

Protocol for CRISPR/Cas system in medaka | ver. 1.3

作製: 安齋 賢
2015.12.17

1. Materials

ベクター

- pCS2+hSpCas9: Cas9 vector, **Amp耐性**, [Addgene Plasmid 51815]
- pDR274: sgRNA vector, **Kan耐性**, [Addgene Plasmid 42250]

試薬

- BsaI-HF (NEB), DraI, NotI, 各種付属バッファー類
- Proteinase K (20 mg/mL)
- 10% SDS溶液
- 大腸菌関係 (培地, 抗生物質, コンピテントセル等) 一式
- 10x annealing buffer (400 mM Tris-HCl [pH 8.0], 200 mM MgCl₂, 500 mM NaCl)
- AmpliScribe T7-flash Transcription Kit (Epicentre, ASF3507)
- mMessage mMachine SP6 Kit (Thermo/Ambion, AM1340)
- RNeasy mini kit (Qiagen, 74106)
- プラスミド精製 (mini-prep) キット: NucleoSpin Plasmid Quick Pure (MACHEREY-NAGEL) 等
- ゲル/PCR産物精製キット: NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (MACHEREY-NAGEL) 等

2. Design and construction of sgRNA transcription vector

標的配列の選択

PAMによる制限を考慮して、ゲノム中の「5'- N21GG -3'」にsgRNAを設計する。具体的には3'側がGGで終わる配列を探す (目視で十分)。Reverse側での設計も問題ない (つまり画面上のCCでも設計が可能)。

なお、以下のツールがsgRNA設計に有用である。

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

オリゴ設計

「sgRNA design sheet.xls¹」を開き、ゲノム中から探した配列「5'- N21GG -3'」を指定の欄に入力する。※配列処理に使うので、ファイルを開いた時にマクロを有効にすること。

オリゴ発注

普通のプライマーと同じ要領で発注する (22 mer)。
(オペロンで発注する場合、「スタンダードオリゴ」の「一括入力」を選び、上のExcel sheetからそのままコピーして貼れば良い。10 nmoleスケール, OPC精製。)

sgRNA backbone vectorのBsaI消化

¹ sgRNA design sheet.xls はこちらの PDF に添付されています。 Adobe Acrobat Reader で閲覧し、ファイルをご利用ください。ファイル内にマクロを使用していますので、Excel 2008 for mac では使用不可です。その場合は「sgRNA design sheet.odc」を Apache OpenOffice で開いてください。

pDR274は予めmini prepしておく。カラム精製推奨 (BsaIの切れに癖があるので)。

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

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

オリゴのAnnealing (in thermal cycler)

Oligo S (100 µM)	1 µL	
Oligo AS (100 µM)	1 µL	
10X Annealing Buffer	1 µL	95°C 2 min
DW	7 µL	↓
Total	10 µL	30分かけて25°Cに冷却

Ligation

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

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

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

コロニーPCR/mini prep

制限酵素処理での確認やシーケンスを行わないので一応やる。条件は以下の通り。

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

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

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

3. Preparation of Cas9 RNA and sgRNA

転写用ベクターの線状化

>Cas9 RNA (NotIによる切断)

精製したpCS2+hSpCas9をNotIで線状化する

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

反応後、3 µLを取って電気泳動する。8.3 kbのバンドが見えればOK。

>sgRNA (DraIによる切断)

オリゴをクローニングしたpDR274をDraIで線状化する

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

RNA転写用テンプレートの調製 (RNaseの除去及び精製)

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

in vitro RNA transcription

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

mMessage mMachine SP6 kit中の試薬を使い、以下の反応液をPCR tube中にする

DW	2 µL
2X NTP/ARCA	5 µL
10X Reaction Buffer	1 µL
pCS2+hSpCas9 (NotI digested)	1 µL
Enzyme mix	1 µL
<hr/>	
Total	10 µL

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

>sgRNA (T7 RNA polymeraseによる転写)

AmpliScribe T7-flash Transcription Kit中の試薬を使い、PCR tube中に反応液を作る

各試薬が少量なのでMaster mixを作ったほうが良い

	(1反応分)	(4反応分)
DW	2.15 µL	8.6 µL
10X Reaction Buffer	1 µL	4 µL
100 mM ATP	0.9 µL	3.6 µL
100 mM CTP	0.9 µL	3.6 µL
100 mM GTP	0.9 µL	3.6 µL
100 mM UTP	0.9 µL	3.6 µL
100 mM DTT	1 µL	4 µL
RNase Inhibitor	0.25 µL	1 µL
T7 Enzyme Solution	1 µL	4 µL

→9 µLずつ分注する

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

DNase処理

転写後の液に、Kit付属品のDNaseを1 μL 加え、37°Cで15分間反応させる

RNAの精製

(1) RNeasy mini kit (Qiagen) による精製

1. DNase後の反応液 (11 μL) に89 μL の蒸留滅菌水を加え、全量を100 μL とする。
2. Buffer RLT 350 μL を加え、Vortexでよく混合する。
3. 100%エタノール250 μL 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した後、溶液全量をスピncラムに流し入れる。
4. 遠心分離 (8,000 xg, 30 sec) を行い、溶出液を捨てる。
5. Buffer RPE 500 μL を加え、遠心分離 (10,000 xg, 30 sec) を行った後、溶出液を捨てる。この洗浄操作を2回繰り返す。
6. カラムを新しいcollection tubeに移し、遠心乾燥 (10,000 xg, 5 min) を行う。この時、Qiagen RNeasy miniのスピncラムは、フィルター「ふち」に溶液が残りやすいので、Buffer RPEの残存が無いよう、目視で確認する。(opt. エタノールの残存が気になる場合は、遠心乾燥後のスピncラムを70°Cで数分間加熱し、エタノールを蒸発させると良い。)
7. RNase-free water 30 μL を加え、1分程静置した後、遠心 (10,000 xg, 2 min) によって溶出。

(2) フェノール・クロロホルム処理及び酢酸アンモニウム沈殿による精製

1. DNase処理後の液を1.5 mL tubeに移し、DW 89 μL を加えて全量を100 μL にする。
2. TE飽和フェノール 100 μL を加え、Vortexで攪拌後、12,000 rpm以上で5–10分間遠心。
3. 上清を回収後、クロロホルム 100 μL を加え、Vortexで攪拌後、12,000 rpm以上で5–10分間遠心。
4. 上清を回収し、5M Ammonium Acetate 100 μL を加え、Vortexで攪拌する。
5. 氷上に15分間静置。(この間に遠心機を4°Cに冷却する)
6. 冷却後の液を、4°C, 12,000 rpm以上で15分間遠心する。
7. 上清を慎重に除去し、70%エタノール 300 μL を加える。Vortex後、12,000 rpm以上で10分間遠心。
8. 上清 (エタノール) を可能な限り除去した後、風乾させる。
9. 30 μL のDWを加え、沈殿を溶解する。

RNAの定量と保存

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

残りは速やかにディープフリーザーに入れ、-80°Cで保存。

Injection用溶液の調整

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

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

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

準備するもの

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

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

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

Proteinase K (20 mg/mL),

イソプロパノール (2-プロパノール)

70% エタノール

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

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

作業手順

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