

■ Vector Preparation

- Lentiviral sgRNA expression plasmid を以下の組成で制限酵素処理

Lentiviral sgRNA expression plasmid	3 µg
NEBuffer 3.1	3 µL
BsmBI	3 µL
H ₂ O	to 30 µL

- 55°C、Over night でインキュベーション
- 1% Agarose gel を作製、DNA マーカーとサンプルをアプライして泳動 (20-30min)
- サンプルは切り出しするため少し太めのコームを使用し、全てアプライする (10 uL/well)
- 泳動後、撮影、プリント
- Fast GENE ゲル/PCR 抽出キットを使用し、DNA を抽出する
- ゲルを回収したエッペンチューブに GP1 を 600 uL 添加し、55°C、10-15min インキュベーション + 転倒混和
- カラムにサンプルを分注し 13000rpm,30sec 遠心
- フロースルーを捨て、GP2 を 600 uL 添加し、13000rpm,30sec 遠心
- フロースルーを捨て、13000rpm,2min 遠心 (x 2 回)し、メンブレン乾燥させる
- 10 uL の GP3 をメンブレンへ添加し、室温 2min インキュベーション
- 13000rpm,室温、2min 遠心
- 濃度測定 (ng/ul)

■ Library Cloning

- HiFi DNA Assembly を以下の組成で行う

HiFi DNA assembly Master Mix: 50ul

Vector (about 8000bp): 500ng

Oligo Pool: 45nM

Total volume: 100ul (water up to 100ul)

- 50°C、1h インキュベーション
- エレクトロポレーションを阻害する塩やバッファーを除去するため、反応液を精製キットを使用し、DNA を 15 ul MQ で溶出する。※塩を含むので Elution buffer 使用しない！
- 4°Cで保存 (以下の self-ligation check 後に使用するかどうか判断する)

■ Self-ligation check

- Negative control として HiFi DNA Assembly を以下の組成で行う

HiFi DNA assembly Master Mix: 5ul

Vector (about 8000bp): 50ng

Total volume: 10ul

- 50°C、1h インキュベーション
- 上記 insertion vector(精製前)と negative control を 1ul ピックして、DH5a へ Transformation (ヒートショックで OK) 翌日のコロニー数を比較することで insertion と self-ligation vector の割合を確認する。Self-ligation の 5 倍以上 insertion で生えていればライゲーション工程に問題はないと判断する

■ Library Transformation

- Recovery Medium を 37°C で 30 分以上温めておく。低温培地を使うと増えない
- LB プレート を 37°C で 30 分以上温めておく
- Electrocompetent Cells (MegaX DH10B) を 1 vial 氷上で 15 分、静置
- MegaX DH10B 100ul に 5ul の精製後の反応液を加える
- 2.0 kV, 200 Ω, 25 μF の条件でエレクトロポレーションを行う。
- リカバリーメディア(キットに入っている。なければ SOC)を出来るだけ早く 4ml 加えピペティング (キュベットを洗うように 4ml 加える)
- 15 ml チューブへ移す
- 37°C で 1 時間培養する

■ Quality check

- 4ml から 4ul を pick (1/1000)、1ml 培地に懸濁
- 1ml から 100 ul を pick(1/10000)LB に撒く
- それぞれを抗生剤入り LB プレートに撒く
- 翌日コロニー数を確認する

※Quality check 計算方法

例)標的遺伝子 500gene の場合。それぞれに対する sgRNA の数(x3)=1500 variation。ライブラリーvariation の 500 倍以上が望ましいので、750,000 コロニーが必要。上記、希釈した大腸菌液を使用する場合、75 コロニー以上が生えていればクオリティーとして問題ないと判断できる。

■ Plate 播種

- 残りすべての大腸菌懸濁液 4ml を 10cm dish 8 枚程度に播種、翌日コロニーを確認
- LB (液体) を表面に 10 ml 程度加えて、セルスクレーパーでかき集めチューブに回収。この操作を 2 ~ 3 回繰り返して一本のチューブにまとめ、Maxi Prep で精製。

[備考欄]

☆ Custom Oligo の設計、オーダー方法

- Library 遺伝子をリスト化する
- Broad 社の CRISPick を検索

<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>

- 以下の設定で Target(s) に標的を記載

Reference Genome <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Human GRCh38 (NCBI RefSeq v.GCF_000001405.40-RS_2023_10)<input type="radio"/> Human GRCh38 (Ensembl v.111)<input type="radio"/> Human GRCh37 (NCBI RefSeq v.105.20220307)<input type="radio"/> Mouse GRCm38 (NCBI RefSeq v.108.20200622)<input checked="" type="radio"/> Mouse GRCm38 (Ensembl v.102)<input type="radio"/> Rat mRatBN7.2 (NCBI RefSeq v.GCF_015227675.2-RS_2023_06)<input type="radio"/> Rat mRatBN7.2 (Ensembl v.111)	Mechanism ⓘ <ul style="list-style-type: none"><input checked="" type="radio"/> CRISPRko<input type="radio"/> CRISPRa<input type="radio"/> CRISPRi	Enzyme <ul style="list-style-type: none"><input checked="" type="radio"/> SpyoCas9 (NGG) ⓘ<input type="radio"/> Chen (2013) tracrRNA ⓘ<input checked="" type="radio"/> Hsu (2013) tracrRNA ⓘ<input type="radio"/> SaurCas9 (NNGRR)<input type="radio"/> AsCas12a (TTTV)<input type="radio"/> enAsCas12a
Target(s) <ul style="list-style-type: none"><input type="radio"/> Quick gene lookup<input checked="" type="radio"/> Bulk/Advanced targets<input type="radio"/> Upload file <p>Enter up to 500 target IDs, or a single raw DNA sequence of at most 2,000 bases.</p> <div style="border: 1px solid #ccc; height: 100px;"></div>		

- sgRNA の数を設定(3~5 くらい)
- submit し、report を txt として保存、EXCEL data へ paste
- 確認の為に IDT の以下のサイトで guide RNA デザインをいくつか確認する

https://www.idtdna.com/site/order/designtool/index/CRISPR_CUSTOM

CRISPR-Cas9 guide RNA design checker

Assess on- and off-targeting potential of protospacer designs of your own or from publications before ordering guide RNAs (gRNAs, such as crRNA and sgRNA) that are synthesized using our Alt-R gRNA modifications. For HDR experiment designs, please see the following HDR design tool.

Search for predesigned gRNA Design custom gRNA **CRISPR-Cas9 gRNA checker**

Species	Mus musculus	<input type="button" value="CHECK"/>
Input format	FASTA Sequence ⓘ	<input type="button" value="CLEAR AND RESET"/>
Paste/Type input	<input type="button" value="Upload file"/>	
<p>Enter up to 99 FASTA Sequences. Please enter sequences in standard FASTA formatting.</p> <div style="border: 1px solid #ccc; padding: 5px;"><pre>>Sequence1 TAGCCACCATCAAACCT >Sequence2</pre></div>		

- Variation の 10%が NT になるように NT gene を List に加える
(GeCKO library から NT を抽出してよい)
- 5'末端にアダプターに TATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCG を加える
- 3'末端にアダプターに GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAAT を加える
- custom oligo pool の合成委託が可能なメーカーのオーダーシートに各配列を記載して発注