

Single base gene editing in K562 cell line by CRISPR/Cas9

2024/4/22 乾作成

【Purpose】

K562 細胞株への特定のエピジェネティック遺伝子の編集を実施し、EditR ツールを使用することで定量的配列バリエーションの割合を算出する。

【Materials】

- K562 cell
- RPMI-1640 (FBS+A/A)
- ABE8e(TadA-8e V106W) (Plasmid #138495)_A to G
- BE4-Gam (Plasmid #100806)_C to T
- TP53 gRNA(Y234H) p Lenti-guide puuro
- TET2 gRNA(Q803) p Lenti-guide puuro
- ASXL1 gRNA(Q623) p Lenti-guide puuro
- GFPmax-expressing plasmid (Lonza)
- SF Cell Line 4D-Nucleofector™ X Kit S (32 RCT)
- Wizard Genomic DNA Purification Kit
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase kit (M0530L)
- Primer

TP53_Y234H_F : AGTGTGGTGGTGCCCTATGA

TP53_Y234H_R : TTCTTCTTTGGCTGGGGAGA

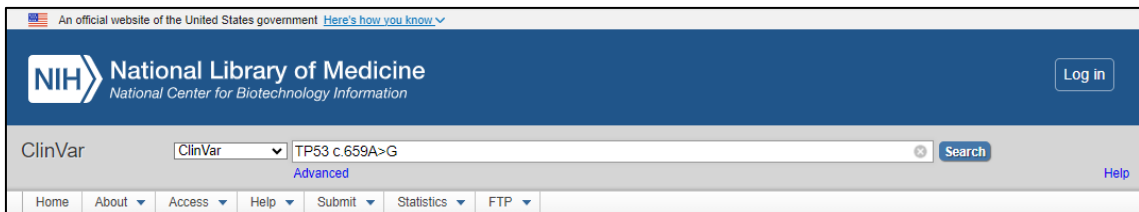
【Methods】

---事前準備（Primer の設計）---

以下、TP53 p.(Y220C)の編集を例として Primer を設計する

【①バリエーション位置の同定】

- 目的遺伝子と変異アミノ酸配列情報を任意のブラウザで検索
- 変異した DNA 配列箇所を確認する。今回 c.659A>G
- NCBI が提供する DB である Clinvar を開く



- 遺伝子名と変異 DNA 箇所を入力し、検索 ※遺伝子 + 変異 DNA 情報でないと Hit しない

Search results
Items: 2

Variation	Gene (Protein Change)	Type (Consequence)	Condition	Classification, Review status
<input type="checkbox"/> NM_000546.6(TP53):c.776A>G (p.Asp259Gly)	TP53 (D127G +3 more)	Single nucleotide variant (missense variant)	Hereditary cancer-predisposing syndrome +3 more	Uncertain significance ★★
<input type="checkbox"/> NM_000546.6(TP53):c.659A>G (p.Tyr220Cys)	TP53 (Y181C +3 more)	Single nucleotide variant (missense variant)	Li-Fraumeni syndrome	Pathogenic ★★★ FDA Recognized database

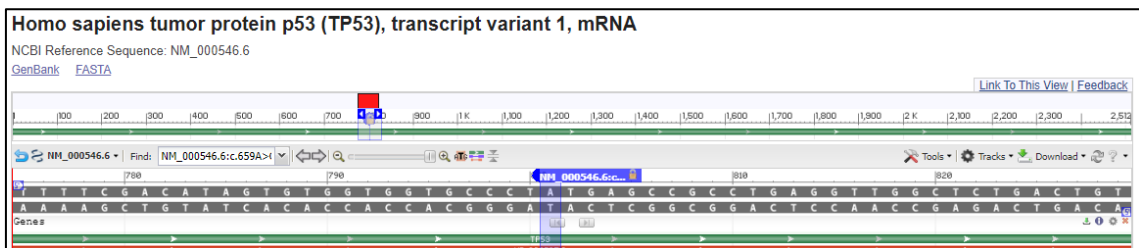
- 該当する結果をクリック

HGVS:	Nucleotide	Protein	Molecular consequence
	NM_000546.6:c.659A>G MANE SELECT ⓘ	NP_000537.3:p.Tyr220Cys	missense
	NM_000546.5(TP53):c.659A>G		
	NM_001126112.3:c.659A>G	NP_001119584.1:p.Tyr220Cys	missense

... more HGVS

- 該当する DNA 配列リンクをクリック

Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_000546.6
[GenBank](#) [FASTA](#)



- 変異塩基の場所を確認する

Homo sapiens tumor protein p53 (TP53), transcript variant 1, mRNA
NCBI Reference Sequence: NM_000546.6
[GenBank](#) [FASTA](#)

- 上記検索結果から GeneBank をクリック

NIH National Library of Medicine
National Center for Biotechnology Information

Nucleotide

GenBank

Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly
NCBI Reference Sequence: NC_000017.11

[FASTA](#) [Graphics](#)

LOCUS NC_000017 19070 bp DNA linear CON 07-OCT-2023
DEFINITION Homo sapiens chromosome 17, GRCh38.p14 Primary Assembly.
ACCESSION [NC_000017](#) REGION: complement(7668421..7687490)
VERSION NC_000017.11
DBLINK BioProject: [PRJNA168](#)
Assembly: [GCF_000001405.40](#)
KEYWORDS RefSeq.
SOURCE Homo sapiens (human)
ORGANISM [Homo sapiens](#)
Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleostomi;
Mammalia; Eutheria; Euarchontoglires; Primates; Haplorrhini;
Cathartini; Hominoidea; Homo

Download 1 item.
Format
Show GI

- Send to よりシーケンスデータをダウンロードし、SnapGene で開く
- Clinvar から同定した変異塩基箇所を SnapGene 上でメモする

[②Primer の設計]

- Primer3 で各パラメーターを設定する

Max Self Complementarity:	<input type="text" value="3"/>	Max 3' Self Complementarity:	<input type="text" value="3.00"/>
		Max 3' Stability:	<input type="text" value="9.0"/>

- 経験上、相補性はやや厳しく設定したほうがよい
- 候補の Primer を作成後、Primer Blast や UCSC から Primer 特性性を確認する
- 特異性に問題なければ、FASMAC で発注

---1st Day ---

〈K562 への Base editing plasmid の導入〉

- RPMI 培地をエッペンチューブへ分注し、37℃、CO2 5%、でプレインキュベーションしておく
 - 96well plate に細胞播種ウェルを決めておき、150 ul ずつメディアウムを添加
 - K562 を遠沈管へ回収、細胞カウント (Cell number : ---cells/ml_---%)
 - 1 条件あたり 2×10^5 cells になるようエッペンチューブへ---ul ずつ分注
 - 300g, 5min,@RT で遠心
 - 完全に上清除去後、Nucleofector Solution 16.4 uL+Supplement 3.6 uL を混合
 - 上記混合済み Buffer で各サンプルをゆっくり懸濁@RT
 - 細胞懸濁液に各 plasmid(base editing : gRNA : GFP=720ng : 240ng : 50ng)を添加
 - 細胞懸濁液を専用チップを用いて 16well カードリッジへ底部から注ぐ
- ※ピペットマンを 2 段階よりやや押し上げて吸い上げ、20 ul 添加すると泡が入らない
- カードリッジの蓋を閉め、総合研究棟でエレクトロポレーションを実施する (96-FF120)
 - 2 号館に細胞を持って帰り、カードリッジの各ウェルにプレインキュベーションをした培地を 80ul ずつ添加する
 - 添加後に 50ul ピックアップし、細胞播種予定のウェルに 50ul 添加しトータル 200ul にする

---2nd Day---

〈GFP の導入確認& 拡大培養〉

- 各条件のウェルを蛍光顕微鏡で確認し、GFP 導入をチェックする
- ※ここで緑色顕微が確認できないウェルはエレクトロポレーションがうまくいっていない
- RPMI 培地 800 uL を追加し、12well plate へ拡大培養

---4th Day---

〈gDNA の抽出&PCR〉

- エレクトロポレーションから 72h 後の K562 細胞をエッペンチューブへ回収
- 300g, 5min,@RT で遠心
- 上清を除去し、PBS 1ml 添加
- 300g, 5min,@RT で遠心
- 上清を除去、600 ul の Nuclei Lysis Solution を添加しピペッティング
- 3 ul の RNase Solution を添加し、転倒混和、15-30min, 37℃でインキュベーション
- 200 ul の Protein Precipitation Solution を添加し、氷上で 5min インキュベーション
- 13000g, 4min,@RT で遠心
- 予め 600 ul 分注したイソプロパノール入りのエッペンチューブへ上清を添加しピペッティング
- 13000g, 1min,@RT で遠心
- 上清を除去し、600 ul の 70%エタノールを添加、ピペッティング

- 13000g, 1min, @RT で遠心
- 上清を除去し、15min 程度ペレットを乾燥させる (2x10⁵cells では恐らくペレット確認できない)
- 20 ul の DNA Rehydrate Solution を添加し、ピペティング
- 65°C 1h か 4 °C オーバーナイトで gDNA を Elution する
- Phusion High-Fidelity DNA Polymerase kit を用いて、PCR を実施

composition	scale	
5x Phusion HF or GC Buffer	4	10
2 mM dNTPs	2	5
10 uM Forward Primer	1	2.5
10 uM Reverse Primer	1	2.5
Template DNA	1	2.5
polymerase	0.2	0.5
NFW	10.8	27
Total (uL)	20	50

- 最終ボリュームが 20 uL 以上であれば精製キットで 20 uL に濃縮する
- 電気泳動で適切な長さの PCR 産物を確認し、切り出しを行う
- 精製キットにて PCR 産物の精製を行い、濃度測定
- 所定の濃度に調製し、シーケンス解析