノックアウト設計
 - CRISPRdirect
 - CRISPROR
 - CRISPR-Cas9を使ったノックアウト結果の予測
 - Microhomology-Predictor
 - InDelphi
- 2章. より応用的なゲノム編集のためのデータベース・ツールを知る
 - ゲノム編集のためのデータベース・ツール一覧
 - CRISPR-Cas9によるノックイン設計ツール：PITCh designer 2.0
 - TALENによるノックアウト設計ツール：TALEN Targeter
 - Base Editorによる塩基編集設計ツール：BE-Designer
 - Base Editorによる塩基編集予測ツール：BE-Hive
 - Prime Editorによる小規模編集設計ツール：PrimeDesign
 - Cas13によるRNA編集設計ツール：Cas13design
 - サンガーシーケンスデータを使った変異分析ツール：TIDE
 - アンプリコンシーケンシングデータを使った変異分析ツール：CRISPResso2
 - UCSC genome browserでのCas9標的の確認
 - ガイドRNA先行研究データベース：dbGuide
 - template-freeゲノム編集データベース：MHCut Browser
- 3章. ゲノム編集情報の安全な設計・解析・管理ツール

- GGGenome (+パッケージ版) によるオフターゲット検索
- ゲノム編集専用データ基盤Genome Editing Cloud
- 0章. 補遺
 - NCBIから遺伝子の配列情報を取得する
 - SnapGeneViewerで配列情報をわかりやすく表示する

講義に際して

- 今回はウェブツールを紹介しますが、同時にアクセスするとサイトにつながりにくくなる可能性があります。私自身はスムーズな進行のために資料のスクリーンショットを追っていく形式で説明していきます。受講者の方は説明を聴きながら実際に手を動かしてもらって大丈夫ですし、ただ聴いてもらうだけでも構いません。
 - 資料を見ながら自力で進められそうな方はどんどん先に進めていっても大丈夫です。
 - タイミングをずらして実行するうまくサイトに接続できる場合があります。

受講前アンケートにご協力いただき、ありがとうございます (回答数 184名)(8/3時点)

受講申込者の専門分野	人数
生物科学	60 名
基礎医学	41 名
バイオインフォマティクス	33 名
基礎生物学	32 名
農学	32 名
臨床医学	30 名
ゲノム科学	29 名
情報学	12 名
基礎化学	5 名
複合化学	3 名

多種多様な分野の方にご参加いただきありがとうございます。ゲノム編集は上に挙がった分野の全てで関わりがある分野なので皆様の役に立つ講義になれば幸いです。

ゲノム編集の原理の説明を聞いたことがありますか？	人数	割合
ある	153 名	87.9 %
ない	21 名	12.1 %

本講義ではウェブツールを使った実際的な標的検索について説明するので、基本原理は事前に知っているほうが望ましいです。

講義内でもできる限り原理がわかるように説明しますが、心配な方は以下の動画等で事前学習されるとよいかもしれません。

ゲノム編集とは|イントロダクション (2分)

ゲノム編集とは|タンパク質ツールによるDNA切断 (2分)

ゲノム編集とは|複合型ツールによるDNA切断 (2分)

ゲノム編集とは|非相同末端結合 (NHE-J)によるDNA修復 (2分)

ゲノム編集とは|相同配列依存的修復 (HDR) によるDNA修復 (2分)

ゲノム編集のウェット実験を行ったことはありますか？	人数	割合
ある	62 名	35.6 %
ない	112 名	64.4 %

本講義は原理は知っているものの今までゲノム編集実験をしたことがない方をメインに据えているのでご参考になるかもしれません。

行ったことがある方にとってはご自身の方法と比較してみて疑問に感じる部分もあるかもしれません。その際にはご質問いただければ幸いです。

アンブリコンシーケンスでゲノム編集サンプルの分析を行ったことがありますか？	人数	割合
ある	15 名	8.8 %
ない	156 名	91.2 %

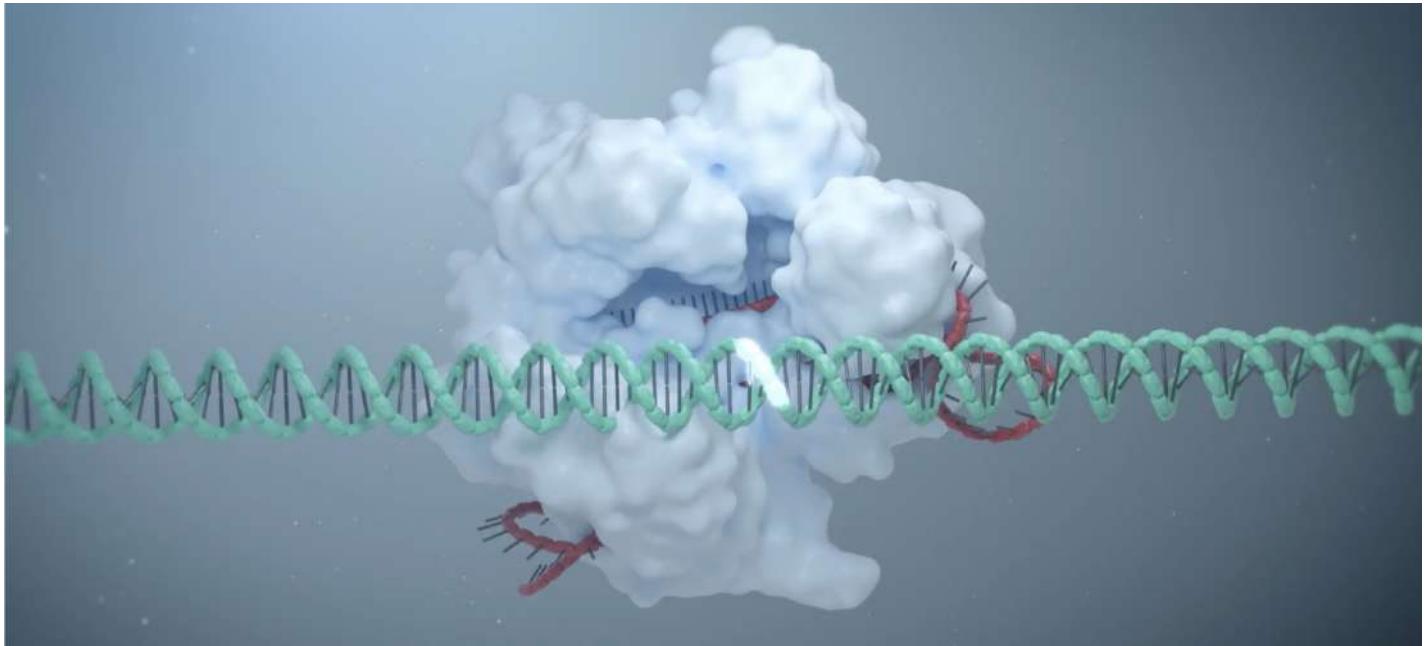
ゲノム編集実験では設計した後に変異検出も行う必要がありますのでアンブリコンシーケンスは知っていても損はないかと思います。

本講義ではメインである1章では取り扱わない内容ですが、2章以降でこの辺りについて少し触れたいと思います。後の質疑応答で詳しくお尋ねいただいても大丈夫です。

ゲノム編集とは？

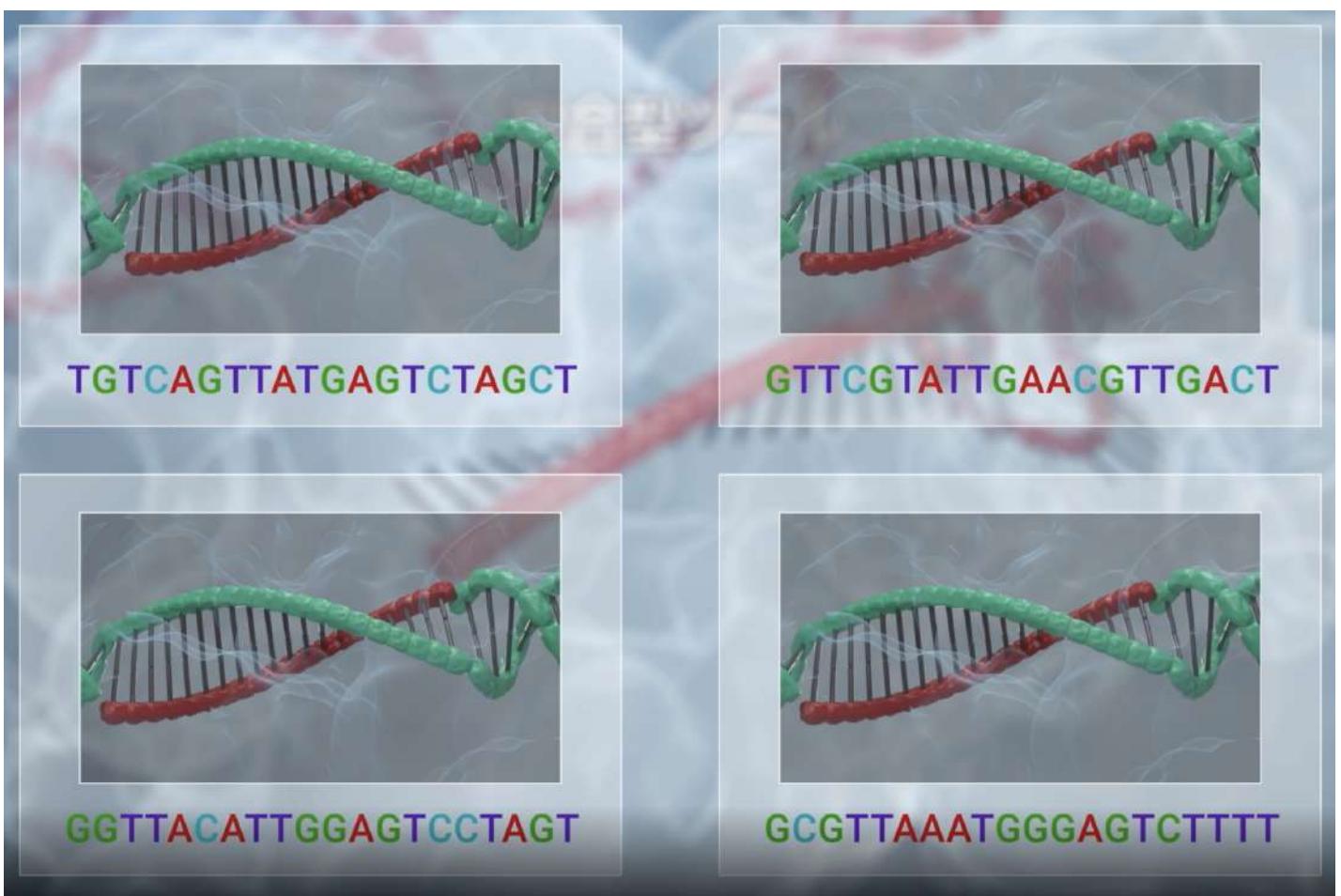
ゲノム編集は、人工的な生体分子を使って配列特異的にゲノム配列を変更する技術を指します。

最も基本的なものは、TALENやCRISPR-Cas9などのゲノム編集ツールを使ってDNAに二本鎖切断を導入し、その際に発生するDNA修復経路を介して変異導入します。



ゲノム編集産業化ネットワークより引用

特に、Cas9ヌクレアーゼとガイドRNAの複合体で編集するCRISPR-Cas9では、ガイドRNAのなかにあるわずか20塩基程度のプロトスペーサ配列を置換するだけで様々なゲノム配列を狙うことができます。



ゲノム編集産業化ネットワークより引用

こうした変異導入によって遺伝子を破壊するノックアウト、あるいは任意の配列を好きな領域へ挿入するノックインなどが行えます。

ゲノム編集によるノックアウトでは、コード領域を標的にして、コドンの読み枠をずらすようなフレームシフト変異をゲノム編集ツールで誘導して実現するのが基本です。

しかしゲノム内の様々な標的を狙うことができるゲノム編集ツールですが、必ずしも完全ではなく、実験者が意図していない標的配列を切断するケースもあります。これをオフターゲットと呼んでいて、ゲノム編集の設計において最も懸念すべき要素の一つです。

本講義ではそういったオフターゲット等についても具体的な判断を述べながら説明ていきたいと思います。

重要用語とその説明をここにメモしておきましょう。

- ・ゲノム編集：人工的な生体分子を使って配列特異的にゲノム配列を変更する技術
- ・ゲノム編集ツール：ゲノム編集を行うために使われる生体分子（タンパク質・核酸分子）

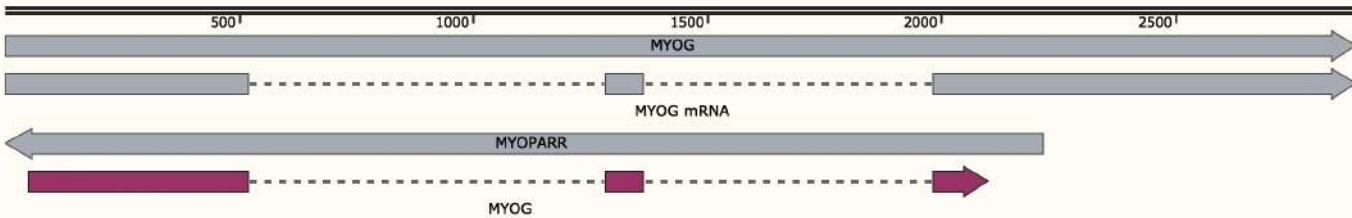
- CRISPR-Cas9：ゲノム編集ツールの一つ。DNAを切断する"Cas9ヌクレアーゼ"と任意のゲノム配列を認識する"ガイドRNA"の複合体を使って生体内のゲノムDNAを配列特異的に切断することができる。
 - プロトスペーサー：ガイドRNAの一部分。この部分を標的したいゲノムに対して相補的に結合するように設計することで、CRISPR-Cas9は任意のゲノム配列を認識することができる。
 - PAM配列：Cas9ヌクレアーゼがもつDNA結合モチーフ。特定の配列モチーフがないとCas9ヌクレアーゼはDNA切断活性を発揮しない。ガイドRNAは自由に設計できるが、このPAM配列は変えることができないので、これがCRISPR-Cas9システムにおける制約となっている。
- TALEN：ゲノム編集ツールの一つ。DNAを切断する"FokIヌクレアーゼ"と任意のゲノム配列を認識する"TALEタンパク"との融合タンパクとなっている。
- ノックアウト：特定の遺伝子の機能を不活性化させるためのゲノム操作を指す。様々な実現方法があるが、ゲノム編集ではタンパクコード領域にフレームシフト変異を誘導してアミノ酸配列情報を破壊する方法が一般的。
- ノックイン：特定の配列を特定のゲノム領域に挿入するゲノム操作を指す。
- オンターゲット：実験者が意図している標的配列、またはそれに対する切断を指す。
- オフターゲット：実験者が意図していない標的配列、またはそれに対する切断を指す。これによってランダムな表現型が導かれて正しくない考察に繋がってしまう可能性がある。あるいは治療や品種改良のうえではリスクとなり得るのでなるべく避けるように設計することが重要。

1章. ゲノム編集を使ってノックアウトのための標的を設計する

CRISPR-Cas9を使ったノックアウト設計

ノックアウトについて

- 遺伝子の機能を消失させるノックアウト法にはさまざまな方法が知られています。一種類のCRISPR-Cas9を使ったランダム変異導入や複数のCRISPR-Cas9を使ったラージデリーション導入、TALENによる変異導入、そして古典的なノックインによるノックアウトなどが知られています。今回の標的選択では現在最もシンプルな方法として知られている一種類のCRISPR-Cas9を使ったランダム変異導入を考えてみます。
- ノックアウトを行う位置に関してですが、単純に遺伝子を破壊したいという場合であれば開始コドンの直下のExon領域をターゲットにして、ゲノム編集でフレームシフトを発生させる方法が一般的です。これによって中途半端な翻訳産物を生み出すことなく、多くの場合において遺伝子の発現を完全に抑えることが可能です。
- 標的を選ぶ際にはできる限りしっかりとアノテーションがついた情報を参照するようにしましょう。本資料末尾にある0章ではNCBIから遺伝子情報をダウンロードしていますが、こうしたものでは一つの遺伝子に対して複数種のアイソフォームが割り当てられているものがあります。完全にノックアウトを行いたい場合はなるべく全てのアイソフォームに重複するExon領域でゲノム編集のターゲットを選択するようにしてください。
- MYOG遺伝子座 (myogeninをコード) の場合

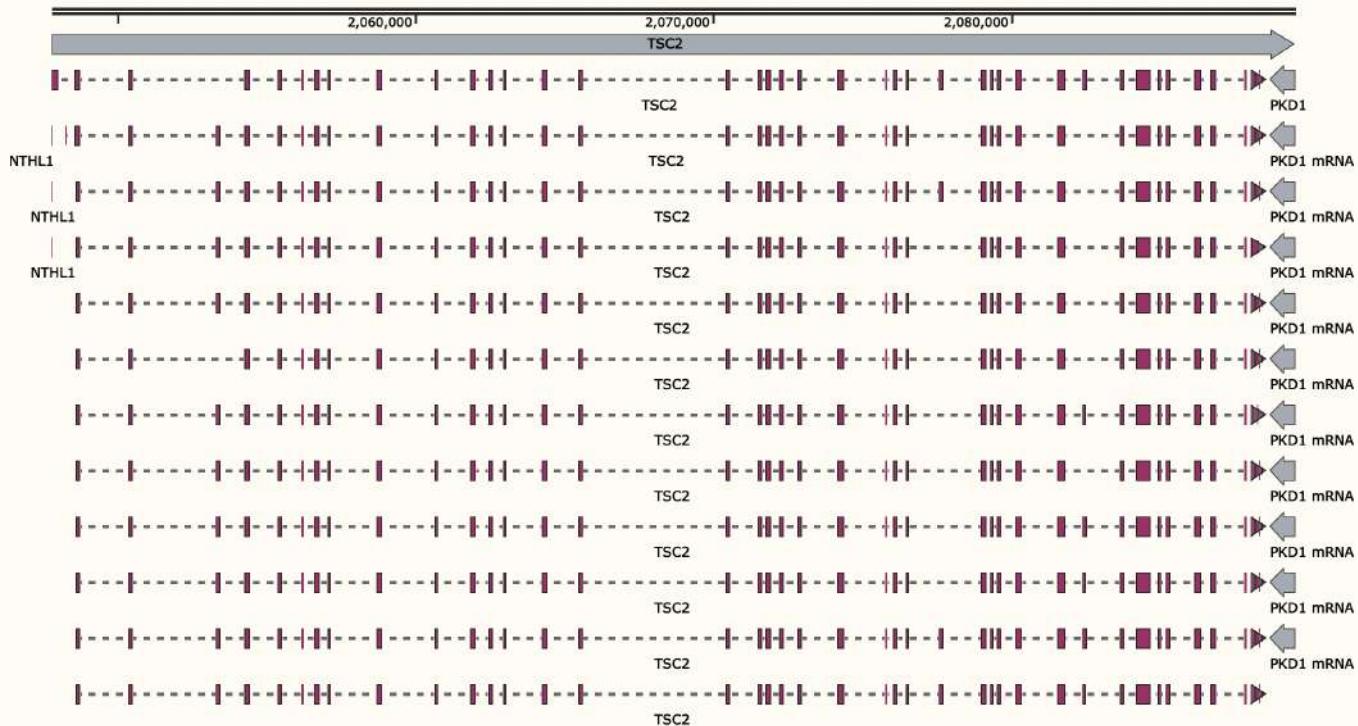


* MYOPARRはMYOGのプロモータに関わるnon-coding RNA

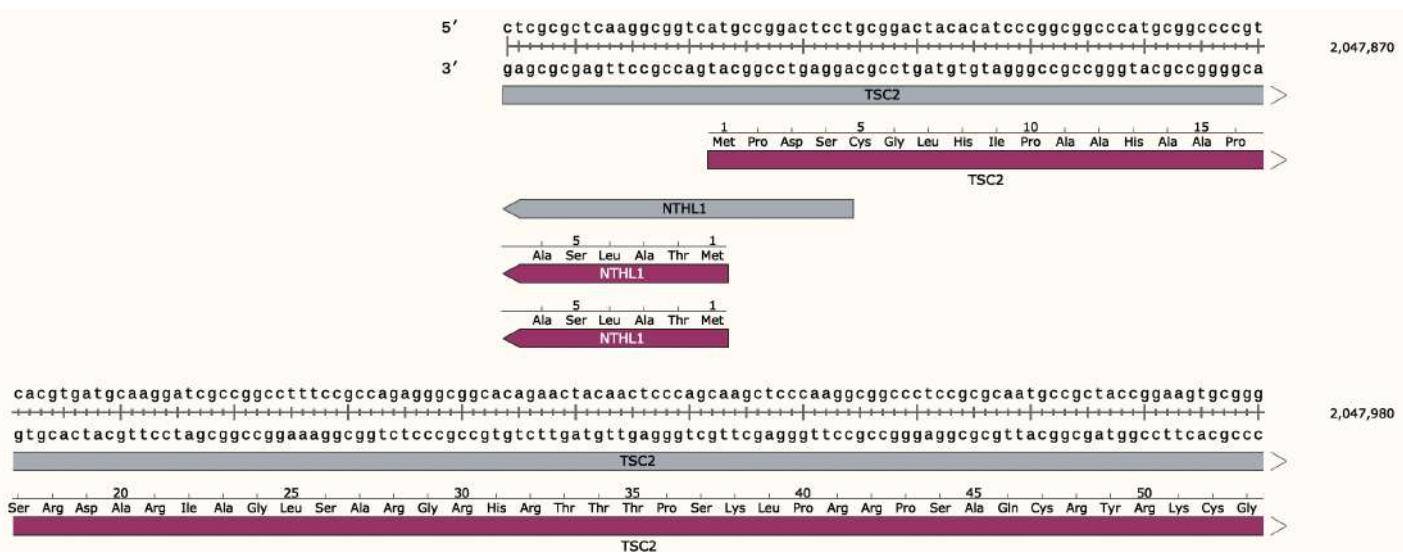
The screenshot shows the SnapGene Viewer software interface. The main window displays the MYOG gene sequence with the 5' and 3' ends. The sequence is annotated with exons and introns. The MYOG gene is shown above the MYOPARR non-coding RNA. The sequence is translated into amino acids (Met, Glu, Leu, Tyr, Glu, Thr) for both MYOG and MYOPARR. The software interface includes various tools like Enzymes, Features, Primers, and Tools. On the right, there is a detailed panel for the sequence, including Source (Homo sapiens), Sequence Class (UNA - unannotated), Description (Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly), and Comments (REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2). The comments also mention that the sequence was replaced on Feb 3, 2014, and provides information about the Human Genome Project and PCR products.

- 場合によっては転写産物にバリエントが存在しているケースがあります。こういった場合は全てのバリエントで重複しているコード領域を見つけてノックアウトを設計するほうがいいでしょう。

- TSC2遺伝子座 (tuberinをコード) の場合



- またコード領域が他の遺伝子と被っていたりするケースがあります。特定の遺伝子のノックアウトの表現型をとりたい場合は、なるべく他の遺伝子のコード領域を破壊しないように設計場所を選ぶほうが無難です。あるいは他の遺伝子ではサイレント変異となるような改変の導入を検討してもいいかもしれません。



- ノックアウトの結果、事前情報からでは想定できなかった転写・翻訳産物が出現するケースもあります。また設計上仕方なく損傷を与えてしまった遺伝子についても発現が変わってしまっている恐れがあります。実験後はゲノム配列の確認とともに、周辺遺伝子のqPCR、ddPCR、ウェスタンプロット等で発現レベルを確認することも必要に応じて検討してみてください。

CRISPRdirect

- CRISPR-Cas9標的の検索できるウェブツール。特にオフターゲット作用を考慮した検索が可能。
 - <https://crispr.dbcls.jp>
 - 論文リンク

◦ 紹介動画 - 統合TV トップページ

The screenshot shows the CRISPRdirect website interface. At the top, there's a navigation bar with links like Chrome, File, Edit, View, History, Bookmarks, Profiles, Tab, Window, Help, and a Remaji icon. The main header says "CRISPRdirect - Rational design of CRISPR/Cas target." Below the header is a search bar with placeholder text "Enter an accession number (e.g. NM_006299) or genome location (e.g. hg19:chr7:900000-901000):" and a "retrieve sequence" button. There's also a text area for pasting a nucleotide sequence, a file upload field for uploading a sequence file, and a PAM sequence requirement dropdown set to "NGG". A specificity check dropdown is set to "Human (Homo sapiens) genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)". A "design" button is visible.

What's new:

- 2020-11-07 Added mouse genome GRCm39/mm39.
- 2020-09-11 Longer/shorter PAM supported. (e.g. NNNRRT, NG)
- 2018-05-07 Added 12 genomes - List
- 2017-12-11 Added carrot genome v2.0 from Phytozome.
- 2017-11-30 Added 376 genomes from Cyanobase - List
- 2017-11-08 Added 5 species - List
- 2017-06-19 Added 8 species - List
- 2017-06-09 Added Human Japanese Reference Genome JRGv2.
- 2017-02-17 *Brassica rapa* genome v1.5 is available.
- 2017-01-23 Added 8 species - List
- 2016-12-14 CRISPRdirect shows restriction enzyme cutting sites - Sample

検索にヒットした標的候補一覧表

show highly specific target only

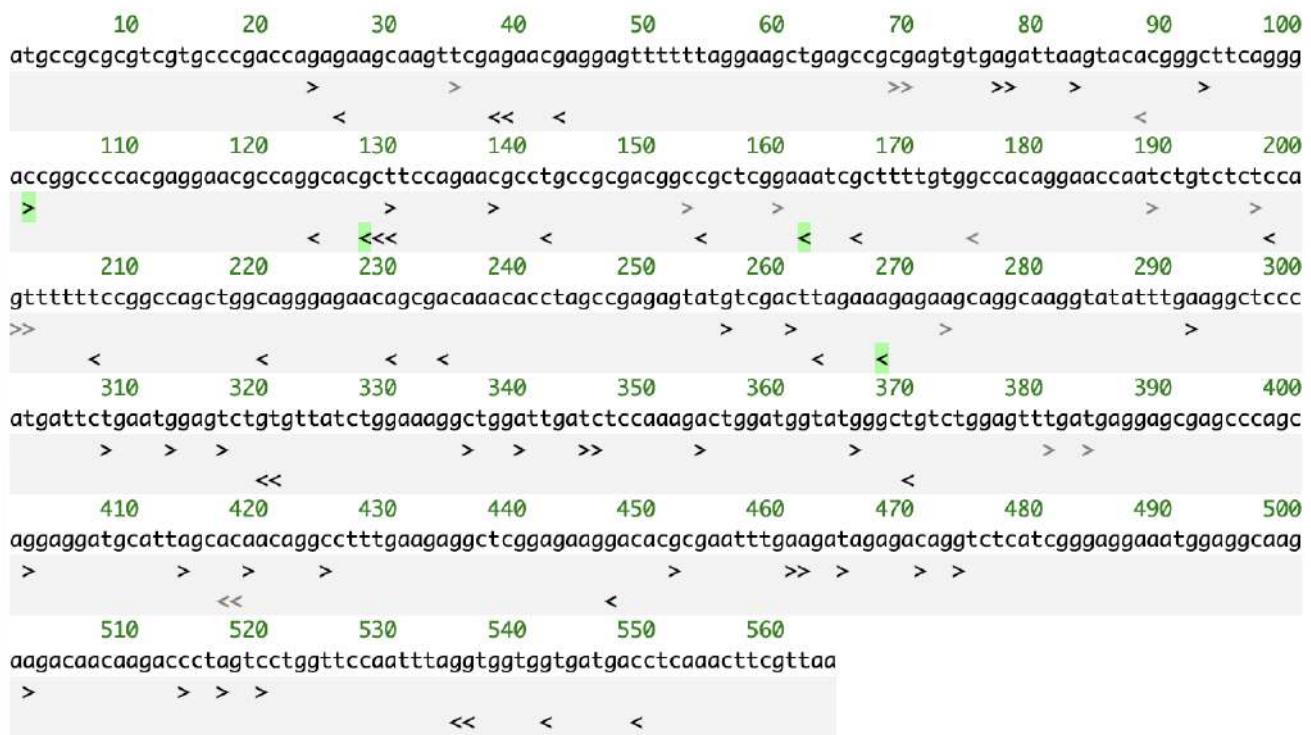
Show 20 entries		Search: []								
position		target sequence		sequence information			number of target sites			
start - end	+ -	20mer+PAM (total 23mer)		GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
4 - 26	-	ccgcgtcggtccccgaccagag [gRNA]		75.00 %	82.34 °C	-	Bme1580I	1 [detail]	3 [detail]	103 [detail]
16 - 38	-	cccgaccagagaaggcaagttcga [gRNA]		50.00 %	71.17 °C	-		1 [detail]	26 [detail]	4354 [detail]
17 - 39	-	ccgcaccagagaaggcaagttcga [gRNA]		50.00 %	71.53 °C	-		1 [detail]	32 [detail]	5910 [detail]
21 - 43	-	ccaaagaaggcaagttcgagaacg [gRNA]		50.00 %	69.25 °C	-		1 [detail]	24 [detail]	8744 [detail]
24 - 46	+	gagaaggcaagttcgaagacgg [gRNA]		50.00 %	69.25 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	306 [detail]
35 - 57	+	tcgagaaacggaggattttttgg [gRNA]		40.00 %	66.49 °C	+		1 [detail]	25 [detail]	9901 [detail]
66 - 88	-	ccgcgagtgtagattaagtaca [gRNA]		40.00 %	65.70 °C	-		0 [detail]	3 [detail]	1097 [detail]
69 - 91	+	cgagtgttagattaagtacaagg [gRNA]		40.00 %	65.70 °C	-		0 [detail]	26 [detail]	3790 [detail]
70 - 92	+	gagtgttagattaagtacacggg [gRNA]		40.00 %	65.27 °C	-		0 [detail]	3 [detail]	3604 [detail]
77 - 99	+	agattaagtacacgggcttcagg [gRNA]		45.00 %	70.40 °C	-		1 [detail]	6 [detail]	1306 [detail]
78 - 100	+	gattaaagtacacgggcttcagg [gRNA]		45.00 %	70.01 °C	-		1 [detail]	9 [detail]	6616 [detail]
83 - 105	+	agtacacgggcttcaggacgg [gRNA]		60.00 %	78.32 °C	-		1 [detail]	63 [detail]	6397 [detail]
93 - 115	+	cttcaggggaccggccccacgg [gRNA]		75.00 %	84.21 °C	-		1 [detail]	7 [detail]	2568 [detail]
102 - 124	+	ccggccccacggggacggccagg [gRNA]		80.00 %	86.67 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	1244 [detail]
102 - 124	-	ccgcggccacggggacggccagg [gRNA]		75.00 %	84.31 °C	-		1 [detail]	19 [detail]	3777 [detail]
106 - 128	-	cccacggggacggccaggacgg [gRNA]		70.00 %	80.55 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	1098 [detail]
107 - 129	-	cccaacggggacggccaggacgg [gRNA]		70.00 %	82.51 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	1116 [detail]
108 - 130	-	ccacggggacggccaggacggct [gRNA]		70.00 %	82.52 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	1011 [detail]
120 - 142	-	ccaggcggccaggacggccct [gRNA]		65.00 %	80.61 °C	-		1 [detail]	6 [detail]	1510 [detail]
130 - 152	+	ttccaggaaacgcctggccgca [gRNA]		65.00 %	80.58 °C	-		1 [detail]	4 [detail]	289 [detail]

Showing 1 to 20 of 77 entries

First Previous 1 2 3 4 Next Last

標的候補の位置関係

Graphical View:



データ出力も可能です。

Data Export:

- Tab-delimited text: [Open in new window](#) | [Download](#)

CRISPRdirect (1)																					
A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V
1	# [CRISPRdirect 2021-08-02 00:56:10]																				
2	# sequence_ sample sequence																				
3	# pam_sequ NGG																				
4	# specificity Human (Homo sapiens) genome, GRCh37/hg19 [Feb, 2009]																				
5	# start	end	strand	sequence	GC	Tm	TTTT	RE_sites	hit_20mer	hit_12mer	hit_8mer										
6	#																				
7	4	26 -	cgcggcgatgt	75	82.34	0 Bpu1580I	1	3	103												
8	16	38 -	ccggacccag	50	71.17	0	1	26	4354												
9	17	39 -	cggactagaga	50	71.53	0	1	32	5910												
10	21	43 -	ccggaggaaat	50	69.25	0	1	24	8744												
11	24	46 +	gagaaatcgat	50	69.25	0	1	2	306												
12	35	57 +	tggaaaatgg	40	66.49	1	1	25	9901												
13	66	88 -	cgcggatgtg	40	65.7	0	0	3	1097												
14	69	91 +	cggatgttgg	40	65.7	0	0	26	3790												
15	70	92 +	gtttgtggat	40	65.27	0	0	3	3604												
16	77	99 +	aggataatgtt	45	70.4	0	1	6	1306												
17	78	100 +	gttttttttttt	45	70.01	0	1	9	6616												
18	83	105 +	agtacatcggtt	60	78.32	0	1	63	6397												
19	93	115 +	cttcggggccgg	75	84.21	0	1	7	2568												
20	102	124 +	cggccccccggc	80	86.67	0	1	1	1244												
21	102	124 -	cggccccccggc	75	84.31	0	1	19	3777												
22	106	128 -	ccccacgggg	70	80.55	0	1	1	1088												
23	107	129 -	ccccacgggg	70	82.51	0	1	2	1116												
24	108	130 -	ccgggggggg	70	82.52	0	1	2	1011												
25	120	142 -	ccgggggggg	65	80.61	0	1	6	1510												
26	130	152 +	tttttttttttt	65	80.58	0	1	4	289												
27	132	154 -	ccgggggggg	80	86.25	0	1	2	937												
28	138	160 +	cgccgtcgccg	85	90.21	0 BpuE,I,Eae,I,Ea	1	5	815												
29	140	162 -	cgccgtcgccg	80	86.71	0 BpuE,I,Eae,I,Ea	1	1	1044												
30	144	166 -	cgccgtcgccg	70	79.76	0 BpuE,I,Eae,I,Ea	1	16	628												
31	153	175 +	cggccggaaat	55	72.84	1	0	7	801												
32	153	175 -	cggccggaaat	50	70.06	0	0	1	805												
33	160	182 +	gaatgtttttt	50	71.37	1 Eae,I,MspI	0	37	7499												
34	176	198 -	ccgggggggg	50	70.22	0	1	26	6244												
35	185	207 -	ccaaatgttttt	35	64.99	0	2	70	6556												
36	189	211 +	tgttgttttttt	40	65.97	1	1	36	4988												
37	197	219 +	tccatgtttttt	55	75.79	1 Eae,I,MspAI	1	6	2206												
38	198	220 -	ccatgtttttt	60	77.94	0 Eae,I,MspAI	1	3	8494												

- 標的候補一覧表の見方

position	target sequence	sequence information	number of target sites					
start - end	strand	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM

- "position"

- "start - end"はターゲットの位置になります。
- "+"はゲノムリファレンス上でどちらのstrand属するかを指します。

- "target sequence"
 - "target sequence"が標的とする配列です。四角で囲まれているのがPAM結合サイトであり、それ以外の部分はガイドRNAがもつprotospacer配列を指します。
- "sequence information"
 - "GC% of 20mer"や"Tm of 20mer"はprotospacer配列のGC%・Tm値を指します。
 - "TTTT in 20mer"はprotospacer配列に4連続するTがあるかどうかを指します。こうした配列はプロモータによっては転写終結シグナルとなるため使用を避けた方がよいです。
 - "restriction sites"はそこに制限酵素サイトがあるかどうかを示します。ゲノム編集の解析をする場合には編集した箇所で作用する制限酵素を使って変異導入の有無を電気泳動で確認する方法があります（RFLP法）。ここで示されている制限酵素はそういった検証に利用可能です。
- "number of target sites"
 - "20mer+PAM"はPAM結合サイトとプロトスペーサー配列のゲノム上での特異性を指します。
 - 1の場合はゲノム上に1つしかないということを表します。
 - それ以上の場合は、目的でない結合箇所（オフターゲットサイト）がゲノム上に数ヶ所あるということになります。
 - 0の場合はゲノム上に存在しないことを表します。成熟mRNA配列などから配列を取得した場合ではExonのつなぎ目領域でこのような結果になることがあります。こうしたものは基本的にターゲティングできません。
 - "12mer+PAM"や"8mer+PAM"はPAM結合サイトとプロトスペーサー配列の3'末端から12bp, 8bpのゲノム上での特異性を指します。SpCas9の特異性は位置依存的であることが知られており、3'側に位置するほど特異性が高くなる傾向があります。3'末端から12bp, 8bpの領域で一致するオフターゲットサイトが大量にある場合はゲノムに対して意図しない変異導入を大量に起こしてしまう可能性が高く、ゲノム編集の標的として適切とはいえないません。
 - "detail"をクリックすると、検索にヒットした標的配列あるいはオフターゲットサイトがゲノム上のどのあたりに存在するか参照することができます。
 - " ≤ 1 mismatch/gap"または" ≤ 2 mismatch/gap"をクリックすることで、ミスマッチ・ギャップを含むオフターゲットサイトも表示することができます。

Summary:

- CCNcgctat (7732)
- acgacacnug (7720)
- **TOTAL (15452)**

Results:

Matches are highlighted with blue background. **Mismatches** and **indels** are marked in red.

Chromosome	Position	Sequence
chr1:443235-443244	▼443235	TCGGGGTTCACGCCATTCTCCCTCAGCGCTCGCG-CGTAGCTGGACTACAGGGCCTGCCACCATGC
chr1:456729-456738	▼456729	CTCCCCGCTACATTCCCCACCTCTGGTAACCAAGCGTC-TACCCCTCTCTTACGAGAGCTACTTTTT
chr1:733708-733717	▼733708	GTTGCTCAAATGCCCTGACACCATATCAC-CGTCGTCAGCAATCTATGTTCAATGTTCTTAAAAA
chr1:852319-852328	▼852319	GAAGTCGGGGCTGCCCTAACGCTAGCAAGCCA-CGTCGTCGCTGGCTGGCCGCCAGGGCCCCACCCAGA
chr1:869028-869038	▼869028	ATGCTGAGGCCAGAGTCCTCTCTGACACCCCCGGCTCGATTAGGATCATGGAAGGGATGAGTCGCTG
chr1:877764-877774	▼877764	GGCCGGCTGGACGCCCTCGGACCCCCCGACCCCGGTTGTCCCCCTCCCCACCAAGGCTACGGCTTCTGC
chr1:882001-882011	▼882001	GTGCAAGCTGGCCCAAGGCTCTGTGCAAAACCAAGCGTGTGGCACGGGATAACCCAGGGGGACATG
chr1:902231-902240	▼902231	GGTGGCTGTGGCTGGAGCGTGGCTCTGCCGCCCGT-GTGTGCGCTGTGCGTGCAGCTCAGGGCTT

<https://crispr.dbcis.jp/detail/en/hg19/1/CCNcgctat>

【使用例】CRISPRdirectを使って、ノックアウトのための標的を設計する

1. 検索配列を入力します。

or Paste a nucleotide sequence: 



2. 配列はSnapGene Viewerからドラッグ>コピーで取得します。今回は開始コドンから159bpを取得します。

入力配列 :

>MYOG
atggagctgtatgagacatccccctacttaccaggAACCCGCTCTATGATGGGAAAACCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAGCGGACGGAGCTACCCCTGAGCCCCGAGGCCCTGAGGACAAG

The screenshot shows the MYOG gene sequence in SnapGene Viewer. The sequence is 2884 bp long. It includes the MYOG gene itself and its mRNA variants (MYOG mRNA and MYOPARR). A specific region from position 52 to 210 is highlighted, showing the nucleotide sequence:
 5' gggctgctggagcttggggctggcggcggaaacaacgccttcgacccatggagctgtatgagacat
 3' cccgacgacccctcgaaacccccggaccaccgtccttgtcggaaaaggctggggtaacctcgacatactctgt
 MYOG
 MYOG mRNA
 MYOPARR
 MYOG
 1 Met Glu Leu Tyr Glu Thr
 140
 cccccctacttctaccaggaaccccgcttctatgtatggggaaaactacactgcctgtccacccctccaggggctt
 gggggatgaagatggtcctggggcaagatactaccctttgtatggacggacaggtagggagggtcccgaa
 MYOG
 MYOG mRNA
 MYOPARR
 MYOG
 210
 cgaaccaccaggctacgagcggacggagctcacccctgagccccgaggccccagggcccttgaggacaag
 ctgggtggccatgctcgccgtcggactcggtccgggtccggaaactccgttc
 MYOG
 MYOG mRNA
 MYOPARR

or Paste a nucleotide sequence: [?](#)

>MYOG

atggagctgtatgagacatccccctacttctaccaggaaccccgcttctatgtatggggaaaactacactgcctgtccacccctccagggg
 ctccgaaccaccaggctacgagcggacggagctcacccctgagccccgaggccccagggcccttgaggacaad

3. Cas9のPAM配列を入力します。今回は最も一般的なSpCas9の"NGG"とします。

PAM配列 : NGG

PAM sequence requirement: (e.g. NGG, NRG, NNRRRT, NG) [?](#)

4. 特異性を確認するゲノムを指定します。今回は最新のヒトゲノムリファレンスである"Human (Homo sapiens) genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013)"とします。ゲノム : Human (Homo sapiens) genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013)

Specificity check: [?](#)

5. "design"をクリックします。

or Paste a nucleotide sequence: [?](#)

```
>MYOG
atggagctgtatgagacatccccctacttctaccaggaaacccgcttcatgtatggggaaaactac
tgcctgtccacctccagg
cttcgaaccaccaggctacgagcggagctaccctgagccccgaggccccttggggacaag
```



or upload sequence file: [?](#) No file chosen

PAM sequence requirement: **NGG** (e.g. NGG, NRG, NNGRRT, NG) [?](#)

Specificity check: Human (Homo sapiens) genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013) [?](#)

6. Resultsの表示を確認します。

Chrome File Edit View History Bookmarks Profiles Tab Window Help  A Romaji ⚡ Mon Aug 2 1:47

Results: [?](#)

Sequence name: MYOG
PAM sequence: NGG
Specificity check: Human (Homo sapiens) genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013)
Time: 2021-08-02 01:46:55

- Highlighted target positions (e.g., **45 - 67**) indicate sequences that are highly specific and have fewer off-target hits.
- Target sequences with '0' in '20mer+PAM' (in number of target sites column) are shown in gray.
- Such sequences may possibly span over exon-exon junctions, so avoid using these.
- Target sequences with TTTTs are also shown in gray. Avoid TTTTs in gRNA vectors with pol III promoter.

show **highly specific** target only

Show 20 entries Search:

position	target sequence	sequence information				number of target sites ?		
start - end	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
15 - 37	+ gacatccccatcttacccgg [gRNA]	55.00 %	75.00 °C	-		1 [detail]	19 [detail]	4667 [detail]
20 - 42	- ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	55.00 %	75.17 °C	-		1 [detail]	24 [detail]	6691 [detail]
21 - 43	- ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	55.00 %	75.17 °C	-		1 [detail]	32 [detail]	6451 [detail]
22 - 44	- ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	55.00 %	75.80 °C	-		1 [detail]	28 [detail]	4433 [detail]
23 - 45	+ ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	60.00 %	78.83 °C	-		1 [detail]	21 [detail]	4635 [detail]
33 - 55	- ccggggaaaaaccggccctttatgtg [gRNA]	55.00 %	74.20 °C	-		1 [detail]	8 [detail]	5962 [detail]
34 - 56	+ ccggggaaaaaccggccctttatgtg [gRNA]	55.00 %	75.25 °C	-		1 [detail]	2 [detail]	6121 [detail]
35 - 57	+ ggaaaccggccctttatgtg [gRNA]	50.00 %	74.64 °C	-		1 [detail]	4 [detail]	7698 [detail]
36 - 58	+ ggaaaccggccctttatgtg [gRNA]	55.00 %	74.20 °C	-		1 [detail]	15 [detail]	3402 [detail]
40 - 62	- ccccttacttttccatccggggaaaa [gRNA]	45.00 %	69.73 °C	+		1 [detail]	3 [detail]	929 [detail]
41 - 63	- ccccttacttttccatccggggaaaa [gRNA]	45.00 %	69.25 °C	+		1 [detail]	19 [detail]	4599 [detail]
42 - 64	- ccggggaaaaaccggccctttatgtg [gRNA]	40.00 %	67.29 °C	+		1 [detail]	24 [detail]	5276 [detail]
63 - 85	+ ctacccgtcgatccatccgg [gRNA]	65.00 %	79.83 °C	-		1 [detail]	52 [detail]	96764 [detail]
64 - 86	+ tcccgccgtgtccatccgg [gRNA]	60.00 %	79.32 °C	-		1 [detail]	53 [detail]	10942 [detail]
66 - 88	- ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	70.00 %	83.84 °C	-		1 [detail]	65 [detail]	11824 [detail]
70 - 92	- ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	65.00 %	79.82 °C	-		1 [detail]	40 [detail]	4902 [detail]
75 - 97	- ccggggccgggtttccatccgg [gRNA]	65.00 %	79.12 °C	-	BstBI	1 [detail]	92 [detail]	23907 [detail]
78 - 100	- ccccttacttttccatccggggcccc [gRNA]	65.00 %	79.19 °C	-	BstBI	1 [detail]	8 [detail]	12959 [detail]
79 - 101	+ ctccagggtttccatccggggcccc [gRNA]	65.00 %	79.12 °C	-	BstBI	1 [detail]	1 [detail]	4098 [detail]
81 - 103	- ccggggccgggtttccatccgg [gRNA]	65.00 %	81.18 °C	-	BstBI	1 [detail]	9 [detail]	1620 [detail]

Showing 1 to 20 of 34 entries

Graphical View:



7. ゲノムに対して特異的なターゲットを表示するために、"show highly specific target only"にチェックをいれて更新します（更新は自動で行われます）。

show **highly specific** target only

Show 20 entries Search:

position	target sequence	sequence information				number of target sites ?		
start - end	20mer+PAM (total 23mer)	GC% of 20mer	Tm of 20mer	TTTT in 20mer	restriction sites	20mer +PAM	12mer +PAM	8mer +PAM
79 - 101	+ ctccagggtttccatccggggcccc [gRNA]	65.00 %	79.12 °C	-	BstBI	1 [detail]	1 [detail]	4098 [detail]
93 - 115	+ accaccaggctacgagcggacgg [gRNA]	65.00 %	81.68 °C	-		1 [detail]	1 [detail]	394 [detail]

Showing 1 to 2 of 2 entries (filtered from 34 total entries)

8. "20mer+PAM"が1で、なおかつ"12mer+PAM"と"8mer+PAM"の数がなるべく少ない標的を選択し、配列をコピーします。

93 - 115	+ accaccaggctacgagcggacgg [gRNA]	65.00 %	81.68 °C	-	1 [detail]	1 [detail]	394 [detail]
-----------------	----------------------------------	---------	----------	---	------------	------------	--------------

Showing 1 to 2 of 2 entries (filtered from 34 total entries)

9. SnapGene Viewerを開き、Edit -> Find -> Find DNA sequenceで配列検索スペースを開き、選択したプロトスペーサ配列"accaccaggctacgagcgg"を検索する

The screenshot shows the SnapGene Viewer interface with the following details:

- File Menu:** New, Open, Save, Print, Undo, Redo.
- Edit Menu:** Cut, Copy, Paste, Copy Bottom Strand Bases, Copy Amino Acids, Copy Map, Paste Reverse Complement, Delete, Select All, Select Range..., Invert Selection, Make Uppercase, Make Lowercase, Set DNA Color..., Insert, Edit DNA Ends..., Change Methylation..., Find, Go To..., MYOG, MYOG mRNA, MYOPARR, Search Tips.
- Sequence View:** Shows the MYOG gene sequence (Linear / 2884 bp) with strands 5' and 3'. The protospacer sequence "accaccaggctacgagcgg" is highlighted in green at position 144-163. The PAM site "cg" is also highlighted in green at position 163-164. The sequence is annotated with exons MYOG, MYOG mRNA, and MYOPARR.
- Search Panel:** Shows the search term "accaccaggctacgagcgg" and 1 match found.
- Description Panel:** Provides detailed information about the sequence, including Source (Homo sapiens (human)), Sequence Class (UNA - unannotated), Description (Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly), and Comments (REFSPEC INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly). It also includes fields for Created (Today), Last Modified (Today), Accession Number (NC_000001), Code Number, Sequence Author, and a checkbox for Description Panel.

The screenshot shows the SnapGene Viewer interface with the following details:

- File Menu:** New, Open, Save, Print, Undo, Redo.
- Edit Menu:** Cut, Copy, Paste.
- Sequence View:** Shows the MYOG gene sequence (Linear / 2884 bp) with strands 5' and 3'. The protospacer sequence "accaccaggctacgagcgg" is highlighted in green at position 144-163. The PAM site "cg" is also highlighted in green at position 163-164. The sequence is annotated with exons MYOG, MYOG mRNA, and MYOPARR.
- Search Panel:** Shows the search term "accaccaggctacgagcgg" and 1 match found.
- Description Panel:** Provides detailed information about the sequence, including Source (Homo sapiens (human)), Sequence Class (UNA - unannotated), Description (Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly), and Comments (REFSPEC INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly). It also includes fields for Created (Today), Last Modified (Today), Accession Number (NC_000001), Code Number, Sequence Author, and a checkbox for Description Panel.

10. 緑色で表示されたプロトスペーサ配列"accaccaggctacgagcgg"とその3'末端に隣接するPAM結合サイト"cg"にフィーチャーをつける。ストランドが把握しやすいように工夫する。

Edit Feature in MYOG遺伝子座

Feature: CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーサ部分)

Type: misc_feature

Translate this feature in Sequence view Feature Translation Options...

20 bp / 1 segment

144 → 163

Segment	Location	Size (bp)	Color
1 CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーザ部分)	144 .. 163	20	[Color Box]

/note

Prioritize display of this feature in maps

Cancel OK

Find DNA sequence: accacaggctacagcgaa 1 match Previous Next

Description Panel

Edit Feature in MYOG遺伝子座

Feature: CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分)

Type: misc_feature

Translate this feature in Sequence view Feature Translation Options...

3 bp / 1 segment

164 → 166

Segment	Location	Size (bp)	Color
1 CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分)	164 .. 166	3	[Color Box]

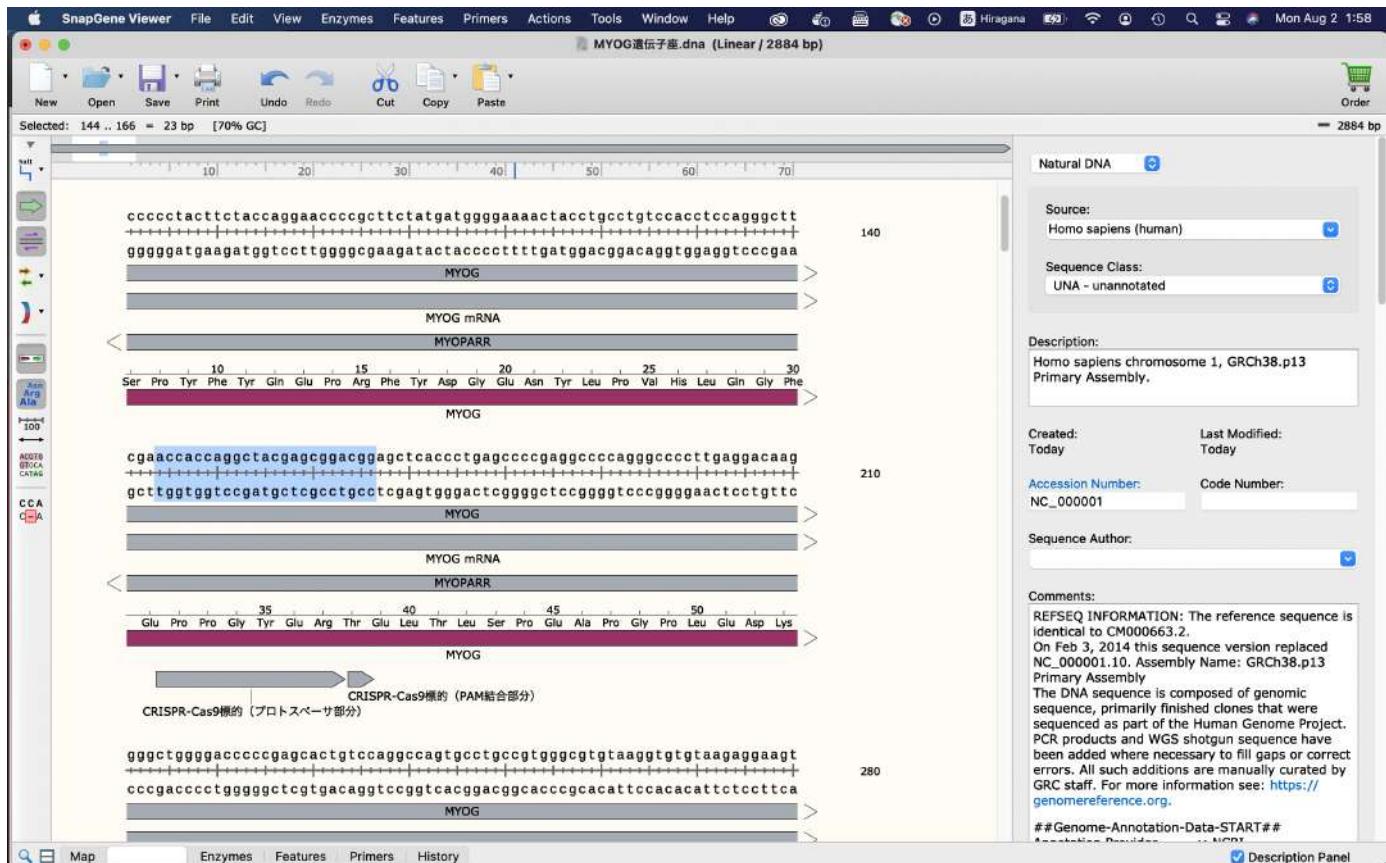
/note

Prioritize display of this feature in maps

Cancel OK

Find DNA sequence: accacaggctacagcgaa 1 match Previous Next

Description Panel



11. プロトスペーサ配列"accaccaggctacgagcgga"をもったガイドRNAを発現させるマテリアル（ベクター等）の作製に用いる一本鎖オリゴヌクレオチドを設計して注文する。

- （例）U6プロモータを介したガイドRNA発現ベクターを作製する場合

1. U6プロモータを使ってガイドRNAを発現する場合は、プロトスペーサ配列の5'末端がGでなければならない。

2. また、Addgeneに寄託されているpX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9プラスミドなどに対してBpuIによる制限酵素処理＆ライゲーションでプロトスペーザ配列を組み込む場合には、BpuIに適合した突出末端を形成するようにアダプター配列をつけておく必要がある。

（i）(ii)を考慮した場合、プロトスペーザ配列"accaccaggctacgagcgga"をもったガイドRNAを発現させるpX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9プラスミドを作製するには下記の二種類の一本鎖オリゴヌクレオチドが必要となる。

- 5'-caccGaccaccaggctacgagcgga____-3'
- 3'-____Ctgttggtccatgtccgcctcaaa-5'

11. 一本鎖オリゴヌクレオチドを注文します。

- FASMACの場合：ウルトラオリゴ/逆相カラム精製/修飾なし

NO	スケール (必須)	グレード (必須)	オリゴ名 全角15/半角30文字以内でご入力ください。 (必須)	配列 5'から3'方向に配列のみご入力下さい (必須)	塩基数	5'修飾	3'修飾	全体修飾	明細備考 全角50/半角100文字以内でご入力 ※お届け先選択欄: CCFA以降用
01	ウルトラ	▼	逆相カラム	caccGaccaccaggctacgagcgga	25	▼	▼	▼	
02	ウルトラ	▼	逆相カラム	aaactccgctgtacggctgtgttC	25	▼	▼	▼	

FASMACのオリゴDNA注文画面

12. 注文後、CRISPR-Cas9システムを動かすためのマテリアルの作製を行い、ゲノム編集実験を行う。詳しくは下記の参考文献を参照してください。

参考文献

- Ran, F., Hsu, P., Wright, J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc 8, 2281–2308 (2013).
- Zhang Lab CRISPR Plasmids
- 山本 卓、佐久間 哲史 (2019) .「完全版 ゲノム編集実験スタンダード～CRISPR-Cas9の設計・作製と各生物種でのプロトコールを徹底解説 (実験医学別冊)」 羊土社

関連ツール

- COSMID
 - 標的配列に対するオフターゲットサイトを予測するツール。ミスマッチ・ギャップの位置に基づいたスコアリング機能もついており、PCR等でオフターゲット解析をする場合の標的選定に活用できます。
- Cas-OFFinder
 - 標的配列に対するオフターゲットサイトを予測するツール。ミスマッチやDNA側あるいはRNA側のギャップ (Bulge) を細かく指定できる。またCRISPRdirect同様に多くの生物種に対応している他、C57BL/6NJやFVB/NJといったマウス亜系統ゲノムでのオフターゲット検索もできます。

CRISPR

- CRISPR-Cas9標的を検索できるウェブツール。標的検索だけでなく、そのオフターゲットの検索からプライマー設計まで含めた包括的な情報収集が可能。
 - http://crispr.tefot.net
 - 論文リンク

◦ 紹介動画 - 統合TV トップページ

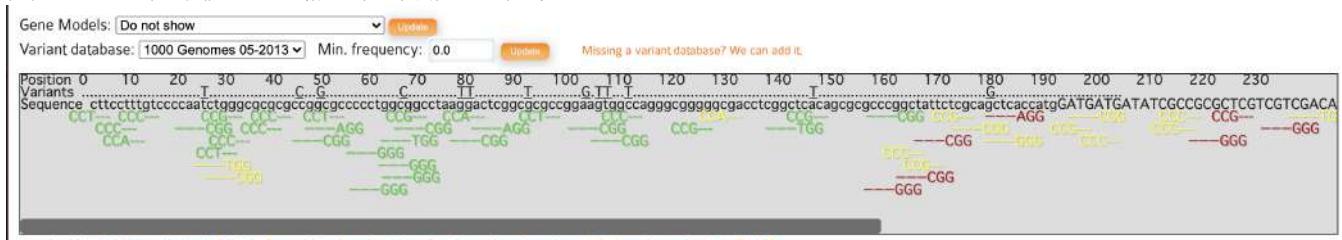
The screenshot shows the CRISPOR web interface. In Step 1, a user has entered a genomic sequence:
`cttcctttgtcccaatctggcgccgcggcccccgtggccctaaggactccggcgccggaaatggcc
 agggcgggggcgaccccggtcatacgccgcggcgatatttcgcagtcaccatgATGATGATATCGC
 CGCGCTCGTCGACAAAGGGCTCCGCATGTGCAAGGCCGCTCGGGCGACGATGCC
 CCCCGGGCCGCTTCCCTCATCGTGGGGCGCC`

In Step 2, the genome is set to "Homo sapiens - Human - UCSC Feb. 2009 (GRCh37/hg19) + SNPs: 1000Genomes, ExAC".

In Step 3, the PAM motif is set to "20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1".

At the bottom, there is a link to "Version 4.99 - Documentation - Contact us - Downloads/local installation - Citation - License".

検索にヒットした標的候補のマップ（緑色が高い特異性をもつ標的）



検索にヒットした標的候補一覧表

The table lists 10 rows of off-target information, each corresponding to a different genomic position and strand. The columns include:

- Position/Strand**: Shows the genomic position and orientation (e.g., 46 / rev, 12 / rev, 30 / fw, 64 / fw, 38 / rev, 70 / fw, 107 / fw).
- Guide Sequence + PAM**: The target sequence with the PAM site highlighted.
- MIT Specificity Score**: A numerical score indicating the specificity of the target.
- CFD Spec. score**: A color-coded score where darker shades indicate higher specificity.
- Predicted Efficiency**: A numerical score for the efficiency of the target.
- Outcome**: Categories for off-targets: 0-1-2-3-4 mismatches, next to PAM, Out-of-Frame, and Indel.
- Off-targets for**: A breakdown of the number of off-targets for each category.
- Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score**: Links to the genome browser for each category.
- checkboxes**: Options to filter results by exons only or chr7 only.

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants <input type="checkbox"/> Only G- <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A-	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency	Outcome	Off-targets for	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score	
46 / rev	TTCCGGCGCCGAGTCCTT AGGG..... ⚠ Inefficient Enzymes: <i>BshF1</i> , <i>Bse21I</i> , <i>TauI</i> , <i>BstDEI</i> , <i>SsiI</i> , <i>Fsp4HI</i> Cloning / PCR primers	97	98	47	57	67 75	0 - 0 - 0 - 0 - 14 0 - 0 - 0 - 0 - 1 14 off-targets	 4:intergenic:SYNJ2BP/SYNJ2BP-COX16-RP11-486O13.4 4:intergenic:AC013275.2-5CTR 4:intron:CR1L show all...
12 / rev	CGCCGGCGCGCCCGAGATT GGGG..... ⚠ High GC content Enzymes: <i>BsfI</i> , <i>BstI</i> Cloning / PCR primers	96	99	22	58	71 78	0 - 0 - 0 - 3 - 28 0 - 0 - 0 - 0 - 0 31 off-targets	 4:exon:LMF1 4:intergenic:MIR4291-RP11-53B5.1 4:intron:DAZAP1 show all...
30 / fw	TCCCCAATCTGGCGCGCG CGGG..... Enzymes: <i>NlaIV</i> , <i>AcyI</i> , <i>BfaI</i> , <i>MspI</i> , <i>BssHII</i> , <i>Cfr10I</i> , <i>HinfI</i> , <i>BanI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>SgrAI</i> , <i>SspDI</i> , <i>NaeI</i> , <i>BspFNI</i> , <i>MreI</i> , <i>BstCBI</i> Cloning / PCR primers	93	95	40	36	65 88	0 - 0 - 0 - 0 - 55 0 - 0 - 0 - 0 - 1 55 off-targets	 4:intron:EPS15L1 4:exon:USP32 4:exon:SBF1 show all...
64 / fw	GGCTTAAGGACTGGCGCG CGGG..... Enzymes: <i>BsaIV</i> , <i>MspI</i> , <i>PaiAI</i> , <i>HinfI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>BspFM1</i> , <i>BstCBI</i> Cloning / PCR primers	92	97	51	45	61 86	0 - 0 - 0 - 1 - 50 0 - 0 - 0 - 0 - 0 51 off-targets	 4:intergenic:NKA1N1-SNRNP40 4:intergenic:SYNJ2BP/SYNJ2BP-COX16-RP11-486O13.4 4:intergenic:RP11-516C1.1/CASC4-RP11-516C1.1 4:exon:PP1R11 show all...
38 / rev	CGCCGAAGTCCTAGGCCAGG AGGG..... Enzymes: <i>TauI</i> , <i>BseDI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>BstNI</i> , <i>BstI</i> , <i>StyD4I</i> , <i>SsiI</i> , <i>Fsp4HI</i> Cloning / PCR primers	91	92	31	40	75 75	0 - 0 - 0 - 2 - 52 0 - 0 - 0 - 0 - 0 54 off-targets	 3:intergenic:ISCA1P4-CHAC1 4:intron:AGAP3 4:intergenic:Y_RNA-CCDC85C show all...
70 / fw	AGGACTCGGCCGCCGAAG TGGG..... Enzymes: <i>BshF1</i> , <i>BsaI</i> , <i>BstNI</i> , <i>LpnPI</i> , <i>AcoI</i> , <i>StyD4I</i> Cloning / PCR primers	91	96	47	61	58 71	0 - 0 - 0 - 6 - 57 0 - 0 - 0 - 0 - 1 63 off-targets	 4:intergenic:RP11-104L21.3-CD247 4:intergenic:RP11-294L11.1-VIT 4:exon:PP1R11 show all...
107 / fw	ACCTCGCTCACGGCGCG CGGG.....	91	94	43	54	71 82	0 - 0 - 0 - 8 - 73	 3:exon:PNMAL2/AC011484.1 intergenic:AC108363.1/UNLK_S68D_X_RNA

"Cloning / PCR primers"をクリックするとガイドRNA構築に必要なオリゴヌクレオチド情報等が表示されます。

Name	Primer Sequence
T7 in vitro expression from a plasmid	ACACCGttccggcgccgacttccttG
U6 expression from an Addgene plasmid	ACACCGttccggcgccgacttccttG
Direct PCR for C. intestinalis	ACACCGttccggcgccgacttccttG

[← return to the list of all guides](#)

Guide sequence: TTCCGGCGCGCCGAGTCCTT AGG

Contents:

- Cloning or expression of guide RNA
 - T7 *in vitro* expression from a plasmid
 - T7 *in vitro* expression from overlapping oligonucleotides
 - T7 expression with the GeneArt kit
 - U6 expression from an Addgene plasmid
 - Direct PCR for *C. intestinalis*
 - Lentiviral vectors: Cloning with Gibson assembly
 - Summary of main cloning/expression primers
- PCR to amplify the on-target site
- Restriction sites for PCR validation
- PCR to amplify off-target sites
- Guide mutations that minimize on-target activity
- Saturating mutagenesis using all guides

Cloning and expression of guide RNA

T7 *in vitro* expression from a plasmid

To produce guide RNA by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase, the guide RNA sequence can be cloned into a variety of plasmids (see [AddGene website](#)).

For the guide sequence ttccggcgccgacttcctt, the following primers should be ordered for cloning into the Bsal-digested plasmid DR274 generated by the Joung lab.

Name	Primer Sequence
T7 in vitro expression from a plasmid	ACACCGttccggcgccgacttccttG

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence ttccggcgccgacttcctt does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid: [MLM3636 \(Joung lab\)](#)

To clone the guide into [MLM3636 \(Joung lab\)](#), use these primers:

Note: Efficient transcription from the U6 promoter requires a 5' G. This is not the case for this guide. Several options are possible, you can either add an additional G- prefix to the N20 guide sequence, called gN20 guides here, or replace the first with a G and create a gN19 guide. For users of HF1 and eSpCas9: G- prefixing with the high-fidelity variants may reduce efficiency, as it introduces a mismatch.

Primers for gN20 guides:

Name	Primer Sequence
gN20-guideRNA46rvU6senseMLM3636	ACACCGttccggcgccgacttccttG
gN20-guideRNA46rvU6antisenseMLM3636	AAAACaaggactcggcgccggaaCG

Primers for gN19 guides:

[Kim et al 2020](#). showed that changing the first nucleotide to 'G' is slightly more efficient.

Name	Primer Sequence
gN19-gN20-guideRNA46rvU6senseMLM3636	ACACCGttccggcgccgacttccttG
gN19-gN20-guideRNA46rvU6antisenseMLM3636	AAAACaaggactcggcgccggaaCG

The plasmid has to be digested with: *BsmBI*

[Click here](#) to download the cloning protocol for MLM3636 (Joung lab)

Direct PCR for *C. intestinalis*

A method only used at the moment by *Ciona intestinalis* (alias *Ciona robusta*) labs. The DNA construct is assembled during the PCR reaction; expression cassettes are generated with One-Step Overlap PCR (OSO-PCR) [Gandhi et al., Dev Bio 2016 \(preprint\)](#) following [this protocol](#). The resulting unpurified

PCR to amplify the on-target site

Use these primers to amplify a genomic fragment around the on-target site:

OntargetGuideRna46rvLeft	AAGGACAAGAAGCCCTGAGCACGGCGCAGCCCCACCCCGAAACCGGGAGGCTCTGTGCAGAGAAAGGCCCTGCC	Tm 59.963
OntargetGuideRna46rvRight	TATGGTAATAACGCGGCCGG	Tm 60.320

Genome fragment with validation primers (underlined) and guide sequence (yellow)

Maximum amplicon length: [400 bp - for >= 250bp paired reads] Primer Tm: [60 deg.]

Genomic sequence chr7:5569347-5569370 including primers, genomic forward strand:

```

AAGGACAAGAAGCCCTGAGCACGGCGCAGCCCCACCCCGAAACCGGGAGGCTCTGTGCAGAGAAAGGCCCTGCC
TCCCGCCCGCTCCCGGGCTGCCAACCCAGCAGCTCCCTACCTGGTGCCTGGGGGCCACGATGGAGGGAAAGAC
GGCCCGGGGGCATCTCGCCCGAAGCCGCCCTGCACATGCCGAGCCGTTGTGACGACGAGGCCGATATCAT
CATCCATGGTGAAGCTCGAGAAATAGCCGGCGCCTGAGCCGAGGTGCCCCCGCCCTGGCCACTTCGGCCGCCGA
GTCCTTAAgccgcaggggcgccggcgcgcgcAGATTGGGACAAGAGAACGCCGGCGCGTTATTACCAT

```

Sequence length: 398

Method: Primer3.2 with default settings, target length 250-400 bp.

Restriction Sites for PCR product validation

Cas9 induces mutations, usually 3bp 5' of the PAM site. If a mutation is induced, then it is very likely that one of the following enzymes no longer cuts your PCR product amplified from the mutant sequence. For each restriction enzyme, the guide sequence with the restriction site underlined is shown below.

Enzyme	Pattern	Guide with Restriction Site	Suppliers
--------	---------	-----------------------------	-----------

"show all..."->"Off-target primers"をクリックすると、各オフターゲットサイトに対するPCRプライマーが表示されます。

4:intergenic:SYNJ2BP/SYNJ2BP-COX16-RP11-486O13.4

4:intergenic:AC013275.2-SCTR

4:intron:CR1L

4:intergenic:WI2-81516E3.1-RPL35P8

4:intergenic:DNAH17-CTD-2357A8.3

4:intergenic:RP11-795F19.5-RP11-795F19.5/RBFADN

4:intergenic:EMX2-CTA-109P11.1

4:exon:C3orf58

4:intergenic:PAIP2B-ZNF638

4:intron:CHID1

4:intergenic:Gap-RNU6-1334P

4:exon:CILP2

4:exon:ATG2B/GSKIP

4:intron:ZADH2

[show less...](#)

[Off-target primers](#)

4:exon:LMF1

4:intergenic:MIR4291-RP11-53B5.1

4:intron:DAZAP1

[show all...](#)

4:intron:EPS15L1

4:exon:USP32

4:exon:SBF1

[show all...](#)

PCR primers for off-targets of TTCCGGCGGCCGAGTCCTT AGG

In the table below, Illumina Nextera Handle sequences have been added and highlighted in bold. Primers for the on-target have been added for convenience. The table below is sorted by the CFD off-target score. Sites with very low CFD scores < 0.02 are unlikely to be cleaved, see our study [Haeussler et al. 2016](#), Figure 2.

In the protocol by Matthew Canver, Harvard, two PCRs are run: one PCR to amplify the potential off-target, then a second PCR to extend the handles with Illumina barcodes. Please [click here](#) to download the protocol. Alternatively, you can have a look at [Fu et al. 2014](#).

If a primer was not found, the reason is usually that the region around the off-target is too repetitive. To avoid unspecific primers, all repeats are masked for the primer design (not for off-target search). If you think that we should change the parameters here or should use different primer3 settings, please let us know.

Maximum amplicon length: Primer Tm:

Name	Primer Sequence	Tm	CFD Score
ontarget_mm0_exon_ACTB/AC006483.1_chr7_5569347_F	Primer3: not found at this Tm	N.d.	1.00
ontarget_mm0_exon_ACTB/AC006483.1_chr7_5569347_R	Primer3: not found at this Tm	N.d.	1.00
mm4_intergenic_SYNJ2BP/SYNJ2BP-COX16 RP11-486O13.4_chr14_70883812_F	TCGTCGGCAGCGTCCACAGCGGTTCCGTTTCAG	60.0	0.49
mm4_intergenic_SYNJ2BP/SYNJ2BP-COX16 RP11-486O13.4_chr14_70883812_R	GTCTCGTGGCTCGGACTGCAATCCATTGGCGGT A	60.0	0.49
mm4_intergenic_AC013275.2 SCTR_chr2_120245676_F	Primer3: not found at this Tm	N.d.	0.38
mm4_intergenic_AC013275.2 SCTR_chr2_120245676_R	Primer3: not found at this Tm	N.d.	0.38
mm4_intron_CR1L_chr1_207844275_F	TCGTCGGCAGCGTCACTGAAATTGTTGCTGGAGT	58.8	0.21
mm4_intron_CR1L_chr1_207844275_R	GTCTCGTGGCTCGGTGCATACACCTGGGAGCAT	59.3	0.21
mm4_intergenic_WI2-81516E3.1 RPL35P8_chr22_49591792_F	TCGTCGGCAGCGTCGGCACCTCCCTTGCTGG	60.3	0.19
mm4_intergenic_WI2-81516E3.1 RPL35P8_chr22_49591792_R	GTCTCGTGGCTCGGTAGCTCGGGAGGTGAG	60.0	0.19
mm4_intergenic_DNAH17 CTD-2357A8.3_chr17_76587005_F	Primer3: not found at this Tm	N.d.	0.10
mm4_intergenic_DNAH17 CTD-2357A8.3_chr17_76587005_R	Primer3: not found at this Tm	N.d.	0.10
mm4_intergenic_RP11-795F19.5 RP11-795F19.5/RBFADN_chr18_77841998_F	TCGTCGGCAGCGTCGTGAAGTGTGATGGGAA	59.9	0.10

Off-target amplicon sequences with primers

These only list off-targets that have primers in the table above. Primers underlined, off-targets in bold.

mm4_intergenic_SYNJ2BP/SYNJ2BP-COX16 RP11-486O13.4_chr14_70883812	CACAGCGGTTTCGGTTTCAGCAGCCTCGAGACCCGAAAAGGAAGCCGAAGGACTCGGAGCACTGGAAATGCTGGAAATCGTGGCT
mm4_intron_CR1L_chr1_207844275	<u>ACCTAGAAATTGTTGCTGGAGTAATTCAATTAAAAATGCTTATGGATGCTTCGGTGTG</u> CACAGTCCTTGGAAATTAAAGAAATGTAAGGAAAGAGCTATGCTCCAAGGTGTATGCA
mm4_intergenic_WI2-81516E3.1 RPL35P8_chr22_49591792	GGCACACCTCCCTTGCTGGGGTGGCTATGGGCTTTGGCTGCAGTCCTTGGTAGTGACTGCTGCCGCTACTCCTCCCCGCTCACTCCTCCCCGAGACTGA
mm4_intergenic_RP11-795F19.5 RP11-795F19.5/RBFADN_chr18_77841998	GTGGAAGTGCTGATGGGAAATGACTCAATGTCCTTACCTGAAAATCCCTAGGCAGGGATTCTGCGTGCAGAGTCCTAAGGATGCTGCTAGGTGAGGAC
mm4_intergenic_EMX2 CTA-109P11.1_chr10_119313024	TTGAGAACCCCTCTGACCCCAGCCGTGACCCCTTCGGGAGGTGGCTTCGGCAGGACCCGGTGCAGCACAAACTCT
mm4_exon_C3orf58_chr3_143691762	AGGCGGCCACGCTTGAAGCGCAAGGTCCATTCA
mm4_intron_CHID1_chr11_909450	CTACGGGGAGCCAAGGACTCGGGCAGCTCTCTGCTTCGCAACCTCAAGGACTCGGAGCGCATGCAGCTGCTGACCC
mm4_intergenic_Gap RNU6-1334P_chrY_143584	TCCGTTGATTCAACCCAGCAACCATTACCCCGTGCCTGAATGTCGCGCTACGGCCACTCACGCCCTCGGACGTGAGTCTCCACCCGCCCTG
mm4_exon_CILP2_chr19_19655442	CTCAAGCTGTGGTCGCTGAACCCGAGACCGGCTTGTGGGAGGAGACGGCCTCCGGCGAGGGGCTCTCGGAGGAC
mm4_exon_ATG2B/GSKIP_chr14_96830114	CGTGTAAAGAGGGCTGGGGCCGCTGGCCGCTGGCTCTCCGGCTCCGGCTGGAGGACTGGAGCCCTTCGAG
mm4_intron_ZADH2_chr18_72916811	GGTGGAAGTCTCCGAGTCCCGTCACTCGGCGCCGGAGCGCAGTGGCGACAGACAGGGCCCGCCGGCTTGACCGTGAACCTTGG

Input file for Crispresso

Crispresso, written by Luca Pinello, is a software package to quantify the Cas9-induced mutations on off- or on-targets.

- 標的候補一覧表の見方

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants	MIT Specificity Score	Predicted Efficiency	Outcome	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score
	<input type="checkbox"/> Only G <input type="checkbox"/> Only GG- <input type="checkbox"/> Only A- <input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> Show all scores Doench '16	<input type="checkbox"/> Mor-Mates <input type="checkbox"/> Out-of-Frame <input type="checkbox"/> Lindel	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> exons only <input type="checkbox"/> chr7 only

- "Position/Strand"

- 数字はターゲットの位置になります。
- "fw/rev"でゲノムリファレンス上でどちらのstrand属するかを指します。

- "Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants"

- 標的の配列情報を指します。Restriction EnzymesはRFLP法で利用可能な制限酵素サイトを指します。VariantsはSNPを示しており、SNPを対象としたい場合はこの情報をもとに標的を選択することができます。

- "MIT Specificity Score"
 - Hsu et al. Nat Biotech 2013に基づいた特異性スコアです。高いほど特異性が高いとされ、50以上が推奨されています。
- "CFD Spec. score"
 - Doench et al. Nat Biotech 2016に基づいた特異性スコアです。
- "Predicted Efficiency"
 - "Doench '16"はFusi et al. preprint 2015とDoench et al. Nat Biotech 2016に基づいた予測切断活性のスコアです。CRISPR-Cas9をレンチウイルス導入したときの活性データを参考に作られています。
 - "Mor.-Mateos"はMoreno-Mateos et al. Nat Method 2015に基づいた予測切断活性のスコアです。CRISPR-Cas9をレンチウイルス導入したときの活性データに基づいています。CRISPR-Cas9をゼブラフィッシュの胚にインジェクション導入したときの活性データを参考に作られています。in vivoでのゲノム編集を行う場合にはこちらのほうがより参考になると考えられています。
- "Outcome"
 - "Out-of-Frame"はBae et al. Nat Method 2014に基づいて欠失によるフレームシフトの起こりやすさを予測したものです。値をクリックすると実際の予測変異パターンを見るることができます。
 - "Lindell"はWei Chen et al. Nucleic Acids Research 2019に基づいて欠失・挿入によるフレームシフトの起こりやすさを予測したものです。値をクリックすると実際の予測変異パターンを見るることができます。
- "Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM"
 - オフターゲットサイトの数を標的配列とのミスマッチ数ごとに表示しています。最初の数字（ミスマッチ0でのオフターゲットサイト）が0である標的が最低限特異的な標的です。
- "Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score"
 - CFD off-target scoreが高い順にオフターゲットサイトが表示されています。
 - マウスオーバーするとScoreとミスマッチ領域を参照できます。
 - クリックするとUCSC Genome Browserにジャンプし、オフターゲットサイトの情報を細かく参照できます。

【使用例】CRISPORを使って、ノックアウトのための標的を設計する

1. 名前を入力します（入力しなくても可）。MYOG

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use **CRISPOR Batch**

Sequence name (optional):

2. 検索配列を入力します。

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use **CRISPOR Batch**

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon 

[Clear Box - Reset to default](#)

Paste here the genomic - not a cDNA - sequence of the exon you want to target. The sequence has to include the PAM site for your enzyme of interest, e.g. NGG. Maximum size 2300 bp. If you only have a cDNA, please BLAST or BLAT the cDNA first to find the right exon sequence for CRISPOR.



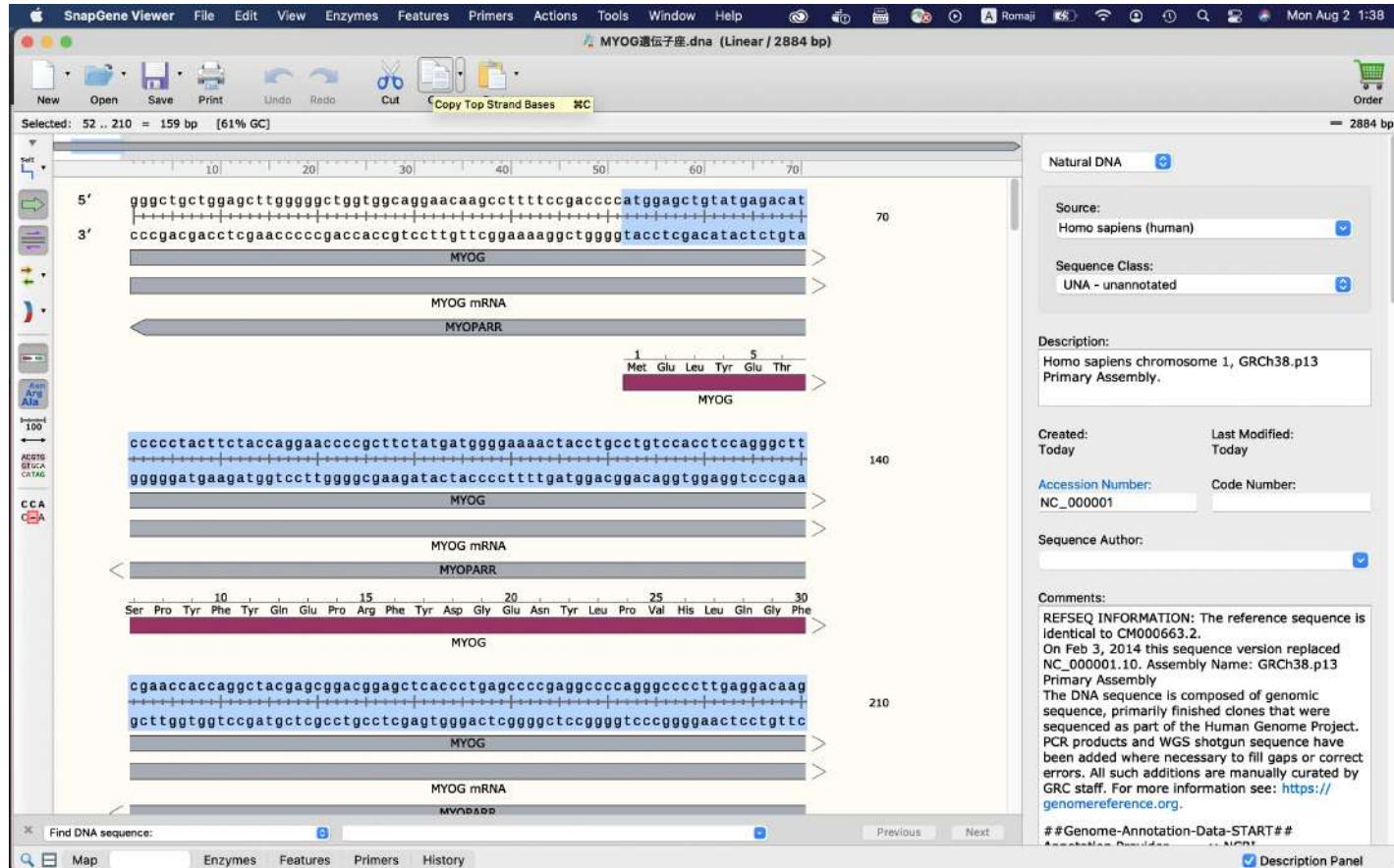
Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.

Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

3. 配列はSnapGene Viewerからドラッグ>コピーで取得します。今回は開始コドンから159bpを取得します。

入力配列：

atggagctgtatgagacatccccctacttaccaggaaccccgcttatgtatggggaaaactacctgcgtccaccctcaggctcgaaaccaccaggctacgagcggacggagctaccctgagcccccaggccccctgaggacaag



Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use **CRISPOR Batch**

Sequence name (optional):

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon

[Clear Box](#) - [Reset to default](#)

```
atggagctgtatgagacatccccctacttaccaggaaccccgcttatgtatggggaaaactacctgcgtccaccctcaggctcgaaaccaccaggctacgagcggacggagctaccctgagcccccaggccccct
acccctccatgtatggggaaaactacctgcgtccaccctcaggctcgaaaccaccaggctacgagcggacggagctaccctgagcccccaggcccccttgaggacaag|
```



Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.

Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

- 特異性を確認するゲノム+SNPデータベースを指定します。今回は最新のヒトゲノムリファレンスである"Homo sapiens- Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar"とします。

ゲノム+SNPデータベース：

Homo sapiens- Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use CRISPOR Batch

Sequence name (optional): MYOG

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon ⓘ

Clear Box - Reset to default

```
atggagctgtatgagacatccccctacttctaccaggaaaccccgcttcatgtggggaaaactacctgcgtcc
accccgccgttcgaaccaccaggctacgagccggacggctcaccctgagcccgaggccccaggcccc
tgaggacaag
```

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

Step 2

Select a genome

Homo sapiens - Human - UCSC Feb. 2009 (GRCh37/hg19) + SNPs: 1000Genomes, ExaC

Heliconius melpomene - Heliconius melpomene - EnsemblMetazoa 70 (HmB1)

Helicoverpa armigera - tobacco budworm - NCBI GCA_002156985.1 (Harm_1.0)

Helobdella austrensis - freshwater leeches - CJ Winchell, Sep 25 2017

Helobdella robusta - Helobdella robusta - EnsemblMetazoa 76 (GCA_000326865.1)

Heterocephalus glaber - Naked Mole Rat - NCBI HetGia_female_1.0

Hevea brasiliensis - Para Rubber Tree - CIRAD, Julie Petit, clone Reyan 7-33-97, unknown version

Hevea brasiliensis - siringa - NCBI GCF_001654055.1 (ASM165405v1)

Histoplasma capsulatum G217B - Ajellomyces capsulatus G217B - NCBI GCA_000170615.1 (ASM17061v1)

Homo sapiens - Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar

Homo sapiens - Human - UCSC Feb. 2009 (GRCh37/hg19) + SNPs: 1000Genomes, ExaC

5. PAM配列を指定します。今回は最も一般的なSpCas9の"NGG"とします。

PAM配列：20bp-NGG - SpCas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1

Step 1

Planning a lentiviral gene knockout screen? Use CRISPOR Batch

Sequence name (optional): MYOG

Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon ⓘ

Clear Box - Reset to default

```
atggagctgtatgagacatccccctacttctaccaggaaaccccgcttcatgtggggaaaactacctgcgtcc
accccgccgttcgaaccaccaggctacgagccggacggctcaccctgagcccgaggccccaggcccc
tgaggacaag
```

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

Step 2

Select a genome

Homo sapiens - Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar

Note: pre-calculated exonic guides for this species are on the [UCSC Genome Browser](#).We have 691 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF_GCA_ID to [CRISPOR support](#).**Step 3 ⓘ**

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

✓ 20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1

20bp-NNG - Cas9 S. canis

20bp-NGN - SpG

20bp-NNGT - Cas9 S. canis - high efficiency PAM, recommended

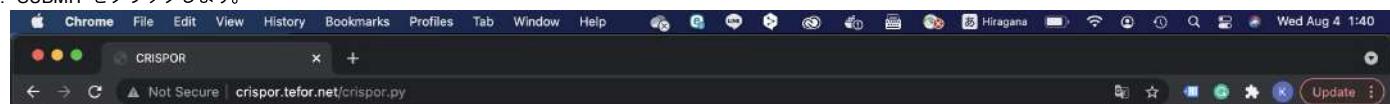
20bp-NAA - iSpyMacCas9

21bp-NNG(A/G)(A/G)T - Cas9 S. Aureus

20bp-NNG(A/G)(A/G)T - Cas9 S. Aureus with 20bp-guides

20bp-NC(G/T) - Cas9 recommended PAM, see notes

6. "SUBMIT"をクリックします。



Step 1
Planning a lentiviral gene knockout screen? Use CRISPOR Batch
Sequence name (optional): MYOG
Enter a single genomic sequence, < 2300 bp, typically an exon ⓘ
Clear Box - Reset to default

```
atggagctgtatgagacatccccctacttctaccaggaaaccccgcttcatgtggggaaaactacctgcgtcc
accccgccgttcgaaccaccaggctacgagccggacggctcaccctgagcccgaggccccaggcccc
tgaggacaag
```

Text case is preserved, e.g. you can mark ATGs with lowercase.
Instead of a sequence, you can paste a chromosome range, e.g. chr1:11,130,540-11,130,751

Step 2

Select a genome

Homo sapiens - Human - UCSC Dec. 2013 (GRCh38/hg38) + SNPs: dbSNP148, Kaviar

Note: pre-calculated exonic guides for this species are on the [UCSC Genome Browser](#).We have 691 genomes, but not yours? Search [NCBI assembly](#) and send a GCF_GCA_ID to [CRISPOR support](#).**Step 3 ⓘ**

Select a Protospacer Adjacent Motif (PAM)

20bp-NGG - Sp Cas9, SpCas9-HF1, eSpCas9 1.1

See notes on enzymes in the manual.

SUBMIT

7. 結果が表示されるまで待ちます。

CRISPOR job has been submitted.

Job Status: Waiting.

This page will refresh every 10 seconds

If you see this message for longer than 5 minutes, please [contact us](#).

Version 4.99 - Documentation - Contact us - Downloads/local installation - Citation - License

8. 標的のリストが特異性が高い順に表示されます。ノックアウトする上では特異性が高く、なおかつ切断活性が低すぎず、フレームシフトが起こりやすい標的を選ぶのがベストです。

- ・ 今回は次の基準で選んでみます。
- ・ 特異性を示す"MIT Specificity Score"と"CFD Spec. score"がいずれも90を上回る
- ・ 切断活性を示す"Doench '16"と"Mor.-Mateos"がいずれも25を下回らない
- ・ フレームシフトの起こりやすさを示す"Out-of-Frame"と"Lindel"がいずれも60を上回る
 - これを満たすのは"ACCAACCAGGCTACGAGCGGA CGG"、"TCGAACCACCAGGCTACGAG CGG"の二標的となります。どちらでもよいですが今回は"ACCAACCAGGCTACGAGCGGA CGG"を選んでみます。

Download as Excel tables: [Guides](#) / [Guides, all scores](#) / [Off-targets](#) / [Saturating mutagenesis assistant](#)

Position/ Strand	Guide Sequence + PAM + Restriction Enzymes + Variants	MIT Specificity Score	CFD Spec. score	Predicted Efficiency	Outcome	Off-targets for 0-1-2-3-4 mismatches + next to PAM	Genome Browser links to matches sorted by CFD off-target score	
					Doench '16	Mor.-Mateos	Lindel	
97 / rev	AGCTCCGTCCGCTCGTAGCC TGG Enzymes: <i>Sst</i> D4I, <i>Lpn</i> P1, <i>Bst</i> NI Cloning / PCR primers	97	96	44	22	69	83	0 - 0 - 0 - 1 - 29 0 - 0 - 0 - 0 - 0 30 off-targets
94 / rev	TCCGTCGGCTGTAGCCCTGG TGG Enzymes: <i>Sst</i> D4I, <i>Lpn</i> P1, <i>Bst</i> NI, <i>Tag</i> I Cloning / PCR primers	94	97	66	53	60	73	0 - 0 - 1 - 1 - 22 0 - 0 - 0 - 0 - 0 28 off-targets
113 / fw	ACCAACCAGGCTACGAGCGGA CGG Enzymes: <i>Mwo</i> I, <i>Tsp</i> GW1, <i>Alu</i> BI, <i>Psp</i> 124BI, <i>Bsp</i> 1286I, <i>Alw</i> 21L, <i>Eco</i> 24I, Cloning / PCR primers	94	97	58	60	72	81	0 - 0 - 0 - 2 - 48 0 - 0 - 0 - 0 - 0 50 off-targets
109 / fw	TCGAACCACCAGGCTACGAG CGG Enzymes: <i>Tsp</i> GW1 Cloning / PCR primers	93	98	69	48	77	88	0 - 0 - 0 - 3 - 22 0 - 0 - 0 - 1 - 1 25 off-targets
33 / rev	CATCATAGAACGGGGTTCC TGG Enzymes: <i>Sst</i> D4I, <i>Lpn</i> P1, <i>Nla</i> IV, <i>Bst</i> NI Cloning / PCR primers	90	93	38	24	53	78	0 - 0 - 0 - 4 - 67 0 - 0 - 0 - 0 - 0 71 off-targets
55 / fw	AGGAACCCCGCTCTATGAT GGG Cloning / PCR primers	90	96	46	31	54	73	0 - 0 - 0 - 5 - 47 0 - 0 - 0 - 0 - 0 52 off-targets
54 / fw	CAGGAACCCC6CTTCTATGA TGG	89	94	36	45	51	78	0 - 0 - 0 - 6 - 67

9. "Cloning / PCR primers"をクリックして、構築に必要なオリゴヌクレオチド情報を表示します。

113 / fw	ACCACCAGGCTACGAGCGGA CGG Enzymes: <i>MwoI</i> , <i>TspGWI</i> , <i>AluBI</i> , <i>Psp124BI</i> , <i>Bsp1286I</i> , <i>Alw21I</i> , <i>Eco24I</i> Cloning / PCR primers
----------	---

← return to the list of all guides

MYOG: Guide sequence: ACCACCAGGCTACGAGCGGA CGG

Contents:

- Cloning or expression of guide RNA
 - *T7 in vitro* expression from a plasmid
 - *T7 in vitro* expression from overlapping oligonucleotides
 - *T7* expression with the GeneArt kit
 - *U6* expression from an Addgene plasmid
 - Direct PCR for *C. intestinalis*
 - Lentiviral vectors: Cloning with Gibson assembly
 - Summary of main cloning/expression primers
- PCR to amplify the on-target site
- Restriction sites for PCR validation
- PCR to amplify off-target sites
- Guide mutations that minimize on-target activity
- Saturating mutagenesis using all guides

Cloning and expression of guide RNA

T7 *in vitro* expression from a plasmid

To produce guide RNA by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase, the guide RNA sequence can be cloned into a variety of plasmids (see [AddGene website](#)). For the guide sequence accaccaggctacgagcgga, the following primers should be ordered for cloning into the *BsaI*-digested plasmid DR274 generated by the Joung lab.

Name	Primer Sequence

10. pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 プラスミドでガイドRNAを発現させたい場合は"U6 expression from an Addgene plasmid"の項目へ行き、"Select your Addgene plasmid."で"pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9(Zhang lab) + derivatives"を選択します。

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence accaccaggctacgagcgg does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid: **MLM3636 (Joung lab)**
pAc-sgRNA-Cas9 (Liu lab)
pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Zhang lab) + derivatives (highlighted)
lentiCRISPR v2 (Zhang lab)
lentiGuide-Puro (Zhang lab)

Note: Efficient transcription from the U6 promoter requires a 5' G. This is not the case for this guide. Several options are possible, you can either add an additional G- prefix to the N20 guide sequence, called gN20 guides here, or replace the first with a G and create a gN19 guide. For users of HF1 and eSpCas9: G- prefixing with the high-fidelity variants may reduce efficiency, as it introduces a mismatch.

Primers for gN20 guides:

Name	Primer Sequence
MYOG_gN20-guideRNA113fwU6senseMLM3636	ACACCGaccaccaggctacgagcggA
MYOG_gN20-guideRNA113fwU6antisenseMLM3636	AAAACtccgctcgtagcctgggtggCG

Primers for gN19 guides:

Kim et al 2020, showed that changing the first nucleotide to 'G' is slightly more efficient.

Name	Primer Sequence
MYOG_gN19-gN20-guideRNA113fwU6senseMLM3636	ACACCGccaccaggctacgagcggA
MYOG_gN19-gN20-guideRNA113fwU6antisenseMLM3636	AAAACtccgctcgtagcctgggtggCG

The plasmid has to be digested with: *BsmBI*
[Click here](#) to download the cloning protocol for MLM3636 (Joung lab)

Direct PCR for *C. intestinalis*

11. 配列が自動で更新されるので、更新された"Primers for gN20 guides"を記録します。

- gN20-guideRNA113fwU6sensepX330: CACCGaccaccaggctacgagcggA
- gN20-guideRNA113fwU6antisensepX330: AAAACtccgctcgtagcctgggtggC

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence accaccaggctacgagcgg does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid: **pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Zhang lab) + derivatives**

To clone the guide into **pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Zhang lab) + derivatives**, use these primers:

Note: Efficient transcription from the U6 promoter requires a 5' G. This is not the case for this guide. Several options are possible, you can either add an additional G- prefix to the N20 guide sequence, called gN20 guides here, or replace the first with a G and create a gN19 guide. For users of HF1 and eSpCas9: G- prefixing with the high-fidelity variants may reduce efficiency, as it introduces a mismatch.

Primers for gN20 guides:

Name	Primer Sequence
MYOG_gN20-guideRNA113fwU6sensepX330	CACCGaccaccaggctacgagcggA
MYOG_gN20-guideRNA113fwU6antisensepX330	AAAACtccgctcgtagcctgggtggC

12. 一本鎖オリゴヌクレオチドを注文します。

- FASMACの場合：ウルトラオリゴ/逆相カラム精製/修飾なし

NO	スケール (必須)	グレード (必須)	オリゴ名 全角15/半角30文字以内でご入力ください。 (必須)	配列 5'から3'方向に配列のみご入力下さい (必須)	塩基数	5'修飾	3'修飾	全体修飾	明細備考 全角50/半角100文字以内でご入力ください ※お届け先選択欄「CCD」は専用項目
01	ウルトラ	▼逆相カラム	▼gN20-guideRNA113fwU6sensepX330	CACCGaccaccaggctacgagcggA	25	▼	▼	▼	
02	ウルトラ	▼逆相カラム	▼gN20-guideRNA113fwU6antisensepX330	AAAACtccgctcgtagcctgggtggC	25	▼	▼	▼	

13. 注文後、CRISPR-Cas9システムを動かすためのマテリアルの作製を行い、ゲノム編集実験を行います。詳しくは下記の参考文献を参照してもよいですし、"Click here"示されているリンク先のプロトコールを参照しても大丈夫です。

U6 expression from an Addgene plasmid

The guide sequence accaccaggctacgagcgg does not contain the motif TTTT, which terminates RNA polymerase, so it can be transcribed in mammalian cells.

Select your Addgene plasmid: [pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 \(Zhang lab\) + derivatives](#)

To clone the guide into [pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 \(Zhang lab\) + derivatives](#), use these primers:

Note: Efficient transcription from the U6 promoter requires a 5' G. This is not the case for this guide. Several options are possible, you can either add an additional G- prefix to the N20 guide sequence, called gN20 guides here, or replace the first with a G and create a gN19 guide. For users of HF1 and eSpCas9: G- prefixing with the high-fidelity variants may reduce efficiency, as it introduces a mismatch.

Primers for gN20 guides:

Name	Primer Sequence
MYOG_gN20-guideRNA113fwU6sensepX330	CACCG <u>g</u> accaccaggctacgagcgg
MYOG_gN20-guideRNA113fwU6antisensepX330	AAA <u>G</u> tccgctcgtagcctgggtgc

Primers for gN19 guides:

Kim et al 2020 showed that changing the first nucleotide to 'G' is slightly more efficient.

Name	Primer Sequence
MYOG_gN19-gN20-guideRNA113fwU6sensepX330	CACCG <u>G</u> ccaccaggctacgagcgg
MYOG_gN19-gN20-guideRNA113fwU6antisensepX330	AAA <u>G</u> tccgctcgtagcctgggtgc

The plasmid has to be digested with: *Bbs*1

[Click here](#) to download the cloning protocol for [pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 \(Zhang lab\) + derivatives](#)

Direct PCR for *C. intestinalis*

A method only used at the moment by *Ciona intestinalis* (alias *Ciona robusta*) labs. The DNA construct is assembled during the PCR reaction; expression cassettes are generated with One-Step Overlap PCR (OSO-PCR) Gandhi et al., Dev Bio 2016 ([preprint](#)) following [this protocol](#). The resulting unpurified PCR product can be directly electroporated or injected into *Ciona* eggs.

Microsoft Word - lentiCRISPRv2 and lentiGuide oligo cloning protocol.docx

Target Guide Sequence Cloning Protocol

In order to clone the target sequence into the lentiCRISPRv2 or lentiGuide-Puro backbone, synthesize two oligos of the following form. All plasmids have the same overhangs after *Bsm*BI digestion and the same oligos can be used for cloning into lentiCRISPRv2, lentiGuide-Puro or lentiCRISPRv1.

Oligo 1 → 5' – CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN – 3'
 3' – CNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAA – 5' ← Oligo 2

Example oligo design: Note that the NGG PAM is not included in the designed oligos.
 Genomic 5' – ... GACCACACTCTGATCAGTTTCCTTGGGCTGCAA... – 3'
 Sequence 3' – ... CTGGTGTCAGACTAGTCAAGGAACCGACGTT... – 5'

Oligo 1 → 5' – CACCGCACTCTGATCAGTTTCCTT – 3'
 3' – GTCAGACTAGTCAAAGGAAAA – 5' ← Oligo 2

Oligonucleotide ordering tips: Standard de-salting oligos (usually the most inexpensive synthesis) are sufficient for cloning. If not already resuspended, dilute each oligo to 100 μM in sterile water or TE.

Lentiviral vector digestion, oligo annealing and cloning into digested vector:

- Digest and dephosphorylate 5ug of the lentiviral CRISPR plasmid with *Bsm*BI for 30 min at 37°C:

5 ug	lentiCRISPRv2 or lentiGuide-Puro
3 ul	FastDigest <i>Bsm</i> BI (Fermentas)
3 ul	FastAP (Fermentas)
6 ul	10X FastDigest Buffer
0.6 ul	100 mM DTT (freshly prepared)
X ul	ddH ₂ O
60 ul	total
- Gel purify digested plasmid using QIAquick Gel Extraction Kit and elute in EB.
 If *Bsm*BI digested, a ~2kb filler piece should be present on the gel. Only gel purify the larger band. Leave the 2kb band.
- Phosphorylate and anneal each pair of oligos:

1 ul	Oligo 1 (100 μM)
1 ul	Oligo 2 (100 μM)
1 ul	10X T4 Ligation Buffer (NEB)

Put the phosphorylation/annealing reaction in a thermocycler using the following parameters:
 37°C 30 min
 95°C 5 min and then ramp down to 25°C at 5°C/min

4. Dilute annealed oligos from Step 3 at a 1:200 dilution into sterile water or EB.

5. Set up ligation reaction and incubate at room temperature for 10 min:

X ul	<i>Bsm</i> BI digested plasmid from Step 2 (50ng)
1 ul	diluted oligo duplex from Step 4
5 ul	2X Quick Ligase Buffer (NEB)
X ul	ddH ₂ O
10 ul	subtotal
1 ul	Quick Ligase (NEB M2200S)
11 ul	total

Also perform a negative control ligation (vector-only with water in place of oligos) and transformation.

参考文献

- Ran, F., Hsu, P., Wright, J. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281–2308 (2013).
- Zhang Lab CRISPR Plasmids
- 山本 卓、佐久間 哲史 (2019) .「完全版 ゲノム編集実験スタンダード～CRISPR-Cas9の設計・作製と各生物種でのプロトコールを徹底解説 (実験医学別冊)」 羊土社

関連ツール

- CHOPCHOP
 - Exonを参照しながらインタラクティブに標的を検索できるツール。
 - 統合TV

CRISPR-Cas9を使ったノックアウト結果の予測

DSBによる変異導入

- CRISPR-Cas9やTALENといったゲノム編集ツールではDNA二本鎖切断（DSB）を引き起こし、その修復の結果発生するフレームシフト変異によってノックアウトを達成されます。
- 教科書的にはこの時の変異導入はランダムと説明されることも多いですが、実際にはある程度の傾向があることが知られています。
- 哺乳類を問わず多くの生物種でみられるのが切断末端間にある相同配列がつながるような欠失変異パターンです。これらはMMEJ/SSAなどといった修復経路によって引き起こされることが知られています（※ゲノム編集の分野ではまとめてMMEJによる修復と呼ばれることが多い）。
- またヒト等の培養細胞では切断面がCICとなっていると一塩基欠失によりC→塩基になったり、切断面でPAM側に位置しない方のTがTTに変わるといったリピート型の挿入が発生しやすかったりすることが知られていますAllen et al. Nat Biotech 2019。
- このような変異パターンを事前に予測するためのツールを紹介します。

Microhomology-Predictor

- DSBによって引き起こされるMMEJによる欠失変異パターンを予測するツール
 - <http://www.rgenome.net/mich-calculator/>
 - 論文リンク トップページ

Microhomology-Predictor

Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites.

When programmable nucleases (such as ZFNs, TALENs, or CRISPR) are treated, 1~3bp deletion or 1bp insertion would be induced via nonhomologous end-joining (NHEJ) repair pathway, or deletions using microhomologies of more than 2 bases would be frequently introduced via microhomology-mediated end joining (MMEJ) pathway for repairing double-strand breaks in DNA. With Microhomology-Predictor, one can simply predict the mutation patterns caused by MMEJ pathway and estimate how frequently unwanted in-frame deletions would be happened.

Citation info: Bae S. et al. Microhomology-based choice of Cas9 nuclease target sites. *Nature Methods* 11, 705-706 (2014).

- Pattern score:** score of each pattern according to the microhomology size and the deletion length
- Microhomology score:** the sum of all the pattern scores
- Out-of-frame score:** the ratio of out-of-frame pattern scores over the sum of all the pattern scores

To avoid unwanted in-frame deletions in a protein-coding sequence as much as possible, one should choose target sites with high out-of-frame scores. A score above 66 is recommended.

入力画面

CRISPR RGEN Tools

Left half-site Right half-site
e.g.) 5' -TG~~TGGCAACATGCTGTCATCCTCATCT~~GATAACTG~~CAAAGGCTGAAGAGCATGAC~~-3' for ZFNs

Left half-site Right half-site
5' -GA~~ACTAGACCCCCGCCACAGCAGCCTCTGAAAGTTGG~~ACAG~~CAAAACCATTTGCTTCACTAC~~-3' for TALENs

Left half-site PAM sequence
5' -CCTCGT~~GGCCCTGGAGCCTGGCTGGAGCTCTGCTAGGCACAGAACGAGTGTCTGGAAAGTGAT~~-3' for RGENs
30~40 bp 30~40 bp (same length as left)

Insert one or more query sequences (A, G, T, C only) flanking the same length at a cleavage site (100bp or less, 60~80bp recommended).

Add

Submit

検索結果

The screenshot shows a web browser window with the URL <https://rgenome.net/mich-calculator/>. The page title is "CRISPR RGEN Tools". Below the title, a message says "Click on target sequence to show predicted patterns." A note below it states: "To avoid unwanted in-frame deletions in a protein-coding sequence as much as possible, one should choose target sites with high out-of-frame scores. A score above 66 is recommended." A table displays target sequences and their scores:

Target	Microhomology Score	Out-of-frame Score
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	7677.5	72.31911429501791
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	7107.900000000001	75.53145092080644

At the bottom, a note says "This website is maintained by Molecular Genome Engineering Lab, Hanyang University, Korea. [Contact Us](#)".

詳細な変異パターン情報

Predicted Patterns	Microhomology	Deletion Length	Pattern Score
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT			Wild Type
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAGC-----TCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GAGC	9	446.6
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACG-----GAGCTACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	ACG	8	335.0
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAGC-----CCGAGCCCCAGGGCCCT	GAGC	20	257.59999999999997
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGG-----ACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GG	10	242.7999999999998
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGG-----CGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GA	5	233.7000000000002
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCT-----CACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GCT	16	224.5
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGG-----CTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	CACC	25	200.9
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGG-----AGCTACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GG	14	198.8
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTACGAG-----GCCAGGGCCCT	CGAG	27	181.3
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGG-----GGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AC	16	134.7
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGG-----CTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AG	17	128.1
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTAC-----CCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AC	17	128.1
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAAGGCTAC-----GAGCTACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	CG	23	126.8

・結果画面の見方

Target	Microhomology Score	Out-of-frame Score	
<code>CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCCCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT</code>	7677.5	72.31911429501791	
Predicted Patterns	Microhomology	Deletion Length	Pattern Score
<code>CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCCCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT</code>		Wild Type	
<code>CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGC-----TCACCCCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT</code>	GAGC	9	446.6
<code>CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACG-----GAGCTCACCCCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT</code>	ACG	8	335.0

◦ "Microhomology Score"

- MMEJによる欠失変異のトータルでの起こりやすさを表します。

◦ "Out-of-frame Score"

- MMEJによる欠失変異の中でもフレームシフト変異となるパターンの起こりやすさを表します。

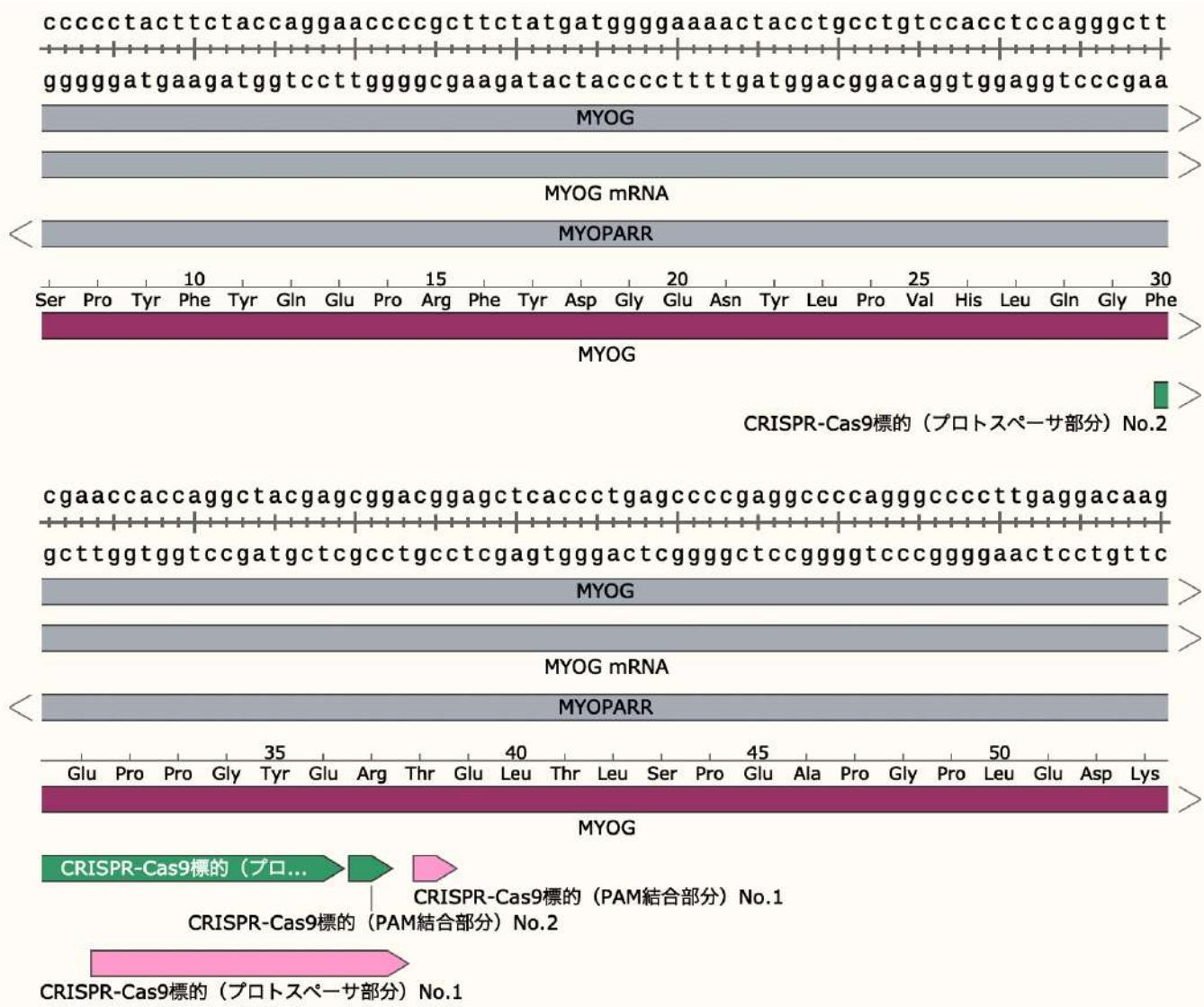
◦ Microhomology : 該当の変異パターンでつながる小さな相同配列（マイクロホモロジー配列）です。

◦ Deletion Length : 該当の変異パターンで引き起こされる欠失長を表します。

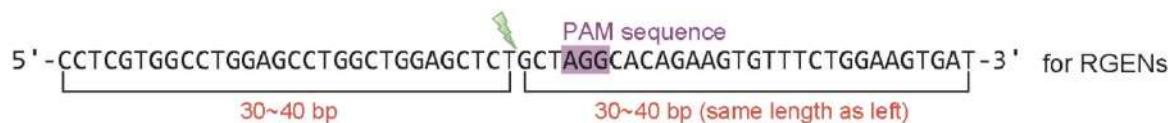
◦ Pattern Score : 該当の変異パターンの起こりやすさを表します。

【使用例】Microhomology-Predictorを使って、ノックアウト結果を予測して標的を決定する

1. 今回はMYOG遺伝子の標的配列"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG" (No.1 : ピンク色) と"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG" (No.2 : 緑色) を例にとって、どちらがノックアウトに相応しそうか調べてみます。



2. まず標的配列ごとに配列を入力します。Microhomology-Predictorは入力配列のちょうど真ん中に切断サイトがくるように入力しなければちゃんと使えません。野生型SpCas9を使う場合、切断サイトはPAM結合サイトの5'末端から3塩基上流になります。したがって以下の手順で入力配列を作っていきましょう。



- ゲノム情報をSnapGeneViewerを開き、標的配列を検索します。

cgaaccaccaggctacgagccggacggagactcaccctgagccccgaggccccaggcccctt gaggacaag
gcttgggtggtcgcatgctcgctcgctcgactgggactcgggctccgggtccggggactcctgttc
MYOG mRNA
MYOPARR
MYOG
Glu Pro Pro Gly Tyr Glu Arg Thr Glu Leu Thr Leu Ser Pro Glu Ala Pro Gly Pro Leu Glu Asp Lys
CRISPR-Cas9標的 (プロ...> CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分) No.1
CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分) No.2
CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーサ部分) No.1

- 以下のようにSnapGeneViewerで切断面を記録します。先ほども述べたように野生型SpCas9の場合、切断サイトはPAM結合サイトの5'末端から3塩基上流になります。

Find DNA sequence: ACCACCAGGCTACGAGCCGGACGG 1 match Previous Next

SnapGene Viewer File Edit View Enzymes Features Primers Actions Tools Window Help A Romaji Sun Aug 8 14:23

Add Feature... Edit Feature... Duplicate Feature... Remove Feature... Create Feature Segment... Delete Feature Segment... Merge Feature Segments... Add Cleavage Site... Remove Cleavage Site... Feature Color... Introns Codons Show or Hide Features Show or Hide Feature Types... Sort Feature List... Import Features Export Feature Data... Detect Common Features... Add to Common Features... Browse Common Features Features Tutorial Video

Insertion Point: 160

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001

Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# # Description Panel

切断面を左クリックして"!"をあわせます。この状態で"Features->"Add Cleavage Site..."を選択します。

The screenshot shows the SnapGene Viewer interface with a DNA sequence titled "MYOG遺伝子.dna (Linear / 2884 bp)". The sequence is annotated with features: MYOG mRNA, MYOPARR, and MYOG. A protein sequence for MYOG is shown below the mRNA. A context menu is open, displaying options related to CRISPR-Cas9 cleavage sites. The "OK" button is highlighted.

Add Cleavage Site

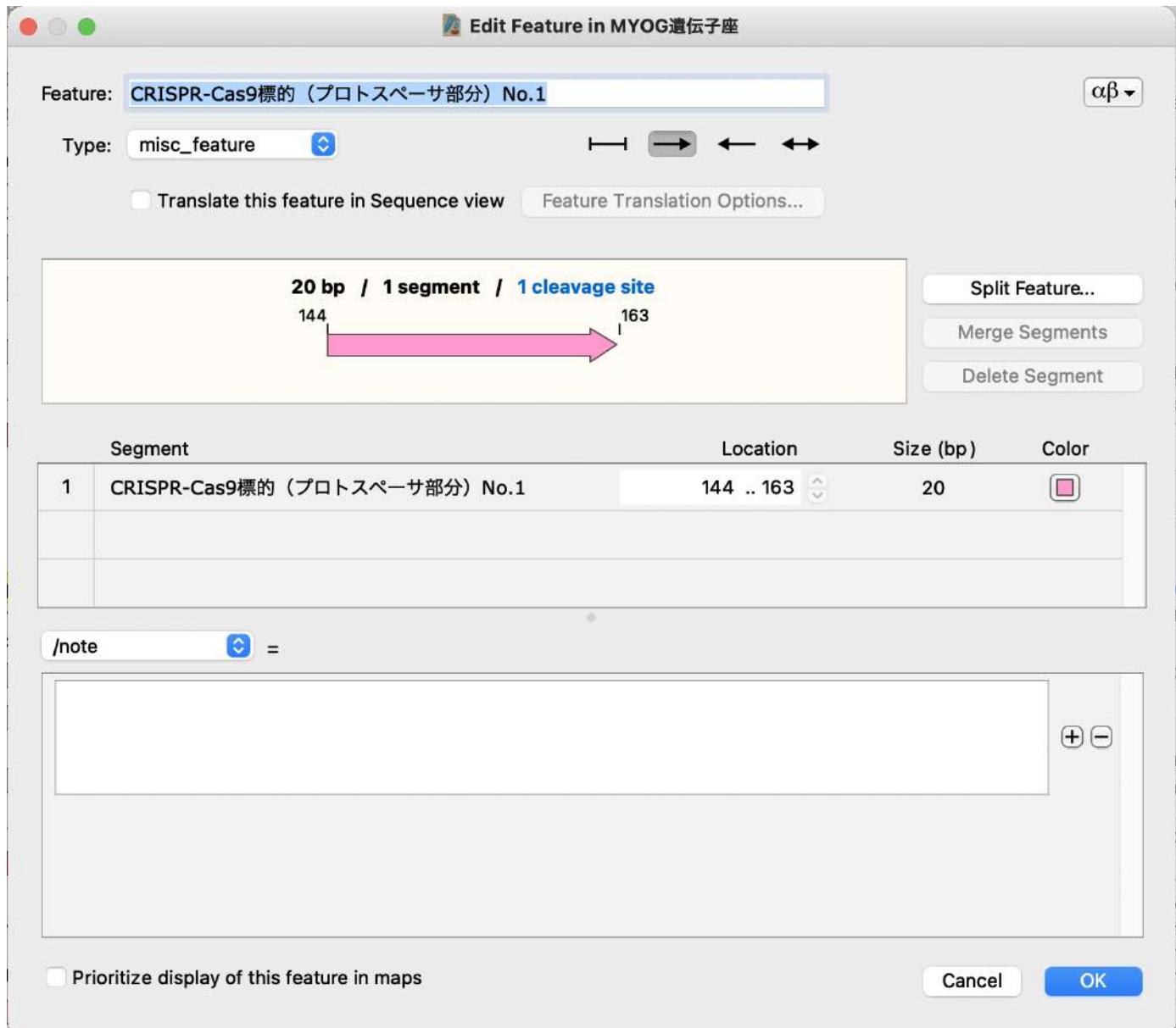
Add a cleavage site to which feature?

- CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分)
- CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーサー)
- MYOG

Comments:

REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2.
On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_00001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly
The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

切断面を登録するフィーチャーを尋ねられますので、"CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーサ部分) No.1"を選択します。



フィーチャー設定画面がでてくるのでOKを押します。完了すると、"CRISPR-Cas9標的（プロトスペーサ部分）No.1"のフィーチャー表示に"↑"マークがつけられます。これ

が切断面の表示です。

The screenshot shows the SnapGene Viewer interface with the following details:

- Title:** MYOG遺伝子.dna (Linear / 2884 bp)
- Sequence:** Natural DNA, Source: Homo sapiens (human), Sequence Class: UNA - unannotated.
- Description Panel:** Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly. Created: Today, Last Modified: Today. Accession Number: NC_000001, Code Number: NCPD.
- Annotations:** CRISPR-Cas9 sites are highlighted with arrows and labels: "CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーサ部分) No.2" (green arrow), "CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分) No.1" (pink arrow), and "CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーザ部分) No.1" (pink arrow).
- Protein Translations:** MYOG, MYOG mRNA, and MYOPARR are shown with their amino acid sequences below them.
- Search Bar:** Find DNA sequence: ACCACCAAGGCTACGAGCGGACGG.
- Bottom Navigation:** Map, Enzymes, Features, Primers, History, Description Panel (checked).

- 以下のように切断面から5'方向40bpに"Left_reference"というフィーチャーをつきます。

The screenshot shows the SnapGene Viewer interface with the following changes:

- Selected Region:** 121 .. 160 = 40 bp [65% GC]
- Annotations:** A blue selection bar highlights the 40bp region from position 121 to 160.
- Comments:** REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

5'方向40bpの配列をドラッグして、"Features"->"Add Features..."をクリックします。

Edit Feature in MYOG遺伝子座

Feature: **Left_reference No.1**

Type: misc_feature ↔

Translate this feature in Sequence view Feature Translation Options...

40 bp / 1 segment

121  160

Split Feature...
Merge Segments
Delete Segment

Segment	Location	Size (bp)	Color
1 Left_reference No.1	121 .. 160	40	

/note ↔ =

Prioritize display of this feature in maps Cancel OK

フィーチャー名を入力してOKを押します。好みで色をつけておくとわかりやすいです。

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# # Annotation Provider: NCBI Description Panel

フィーチャーが反映されます。

- 切断面から3'方向40bpに"Right_reference"というフィーチャーをつきます。

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

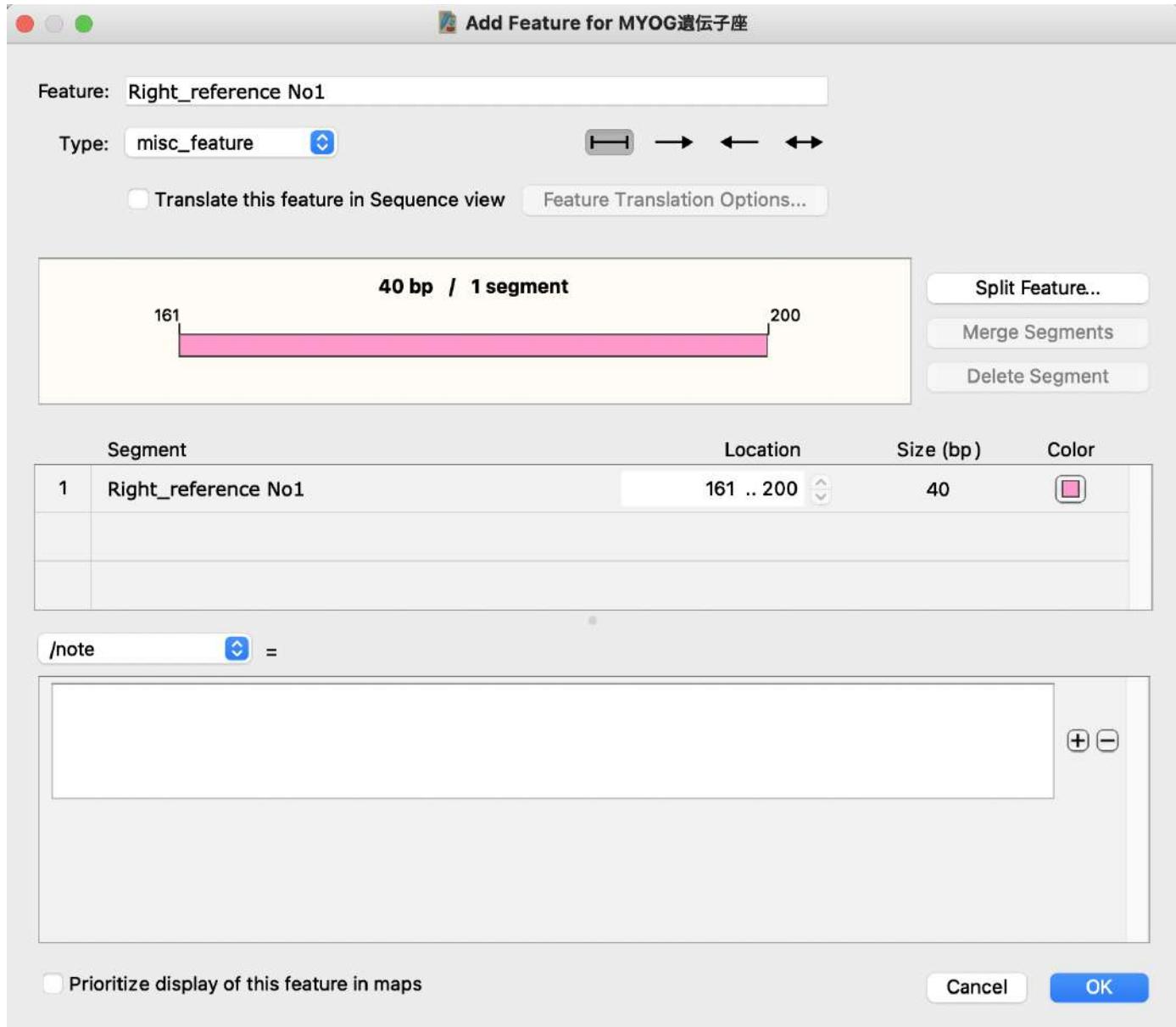
Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# # Annotation Provider: NCBI Description Panel

3'方向40bpの配列をドラッグして、"Features"->"Add Features..."をクリックします。



Selected: Right_reference No1 (161 .. 200 = 40 bp) [78% GC]

MYOG 遺伝子.dna (Linear / 2884 bp)

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# Annotation Provider: NCBI

フィーチャーが反映されます。

・"Left_reference"と"Right_reference"の部分をドラッグして、配列をまとめてコピーします。そしてその配列をサイトに入力します。

Selected: 121 .. 200 = 80 bp [71% GC]

MYOG 遺伝子.dna (Linear / 2884 bp)

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# Annotation Provider: NCBI

Cut Copy Top Strand Bases ⌘C

標的配列が"ACCACCAAGGCTACGAGCGGACGG"の入力配列：

cctgtccacccaggcttcgaaccaccaggctacgagcgacggagctaccctgagccccgaggccccatggccccc

The screenshot shows the CRISPR RGEN Tools interface in a browser window. At the top, there's a navigation bar with links like 'About', 'Cas-OFFinder', 'Microhomology', etc. Below the navigation bar, there's a section titled '1. Calculating microhomology-associated scores for all engineered nucleases [ZFNs, TALENs, RGENs (Cas9 RNA-guided endonucleases), etc.]'. It displays three examples of target sequences:

- e.g.) 5' -TGTGGCAACATGCTGGTACCTCATCTGATAAACTGCAGAGCTGAAGAGCATGAC-3' for ZFNs
- 5' -GAACTAGACCCCCGCCACAGCAGCCCTCTGAAGTTGGACAGCAAAACATTGCTTCACTAC-3' for TALENs
- 5' -CCTCGTGGCTGGAGCCTGGCTGGAGCTCTAGGCACAGAACAGTGGAAAGTGAT-3' for RGENs

Each sequence diagram shows the 'Left half-site' and 'Right half-site' separated by a PAM sequence. Below the sequences, it says '30~40 bp' and '30~40 bp (same length as left)'. In the main input field below, the sequence 'cctgtccacccaggcttcgaaccaccaggctacgagcgacggagctaccctgagccccgaggccccatggccccc' is entered. There are 'Add' and 'Submit' buttons.

2. (Additional Method for RGENs) Searching for RGEN targets & calculating microhomology-associated scores

Insert any sequence (e.g. exon) where you want to search for RGEN (SpCas9) target sites (5000nt or less, A, G, C, T only)
(The sequence length used for calculating microhomology-associated scores is fixed to 60nt):

一つの配列を入力したら、"Add"をクリックして入力フォームを追加して、次の配列を入力します。

標的配列が"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"の入力配列：

cctgcgttccacccaggcttcgaaccaccaggctacgagcgacggagctaccctgagccccgaggccccatggccccc

The screenshot shows the CRISPR RGEN Tools interface in a browser window. At the top, there's a navigation bar with links like 'About', 'Cas-OFFinder', 'Microhomology', etc. Below the navigation bar, there's a section titled '1. Calculating microhomology-associated scores for all engineered nucleases [ZFNs, TALENs, RGENs (Cas9 RNA-guided endonucleases), etc.]'. It displays three examples of target sequences:

- e.g.) 5' -TGTGGCAACATGCTGGTACCTCATCTGATAAACTGCAGAGCTGAAGAGCATGAC-3' for ZFNs
- 5' -GAACTAGACCCCCGCCACAGCAGCCCTCTGAAGTTGGACAGCAAAACATTGCTTCACTAC-3' for TALENs
- 5' -CCTCGTGGCTGGAGCCTGGCTGGAGCTCTAGGCACAGAACAGTGGAAAGTGAT-3' for RGENs

Each sequence diagram shows the 'Left half-site' and 'Right half-site' separated by a PAM sequence. Below the sequences, it says '30~40 bp' and '30~40 bp (same length as left)'. In the main input field below, the sequence 'cctgcgttccacccaggcttcgaaccaccaggctacgagcgacggagctaccctgagccccgaggccccatggccccc' is entered. There are 'Add' and 'Submit' buttons.

2. (Additional Method for RGENs) Searching for RGEN targets & calculating microhomology-associated scores

Insert any sequence (e.g. exon) where you want to search for RGEN (SpCas9) target sites (5000nt or less, A, G, C, T only)
(The sequence length used for calculating microhomology-associated scores is fixed to 60nt):

3. Submitを押します。

The screenshot shows a Chrome browser window with the URL rgenome.net/micr-calculator/. The page title is "CRISPR RGEN Tools". A prominent button at the top right says "Submit". Below it, a message reads: "Click on target sequence to show predicted patterns." A note below states: "To avoid unwanted in-frame deletions in a protein-coding sequence as much as possible, one should choose target sites with high out-of-frame scores. A score above 66 is recommended." A table displays two target sequences with their scores:

Target	Microhomology Score	Out-of-frame Score
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCAACCACCAAGGCTACGAGCGGACGGAGCTACCCCTGAGCCCCGAGGGCCAGGGCCCT	7677.5	72.31911429501791
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCAACCACCAAGGCTACGAGCGGACGGAGCTACCCCTGAGCCCCGAGGGCCAGGGC	7107.900000000001	75.53145092080644

At the bottom, a footer note says: "This website is maintained by Molecular Genome Engineering Lab, Hanyang University, Korea. [Contact Us](#)".

5. 配列をクリックすると、予測されるMMEJ欠失パターンが表示されます。変異パターンはその起こりやすさの順で並べられています。標的の"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"の場合はトップに9塩基欠失というフレームイン型変異があり、一方で標的"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"の場合はトップ8までの変異が全てフレームシフト型の変異となっています。この結果では"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"のほうがノックアウト標的としては適しているそうです。

CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT		7677.5	72.31911429501791
Wild Type			
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGC-----TCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GAGC	9	446.6
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGC-----GAGTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	ACG	8	335.0
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGC-----CCGAGGCCAGGGCCCT	GAGC	20	257.5999999999997
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----ACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GG	10	242.7999999999998
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GA	5	233.7000000000002
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GCT	16	224.5
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACC-----CTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	CACC	25	200.9
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----AGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	GG	14	198.8
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----GCCAGGCCCT	CGAG	27	181.3
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCAC-----GGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AC	16	134.7
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCAC-----CTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AG	17	128.1
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AC	17	128.1
CCTGTCCACCTCCAGGGCTTC-----GAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	CG	23	126.8
-----CTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGCCCT	AC	20	123.5
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	7107.900000000001	75.53145092080644	

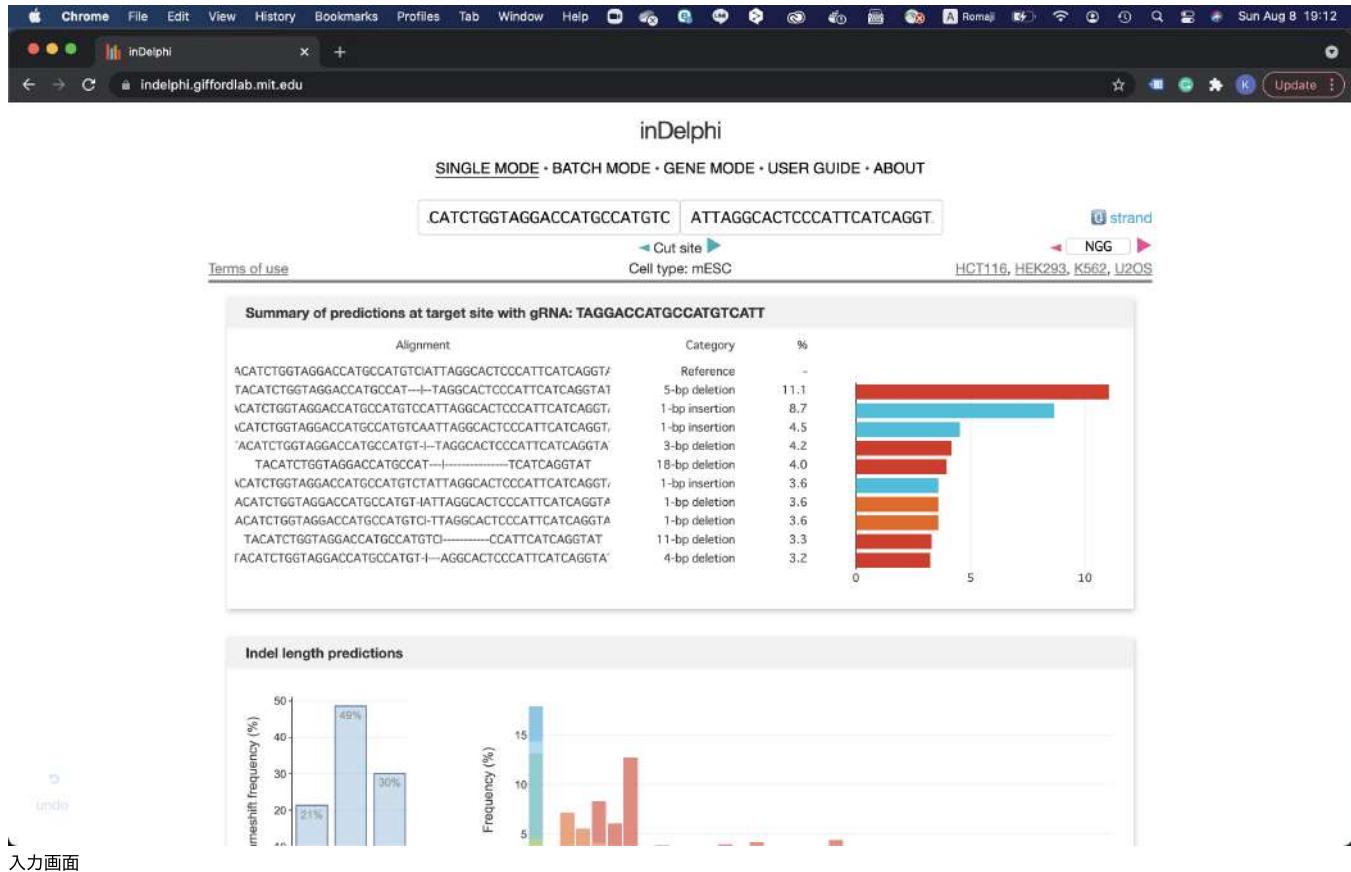
Predicted Patterns	Microhomology	Deletion Length	Pattern Score
Wild Type			
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGGCTACGAGCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC			
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----GGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	GC	7	282.0
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----ACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	GG	10	242.7999999999998
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	GCT	16	224.5
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	AG	8	201.0
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----GGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	AC	8	201.0
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACC-----CTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	CACC	25	200.9
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----AGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	GG	14	198.8
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTC-----GACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	CG	19	154.8
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGA-----GCGGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	GA	15	141.6
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCAC-----GGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	AC	16	134.7
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGG-----GGACGGAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	GC	22	133.2000000000002
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	AG	17	128.1
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACCACCAGG-----CCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	AC	17	128.1
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTC-----GAGCTCACCTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	CG	23	126.8
CCTGCCTGTCCACCTCCAGGGCTTCGAACC-----CTGAGCCCCGAGGCCAGGGC	ACC	28	123.5

補足ですが、標的の選定は変異パターンだけでなく、オフターゲット率なども含めて総合的に判断するのが理想的です。今回のようにどちらも"Out-of-frame Score"が66以上であるという場合はオフターゲット率や次に紹介する"inDelphi"のような別ツールでの判定結果を判断材料にしてもいいでしょう。各自の実験デザインに応じて判断していくのがよいのではないかと思います。

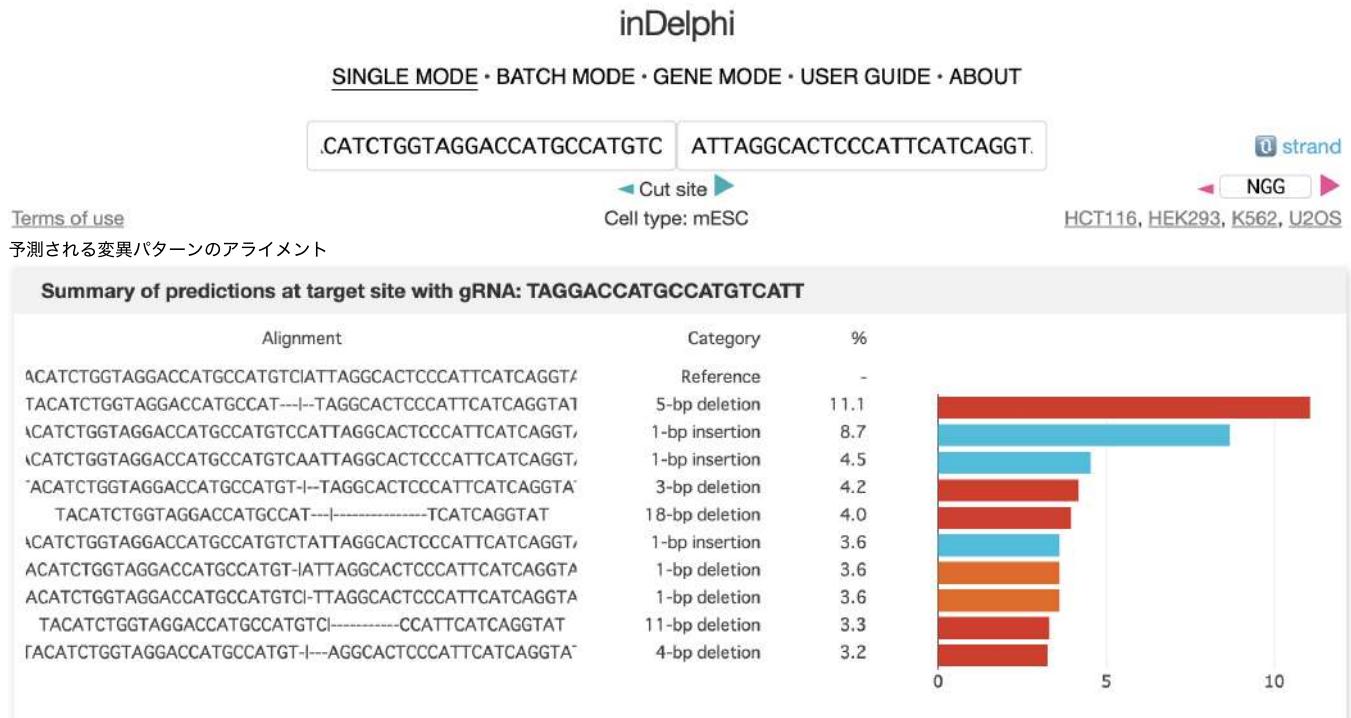
- CRISPR-Cas9によるDSBによって引き起こされる一塩基挿入・欠失変異パターンを予測するツール

- <https://indelphi.giffordlab.mit.edu>

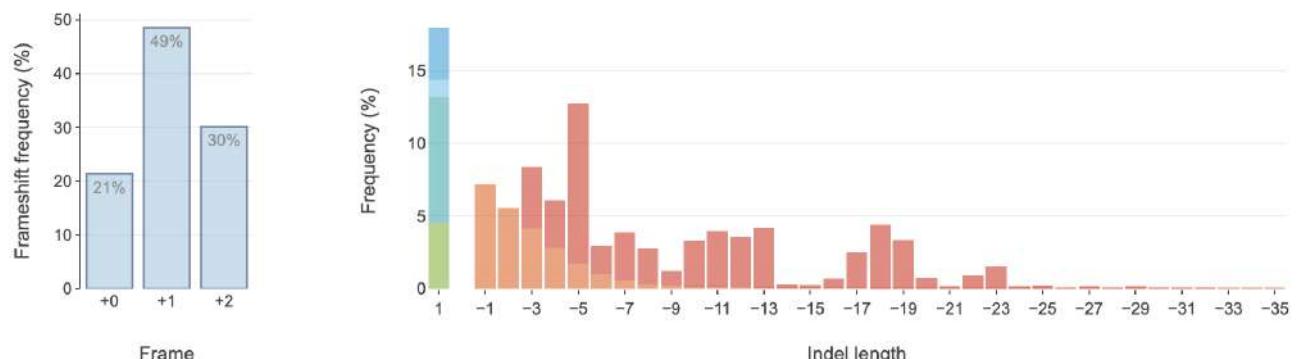
- 論文リンク ページ画面



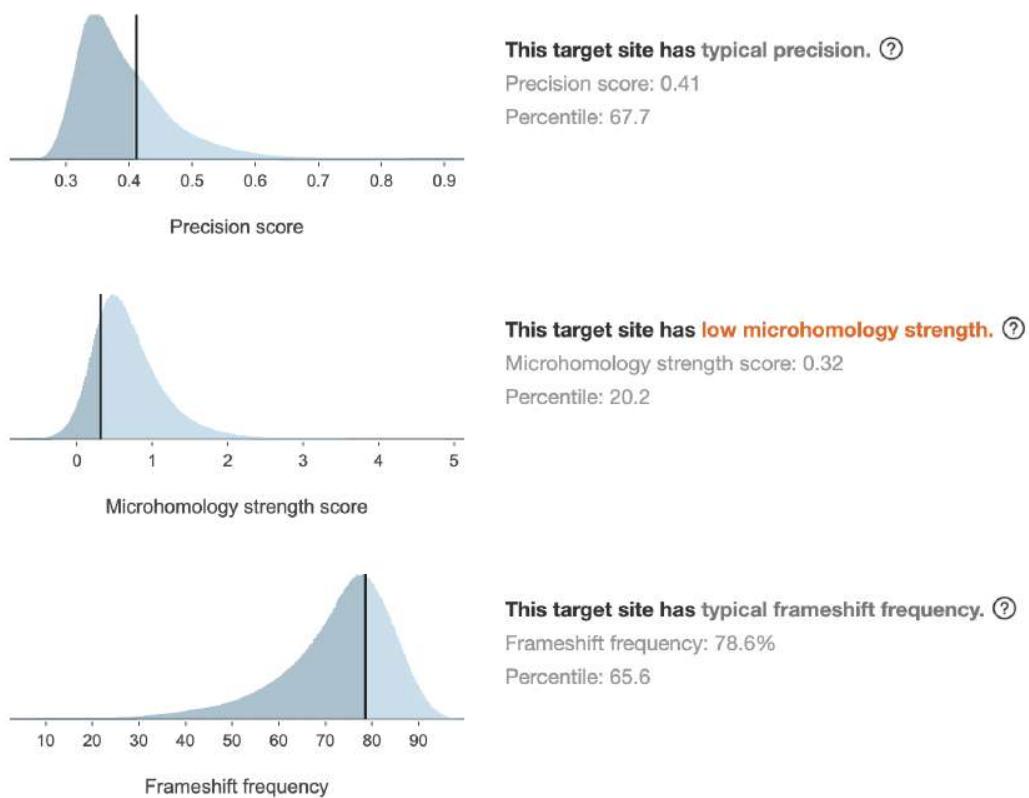
入力画面



予測される変異パターンのヒストグラム

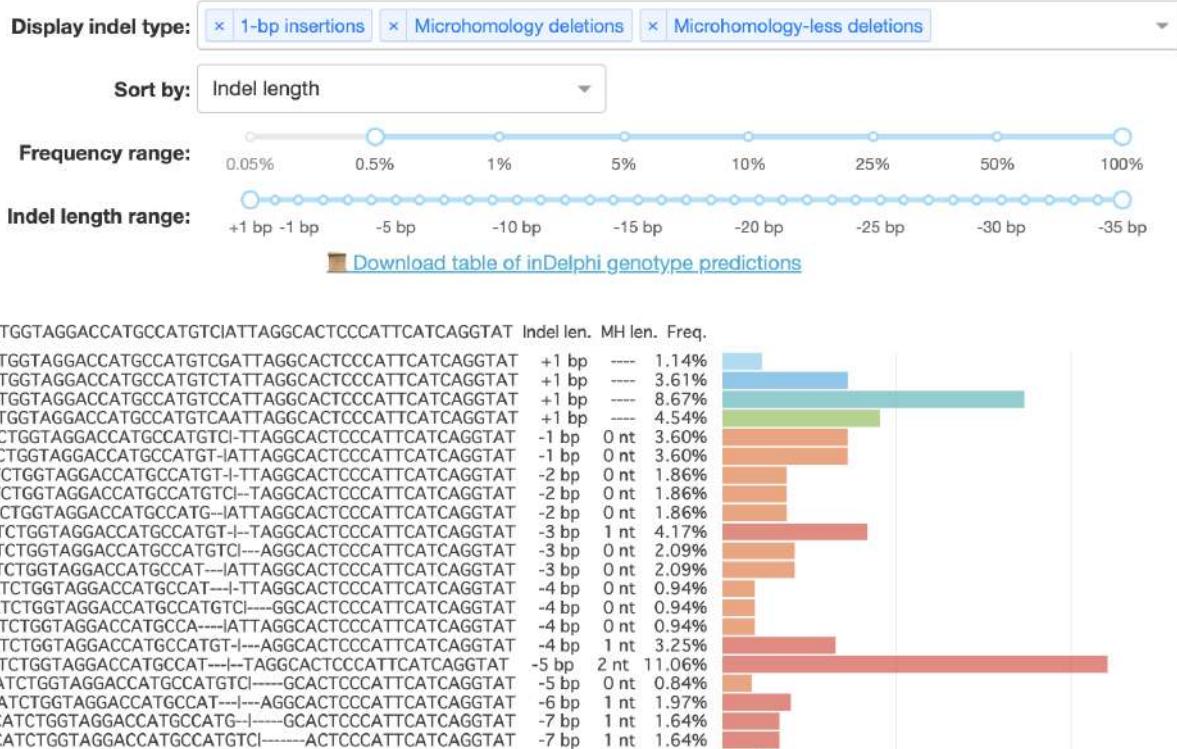
Indel length predictions[🔗 Shareable link to your results](#)

過去データとの比較（予測結果の評価）

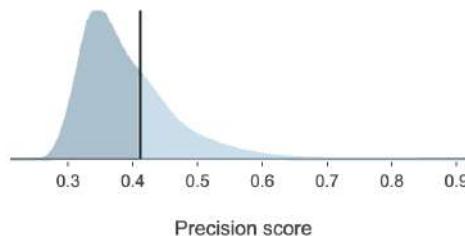


予測変異パターンの一覧

All predictions of 1-bp insertion and 1- to 60-bp deletion events



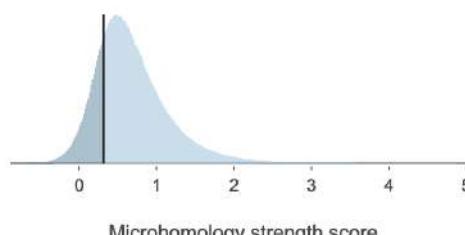
- "Comparison to predictions at 13,273,449 SpCas9 target sites in human exons and introns"の見方



This target site has typical precision. ⓘ

Precision score: 0.41

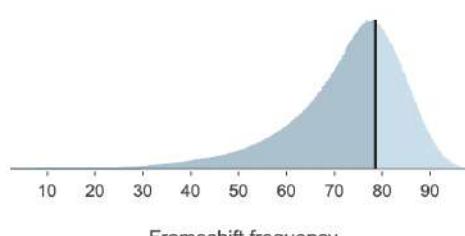
Percentile: 67.7



This target site has low microhomology strength. ⓘ

Microhomology strength score: 0.32

Percentile: 20.2



This target site has typical frameshift frequency. ⓘ

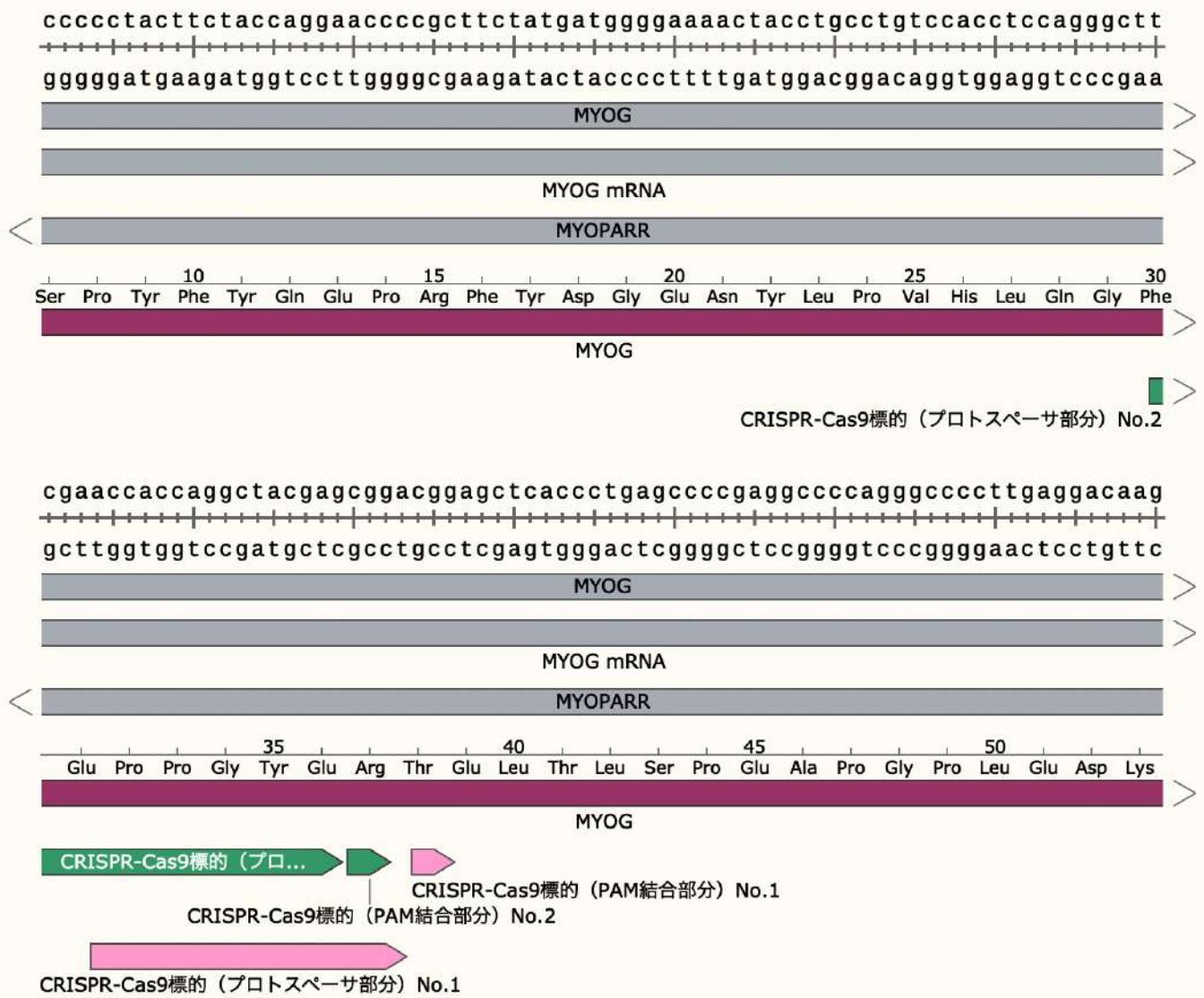
Frameshift frequency: 78.6%

Percentile: 65.6

- "Precision score"は変異の多様度予測したものとなります。この値が高いと細胞集団に対してゲノム編集した際に単一、もしくは少数の変異パターンに収束しやすいことを示します。もしこれが低いとモザイク度の高い編集となる可能性があります。
- "Microhomology strength score"はマイクロホモロジー配列を介した変異が起こりやすいかどうかを示します。これが低い場合はNHEJ修復のようなマイクロホモロジー配列を介さないランダム性の高い変異が出現しやすくなると考えられます。
- "Frameshift frequency"はインデルによるフレームシフトの起こりやすさを示します。

【使用例】inDelphiを使って、ノックアウト結果を予測して標的を決定する

- 今回はMYOG遺伝子の標的配列"ACCACCAAGGCTACGAGCGGACGG"（No.1：ピンク色）と"TCGAACCACCAAGGCTACGAGCGG"（No.2：緑色）を例にとって、どちらがノックアウトに相応しそうか調べてみます。



2. 標的配列ごとに配列を入力します。inDelphiは切断面を境界として5'側、3'側配列（各40bp程度を推奨）を入力する必要があります。

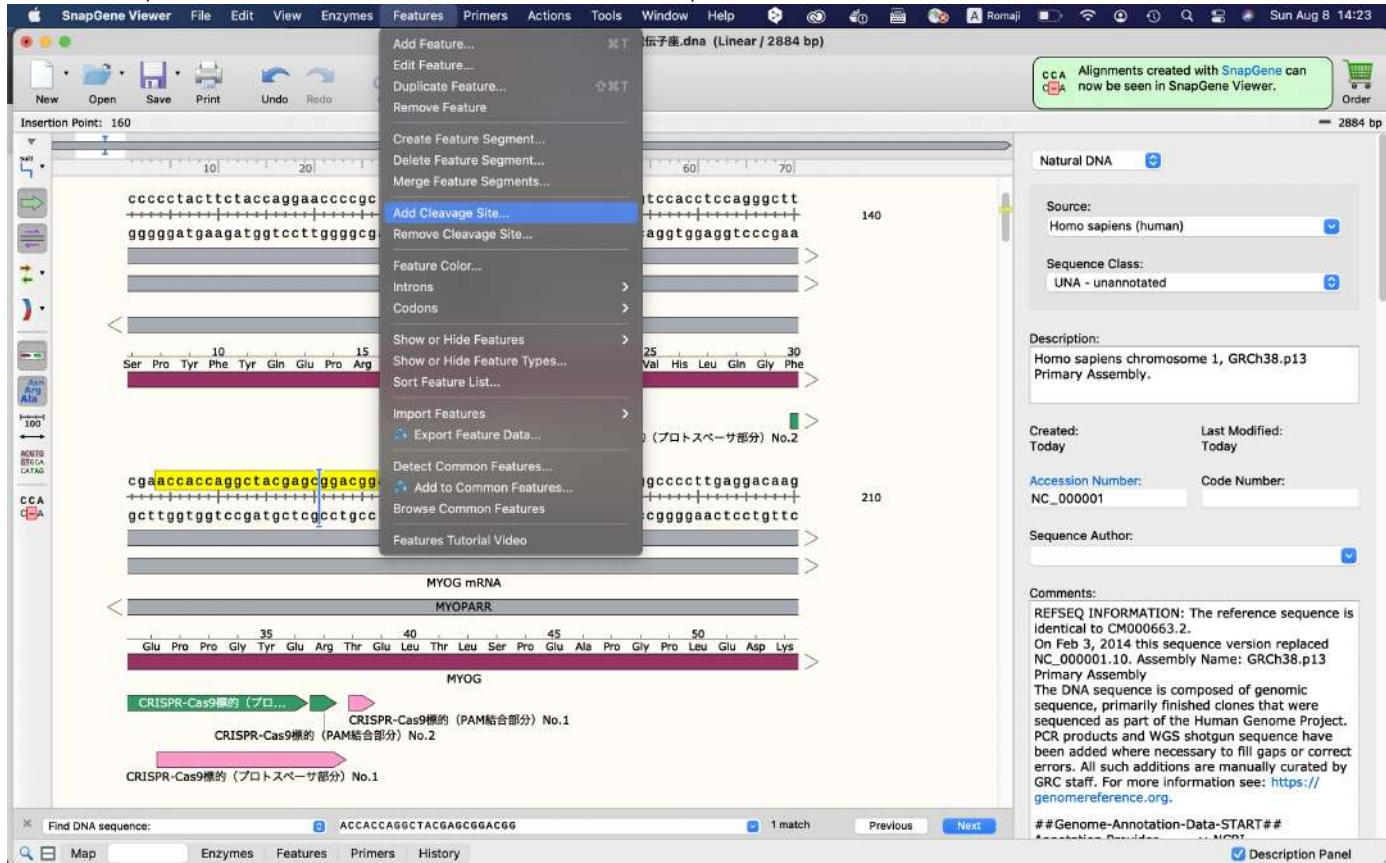
- ゲノム情報をSnapGeneViewerを開き、標的配列を検索します。

The screenshot shows the MYOG gene and mRNA sequences in SnapGeneViewer. The gene sequence is 210 bp long. Two PAM sequences are highlighted: CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分) No.1 at position 35 and CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分) No.2 at position 45. The protospacer regions are also indicated. The MYOG mRNA sequence is shown below the gene, along with the MYOPARR sequence for reference. A search bar at the bottom indicates a match found.

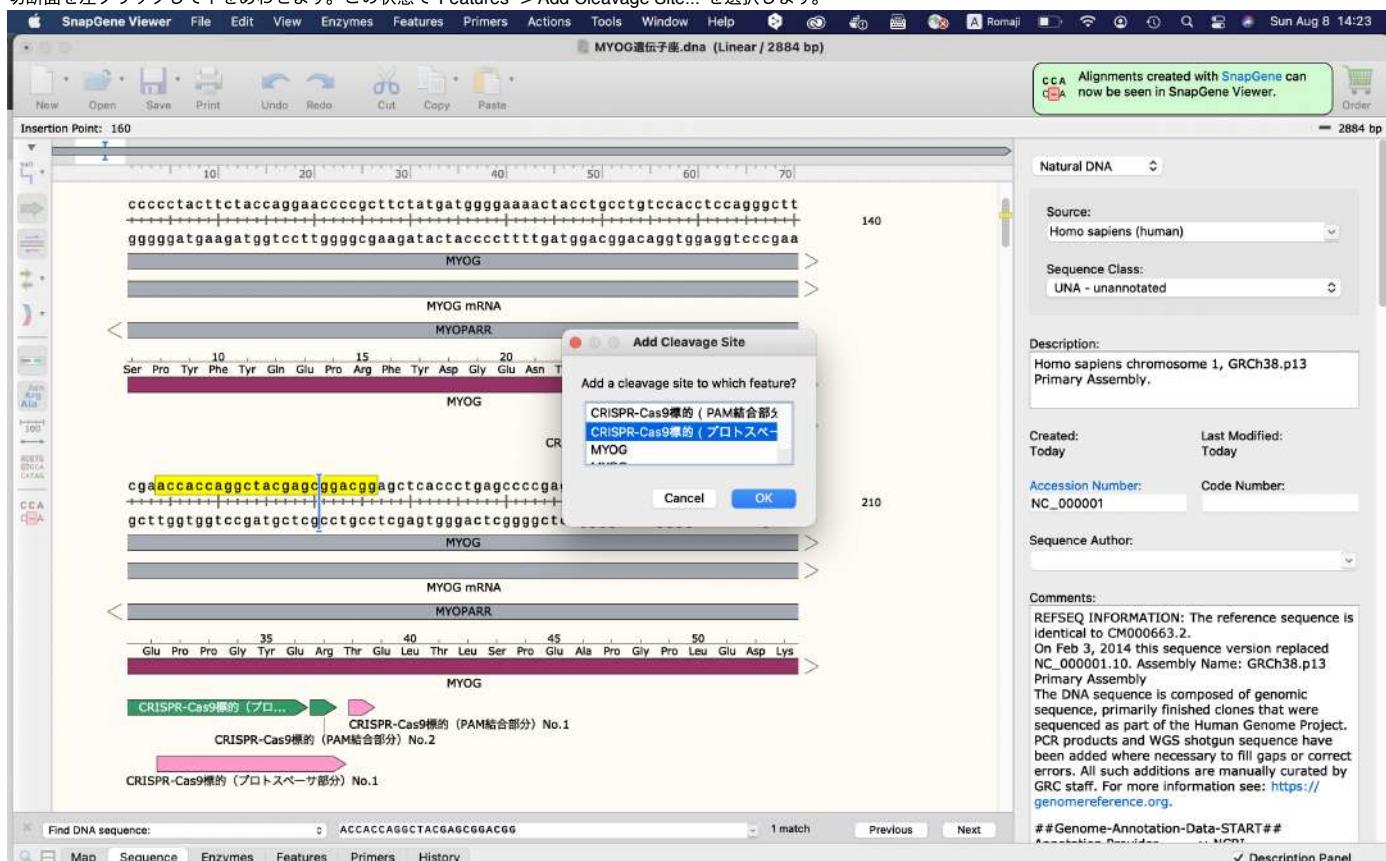
Find DNA sequence: ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG

1 match

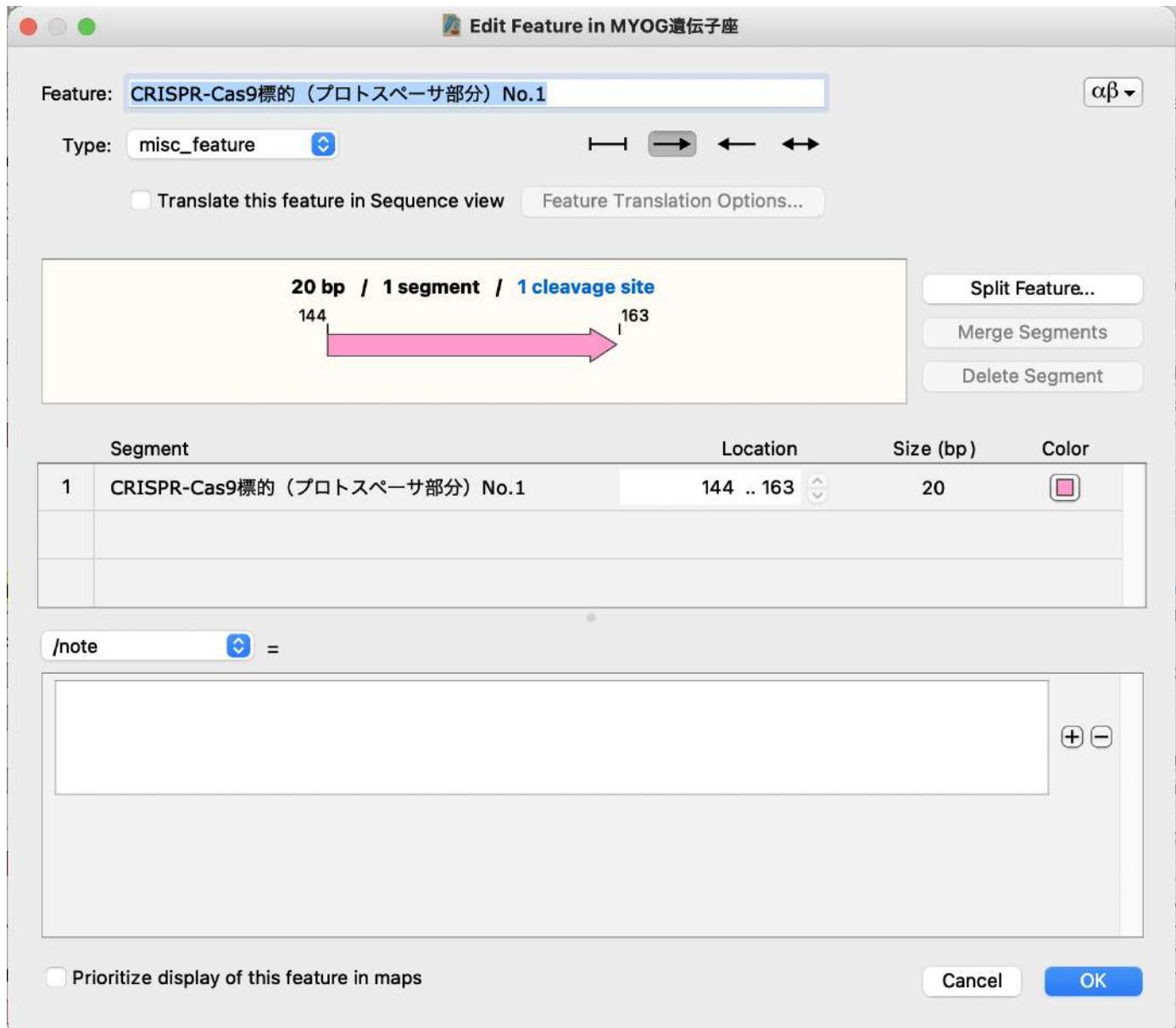
・以下のようにSnapGeneViewerで切断面を記録します。先ほども述べたように野生型SpCas9の場合、切断サイトはPAM結合サイトの5'末端から3塩基上流になります。



切断面を左クリックして"!"をあわせます。この状態で"Features"->"Add Cleavage Site..."を選択します。



切断面を登録するフィーチャーを尋ねられますので、"CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーサ部分) No.1"を選択します。



フィーチャー設定画面がでてくるのでOKを押します。完了すると、"CRISPR-Cas9標的（プロトスペーサ部分）No.1"のフィーチャー表示に"↑"マークがつけられます。これ

が切断面の表示です。

The screenshot shows the SnapGene Viewer interface with a DNA sequence titled "MYOG遺伝子.dna (Linear / 2884 bp)". The sequence is annotated with several features:

- MYOG:** A protein-coding gene spanning from position 10 to 30. Its amino acid sequence is shown below it.
- MYOG mRNA:** The complementary RNA strand.
- MYOPARR:** A pseudogene located below MYOG.
- CRISPR-Cas9:** Three CRISPR-Cas9 features are highlighted:
 - CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーザ部分) No.2:** Located between positions 140 and 210.
 - CRISPR-Cas9標的 (PAM結合部分) No.1:** Located at position 210.
 - CRISPR-Cas9標的 (プロトスペーザ部分) No.1:** Located at position 40.

The right panel displays detailed information about the sequence, including its source (Homo sapiens), sequence class (UNA - unannotated), and a description of the GRCh38.p13 Primary Assembly. It also shows creation and modification dates, accession numbers, and sequence authors.

- 以下のように切断面から5'方向40bpに"Left_reference"というフィーチャーをつきます。

This screenshot shows the same DNA sequence after a new feature has been added:

- Left_reference:** A feature labeled "Selected: 121 .. 160 = 40 bp [65% GC]" is highlighted in blue across the top of the sequence.
- CRISPR-Cas9:** The previously shown CRISPR-Cas9 features remain visible.

The right panel's detailed information remains the same as in the first screenshot.

5'方向40bpの配列をドラッグして、"Features"->"Add Features..."をクリックします。

Edit Feature in MYOG遺伝子座

Feature: **Left_reference No.1**

Type: misc_feature ↔

Translate this feature in Sequence view Feature Translation Options...

40 bp / 1 segment

121  160

Split Feature...
Merge Segments
Delete Segment

Segment	Location	Size (bp)	Color
1 Left_reference No.1	121 .. 160	40	

/note ↔ =

Prioritize display of this feature in maps Cancel OK

フィーチャー名を入力してOKを押します。好みで色をつけておくとわかりやすいです。

MYOG 遺伝子座.dna (Linear / 2884 bp)

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# # Annotation Provider: NCBI Description Panel

フィーチャーが反映されます。

- 切断面から3'方向40bpに"Right_reference"というフィーチャーをつきます。

MYOG 遺伝子座.dna (Linear / 2884 bp)

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

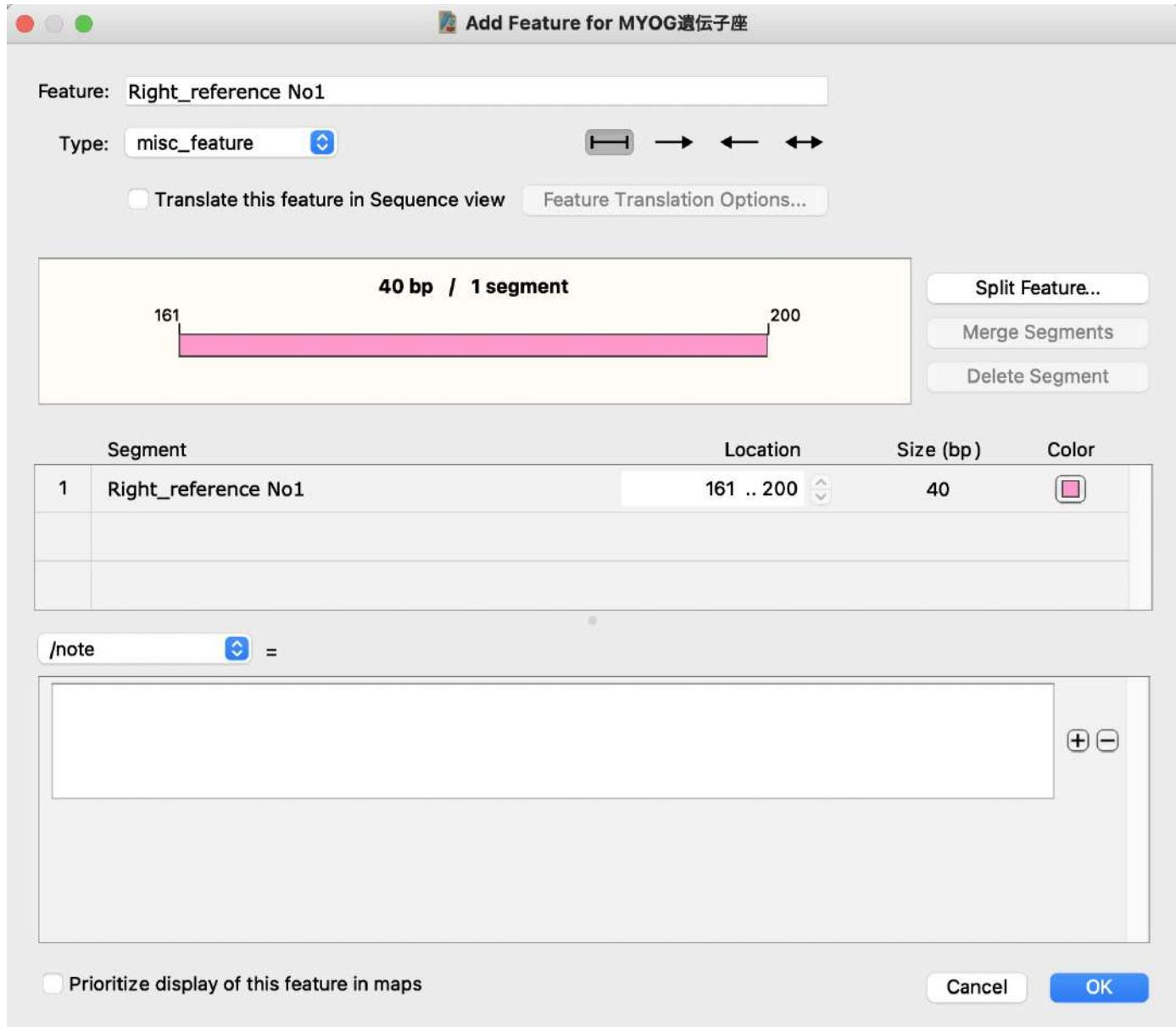
Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# # Annotation Provider: NCBI Description Panel

3'方向40bpの配列をドラッグして、"Features"->"Add Features..."をクリックします。



フィーチャー名を入力してOKを押します。好みで色をつけておくとわかりやすいです。

Selected: Right_reference No1 (161 .. 200 = 40 bp) [78% GC]

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# Annotation Provider: NCBI

フィーチャーが反映されます。

- "Left_reference"と"Right_reference"の部分をそれぞれドラッグして、配列をコピーします。そしてサイトの左側フォームと右側フォームに入力します。

Selected: 121 .. 200 = 80 bp [71% GC]

Natural DNA

Source: Homo sapiens (human)

Sequence Class: UNA - unannotated

Description: Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

Created: Today Last Modified: Today

Accession Number: NC_000001 Code Number:

Sequence Author:

Comments: REFSEQ INFORMATION: The reference sequence is identical to CM000663.2. On Feb 3, 2014 this sequence version replaced NC_000001.10. Assembly Name: GRCh38.p13 Primary Assembly. The DNA sequence is composed of genomic sequence, primarily finished clones that were sequenced as part of the Human Genome Project. PCR products and WGS shotgun sequence have been added where necessary to fill gaps or correct errors. All such additions are manually curated by GRC staff. For more information see: <https://genomereference.org>.

#Genome-Annotation-Data-START# Annotation Provider: NCBI

Cut Copy Top Strand Bases ⌘C

標的配列が"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"の入力配列：

左側フォーム : cctgtccaccctccagggcttcgaaccaccaggctacgagc

右側フォーム : ggacggagactcacccctgagccccgaggccccaggccccct

標的配列が"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"の入力配列：

左側フォーム : cctgcctgtccaccctccagggcttcgaaccaccaggctac

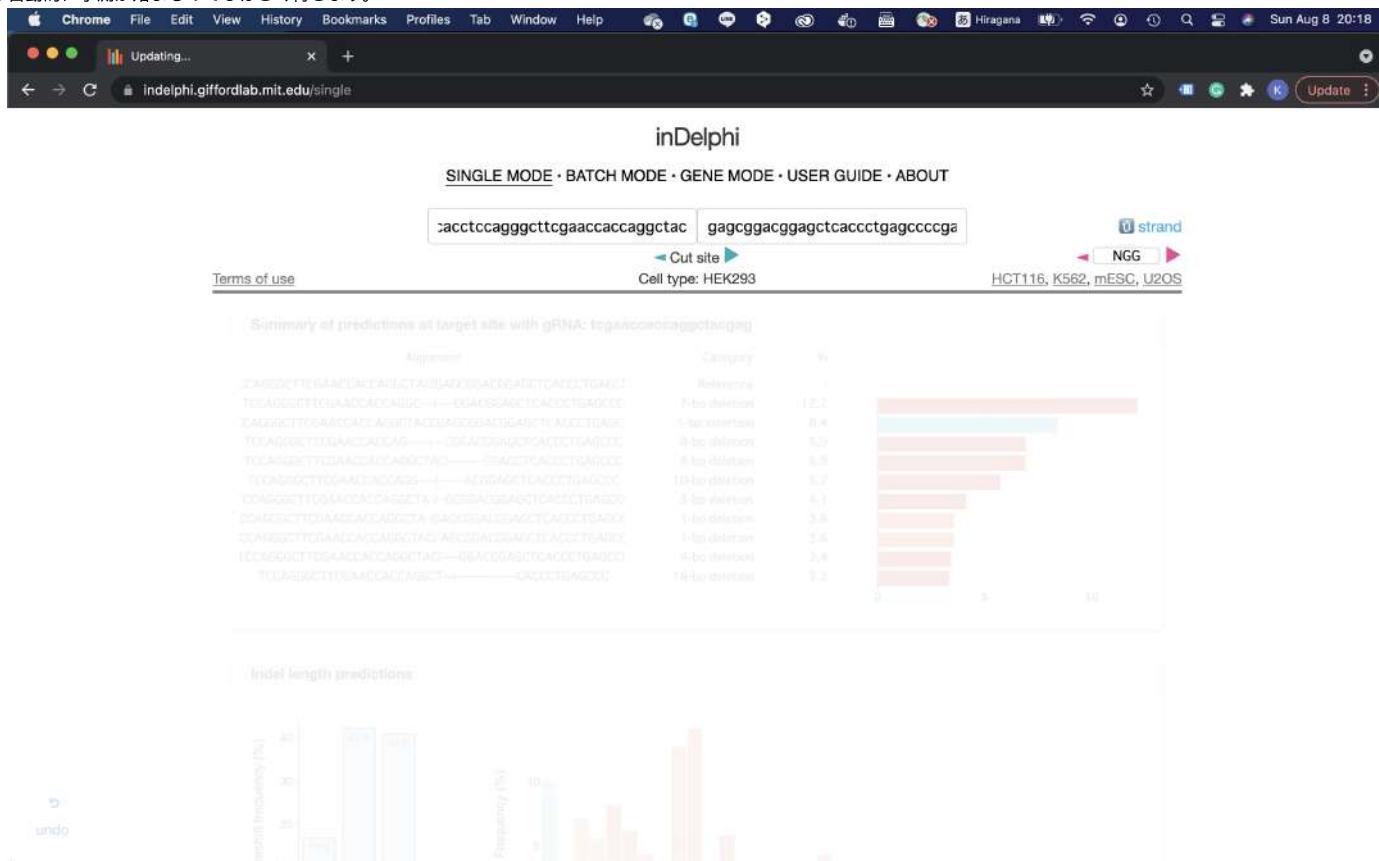
右側フォーム : gagcggacggagactcacccctgagccccgaggccccaggccc

3. PAM配列を指定します。今回は最も一般的なSpCas9の"NGG"とします。PAM配列：NGG

4. "HCT116", "HEK293", "K562", "U2OS", "mESC"の中でご自身が使われている細胞株をクリックします。今回はゲノム編集技術の基礎開発でよく使われる"HEK293"細胞株を選択します。

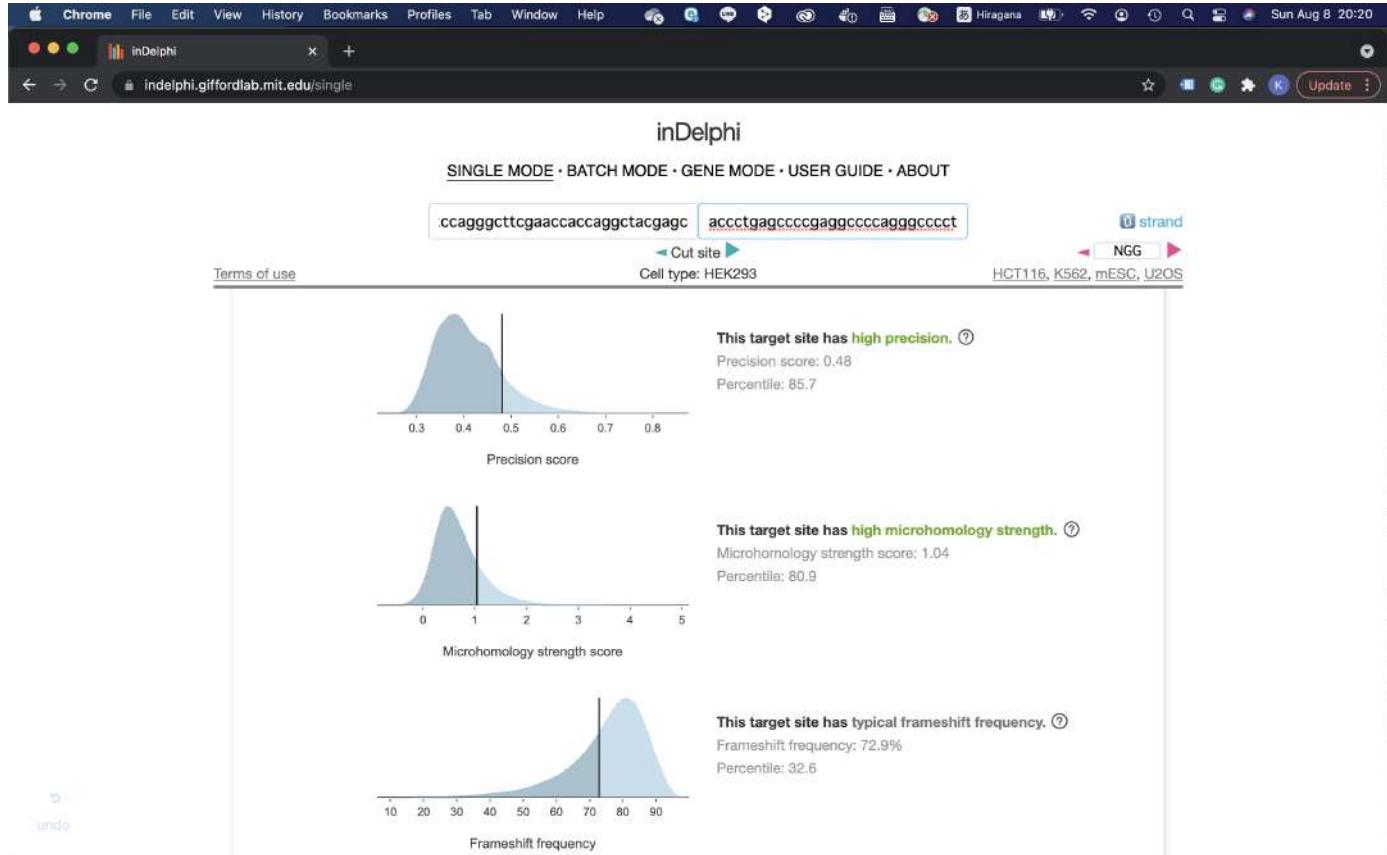
NGG
HCT116, HEK293, K562, U2OS

5. 自動的に予測が始まるのでしばらく待ちます。

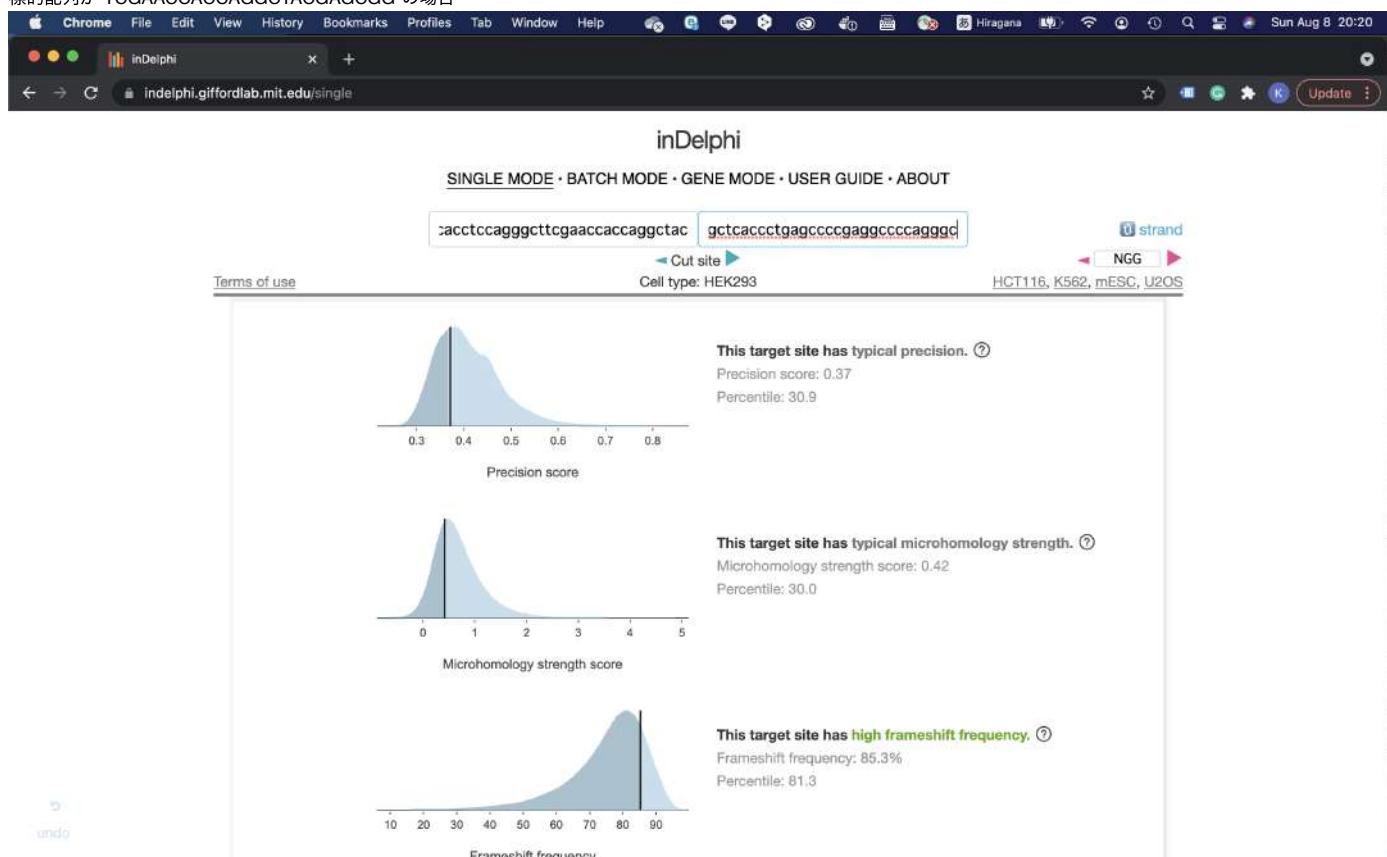


6. 結果が返ってきます。モザイク度を示す"Precision score"とフレームシフト発生率を示す"Frameshift frequency"に着目してみましょう。

- 標的配列が"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"の場合



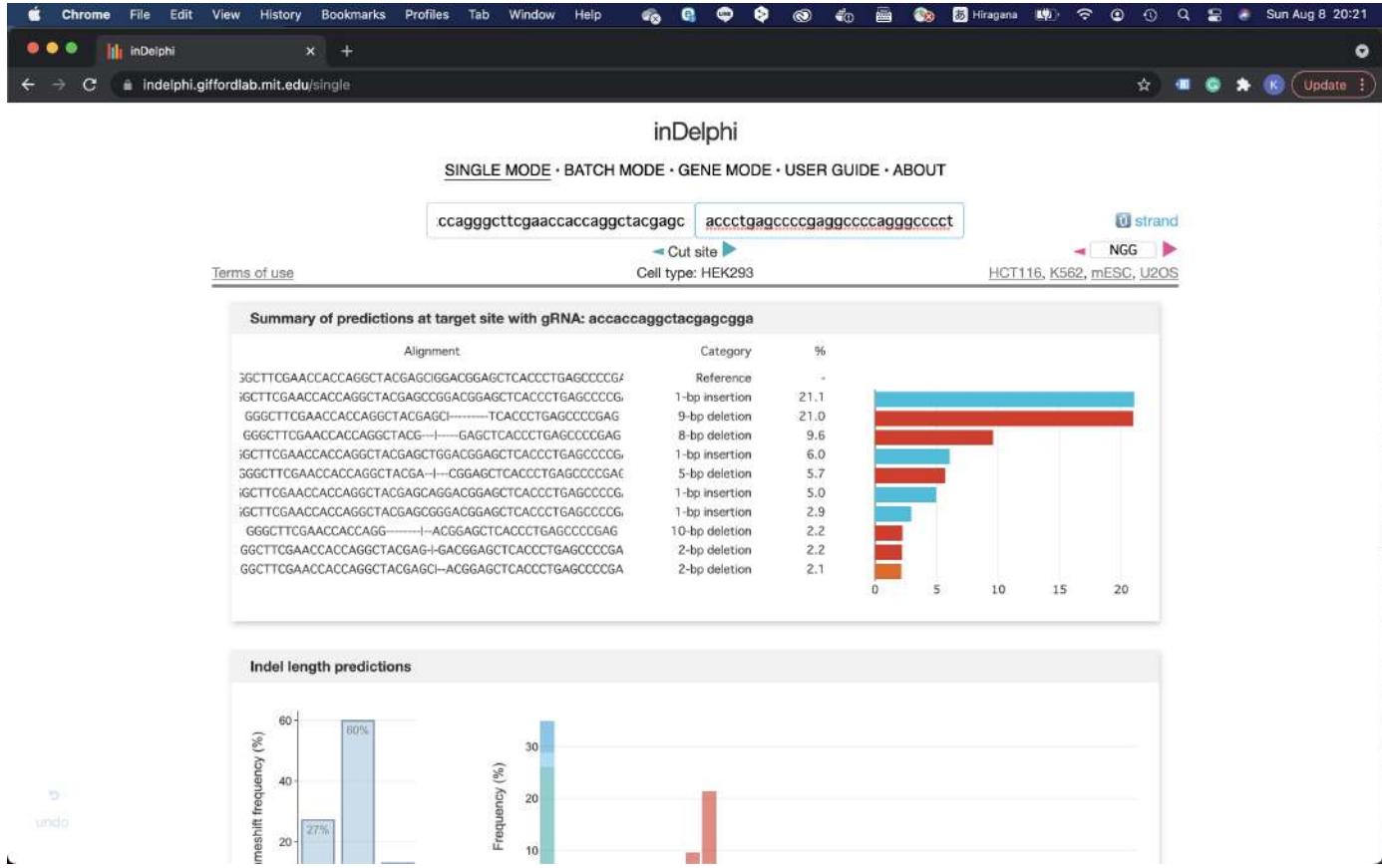
- 標的配列が"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"の場合



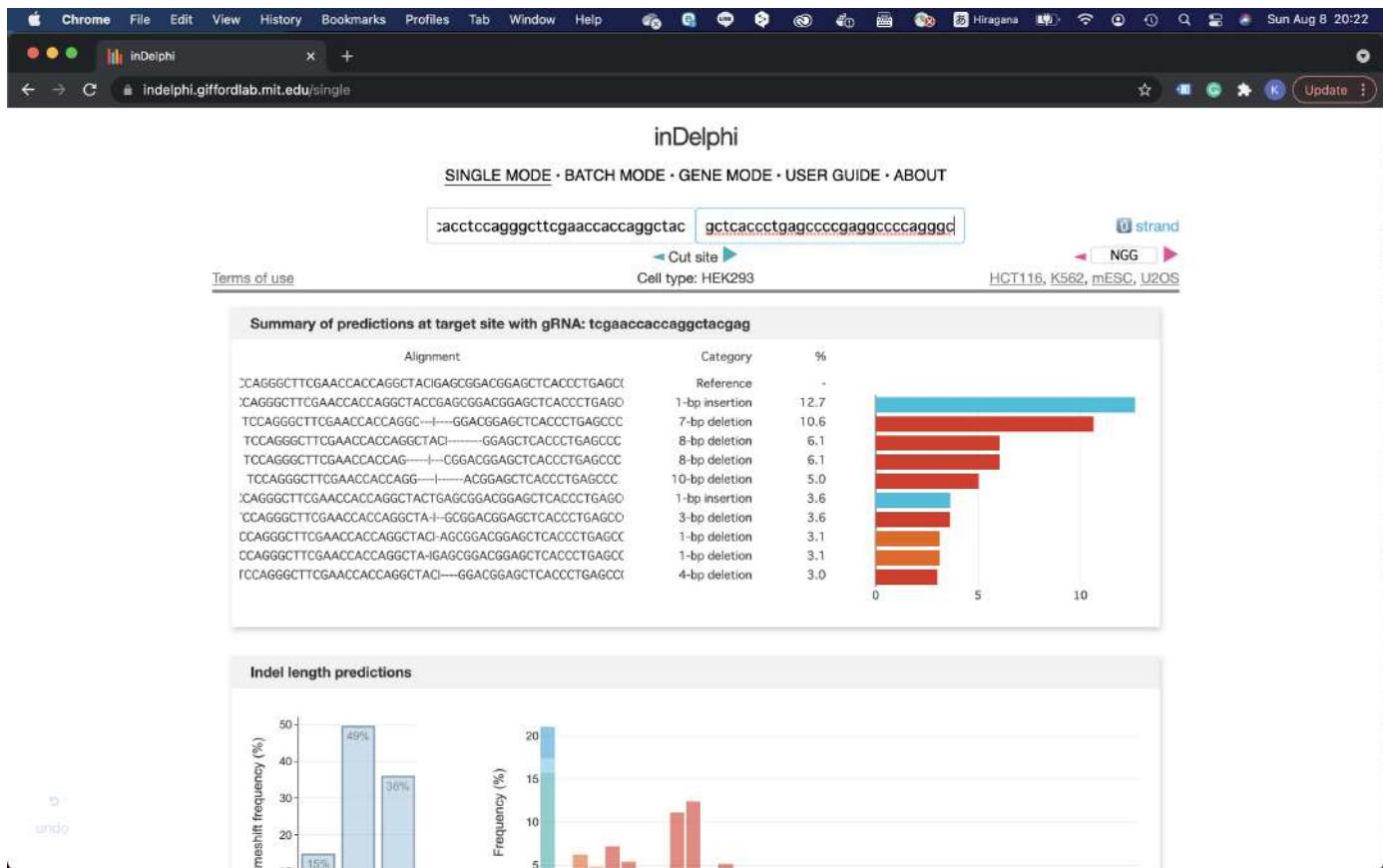
この結果をみるとどちらも極端な値の違いはありませんが、どちらかといえば"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"でモザイク度が低く、一方で"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"ではフレームシフト率が高いといえます。

7. 預測される変異パターンをみてみましょう。

- 標的配列が"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"の場合



- 標的配列が"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"の場合



これを見ると"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"では変異のうち1塩基挿入・9塩基欠失が>20%という結果がでています。一方で"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"では1塩基挿入が12.7%となっています。

- この情報からどちらの標的を選ぶことを考えます。もし実験の目的が「1塩基挿入したフレームシフト変異のクローニング株を数個取得したい」という場合は、モザイク性が低く1塩基挿入率が21.1%の標的"ACCACCAGGCTACGAGCGGACGG"と選ぶといいでしょう。一方で「変異パターンに拘らずフレームシフトした細胞を大量に得たい」という場合は、フレームシフト率が高い標的"TCGAACCACCAGGCTACGAGCGG"を選ぶ方がいいように考えられます。

もちろんこの指標では、そもそも変異導入率がどの程度なのかといった点やオフターゲットの多寡といった点をケアできていないのでそれらは別途調べる必要があります。変異導入率については、HEK293の場合は実際に実験をしてみてヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA : Heteroduplex Mobility Assay)等で大まかな導入率を確認してみてもいいかもしれません。こういったツールによる変異パターン予測とHMA (あるいは後述するTIDE解析) の結果を組み合わせることで、「全細胞のうちどれほどの細胞に変異が導入されるか?

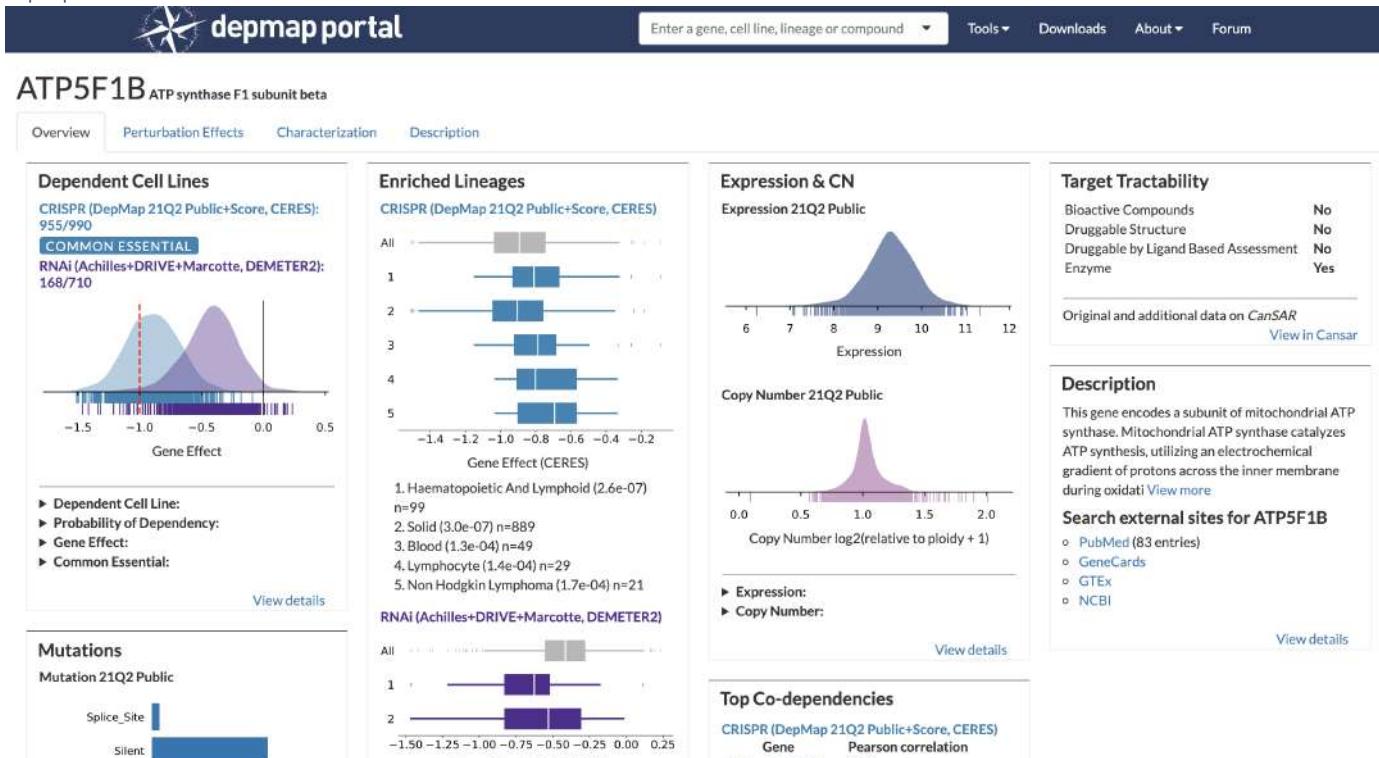
そして導入された細胞の何%がどういった変異パターンをもつか」ということを概算することができます。この情報は「特定の変異クローニング株を取得する際にどれほどの手間がかかりそうか」といったことを把握できるようになるため、スムーズな実験スケジュールの策定に役立つと考えられます。

Microhomology-PredictorとinDelphiの使い分けや両ツールの注意点

Microhomology-PredictorとinDelphiの使い分けに関してはよくわからない方が多いのではないかと思います。まずHEK293などのヒト培養細胞においてはinDelphiの予測はかなり正確であることが示されているので、HEK293にCRISPR-Cas9を使う場合はinDelphiのほうがオススメです。しかしながらinDelphiは機械学習ベースのツールであるため、学習対象にはなかった哺乳類以外の培養細胞、初代培養細胞、またin vivoでのゲノム編集での精度は不明です。もちろん今後詳細な検証がなされていくかと思いますが、哺乳類以外の培養細胞、初代培養細胞、またin vivoでのゲノム編集では代わりにMicrohomology-Predictorのほうを活用してみてもよいかと思われます。またMicrohomology-PredictorはTALENやZFNでも利用できるので、TALENやZFNを扱う場合にはMicrohomology-Predictorのほうを使用すべきです。

そしてこういった変異パターン予測ツールでの注意点としては、変異導入による毒性バイアスは考慮できないという点があります。遺伝子座によってはフレームシフトを導入することで細胞の生存や増殖に大きな影響を与えてしまうケースがあり、そういうサンプルでは解析時のフレームシフト率が極端に低くなってしまいます。長期的な実験を行った際にそういう点を見落としていると大きな損失につながります。ゲノム編集する際には予備実験として編集した細胞集団のサブクローニング・TIDE解析を行うなどして、ちゃんとフレームシフト変異の取得ができるのか確認を行うのが無難でしょう。またこうした致死性等についてはデータベース上にヒントがある場合があります。たとえばヒト遺伝子だとDepMap等でGene essentialityの評価がでていますし、マウスでもIMPCで胚性致死の確認等が可能です。その他PubMedで遺伝子名を検索すればそういう類の情報が見つかる場合もあります。事前にインターネットを活用して十分にリサーチされることをお勧めします。

- DepMap





Search All 7590 Knockout Data...



Gene: Vps4a

[Log in to follow](#)

Name vacuolar protein sorting 4A

MGI ID MGI:1890520

Synonyms 4930589C15Rik

Viability Data availableEmbryo viewer [3D Imaging](#)Other links [MGI](#) [Ensembl](#)

Significant phenotypes (11)



Measurements chart (200)



All data table (630)



Expression & images (111)



Disease models (938)



Order (2)



Significant Not Significant Not tested

[View body weight measurements](#)

関連ツール

- SPROUT

- primary human T cellsでのゲノム編集結果に基づいて作製された変異パターン予測ツール。primary human T cellsを扱う場合はこちらも参考になります。

2章. より応用的なゲノム編集のためのデータベース・ツールを知る

応用的なゲノム編集について

ゲノム編集でできることはDSBによるノックアウトだけではありません。

例えばDSB導入と同時にドナーDNAも導入することで人工的な配列を挿入するノックインができますし、またDNA脱アミノ化酵素をニッカーゼ型Cas9に取り付けることで二本鎖切断を伴わない塩基置換（Base Editing）を実現できます。

さらに最近では、ニッカーゼ型Cas9と融合させた逆転写酵素を利用して置換やインデルを加える方法（Prime Editing）が開発されています。

またこのようなCRISPR-Cas9、およびその派生技術が興隆する一方で、規制やライセンスの観点からZFNやTALENなども商業的に注目されています。

他にもゲノム編集から広がってRNA編集にもCRISPRが利用されつつあります。CRISPR-Cas13はその代表例で、RNAiによるノックダウンよりも特異的なノックダウン効果を実証しています。

このように世界中でゲノム編集が使われるなかで、それらを設計・解析する専用ツールやデータベースも開発されている状況です。

本章ではこのようなツールの一部を紹介し、ゲノム編集についてより理解を深めていただければと思います。

またこのようなツール・データベースに関しては演者が個人的にまとめていますので下記のQiitaのページをご参考にしていただけますと幸いです。

ゲノム編集のためのデータベース・ツール一覧

ゲノム編集系のバイオインフォマティクス

- <https://qiita.com/KazukiNakamae/items/fa1c58351c1a8ce4c937>

CRISPR-Cas9によるノックイン設計ツール

ゲノム編集におけるノックインには非常にさまざまなものが知られています。

ドナーDNAを導入するタイプのノックインでは基本的に特定のDSB修復経路を利用しておらず、何を利用するかはどういったドナーDNAを扱うかによります。

たとえば相同組換え修復(HR)を利用する場合は500bp以上のホモジニアームを両端に持たせる必要があります(Yao et al., 2017)。

また、HDR/MMEJ/NHEJを利用する場合はドナーも直鎖化しておき、修復経路に応じた長さのホモジニアームを持たせておく必要があります(Nakade et al., 2014、Chu et al., 2015、Suzuki et al., 2016、Yao et al., 2017、Suzuki et al., 2019)。

さらに一本鎖DNAをドナーとして利用する場合もあり、この場合は主にSSTRという経路が利用されます(Radecke et al., 2010, Yoshimi et al., 2016)。

今回はMMEJ等を利用したノックイン（PITCH法）の設計ツールを紹介します。

MMEJ等を利用したノックインはホモロジーアームが20-40bpほどの相同配列（マイクロホモロジー）を取り付けるだけでドナーの作製ができるため、PCRによるアダプター付加のみでドナーを作製できます。

これは500bp以上の配列をゲノムから取得する必要があるHRなどと比べると、簡便でありなおかつさまざまな生物種で利用可能であることが示されています（リンク参照）。

PITCH designer 2.0

- <https://www.mls.sci.hiroshima-u.ac.jp/smgi/PITCHdesigner/index.html>
- 論文リンク

PITCH KnockIn

About PITCH designer 2.0 Contact

2. Select the target position

1	4	7	10	13	16	19	22	25	28
G	T	G	A	C	G	T	T	T	
Val			Thr		Phe		Gln		
31	34	37	40	43	46	49	52	55	58
A	G	A	G	C	C	A	C	A	G
Arg			Glu		Pro		Pro		
61	64	67	70	73	76	79	82	85	88
C	T	C	T	G	G	A	C	A	C
Leu			Trp		Ser		Gly		
91	94	97	100	103	106	109	112	115	118
G	G	G	T	A	C	A	T	C	A
Gly			Gly		Trp		Ser		
121	124	127	130	133	136	139	142	145	148
G	C	A	C	A	G	C	T	G	C
Gly			Gln		Ala		Trp		

入力例

nucleotide sequence :

>ゲノム配列サンプル

```
GTGACGTTCAACACAGACCTGAGGGAGGGAGAGAGAGCCCCAACAGAGAACACAGCACAGGCTCTGGAGTGGCGGCAGGAACCCAGGGGGTACAT
GGTCTCACTCAGGATCACACGGACAGGCTGGAACCCCACATCTGCCACCCACCCCTGAGGGGCCAGGCCCTGGGGACTCACAGGACAGGGCTCCGGC
AGCTTCGGGGAGGGGGTGGGGTAATTCTGGCAAGACGGAGCTCCTTGGCTGTGGAGAGGAGAAGGGGGAGGAAGGGGGAGCTCCCTCGACTGGGCAG
GGGCCTGGGCCTGGACCCGGCCAACCTCACTCACCTGAGTGGAGGTCCCTCCAGCCAGGAGGAGGAGCCGAGCGCTGCAGCCCAGCCCCAGGGCT
CCCTCCGCTGTCCGCCTTCAGGGGACCCAGGGACCAGAACACTCCCTGTCTTCAGGAGGCCAAAGCGCCTGGAGAAGGGGGCTTCAAGCTGCTGGG
AGAAGGAGGAGGTCTCAGTAGAGAGAAAGGATCCCTTCTCAGACCTCAAGGGTTAGCCCCAAAGGACTGCAACAAACTACAATCCCCATCAGCCCC
CGGGGCAGGCACAGCCTAAAAAGGAAGCCGGTTGCCAGGACGACTCTGGAACTATAGTCTCCCCATCTGCCCTGCCAGAGGTTCACAGGCTGTA
TGGAAATCCACCTCCGGGCCCTCCAGCCTCACAGGACCTCTCAGGGCATCCACTACCACGGACTCTAGGGCTGGGGTGCAGGGAGGAGACGCC
ATTGAGGGTTCTGGGTCTGCAGGGGGTGGTCTGTGATGTGGGAACACCGGGCAGGTACAGAAGATGCCAGTTGCCCTAGATTAGAG
```

Reading frame :

Frame1

Adjustment of reading frame :

C-insertion method

Knock-in cassette :

User defined insert

insert sequence :

```
>User defined insert atggtagacaaggcgaggagctgtcacgggggtggccatctggtcagtgacggcgacgtaaacggccacaagtccgtgtccggcgagg
ggcgaggcgatccactacggcaaggcgacacctcgtaaggtaatctgcaccacggcaagctgcccgtgccctggcccaacctctgtgaccacccctgacta
cgccgtcgactgtcgccgtaccatcgacgcacgcacttctcaactcgccatcgccgaaggctacgtccaggagcgaccatcttc
ttcaaggacgacggcaactacaagacccgcgcggatgtcgaggcgacacccctgtgaaccgcacatcgacgtcgaggcatcgactcaaggagg
acggcaacatctggccacaatcgacgtggatcaactacaacgcaccaacgcgttatcatatcgccgacaaacggccatcaaggatcgactcaa
gtccggccacaatcgacggatcgccgtcgacgtccggcggaccatccacgcacaaaccccccattccggacggcccccgtgtcgccgtccggacaaccac
tacatcgacgtccggccatcgacggatcgacgtccggccatccacgcacaaaccccccattccggacggcccccgtgtcgccgtccggacaaccac
```

Length of left microhomology :

40bp

PAM sequence requirement :

NGG

Length of right microhomology :

Human(Homosapiens)genome, GRCh38hg38(Dec,2013)

Base Editorによる塩基編集設計ツール

Base Editingに使う脱アミノ酵素をニッカーゼ型Cas9 (Base Editor) には大きく分けて二つのタイプがあります。

シトシン (C) をチミン (T) に変換するシトシン型Base Editorとアデニン (A) をグアニン (G) に変換するアデニン型Base Editorです。

これらはニッカーゼ型Cas9が結合したゲノムの特定の範囲 (Windowと呼びます) に対して作用し、上記の置換を行います。

WindowはBase Editorの種類によって違っており、以下のツールではそうしたWindowを考慮した上の標的配列設計を行うことができます。

BE-Designer

- <http://www.rgenome.net/be-designer/>

- 論文リンク



BE-Designer

A guide-RNA designer for CRISPR base editing.

CRISPR base editing technologies enable the direct conversion of DNA bases (C to T/A/G) without inducing double-strand breaks of DNA by the fusion of cytidine deaminase with deactivated Cas9 (dCas9) or Cas9 nuclease.

Citation info: [Hwang G-H et al. Web-based design and analysis tools for CRISPR base editing. BMC Bioinformatics 19, 542 \(2018\).](#)

Job title (Optional):

E-mail (Optional):

* The result will be notified by e-mail (searching job is working in sequence for many input data, therefore it would be convenient to receive the results by e-mail).

PAM Type

CRISPR-Cas orthologues for base editing

SpCas9 from Streptococcus pyogenes: 5'-NGG-3'

SpCas9-VQR from Streptococcus pyogenes: 5'-NGAN-3'

SpCas9-EQR from Streptococcus pyogenes: 5'-NGAG-3'

SpCas9-VRER from Streptococcus pyogenes: 5'-NGCG-3'

SaCas9 from Staphylococcus aureus: 5'-NNGRRT-3'

SaCas9-KKH from Staphylococcus aureus: 5'-NNNRRT-3'

StCas9 from Streptococcus thermophilus: 5'-NNAGAAW-3' (W = A or T)

CjCas9 from Campylobacter jejuni: 5'-NNNVRVYAC-3' (V = G or C or A, R = A or G, Y = C or T)

VcSe0.2 (VcRNA Cas9) from Streptococcus pneumoniae: 5'-NNTT-3'

Target Sequence

Insert any sequence(s) where you want to search for CRISPR base editing targets (raw sequence or FASTA format, maximum 1000 chars):

```
>homo sapiens FANCN, exon 2
GGCTCACACAAGCTTCACCAAGGAAGGAAATATGGTGCACT
AAGAGAGTGCTTTTCTAACACCTCAGGTATGGTAATGAC
CTTCTAGAGGAGCTTGCCGCTGTGAATAAGCTCTCGAAAATATGCTTAT
GTTATTGATGAAGCTCATAAAGCTCTCGAAAATATGCTTAT
TGCCAG
```

crRNA length (length of target without PAM)

20

入力例

PAM Type :

SpCas9 from Streptococcus pyogenes: 5'-NGG-3'

Target Genome :

Vertebrates

Homo sapiens (GRCh38/hg38) - Human

Target Sequence :

>sample atggagctgtatgagacatccccctacttaccaggaaccccgcttatgtatggggaaaactacctgcctgtccaccccccaggcc

crRNA length :

20

Base editing type :

BE (C to T) [Ref1]

Base editing window :

13 to 17

Base Editorによる塩基編集予測ツール

結合したゲノム箇所に塩基置換を導入できるBase Editorですが、Window内の目的とは異なる位置にC塩基またはA塩基がある場合はその塩基も同時に置換してしまうケースがあります。また場合によってはCからGへの変換などマイナーな塩基置換を発生させることもあり、100%指向的に置換変異を入れられるわけではありません。

そのため過去のBase Editingデータを学習し、置換パターンを事前に予測するツールも開発されています。これを使うことで変異の指向性をある程度予想することができます。

BE-Hive

- <https://www.crisprbehive.design>
- 論文リンク



[SINGLE MODE](#) • [BATCH MODE](#) • [EDITOR EFFICIENCIES](#) • [USER GUIDE](#) • [ABOUT](#)

Target genomic DNA:

'GCCTATTGCCCTAGCGTATGACACCG'

CRISPR protospacer:

GGGTTACCACACCCGGCTC

Base editor / cell type: BE4, mES

Amino acid frame:

None

Base editing outcomes among edited reads: DNA sequence

	1	5	10	15	20	
						GGGTTACCAACACCCCCGGCTC
CACCATCTACCAACAT	C	A	G	A	C	GGGTTACCAACACCCCCGGCTC
CACCATCTACCAACAT	T	A	C	A	C	52.6%
CACCATCTACCAACAT	T	A	C	A	C	14.6%
CACCATCTACCAACAT	T	A	C	A	C	5.9%
CACCATCTACCAACAT	G	A	C	A	C	4.5%
CACCATCTACCAACAT	T	A	C	A	C	3.1%
CACCATCTACCAACAT	A	C	A	C	C	2.4%
CACCATCTACCAACAT	T	A	C	A	C	1.9%
CACCATCTACCAACAT	T	G	A	C	C	1.3%
CACCATCTACCAACAT	G	T	A	C	C	1.3%
CACCATCTACCAACAT	A	T	A	C	C	0.8%

[Download table of predictions](#)

入力例

Target genomic DNA :

gacatccccctacttctaccaggaaaccccgctctatgtggggaaaactacctgcctgtcca

CRISPR protospacer :

aggaaccccgcttctatgtat

Base editor / cell type :

BE4, HEK293T

Amino acid frame :

Frame 2, + strand

Prime Editorによる小規模編集設計ツール

逆転写酵素を利用したゲノム編集手法であるPrime Editingはインデル置換が入り混じった複雑な小規模変異を導入可能ですが、そのために使うプロトスペーサ配列（pegRNA spacer）や逆転写テンプレートとプライマー結合サイト（pegRNA extension）、そしてニック導入用のガイドRNAのプロトスペーサ配列（ngRNA spacer）など通常のCRISPR-Cas9による変異導入やBase Editorと比べると設計がやや複雑です。

以下のツールではそのような設計の複雑さを解消するために配列の自動設計機能を提供しています。

PrimeDesign

- <https://drugthatgene.pinellolab.partners.org>

- 論文リンク

The screenshot shows the PrimeDesign web application interface. At the top, there is a logo of a DNA double helix with the text "PrimeDesign" and "Design tool for prime editing". Below the logo, there are navigation links: Design, PooledDesign, PrimeVar, About, Help, and a button to "WATCH A SHORT TUTORIAL".

Input sequence: This section contains a text input field where users can enter their target DNA sequence. It includes checkboxes for Substitution, Insertion, and Deletion examples, and a note about input sequence requirements. An error message "Error: Input sequence does not have full sets of parentheses" is displayed in red.

Recommended Designs: This section is divided into two parts: pegRNA design and ngRNA design. Each part has fields for Annotation, PBS length, RTT length, Spacer oligo top, Spacer oligo bottom, Extension oligo top, and Extension oligo bottom.

Visualize sequence: This section allows users to visualize the reference DNA, edited DNA, and pegRNA spacers. It includes checkboxes for visualizing amino acid sequences and selecting pegRNA spacers. The reference DNA sequence is shown as "1 | CATCATAGAAGCGGGGTTC". Below it are buttons for Substitution, Insertion, pegRNA extension, and ngRNA spacer.

Edited DNA: This section is similar to the sequence visualization but for the edited DNA. It also includes checkboxes for selecting pegRNA extensions and ngRNA spacers. The edited DNA sequence is shown as "1 | atggagctgtatgagacatccccctacttcta(c/a)caggaacccgcctatgtggggaaaactacctgcctgtccaccctccaggcgct". Below it are buttons for Substitution, Insertion, pegRNA extension, and ngRNA spacer.

入力例

Input sequence (これだけ入力すれば他の入力は自動でサジェストされる) : atggagctgtatgagacatccccctacttcta(c/a)caggaacccgcctatgtggggaaaactacctgcctgtccaccctccaggcgct

pegRNA spacers :

CATCATAGAAGCGGGGTTC

pegRNA extensions :

ACTTCTAAcCAGGAACCCCGCTTCTA

ngRNA spacers :

GACATCCCCCTACTTCTAAc

TALENによるノックアウト設計ツール

TALENはCRISPR-Cas9と同様に任意の配列に結合させてDNA二本鎖切断による変異導入することが可能なゲノム編集ツールです。

RNA-DNA結合のCRISPR-Cas9とは違って、TALENはタンパク質-DNA結合となっているので直感的ではありませんが、これをうまく設計するためのツールも開発されています。

ちなみに日本語での設計プロトコルも広島大学が公開しているので併せてご参照いただければと思います。

TALEN Targeter (old version with design guidelines)

- <https://tale-nt.cac.cornell.edu/node/add/talen-old>

- 論文リンク

 Cornell University

TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0

Tools About TALE-NT Resources Software FAQs Tutorials

Submit Old TALEN Targeter

Test the tool using sample data

Sequence

```
>sample
aacaaggccttccgacccatggagctgtatgagacatccccctacttaccaggaaccccgcttatgatggggaaaactacctgcctgtccacct
```

Enter up to 2 megabases total in any number of sequences. Sequences should be in FASTA format and include a header line that starts with a '>'. For larger data sets, attach a file instead of pasting text in.

Sequence File

Choose File no file selected

Files must be less than 2 MB.
Allowed file types: **fasta**.

Use a Preset Architecture Provide Custom Spacer/RVD Lengths

Spacer

Minimum Spacer Length
12

Maximum Spacer Length
16

Repeat Array

Minimum Repeat Array Length
16

Maximum Repeat Array Length
20

Upstream Base *

入力例

Sequence :

>sample aacaaggccttccgacccatggagctgtatgagacatccccctacttaccaggaaccccgcttatgatggggaaaactacctgcctgtccacct

Spacer :

Minimum Spacer Length : 12 Maximum Spacer Length : 16

Repeat Array :

Minimum Repeat Array Length : 16 Maximum Repeat Array Length : 20

Upstream Base :

T only (Recommended)

Options :

- Require C, G, or T at position 2 (not an A)
- Percent composition
- Do not allow sites to end in G
- Require A, C, or G at position 1 (not a T)

Expires :

One hour

Cas13によるRNA編集設計ツール

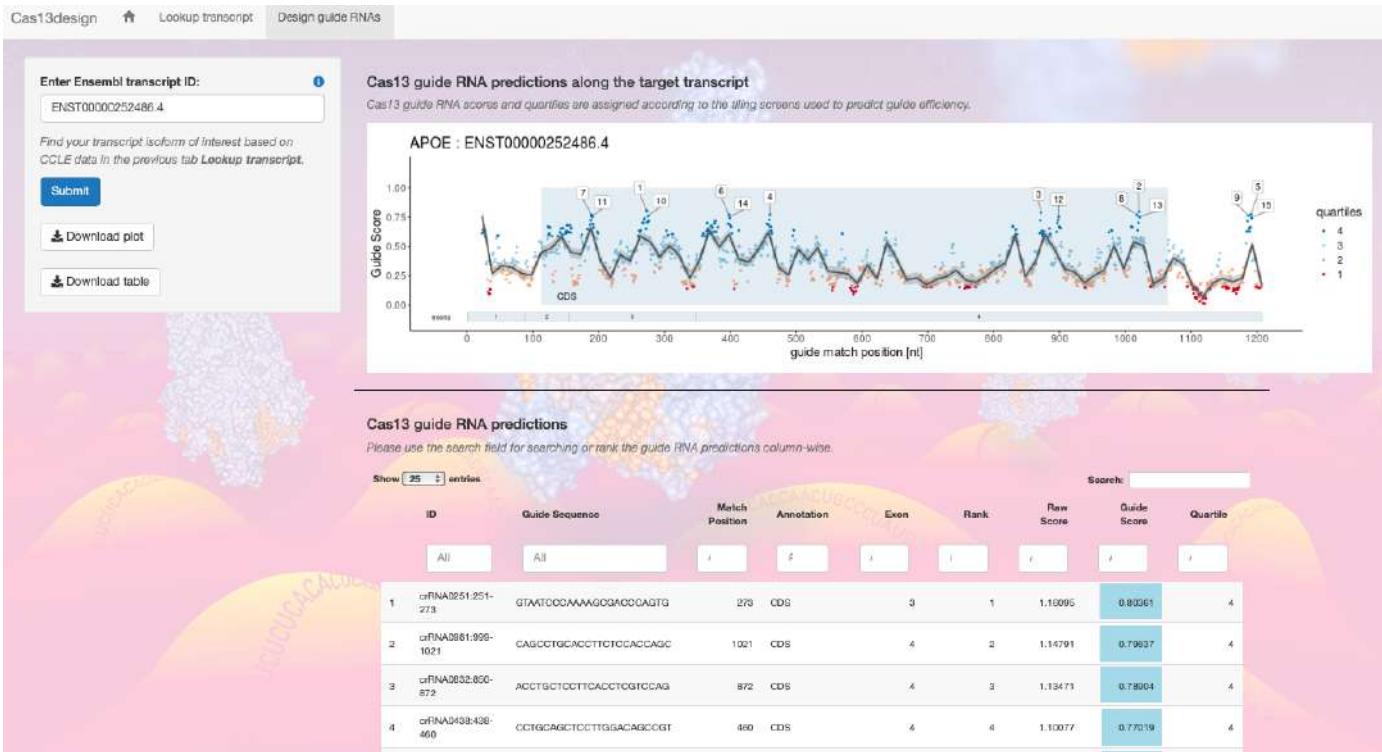
CRISPR-Cas13は一本鎖RNAに対して配列特異的な結合をすることができます。

これによってRNAi以上の特異性でノックダウンを行えますが、その有効性は標的によってやや異なることが知られています。

このツールではその有効性を予測しつつ標的配列の選定を行うことが可能です。

Cas13design

- <https://cas13design.nygenome.org>
- [論文リンク](#)



入力例

- オリジナルの配列を評価する場合

Design custom gRNAsを選択

Input Type :

Paste single target

target RNA sequence :

ggcgcccacactgaggagaagcgcaggctcaagaaggtaatgaggccctcgaggccctgaagagaagcacccgtcaaccacaaccagcggctgccaaaggtagatccctgcgcagtgccatccagtacatcgagcgcctccaggcccgtct

- ヒトのトランск립トに対して一括設計する場合

Humanを選択

Gene symbol :

MYOG

Ensemble transcript ID (自動でサジェスト) :

ENST00000241651.4

- RNAウイルス (SARS-CoV-2) に対して一括設計する場合

RNA virusを選択

virus :

SARS-CoV-2

Gene name :

S

サンガーシーケンステータを使った変異分析ツール

一般的なサンガーシーケンスで読み出せる配列は一種類であり、細胞集団に対して一斉にゲノム編集を行ったサンプル（ポピュレーションサンプル）のジェノタイピングを行う場合はサブクローニングを行う必要があります。

しかし最近では、ゲノムPCR産物を直接サンガーシーケンサーによって解析する方法も開発されてきています。

TIDE解析はそうしたアプローチのもとでゲノム編集サンプルを解析する方法です。

通常の考え方では、ゲノムPCR産物を直接サンガーシーケンスで読み出した場合は様々な配列のシグナルが混ざり合って、塩基配列として読み出すことができません。しかしTIDE解析では、こうした混合シグナルをコンピュータ上で分離することで、ゲノム編集の結果で生じた配列パターンを明らかにすることができます。

TIDE

- <http://shinyapps.datacurators.nl/tide/>
- [論文リンク](#)

- ・統合TV



まず以下のリンクから使用するシーケンスファイルをダウンロードしてください。 [ダウンロードリンク（自動） from ICE Analysis | SYNTHEGO](#)

入力例

Title plot :

sample

Guide sequence :

TGTATGAGTCGAAGATCTCC

Control Sample Chromatogram :

high_edit_GRK2_control.ab1

Test Sample Chromatogram :

high_edit_GRK2_experiment.ab1

アンプリコンシーケンシングデータを使った変異分析ツール

ポピュレーションサンプルをアレルベースでのシーケンス解析するうえで最も高解像度な方法はアンプリコンシーケンスといえます。

こうしたシーケンスデータはマッピングを介した変異検出手法で解析されますが、こうした解析は必ずしもゲノム編集を前提としたデータ形式になっておらず、また解析自体にもそれなりの知識を要します。

このような状況からゲノム編集解析に特化したアンプリコンシーケンス解析ツールが発表されています。

これらを使うことでゲノム編集という文脈のなかで理解しやすいデータを得ることが可能です。

CRISPResso2

- <https://crisperso.pinellolab.partners.org/submission>

- 論文リンク



CRISPResso2

Analysis of genome editing outcomes from deep sequencing data

Not sure where to start?

[Manual](#)
[Source on Github](#)
[Examples](#)

NHEJ (Non-homologous end joining)			
Multiple alleles			
Base-editors			
HDR (Homology directed repair)			
Prime editing			
Batch mode			

Experimental design

Editing tool:

Cas9 Cpfl Base editors Prime editors Custom

Sequencing design:

Paired end reads Single end reads Interleaved reads

Fastq file R1	Use the Browse button or drag and drop a fastq or f...	
Fastq file R2	Use the Browse button or drag and drop a fastq or f...	
Amplicon	Enter the amplicon sequence. If submitting more than one amplicon, please separate amplicons using commas.	
sgRNA	Enter the sgRNA sequence/s excluding the PAM sequence.	

入力例

Examples

- NHEJ (Non-homologous end joining)
- Multiple alleles
- Base-editors
- HDR (Homology directed repair)
- Prime editing
- Batch mode

以下の三角ボタンをクリックすることで例示データを自動入力することができます。

CRISPR-Cas9によるノックアウトサンプルの解析の場合は"NHEJ(Non-homologous end joining)"の入力パターンがあてはまります。

Editing tool :

Cas9

Sequencing design :

Paired end reads

Fastq file R1 :

nhej.r1.fastq.gz

Fastq file R2 :

nhej.r2.fastq.gz

Amplicon :

AATGTCCCCCAATGGGAAGTTCATCTGGCACTGCCACAGGTGAGGAGTCATGATCCCCTCTGGAGCTCCACGGGCCGTGGCTGGTCATCTGTAAGAATGGCTCAA

TIDEとアンプリコンシーケンシングの比較と注意点

TIDEとアンプリコンシーケンシングはどちらも変異の定量解析ができるという点で似た方法です。そこでどちらの手法を使うべきか悩むこともあるかもしれません。

TIDE解析の結果はアンプリコンシーケンシングで検出できる変異パターンと相関があることが示されており、コストという点ではNGSベースのアンプリコンシーケンシングよりも安価です。そのためTIDEはアンプリコンシーケンシングの簡易版ととらえてもいいかもしれません。

ただし、TIDE解析はアンプリコンシーケンシングほどの解像度はないため、細胞集団の中にある稀な変異パターンを検出することはできません。また挿入・置換配列の解析を十分に行うことは難しいため、Base Editingや短い配列のノックイン等の解析には向きです。

よってTIDE解析の利用シーンとしては、ノックアウト実験に適した標的的選定やゲノム編集実験系の確認といったフェーズで利用するに向いています。

その一方でアンプリコンシーケンシングは高い解像度や短い配列挿入（ノックイン・予期しないベクターのバックボーンの挿入等）の検出もある程度は可能なので微小なオフターゲットの検出や変異パターンの厳密なプロファイリングに向いています。

もちろんTIDE解析したものも論文用の変異解析データとして提出可能です。予算、実験系、検出したい変異パターン、安全性の要求度を考えながらどちらを行うかを判断するといいかと思います。

また、注意すべき点としては現状のTIDE解析とNGSによるアンプリコンシーケンシングは大規模インデル等を検出するのは困難です。

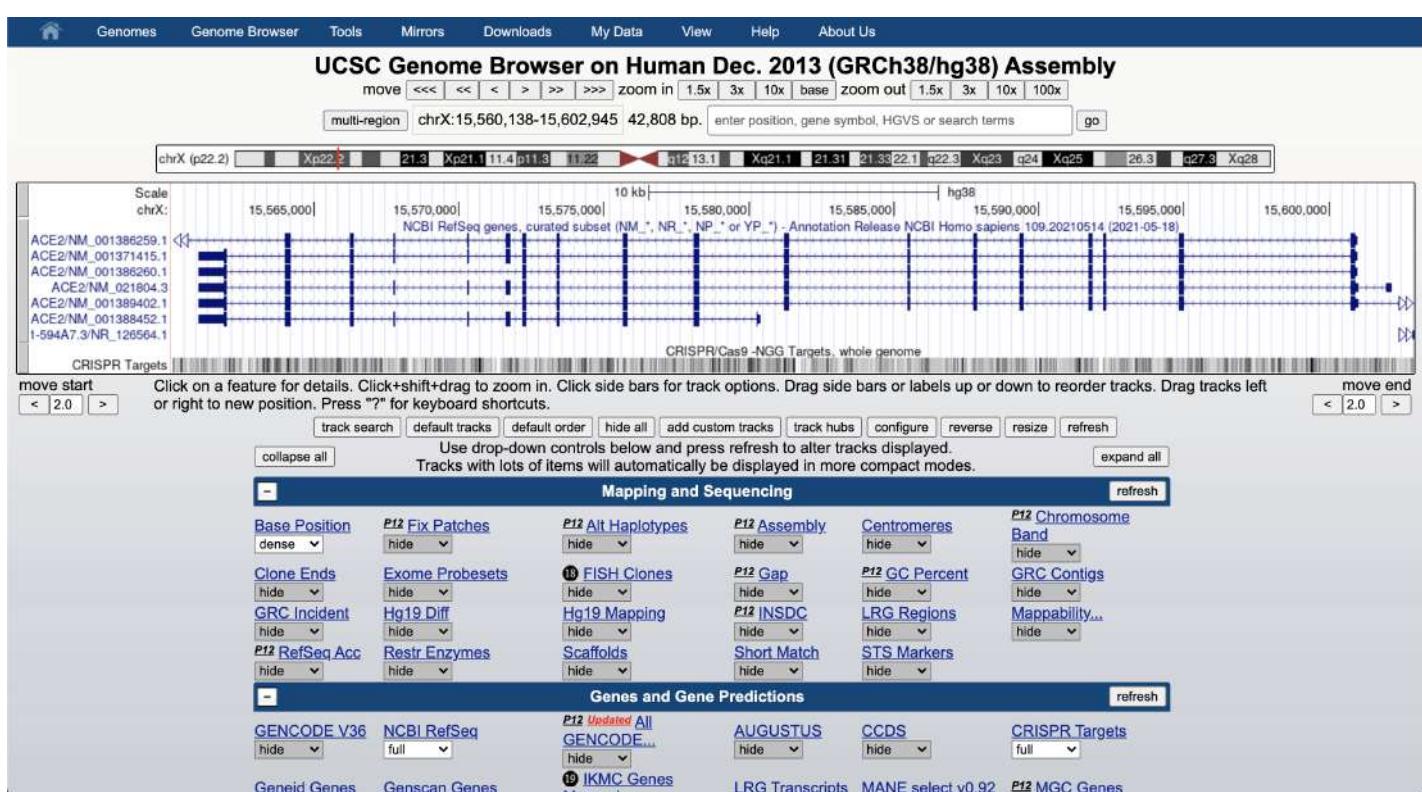
しかしながらゲノム編集において数kbレベルの欠失が起こるケースは存在します。そのため慎重に実験を行なうならTIDE解析・アンプリコンシーケンシングすると同時に広範囲でのgenomic PCRを行って大規模インデルが頻発していないか電気泳動レベルで確認してみたほうがよいでしょう。

UCSC genome browserでのCas9標的の確認

UCSCのUCSCのgenomue browserではあらかじめCRISPR-Cas9標的のアノテーション（CRISPR Targets）が用意されています。

これを参考することで標的可能な部位をおおよそ見積もることが可能です。

また予測切断活性やオフターゲットも評価されており、このサイトだけでも十分な選定が可能となっています。



ガイドRNA先行研究データベース

CRISPR-Cas9が発表されて早9年が経とうとしており、これまでさまざまなゲノム標的でCRISPR-Cas9が利用されてきました。

こうした過去の実験データは徐々にデータベースとして収録されており、今後はこういったものを参考に標的を選定することで効率的な実験デザインが可能となります。

dbGuide

- <https://sgrnascorer.cancer.gov/dbguide/>
- 論文リンク

Chari Lab CRISPR Resources dbGuide sgRNA Scorer 2.0 Publications Plasmids and Protocols FNLCR

dbGuide

Welcome to the dbGuide database, a resource containing validated guide RNA sequences that have been used in gene editing experiments in human and mouse cells. We currently have aggregated information from over 1000 publications using the CRISPR/Cas9 technology in human or mouse cells as well as data generated by our lab assessing editing efficiency by Illumina sequencing. Each guide RNA listed that was sourced from a primary publication has a direct link to the publication.

To keep this resource current, we will be actively updating this database on a monthly basis and to help facilitate this, we invite researchers to submit data into our database. Our data template file can be found: [here](#). Once completed, please e-mail the file to sgrnascorer@nih.gov. All contributions to this database will be given proper citation to the original publication. For further instructions/help on using our database and how to interpret results, please go [here](#).

Species:

Search with either a HUGO gene symbol (e.g. KRAS), Ensembl transcript (e.g. ENST00000256078), Ensembl gene (e.g. ENSG00000133703), or genomic coordinates in BED format (e.g. chr12:25205246-25250929)

入力例

Species :

Human(hg38)

HUGO gene symbol :

KRAS

template-freeゲノム編集データベース

SNP配列の構築はノックインで実現されることが多いですが、MMEJを介した指向性のある変異導入を行えばドナーテンプレートを導入することなく、単純なノックアウトでSNP構築が可能です。

こうしたtemplate-freeな手法で構築可能なSNPはデータベース化されています。

MHcut Browser

- <http://mhcut-browser.vhost38.genap.ca>

• 論文リンク

The screenshot shows the MHcut Browser interface. At the top, there are logos for CIRAC and Canadian Centre for Computational Genomics. The main area displays a table of variants with columns for ID, rs, gene_info, chr, pos_start, pos_end, location, var_1, and cldna. A search bar on the right allows querying by gene name or RS ID, with options for advanced search and position search (chr#:start-end). Filters on the right include variant location (intronic, exonic, intergenic), minimum consecutive first match in MH (set to 3), and checkboxes for Variant in ClinVar, NGG PAM Available, and Unique Guide Avail. Buttons for 'Apply Filters' and 'Clear Filters' are also present.

ID	rs	gene_info	chr	pos_start	pos_end	location	var_1	cldna
11397	-	AGRN:375790	chr1	1040745	1040747	exonic	3	Myasthenic_syndrome; _congenital; _B
11590	886044664	AGRN:375790	chr1	1049928	1049942	exonic	15	not_specified
15094	786200943	B3GALT6:126792 SDF4:51150	chr1	1232595	1232616	exonic	22	Spondyloepimetaphyseal_dysplasia_with_joint_lax_type_1; _with_fractures
15098	786200942	B3GALT6:126792 SDF4:51150	chr1	1232685	1232693	exonic	9	Ehlers-Danlos_syndrome; _progeroid_type; _2
17857	797044834	DVL1:1855	chr1	1338099	1338111	exonic	13	Robinow_syndrome; _autosomal_dominant_2
37269	398122889	SKI:6497	chr1	2229046	2229054	exonic	9	Shprintzen-Goldberg_syndrome
38612	-	SKT:6497	chr1	2229067	2229077	exonic	6	Tobacco_nascent_diseases

Items Per Page: 100 Page 1 of 54 (5332 variants, 5610 guides)

入力例

DATASET :

Cas9

gene name, RS ID :

KRAS

Variant Location :

intronic exonic intergenic utr

Minimum consecutive first match in MH :

3

3章. ゲノム編集情報の安全な設計・解析・管理ツール

ゲノム編集を支援するデータベース・ツールは非常に多く発表されていますが、現状はほとんどのものは海外製であり、データ管理という観点で懸念が全くないわけではありません。

今回は最後に、安全なゲノム編集設計・解析・管理を行うための国産ツールとして「GGGenome」および「Genome Editing Cloud」が開発されていますのでこちらを最後に紹介しておきます。

GGGenome (+パッケージ版) によるオフターゲット検索

- <https://gggenome.dbcls.jp/ja/hg38/1/>
- 統合TV

DBCLSが運営している商用利用可能な高速配列検索サイトです。

特定のゲノムを指定してミスマッチ・ギャップつきオン/オフターゲットを検索することができます。

ある程度であれば検索長の制約はないので、一般的なCRISPR-Cas9のみならず様々なゲノム編集ツールでも利用ができます。

またVやRといった縮重塩基にも対応しているのでモチーフ検索等にも活用可能です。



高速塩基配列検索 GGGenome

[Help](#) | [English](#)

データベース：

Human genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013)



- ミスマッチ/ギャップを許容 ミスマッチのみ許容 : 塩基まで (検索する配列長の25%まで)
 双方向を検索 +方向のみ検索 -方向のみ検索

検索例：

- [TTCATTGACAACATT] 塩基配列を検索
- 詳細な使い方
- 遺伝子や転写産物のキーワード検索は **GGRNA** 《ぐぐるな》へ
 - 例) ヒトの「nanog」を検索：<https://GGRNA.dbcls.jp/hs/nanog>

検索結果へのリンク：

- [http\[s\]://GGGenome.dbcls.jp/db/k/\[strand\]/\[nogap\]/sequence\[.format\]\[.download\]](http://GGGenome.dbcls.jp/db/k/[strand]/[nogap]/sequence[.format][.download])
 - **db** → hg19, mm10, dm3, ce10, TAIR10, pombe, refseq, etc. 省略時は hg19
検索可能なデータベース一覧
 - **k** → 許容するミスマッチ/ギャップの数。あまり大きいとしほうする。省略時は 0
 - **strand** → '+' ('plus') または '-' ('minus') で特定の方向のみ検索。省略時は両方向を検索
 - **nogap** → ギャップを許容せず **k** 塩基以内のミスマッチのみ許容して検索する
 - **sequence** → 塩基配列。大文字・小文字は区別しない
 - **format** → html, txt, csv, bed, gff, json。省略時は html
 - **download** → URLの最後に付加すると検索結果をファイルとしてダウンロードできる

入力例

- SpCas9 (NGG-3' PAM, プロトスペーサ 20 nt) 向け

gtccgtggaccggcgccggNgg

データベース：

Human genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013)

ミスマッチ/ギャップを許容：

1塩基まで

双方向を検索にチェック

- AsCas12a (5'-TTTV PAM, プロトスペーサ 23 nt) 向け

tttVcagacaagataaaggcagtgggg

データベース：

Human genome, GRCh38/hg38 (Dec, 2013)

ミスマッチ/ギャップを許容：

1塩基まで

双方向を検索にチェック

またレトリバ社はGGGenomeのパッケージ版を販売しており、ローカルな環境で実行することができます。

- <https://gggenome.retrieva.jp/>

レトリバ

デモ動画 特徴 提供形態 教育機関の皆様へ 検索支援スクリプト 動作環境 よくある質問 利用規約 お見積り



ゲノム編集専用データ基盤Genome Editing Cloud

プラチナバイオ・凸版印刷・広島大学が開発しているゲノム編集専用データ基盤です。

現在は商用利用可能なsgRNAの設計や活性予測、アンプリコンシーケンス解析機能を開発しており、解析データは凸版印刷のセキュアなクラウド内に保存することが可能となっています。

基本的に国内のアカデミア・企業のゲノム編集支援ツールを目指しており、要望に応じて機能拡充を行っていく予定です。

現在はクローズなテストを行っていますが、ご利用にご興味ある方は以下のアドレスまでご連絡ください。

中前 和恭：nakamae@pt-bio.com



0章. 補遺

ゲノム編集をするうえで配列の情報収集は欠かせません。

補遺ではデモ資料で用意した配列情報を取得した流れを説明します。

NCBIから遺伝子の配列情報を取得する

- まずウェブ検索でアメリカ国立生物工学情報センター（NCBI）へアクセスする。

The screenshot shows the NCBI homepage. At the top, there's a banner for COVID-19 Information with links to CDC, NIH, SARS-CoV-2 data, HHS, and Spanish resources. Below this is the UNITE initiative logo, which is a colorful graphic with the text "Ending Structural Racism". A sidebar on the left lists various NCBI databases from A-Z, including Resource List (A-Z), All Resources, Chemicals & Bioassays, Data & Software, DNA & RNA, Domains & Structures, Genes & Expression, Genetics & Medicine, Genomes & Maps, Homology, Literature, Proteins, Sequence Analysis, Taxonomy, Training & Tutorials, and Variation. The main content area features sections for Welcome to NCBI, Submit, Download, Learn, Develop, Analyze, and Research. On the right, there are Popular Resources like PubMed, Bookshelf, and BLAST, as well as NCBI News & Blog posts.

2. 検索欄で「Gene」を選択して、「MYOG」と入力して検索

The screenshot shows the NCBI search interface. The search bar has 'Gene' selected and 'MYOG' typed into it. There is a 'Search' button to the right.

3. 検索対象をヒト (Homo sapiens) に限定するためクリック

The screenshot shows the NCBI search results for 'MYOG'. The search bar now shows 'Gene' and 'MYOG'. The results are displayed in a tabular format with 20 items per page, sorted by relevance. The first result is for 'GENE MYOG - myogenin'. On the right, there are filters for 'Send to:' and 'Filters: Manage Filters'. Below the results, there's a 'Results by taxon' section with a 'Top Organisms' tree, showing 'Homo sapiens (73)' and 'Mus musculus (25)'.

4. MYOG – myogeninがでてくるのでクリックして先に進む。

GENE

MYOG – myogenin

Homo sapiens (human)
Also known as: MYF4, bHLHc3, myf-4
Gene ID: 4656
[RefSeq transcripts \(1\)](#) [RefSeq proteins \(1\)](#) [PubMed \(76\)](#)

Orthologs Genome Data Viewer BLAST Download

RefSeq Sequences

5. MYOG遺伝子の総合情報が表示される。この中で今回は人のゲノム上の遺伝子配列が知りたいので「Genomic regions, transcripts, and products」の欄へ行って、GenBankをクリックする。

Genomic regions, transcripts, and products

Go to [reference sequence details](#)

Genomic Sequence: NC_000001.11 Chromosome 1 Reference GRCh38.p13 Primary Assembly ▾

Go to nucleotide: [Graphics](#) [FASTA](#) [GenBank](#)

6. 遺伝子配列に関する総合情報（GenBankフォーマット）が表示されるので、この情報をファイルとして保存するために「Send to」をクリック。

NCBI Reference Sequence: NC_000001.11

FASTA Graphics

LOCUS NC_000001 2884 bp DNA linear CON 16-MAY-2021

DEFINITION Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

ACCESSION NC_000001 REGION: complement(203083129..203086012)

VERSION NC_000001.11

DBLINK BioProject: PRJNA168

Assembly: GCF_000001405.39

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominoidea; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2884)

AUTHORS Gregory,S.G., Barlow,K.F., McLay,K.E., Kaul,R., Swarbreck,D., Dunham,A., Scott,C.E., Howe,K.L., Woodfine,K., Spencer,C.C., Jones,M.C., Gillison,C., Searle,S., Zhou,Y., Kokocinski,F., McDonald,L., Evans,R., Phillips,K., Atkinson,A., Cooper,R., Jones,C., Hall,R.E., Andrews,T.D., Lloyd,C., Ainscough,R., Almeida,J.P., Ambrose,K.D., Anderson,F., Andrew,R.W., Ashwell,R.I., Aubin,K., Babage,A.K., Baguley,C.L., Bailey,J., Beasley,H., Bethel,G., Bird,C.P., Bray-Allen,S., Brown,J.Y., Brown,A.J., Buckley,D., Burton,J., Bye,J., Carter,C., Chapman,J.C., Clark,S.Y., Clarke,G., Clee,C., Cobley,V., Collier,R.E., Corby,N., Coville,G.J., Davies,J., Deadman,R., Dunn,M., Earthrow,M., Ellington,A.G., Errington,H., Frankish,A., Frankland,J., French,L., Garner,P., Garnett,J., Gay,L., Ghori,M.R., Gibson,R., Gilby,L.M., Gillett,W., Glithero,R.J., Graham,D.V., Griffiths,C., Griffiths-Jones,S., Grocock,R., Hammond,S., Harrison,E.S., Hart,E., Haugen,E., Heath,P.D., Holmes,S., Holt,K., Howden,P.J., Hunt,A.R.,

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_000001.11?report=genbank&from=203083129&to=203086012&strand=true#

7. フォーマットとして「Comple Record」「File」「GenBank」を指定して、「Create File」でダウンロードする。そうすると「sequence.gb」というファイルが手にはいる。

NCBI Reference Sequence: NC_000001.11

FASTA Graphics

LOCUS NC_000001 2884 bp DNA linear CON 16-MAY-2021

DEFINITION Homo sapiens chromosome 1, GRCh38.p13 Primary Assembly.

ACCESSION NC_000001 REGION: complement(203083129..203086012)

VERSION NC_000001.11

DBLINK BioProject: PRJNA168

Assembly: GCF_000001405.39

KEYWORDS RefSeq.

SOURCE Homo sapiens (human)

ORGANISM Homo sapiens

Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi; Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini; Catarrhini; Hominoidea; Homo.

REFERENCE 1 (bases 1 to 2884)

AUTHORS Gregory,S.G., Barlow,K.F., McLay,K.E., Kaul,R., Swarbreck,D., Dunham,A., Scott,C.E., Howe,K.L., Woodfine,K., Spencer,C.C., Jones,M.C., Gillison,C., Searle,S., Zhou,Y., Kokocinski,F., McDonald,L., Evans,R., Phillips,K., Atkinson,A., Cooper,R., Jones,C., Hall,R.E., Andrews,T.D., Lloyd,C., Ainscough,R., Almeida,J.P., Ambrose,K.D., Anderson,F., Andrew,R.W., Ashwell,R.I., Aubin,K., Babage,A.K., Baguley,C.L., Bailey,J., Beasley,H., Bethel,G., Bird,C.P., Bray-Allen,S., Brown,J.Y., Brown,A.J., Buckley,D., Burton,J., Bye,J., Carter,C., Chapman,J.C., Clark,S.Y., Clarke,G., Clee,C., Cobley,V., Collier,R.E., Corby,N., Coville,G.J., Davies,J., Deadman,R., Dunn,M., Earthrow,M., Ellington,A.G., Errington,H., Frankish,A., Frankland,J., French,L., Garner,P., Garnett,J., Gay,L., Ghori,M.R., Gibson,R., Gilby,L.M., Gillett,W., Glithero,R.J., Graham,D.V., Griffiths,C., Griffiths-Jones,S., Grocock,R., Hammond,S., Harrison,E.S., Hart,E., Haugen,E., Heath,P.D., Holmes,S., Holt,K., Howden,P.J., Hunt,A.R.,

SnapGeneViewerで配列情報をわかりやすく表示する

8. gbファイル（GenBankファイル）を読み込むには専用のソフトが必要になる。今回はSnapGene Viewerという無料ソフトをダウンロードして使う。

配布元のリンク

[Features](#)[Plasmids](#)[Resources](#)[Pricing](#) [My Account](#) [Free Trial](#)

SnapGene Viewer

View, annotate and share sequence files with the free SnapGene Viewer.
To edit, align and clone sequences, try the full version of SnapGene.

[Download Viewer](#)[Try SnapGene](#)

9. 自身のメールアドレスを入力してダウンロード・インストールを行う。

Gain Unparalleled Visibility of Your Plasmids

With SnapGene Viewer you can view plasmid maps, annotate features, and share sequences with your colleagues for free. And when you want to do more, subscribe to SnapGene to simulate cloning and PCR, validate sequenced constructs and customize your plasmids.

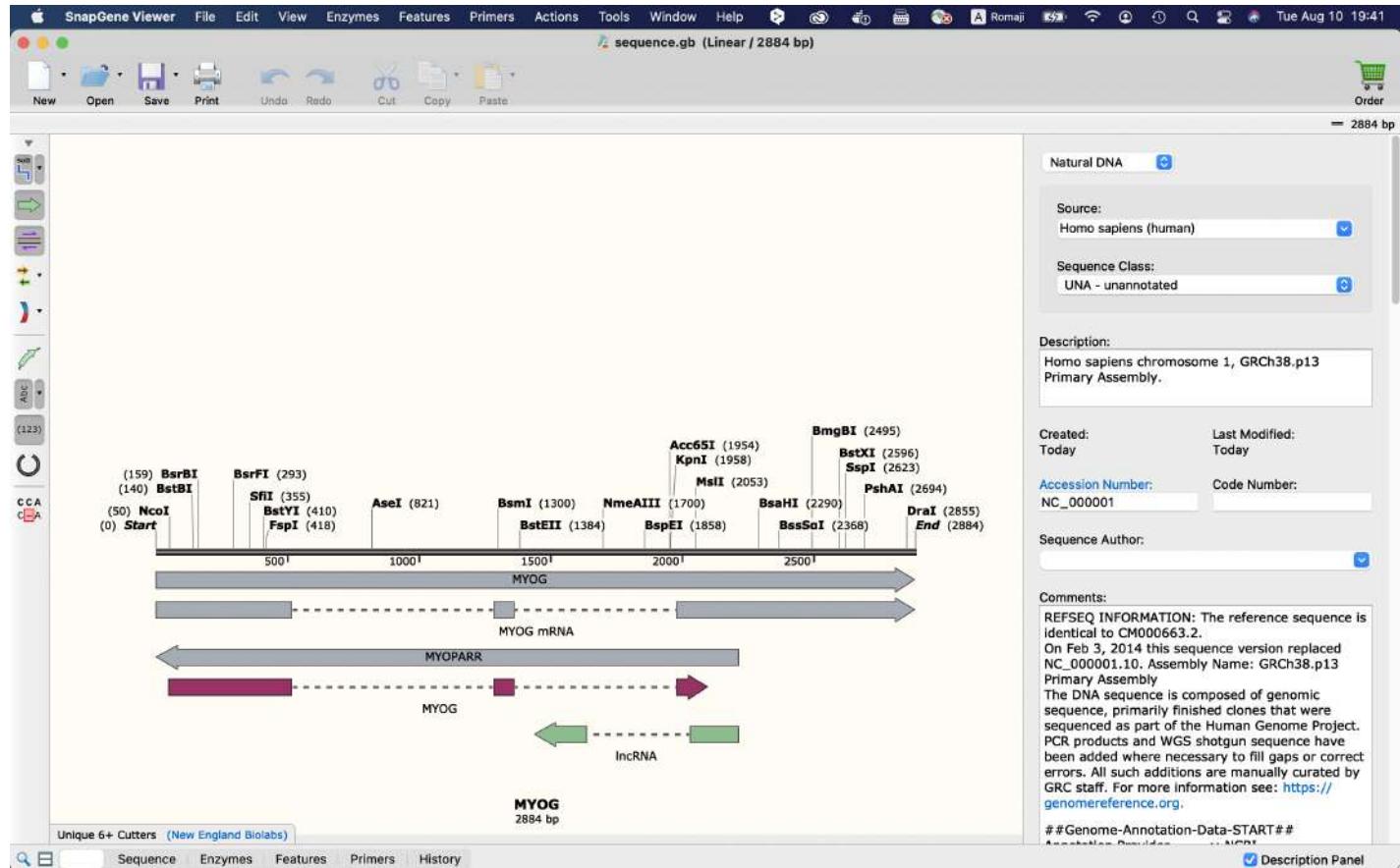
Download SnapGene Viewer

EMAIL: *

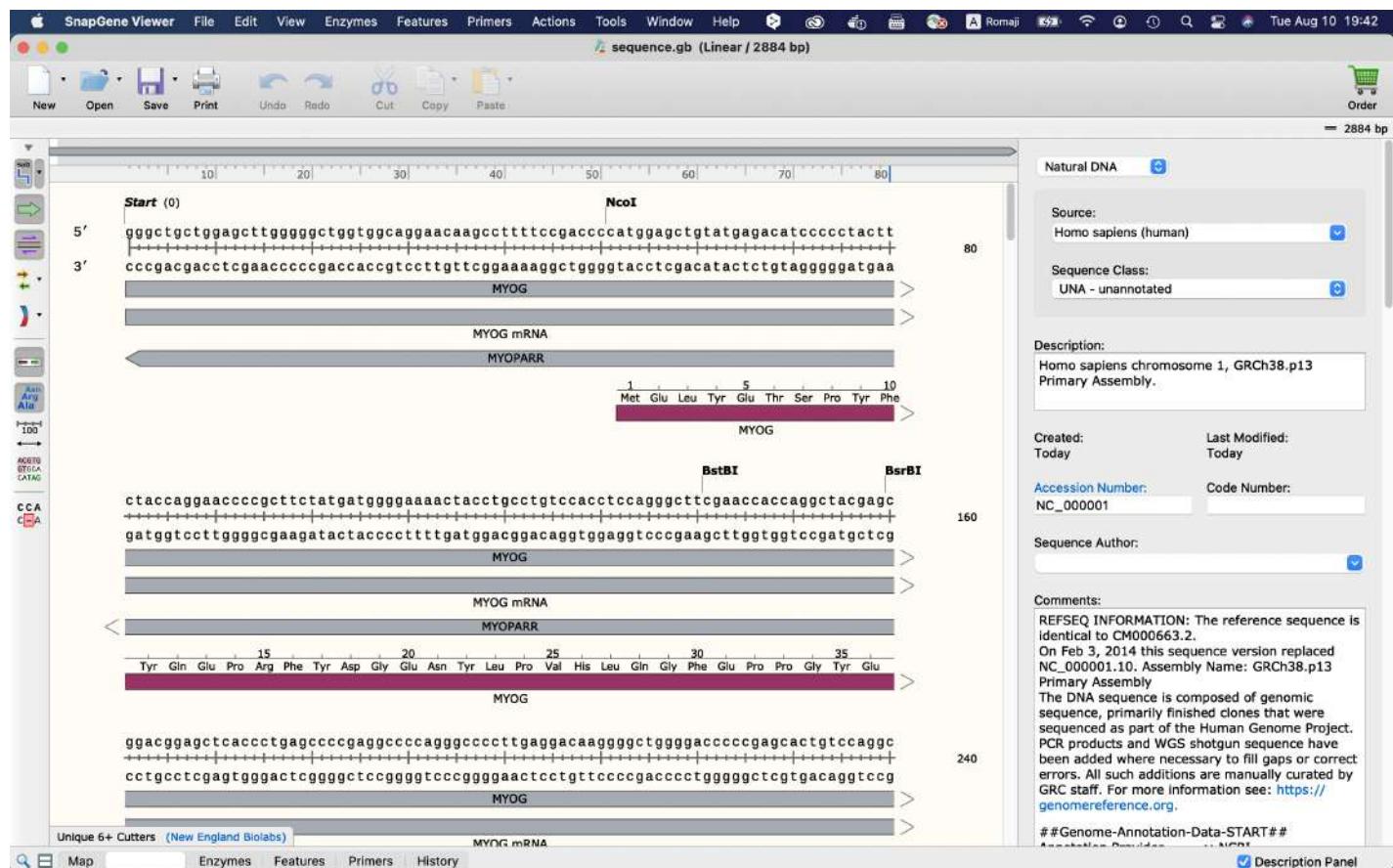
[Download](#)

Your download will be available immediately.

10. SnapGene Viewerでsequence.gbを開くと次のようになる。小豆色の矢印がアミノ酸に変換されるコード領域となっている。



11. "Sequence"をクリックすると以下のようになる。小豆色の線上に表示されているのが該当するDNA二重鎖配列となっている。



*ちなみに無料版の"SnapGene Viewer"では配列の編集ができません。編集する場合は有償版である"SnapGene"を利用するか"Serial Cloner"のような別ソフトを併用されるとよいでしょう。