

Protocol for CRISPR/Cas system in medaka | ver. 3.0

安齋 賢 Satoshi Ansai [Email: satoshi.ansai.e7@tohoku.ac.jp]

Feb 29, 2020

Version 3.0での主な変更点

- ・ sgRNAのテンプレート作製を"Plasmid-free"のPCRベースにした
- ・ RNA転写/精製に使用するkit, その他試薬の変更
- ・ Cas9タンパク質を使うプロトコルの追加

1. Synthesis of custom-designed sgRNA

主にCUGA7 gRNA Synthesis Kitを使って, 自分でgRNAを合成する. コストは約¥1,500/target.
化学合成でcrRNA/tracrRNAを入手する場合は省略可能.

1-1. Materials

DNAオリゴ

脱塩 or 逆相カラムグレードで以下のオリゴを合成する

sgRNA-scaffold:

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCG
AGTCGGTGCTTTT (80-mer)

sgRNA-RV: AAAAGCACCGACTCGGTGCC (20-mer)

試薬・Kit類

- ・ CUGA7 gRNA Synthesis Kit (ニッポンジーン, 314-08691)
- ・ FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス, FG-91302)

1-2. Design of sgRNAs for target loci

標的配列の選択

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

つまり3'側が"GG"で終わる配列を探せばOK. 逆鎖側での設計も問題なし (=画面上の"CC"にも設計可能).

設計には以下のツールが便利だが, 他にもたくさんツールがあるので, 好みで選んでOK.

1. CCTop (<http://crispr.cos.uni-heidelberg.de/index.html>)
2. CRISPRscan (<http://www.crisprscan.org/>)
3. CHOPCHOP (<https://chopchop.cbu.uib.no/>)

オリゴ設計

"sgRNA_PCRoligo.xlsx"を開き, 選んだゲノム配列を「5'- N₂₁GG -3'」の形にして指定の欄に入力する.

※配列処理に使うので, ファイルを開いた時にマクロを有効にすること.

得られた57-merの配列のDNAオリゴを化学合成する (外注). 脱塩 or 逆相カラムグレードでOK.

1-3. *in vitro* synthesis of sgRNAs

PCRによるテンプレート作製

DW	29.7 μ L	PCR条件
5X PrimeSTAR GXL Buffer	10 μ L	
dNTP mixture (2.5 mM each)	4 μ L	(98°C 10s → 55°C 15s → 68°C 30s) *35
sgRNA-scaffold (0.1 μ M)	2 μ L	
sgRNA-RV (10 μ M)	2 μ L	
PrimeSTAR GXL	0.3 μ L	
Custom-designed oligo (10 μ M)*	2 μ L	*のオリゴは各標的毎に設計したもの
Total	50 μ L	

5 μ L分取し, 2%アガロースで電気泳動を行う. 120 bp前後に1本バンドが見えればOK.

PCR産物の精製

PCR産物の全量を, FastGene Gel/PCR Extraction Kitにより精製する (詳細は添付説明書を参照).

1. 新しい1.5 mLチューブに, 225 μ Lの結合バッファ-GP1を加える.
2. PCR産物の残り (45 μ L) をGP1の入った1.5mLチューブに移し, Vortexでよく攪拌する.
3. 溶液全量 (270 μ L) をFastGene GPカラムに移し, 遠心 (16,000 xg, 30 sec) する.
4. カラムを通過した溶液を捨て, 600 μ Lの洗浄バッファ-GP2を加え, 遠心 (16,000 xg, 30 sec) する.
5. カラムを通過した溶液を捨てた後, 遠心 (16,000 xg, 2 min) し, カラムを乾燥させる.
6. FastGene GPカラムを新しい1.5mLチューブに移し, 20 μ Lの溶出バッファ-GP3を加える.
7. 室温で2分間静置した後, 遠心 (16,000 xg, 2 min) し, 精製DNAを溶出する

溶出液の1 μ Lを分取し, NanodropでDNAを定量する. 30–50 ng/ μ L前後になればOK.

RNase-free Waterを使って, 25 ng/ μ Lに希釈しておく.

in vitro transcription

1. PCR tube中に以下の反応液を調製する (詳細はCUGA7 gRNA Synthesis Kitの説明書を参照).

	(1反応分)	(4反応分)
RNase-free Water	2 μ L	8 μ L
5x Transcription Buffer	4 μ L	16 μ L
0.1 M DTT	2 μ L	8 μ L
NTP mix	6 μ L	24 μ L
CUGA7 Enzyme Solution	2 μ L	8 μ L

→ 16 μ Lずつ分注する

2. 分注した溶液に, 25 ng/ μ Lに調製したテンプレートDNAを2 μ L (=Total 100 ng) ずつ加える.
3. Thermal cyclerに移し, 37°Cで2時間, 転写反応を行う
4. 添付のDNase Iを2 μ L加え, 37°Cで10分間反応させる (RNAが分解するので, 延長厳禁!)

スピнкаラムによるRNAの精製 (詳細はCUGA7 gRNA Synthesis Kitの説明書を参照)

1. 転写反応液 (22 μ L) に578 μ LのgRNA Binding Bufferを加え, よく攪拌する.
2. 混合液 (600 μ L) 全量をカラムに添加し, 遠心 (13,000 xg, 1分間, 4°C) する.
3. 溶液を捨てた後, 750 μ LのgRNA Wash Bufferをカラムに加え, 遠心 (13,000 xg, 1 min, 4°C) する.
4. 溶液を捨てた後, カラムを空のまま遠心 (13,000 xg, 2 min, 4°C) し, 乾燥させる.
5. カラムを新しい1.5 mLチューブの上に移した後, RNase-free Water 50 μ Lを滴下する.
6. 3分間室温で静置した後, 遠心 (13,000 xg, 2 min, 4°C) し, RNAを溶出する.

sgRNAの定量・QC・保存

1. 溶出液の1 μ Lを分取し, Nanodropで定量する. この時, 500–1500 ng/ μ L (Total 25–75 μ g) 前後になればOK.
2. 定量後の溶出液をチューブに回収し, 2%アガロース/TAEで通常の電気泳動を行う. この時100 bpにシングルバンドが見えればOK.
3. RNA溶液は, -80°Cで保存する.

2. Synthesis of Cas9 RNA

主にAmpliCap SP6 High Yield Message Maker Kitを使用して、受精卵での翻訳に適した5' Cap構造付きのCas9 RNAを合成する。

コストは約¥3,500/runで、約20 µg (= 200 µLのインジェクション溶液に相当) のCas9 RNAを合成可。

Cas9タンパク質を購入する場合は省略可能。なお、Knock-out/Knock-inともに、タンパクでもRNAでもほぼ導入効率は同等である。

2-1. Materials

プラスミドベクター

次のプラスミドのいずれかを精製しておく (カラム精製以上, Midi prepでstockしておくのがおすすめ)

- ・ pCS2+hSpCas9: Cas9 vector, **Amp耐性**, [Addgene Plasmid 51815]
- ・ pCS2+hSpCas9-mAG: 緑色蛍光タンパク質 (monomeric Azami-Green) をC末端に付加したCas9 vector, **Amp耐性**, [未発表]

KOの時は、Injectionの補正も兼ねて蛍光ありのCas9-mAGの使用を推奨。

試薬・Kit類

- ・ AmpliCap SP6 High Yield Message Maker Kit (CellScript/エアブラウン, C-AC0706)
- ・ FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス, FG-91302)
- ・ Monarch RNA Cleanup Kit (50 µg) (NEB, T2040L)
- ・ NotI-HF (NEB, R3189S)
- ・ Proteinase K (20 mg/mL)
- ・ 10% SDS

2-2. in vitro transcription of capped RNA of Cas9

プラスミドベクターのlinearization

以下の反応液を1.5 mLチューブ中に調製する。

DW	up to 100 µL
CutSmart buffer	10 µL
NotI-HF	1 µL
Cas9 Plasmid (10 µg)	x µL
Total	100 µL → 37°C, o/n

反応後、2 µLを取って電気泳動する。

8.3 kb (pCS2+hSpCas9) or 9.1 kb (pCS2+hSpCas9-mAG)のバンドが見えればOK。

RNA転写用テンプレートの調製 (RNaseの除去及び精製)

プラスミド抽出液におけるRNaseの残存活性を除去するため、Proteinase K処理を行う。

5 µLの10% SDSと2 µLのProteinase K (20 mg/mL) を加え、55°Cで30分間反応。

処理後の溶液を、FastGene Gel/PCR Extraction Kitにより精製する (詳細は添付説明書を参照)。

1. 新しい1.5 mLチューブに、525 µLの結合バッファーGP1を加える。
2. ProK処理液 (105 µL) をGP1の入った1.5mLチューブに移し、Vortexでよく攪拌する。
3. 溶液全量 (630 µL) をFastGene GPカラムに移し、遠心 (16,000 xg, 30 sec) する。
4. カラムを通過した溶液を捨て、600 µLの洗浄バッファーGP2を加え、遠心 (16,000 xg, 30 sec) する。
5. カラムを通過した溶液を捨てた後、遠心 (16,000 xg, 2 min) し、カラムを乾燥させる。
6. FastGene GPカラムを新しい1.5mLチューブに移し、20 µLの溶出バッファーGP3を加える。
7. 室温で2分間静置した後、遠心 (16,000 xg, 2 min) し、精製DNAを溶出する

溶出液の1 µLを分取し、NanodropでDNAを定量する。200–400 ng/µL前後になるはず。

in vitro RNA transcription

1. AmpliCap SP6 High Yield Message Maker Kit中の試薬を使い、以下の反応液をPCR tube中に調製。

RNase-free Water	up to 20 μ L
10X AmpliCap SP6 Transcription Buffer	2 μ L
AmpliCap Cap/NTP PreMix	5.3 μ L
100 mM DTT	2 μ L
ScriptGuard RNase Inhibitor	0.5 μ L
AmpliCap SP6 Enzyme Solution	2 μ L
Linearized Cas9 Plasmid (1000 ng)	x μ L
Total	20 μ L

2. 37°CにセットしたThermal cyclerで、2時間反応を行う。
3. 添付のRNase-free DNase Iを1 μ L加え、37°Cで10分間反応させる (RNAが分解するので、延長厳禁!)

スピncラムによるRNAの精製 (詳細はMonarch RNA Cleanup Kitの添付説明書を参照)

1. 新しい1.5 mLチューブを用意し、29 μ LのRNase-free Waterを加える
2. 反応液 (21 μ L) を1.5mLチューブに移し、Vortex でよく混ぜる。
3. RNA Cleanup Binding Buffer 100 μ Lを加え、よく攪拌する。
4. 100% エタノール 150 μ l を加え、加えたチップを使ってそのままピペッティングを行い溶液を緩やかに混合 (Vortexしない!) した後、溶液全量をスピncラムに流し入れる。
5. 遠心 (16,000 xg, 1 min) を行い、溶出液を捨てる。
6. RNA Cleanup Wash Buffer 500 μ l を加え、遠心 (16,000 xg, 1 min) を行った後、溶出液を捨てる。
7. もう一度RNA Cleanup Wash Buffer 500 μ l を加え、遠心 (16,000 xg, 3 min) を行った後、溶出液を捨てる。
8. カラムを新しい1.5 mLチューブに移した後、RNase-free Water 30 μ Lを加え、遠心 (16,000 xg, 1 min) により溶出する。

RNAの定量・QC・保存

1. 溶出液の1 μ Lを分取し、Nanodropで定量する。この時、700 ng/ μ L (Total 20 μ g) 前後になればOK。
2. 定量後の溶出液をチューブに回収し、1%アガロース/TAEで通常の電気泳動を行う。この時2kb付近にシングルバンドが見えればOK。
3. RNA溶液は、-80°Cで保存する。

3. Preparation of RNase-free DNA for the knock-in experiments

通常の手法で回収したプラスミドDNAには、大腸菌由来RNAの分解のために加えるRNase活性が残存する。RNAとプラスミドDNAの共導入を行なうためには以下の手法でmini prepを行うのが良い。

3-1. Materials

準備するもの

- ・ 10% SDS
- ・ Proteinase K (20 mg/mL)
- ・ FastGene Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティクス, FG-91302)
- ・ 何らかのPlasmid Mini Prep Kit or 下記の自作試薬

スピнкаラムを使わずにMiniprepをする際に準備するもの

- ・ 2-プロパノール
- ・ 70%エタノール
- ・ Mini prep用buffer (Qiagen Plasmid Kitの組成を参考に自作)
 - Buffer P1: 50 mM Tris-HCl [pH 8.0], 10 mM EDTA (冷蔵保存)
 - Buffer P2: 200 mM NaOH, 1% SDS (室温保存, 冬はSDS析出注意)
 - Buffer P3: 3M 酢酸カリウム [pH 5.5] (冷蔵保存)
- ・ TE+RNaseA: TE (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 1 mM EDTA) + RNaseA (20 µg/mL, 冷蔵保存)
- ・ LB培地

3-2. [opt.] Plasmid extraction without any spin columns

1. 15 mL遠沈管にLB培地 3 mL (+抗生物質) を入れ, pickしたコロニーを入れ, 37°Cで一晩振盪培養する。
2. 遠心 (12,000 rpm, 2 min) によって集菌し, 得られた上清を捨てる。
3. 250 µLのP1を加え, Vortexで菌を再懸濁させた後, 1.5 mLチューブに移す。
4. 250 µLのP2を加え, 10回程転倒混和 (Vortex厳禁!) した後, 室温で5分間放置する。
5. 250 µLのP3及び30µLのクロロホルムを加え, 10回程転倒混和 (Vortex厳禁!) した後, 遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) を行い, 得られた上清を新しい1.5 mLチューブに回収する。
6. 750 µLの2-プロパノールを加え, Vortexで良く攪拌した後に遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) し, 得られた上清を捨てる。
7. 70%エタノール 300 µLを加え, Vertexでよく攪拌した後に遠心 (16,000 xg 以上, 5 min) し, 得られた上清を捨てる。
8. スピンドウンした後, ピペティングで可能な限り上清を除去してから, 室温で残存エタノールを乾燥させる (5分くらい, 乾かしすぎ厳禁)
9. 50 µLのTE+RNaseAを加え, 37°Cで30分間反応させる。沈殿が溶けにくい時は, 5-10分程経過した時に一度攪拌すると, 溶解しやすい。

3-3. Removal of the residual RNase activity in plasmid DNA solutions

一般的な方法で回収したプラスミドDNA中に残存するRNase活性を, 以下のProteinase K処理およびスピнкаラム精製 (FastGene Gel/PCR Extraction Kit, 詳細は添付説明書参照) によって除去する。

1. プラスミド溶液 (50 µL) に対して, 2.5 µLの10% SDSと1 µLのProteinase K (20 mg/mL)を加え, 軽く混和した後, 55°Cで30分間反応させる。
2. 250 µLの結合バッファーGP1を加え, Vortexでよく攪拌する。
3. 溶液全量 (300 µL) をFastGene GPカラムに移し, 遠心 (16,000 xg, 30 sec) する。
4. カラムを通過した溶液を捨て, 600 µLの洗浄バッファーGP2を加え, 遠心 (16,000 xg, 30 sec) する。
5. カラムを通過した溶液を捨てた後, 遠心 (16,000 xg, 2 min) し, カラムを乾燥させる。
6. FastGene GPカラムを新しい1.5mLチューブに移し, 20 µLの溶出バッファーGP3を加える。
7. 室温で2分間静置した後, 遠心 (16,000 xg, 2 min) し, 精製DNAを溶出する

溶出したDNAの濃度をNanodropで定量する。溶出液は, RNAグレードとして扱う。

4. Assembly of Cas9 RNP for microinjection

Cas9タンパク質を用いたゲノム編集実験を行う場合、安定なCas9タンパク質とgRNAの複合体 (リボヌクレオタンパク質, RNP) を、予めin vitroで形成させることが出来る。

4-1. Materials

準備するもの

- ・ Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 ()
- ・ Cas9 working buffer (20 mM HEPES; 150 mM KCl, pH 7.5): 4度保存
- ・ sgRNA: 転写後のものを、Cas9 working bufferを用いて100 ng/μLに希釈しておく: -80度保存
- ・ ProK処理後のプラスミドDNA

4-2. Assembly of Cas9 RNP for knock-out experiments

Cas9タンパク質の希釈

1. 以下の溶液を調製する

Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 (10 μg/μL)	0.5 μL
Cas9 working buffer	9.5 μL
Total	10 μL

2. 得られた希釈液は、-80度で長期間保存が可能。ただし、凍結融解は最小限にすること！

Cas9 RNPの形成

1. 以下の反応液をPCRチューブ中に調製する

Diluted Cas9 Nuclease (500 ng/μL)	3 μL
sgRNA (100 ng/μL)	1.5 μL
Cas9 working buffer	1.5 μL
Total	6 μL

2. サーマルサイクラー中で、37度で10分間のインキュベーションを行い、Cas9 RNPを形成させる。
3. 反応後のRNP溶液をインジェクションに用いる。インジェクション中は氷上保管。
4. RNP溶液は、4度で~2週間、-80度で長期間保存可能。ただし、凍結融解は最小限にすること！

4-3. Assembly of Cas9 RNP for knock-in experiments

Cas9タンパク質の希釈

1. 以下の溶液を調製する

Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 (10 μg/μL)	0.5 μL
Cas9 working buffer	9.5 μL
Total	10 μL

2. 得られた希釈液は、-80度で長期間保存が可能。ただし、凍結融解は最小限にすること！

Cas9 RNPの形成

1. 以下の反応液をPCRチューブ中に調製する

Diluted Cas9 Nuclease (500 ng/μL)	2.5 μL
sgRNA (100 ng/μL)	1 μL
sgRNA for a Bait sequence (100 ng/μL)	1 μL
Total	4.5 μL

2. サーマルサイクラー中で、37度で10分間のインキュベーションを行い、Cas9 RNPを形成させる。
3. 反応後の溶液にKI用のプラスミドDNA (30–50 ng/μL) を0.5 μL加え、その溶液をインジェクションに用いる。インジェクション中は氷上保管。
4. 溶液の保存性は不明であるが、おそらく保存はしない方が良い (Baitで切れることが大事だとすると)。