

Short-homology-mediated CRISPR/Cas9-based method in fission yeast

Hayashi & Tanaka 2019, G3 <https://doi.org/10.1534/g3.118.200976>

Two plasmids (Cas9 + gRNA)

Cas9発現プラスミドによる形質転換

↓ + チアミン、4日培養

gRNA発現プラスミドによる形質転換
+ ドナーDNA

↓ - チアミン、6日培養

YES培地へのコロニーのストリーク

↓ 2~3日培養

変異導入/タグ導入の確認

例: 表現型
コロニーPCR
シーケンス

Single plasmid (gRNA-Cas9)

gRNA-Cas9 発現プラスミドによる形質転換
+ ドナーDNA

↓ - チアミン、6日培養

選択培地へのコロニーのストリーク

↓ - チアミン、2日培養

YES培地へのコロニーのストリーク

↓ 2~3日培養

変異導入/タグ導入の確認

例: 表現型
コロニーPCR
シーケンス

1. gRNAの設計

1-1. gRNAの設計

PAM配列(Protospacer adjacent motif, NGG)を変異導入(または遺伝子挿入)をおこなう近傍のDNA配列(両鎖)から探し、5'側の上流20 bpをgRNAとして設計する。切断はPAMの約3 bp上流に入るため、なるべく変異塩基の近くに切断点を持つgRNA候補を選択する。またgRNA設計のためのwebサイト(例: CRISPRdirect)でgRNA配列の候補を検索することができる。各webサイトの検索欄に目的遺伝子のゲノム配列 ~500 bpをペーストし、ターゲットの生物種を選択して(分裂酵母など) 検索を開始する。

1-2. gRNAの特異性の確認

複数の候補がある場合はオフターゲットとして似た配列を多く持つものや40%以下の低いGC含量を持つgRNAを除く。またPAM配列の近傍に多くのA/T配列があるgRNAの候補を除く。

1-3. gRNAのオリゴを注文する

gRNA - Fw 5' -caccXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

gRNA - Rv 5' -aaacXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX-3'

(gRNA配列20 bpの相補鎖)

★ PAM (NGG)は含めない

BbsI切断箇所にクローニングできるように4 bp加える

gRNA 設計のためのWebサイト

CRISPRdirect

<https://crispr.dbcls.jp>

E-CRISP

<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html>

Bähler lab genome Regulation

<http://bahlerweb.cs.ucl.ac.uk/cqi-bin/crispr4p/webapp.py>

2. gRNAのクローニング

2-1. オリゴのアニーリング

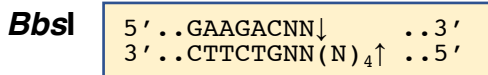
| | | | |
|---|----|------------------------|---------------|
| CACCCXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXCAAA | 例: | *10 x annealing buffer | 3 ul |
| | | gRNA Fw (100 uM) | 6 ul |
| | | gRNA Rv (100 uM) | 6 ul |
| | | dH ₂ O | 15 ul / 30 ul |

合成オリゴとアニーニングバッファー(制限酵素バッファーでも可)と水をPCRチューブに入れて混ぜ、PCR装置でアニーリング反応をおこなう。95°Cで2分処理したのち、放置または取り出して室温で30分静置する。PCR装置を用いたアニーリングプログラムを使用しても良い。

例: 95°C 2分、-2°C/分で25°Cまでクールダウンさせる。

*10 x annealing buffer: 0.1 M Tris pH7.5~8, 0.5 M NaCl, 10 mM EDTA

2-2. *Bbs*IによるgRNA発現プラスミドの切断



★ Cas9発現プラスミドを大腸菌から精製した場合は65°Cで30分処理して保存する。
Cas9遺伝子をもつプラスミドは不安定なので、できれば-80°Cに保存する。

| | | | |
|----------------------------|----|---|--------------|
| 37°Cで1時間処理。 長い処理時間は避ける。 | 例: | 10 x buffer | 10 ul |
| | | Plasmid (1 ~ug) | X ul |
| | | <i>Bbs</i> I (NEB) or <i>Bpi</i> I (Thermo Fisher) | 0.4 ul |
| | | (5~10 U/ ul) | Y ul /100 ul |

アガロースゲル電気泳動で切断を確認する。
熱処理で*Bbs*Iを失活させる(65°Cで20分)。

エタノール沈殿またはカラム精製してプラスミドを回収する。カラム精製の場合はプラスミドのサイズが大きい場合、回収効率が下がる場合がある。

-80°Cで保存する。凍結融解による分解が気になる場合は小分けにして保存する。

2-3. gRNAのプラスミドへのクローニング

どのライゲーションキットでも使用可。東洋紡のLigation high ver. 2を使用した場合の条件を示す。

| | | |
|---|---|-------------|
| アニールしたオリゴを100分の1 希釈して加える。 16°Cで30分処理。 | Ligation high (1/2 volume of DNA) | 1 ul |
| | <i>Bbs</i> I digested Plasmid (~10 ng/ul) | 1 ul |
| | 1/100 diluted annealed oligo | 1 ul / 3 ul |

2-4. 大腸菌の形質転換

ライゲーションした反応液をコンピテントセルに加える
(例: ~5 ulの反応液を50 ulのコンピテントセルに加える)。

氷上で30分静置し、42°Cで30秒ヒートショックする。

氷上で2分静置してからLB-Ampプレートに細胞を広げる。

37°Cで一晩培養する。

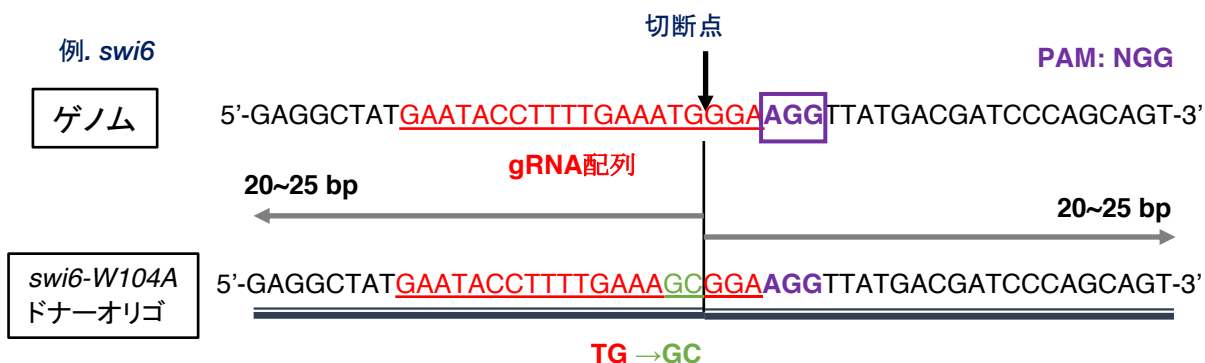
2.5. gRNAのクローニングの確認

形質転換体をLB-Amp培地で培養し、プラスミドDNAを精製する。Cas9遺伝子を持つプラスミドは65°Cで30分処理してから保存する。

gRNAの挿入確認は基本的にシーケンスによって確認するが、gRNA用のオリゴと近傍のプライマーとのセットを用いたコロニーPCRによる挿入確認でも可。

3. ドナーオリゴDNAの設計

3.1. 点変異導入



PAMから3 bp上流に切断が入るため、切断点から両方向の20~25 bpの配列と変異を持つオリゴを設計する。二本鎖オリゴまたは相補鎖オリゴを混合したドナーを用いると高い挿入効率を得られる。一本鎖オリゴでも挿入が可能。

3.2. N末へのタグ付加

ドナーDNAとして一本鎖オリゴを用いる場合は点変異導入と比べて挿入頻度が低下した。二本鎖または相補鎖オリゴを混合したドナーを用いると高い挿入効率を得られた。

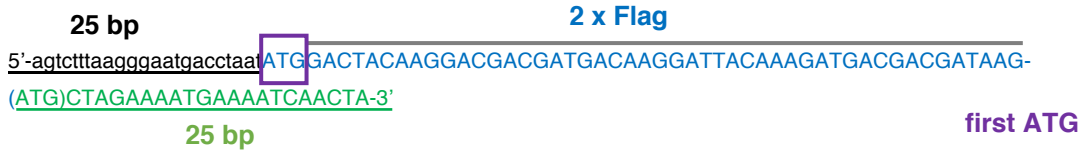
* 250~bpの相同配列のアームを持つDNA断片をドナーDNAとして導入しても高い頻度で挿入される。ただしDNA断片をPCRで増幅する場合は相同配列の間に入れる抗体エピトープの繰り返し配列を増幅するのが難しい。

** GFPなどの比較的長い遺伝子を挿入する場合、25 bpの相同配列を利用しても挿入が得られるが、PCRで長い相同配列のアームを持つDNA断片を増幅し、ドナーDNAとして導入することもできる。

3. 2. N末へのタグ付加(続き)



遺伝子上流～25 bpと ATG、タグ配列、遺伝子の開始コドンから5'側の配列～25bpを含むオリゴを合成する。



4. ドナーDNAを加えた分裂酵母の形質転換

2個のプラスミドを用いる方法

2つのプラスミドを用いる方法は高い導入効率が見られる利点があり、使用する細胞株が同じ場合はあらかじめCas9 発現プラスミドを持たせた細胞をストックしておくことで、いつでも形質転換に用いることができる。Cas9発現プラスミドで形質転換するときはチアミン添加の培地を使用し、発現が抑制された状態で細胞をストックするとCas9による不特定のゲノム切断を避けることができる。形質転換する前培養ではチアミンなしの培地で少なくとも1晩培養する。

1個のプラスミドを用いる方法

酵母細胞の前培養としてチアミンなしのEMM5S液体培地で少なくとも1晩培養する。

形質転換(酢酸リチウム法) 例. *S.pombe* transformation kit (Wako)

対数増殖期($1\sim 2 \times 10^7$ cells/ml)の細胞を集菌し、 $1\sim 2 \times 10^9$ cells/mlになるように懸濁する。

例: 10 ml の培養液($1\sim 2 \times 10^7$ cells/ml)を集菌して 100~200 ul になるように培地を残す。

| | |
|--------------|--|
| チューブに 混ぜる | gRNAまたはgRNA-Cas9発現プラスミド(~1 ug) ドナーDNA : 一本鎖オリゴ: 100 uM 10 ul (1 nmol)) 二本鎖オリゴ: 100 uM 4.5 ul x 2 : 900 pmol PCR断片: 300~ ng、断片の大きさにもよる キャリアDNA (2 mg/ml salmon testes DNA 2 ul) 1~2 x 10 ⁷ 細胞 (10 ul) Transformation reagent (45 ul) |
|--------------|--|

37°Cで2~3 時間静置する。もし酵母株が高温感受性株の場合は許容温度で処理する(例: 25°Cで6時間から一晩)。

細胞をやさしくプレートに広げる。

プレートを32°Cで6~7日間培養する。もし変異導入によって細胞が温度感受性を示す場合、許容温度で培養する(例: 25°Cで10日間)。

5. Knock-inの確認

5.1. 形質転換体の選び方: 小さいコロニーを取る

2個のプラスミドを用いる方法

★ 大きな形質転換体は選ばないこと

最も小さなコロニーを選び、YESプレートにシングルコロニーが得られるようにストリークする。
32°Cで2、3日培養する。

1個のプラスミドを用いる方法

最も小さなコロニーを選び、EMM選択プレート(チアミンなし)にひろげる。32°Cで2、3日培養し、生えてきた細胞をYESプレートにシングルコロニーが得られるようにストリークする。32°Cで2、3日培養する。

5.2. 表現型の確認

変異導入によって細胞が表現型を示す場合、変異導入をシークエンスで確認する前に複数の形質転換体を表現型で選別することができる。

5.3. プラスミド脱落の確認

シングルコロニーをYESとEMM選択培地に広げ、プラスミドの脱落を確認する。*ura4⁺*マーカープラスミドを用いた場合は5-FOAプレートで培養してプラスミドを落とすことができる。

5.4. コロニーPCR

プラスミドを脱落したコロニーを選び、コロニーPCRをおこなう

| | | |
|---|---|-------------|
| 例 | 10 x PCR Buffer | 1 ul |
| | 2 mM dNTPs | 0.8 ul |
| | primers (2.5 uM) Fw & Rv | 0.4 ul each |
| | Taq polymerase (Bio Academia) (5 U/ul) | 0.05 ul |
| | dH ₂ O | X ul |
| | *yeast cells | |
| | | /10 ul |

*1~2日培養した細胞を200 ulのチップの先でつつき、PCR反応液に浸してからチューブの壁で細胞を良く混ぜて反応液に加える。

94°C 2 min – (94°C 30 sec. – 52°C 40 sec. – 72°C (1 kb/ 1 min)) x 36 cycles – 72°C 10 min – hold 12°C

5.5. PCR 産物の電気泳動

1 ulのPCR産物をアガロースゲルで電気泳動し、PCR産物の大きさ(異常な組換えや遺伝子挿入)と増幅量を確認する。

5.6. シークエンス

シークエンス反応に用いるPCR産物はカラム精製または前処理の試薬を用いてプライマーや余剰のdNTPを除く。

| | | |
|---|-----------------------------|--------------------|
| 例 | PCR product | 2.5 ul |
| | ExoSAP-IT <i>express</i> | 0.25 ul |
| | dH ₂ O | 0.75 ul / 1 sample |

37°C 4 min – 80°C 1 min – hold 4°C

ExoSAPで処理した1 ul の PCR 産物をシークエンス反応に使用する