

\* 参考文献

Nature Protocols 17, 2431–2468 (2022)

Designing and executing prime editing experiments in mammalian cells

(1) epegRNA のデザイン

1.protospacer、2.PBS、3.RTT 配列を決定する。一度原理を理解した上で、Prime Editor デザイン用の Website や過去の論文で使われた配列を参考にすると良い（下のデザイン例参照）。

(デザイン上の注意点) (website を活用するのが現実的か?)

4 つ以上の U が続く配列はなるべく避ける。

Spacer 配列の最初は G でスタートするようにする。

RTT 配列はなるべく C で始めない。

RTT 配列中の PAM 配列に変異を入れる。また MMR を抑制する変異も入れた方が良い。

(コドン利用表をチェックして、使用頻度が著しく低いコドンを使わないようにする。)

PBS の長さは、10, 13, 15 くらいが適切なことが多い。

RTT はいろいろだが、一変異置換の場合は、Edit 場所+7bp を最小とし+10, +13 くらいが良い候補となる。Tag 入れなどの場合は、Edit 場所+20bp を最小とする。

(2) epegRNA の作製

① protospacer, ② scaffold, ③ RTT-PBS 配列を epegRNA vector(pU6-tevopreq1-GG-accepto, Addgene #174038)に Golden Gate 法を使って挿入する。

① protospacer 配列

Golden Gate part1, Top oligo: CACC(N<sub>20-21</sub>)GTTTT N<sub>20-21</sub>: 20-21 塩基の spacer 配列

Golden Gate part2, bottom oligo: CTCTAAAAC(N<sub>20-21</sub>) N<sub>20-21</sub>: 上記の reverse complement

② scaffold 配列 5'をリン酸化しておく(注文時に可能だが、後でつけることもできる)

Golden Gate part 2, Top oligo:

/5Phos/AGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG  
TGGCACCGAGTCG

Golden Gate part 2, bottom oligo:

/5Phos/GCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAAC

TTGCTATTTCTAG

③ RTT/PBS 配列

Golden Gate part 3, top oligo: GTGC(N<sub>RTT-PBS</sub>) N<sub>RTT-PBS</sub>: RTT-PBS 3'配列

Golden Gate part 3, bottom oligo: CGCG(N<sub>RTT-PBS</sub>)N<sub>RTT-PBS</sub>: 上記の reverse complement

Golden Gate cloning of epegRNAs

- BsaI-HFv2 (NEB, cat. no. R3733S)
- NcoI-HF (NEB, cat. no. R3193S)
- PvuII-HF (NEB, cat. no. R3151S)
- rCutsmart buffer (10×; NEB, cat. no. B6004S or provided with restriction enzymes)
- Tris-HCl (pH 8.0, 1 M solution; Thermo Fisher Scientific, cat. no. 15568025)
- NaCl (5 M solution; Thermo Fisher Scientific, cat. no. AM9760G)
- T4 DNA ligase (NEB, cat. no. M0202S)
- T4 DNA ligase reaction buffer, 10× provided with the T4 DNA ligase, but can also be ordered separately (NEB, cat. no. B0202S)
- T4 polynucleotide kinase, necessary if sgRNA scaffold oligos for Golden Gate method will be manually phosphorylated (NEB, cat. no. M0201S)
- QIAquick gel extraction kit (Qiagen, cat. no. 28704)

(1) Golden Gate cloning のための Annealing buffer の作製

50 mL の annealing buffer を以下のように作製する。室温で長期保存可能。

1 M Tris-HCl (pH8.0)	500 μL
5 M NaCl	500 μL
nuclease-free water	49 mL

(2) Golden Gate part1, 2, 3 の Oligo (single-stranded)を anneal して dsDNA を作る。

Component	Amount (μL)	Final concentration
Top oligonucleotide, 100 μM	1	4 μM
Bottom oligonucleotide, 100 μM	1	4 μM
Annealing buffer	23	—
Total reaction volume	25	—

95°C 3 min, その後室温で放置。丁寧にやるなら、Thermocycler で以下のように。

Step number	Step description	Duration
1	95 °C	3 min
2	Cool to 22 °C at 0.1 °C s <sup>-1</sup>	—

H<sub>2</sub>O 75 ul を加えて、total 100 ul にする。(最終濃度 1 uM). -20°Cで長期保管可。

(\*sgRNA scaffold (Golden Gate part 2)のリン酸化をしていない場合は、薄めずにこの時点でリン酸化する。)

(3) pU6-tevopreq1-GG-acceptor を BsaI/NcoI/PvuII で切断する。

Component	Amount (μL)	Final concentration
pU6-tevopreq1-GG-acceptor, 5 μg	x	125 ng μL <sup>-1</sup>
BsaI-HFv2 (20 U μL <sup>-1</sup> )	1	0.5 U μL <sup>-1</sup>
NcoI-HF (20 U μL <sup>-1</sup> )	1	0.5 U μL <sup>-1</sup>
PvuII-HF (20 U μL <sup>-1</sup> )	1	0.5 U μL <sup>-1</sup>
10× rCutsmart buffer	4	1×
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	to 40	—
Total volume		—

37°C、OverNight で切断。2.2kb/825b の 2 本のバンドが見えるので、2.2kb の方を切り出し。

30 ng/ul に調整。

(4) annealした oligo と切断した pU6-tevopreq1-GG-acceptor を Golden Gate 法でつなげる。

Component	Amount (μL)	Final concentration
Annealed spacer oligonucleotides, 1 μM Golden Gate part 1 (from Step 3A(iv))	1	0.1 μM
Annealed and phosphorylated sgRNA scaffold oligonucleotides, 1 μM Golden Gate part 2 (from Step 3A(iv) or 3A(vi))	1	0.1 μM
Annealed epegRNA RTT/PBS 3' extension oligonucleotides, 1 μM Golden Gate part 3 (from Step 3A(iv))	1	0.1 μM
pU6-tevopreq1-GG-acceptor 2.2 kb fragment, 30 ng μL <sup>-1</sup> Golden Gate part 4 (from Step 3A(xii))	1	3 ng μL <sup>-1</sup>
BsaI-HFv2 (20 U μL <sup>-1</sup> )	0.2	0.4 U μL <sup>-1</sup>
NcoI-HF (20 U μL <sup>-1</sup> )	0.2	0.4 U μL <sup>-1</sup>
PvuII-HF (20 U μL <sup>-1</sup> )	0.2	0.4 U μL <sup>-1</sup>
T4 DNA ligase (40 U μL <sup>-1</sup> )	0.50	2 U μL <sup>-1</sup>
10× T4 DNA ligase buffer	1	1×
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3.9	—
Total reaction volume	10	—

Thermocycler を用いて以下の設定で assembly reaction を行う。

Cycle number	Step description (°C)	Duration (min)
1	20	10
2	37	5
3	80	5

Reaction 後、tube は on ice. 1ul を使って transformation.

かならず Sequence でデザイン通りのクローンができたことを確認する。

Cut check? Sequence primer?

デザイン例

TP53-R248Q (c.743G>A)

(参考文献 Nature Biotechnology 2024

High-throughput evaluation of genetic variants with prime editing sensor libraries)

論文の配列をそのまま使う。

**Protospacer: GCATGGGCGGCATGAACCGG**

Proto\_oligo\_top: caccgGCATGGGCGGCATGAACCGGgtttt

Proto\_oligo\_bottom: ctctaaaacCCGGTTCATGCCGCCCATGCc

**PBS-RTT (5 to 3): ATGGTGAGGATGGGCCTCTGGTTCATGCCGCCAT**

Ext\_oligo\_top: gtgcATGGTGAGGATGGGCCTCTGGTTCATGCCGCCAT

Ext\_oligo\_bottom: cgcgATGGGCGGCATGAACCAGAGGCCCATCCTCACCAT

DNMT3A-R882H (c.2645G>A) (ClinVar ID: 375881 Accession: VCV000375881.50)

(1) SynDesign (<https://deepcrispr.info/SynDesign>)で設計

Tgcactgaaatggaaagggatatttggttcccagtcactatactgacggtctccaacatgagcc|g(/a)cttggcgaggca  
gagactgctggccggtcatggagcgtgccagtcacccac

Spacer (黄色) Pam (青) PBS-RTT(下線)

Protospacer\_oligo\_top: caccGGTCTCCAACATGAGCCGCgtttt

Protospacer\_oligo\_bottom: ctctaaaacGCGGCTCATGTTGGAGACC

Ext\_oligo\_top: gtgcTCTGCCTCGCCAAGTGGCTCATGTTGGAG

Ext\_oligo\_bottom: aaaaCTCCAACATGAGCCACTTGGCGAGGCAGA

Extension Top wSynMut: gtgcGTCTCTGCCTCGCCTAGTGGCTCATGTTGGAG

Extension Bottom wSynMut: cgcgCTCCAACATGAGCCACTAGGCGAGGCAGAGAC

**\* SynDesign のデフォルトでは Bottom には aaaa がついているが、cgcg に置き換える。**

WT sequence:

CTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGGCGAGGCAGAGACTGCTGGGCCGGTCATGGAGCGTG  
CCAGTCATCCGC

Edited Sequence: CTCCAACATGAGCC(G/A)CTTGGCGAGGCAGA

Edited Sequence wSynMut: CTCCAACATGAGCC(G/A)CT(T/A)GGCGAGGCAGA

(2) (<http://bicdb.ncpsb.org.cn/OPED/>)でデザイン

まず、DNMT3A-R882 周辺の配列を入れて click.

tgactgaaatggaagggtatttggttcccagtcactatactgacgtctccaacatgagccg(/a)cttggcgaggca  
gagactgtgggccggtcatggagcgtgccagtcacccgac

Spacer:GCAGTCTCTGCCTCGCCAAG (Yellow)

Pam : CGG (Blue)

PBS: GGCGAGGC (下線)

RTT: TCCAACATGAGCCACTT(二重下線)

RTT-PBS: TCCAACATGAGCCACTTGGCGAGGC

Protospacer\_oligo\_top: caccGCAGTCTCTGCCTCGCCAAGgtttt

Protospacer\_oligo\_bottom: ctctaaaacCTTGGCGAGGCAGAGACTGC

Ext\_oligo\_top: gtgcTCCAACATGAGCCACTTGGCGAGGC

Ext\_oligo\_bottom: cgcgGCCTCGCCAAGTGGCTCATGTTGGA

PAM を無くすため、AGC→AGT(どちらもセリン)に変換。AGT のヒトでの Codon usage はまずまず。

mExt\_oligo\_top: gtgcTCCAACATGAGTCACTTGGCGAGGC

mExt\_oligo\_bottom: cgcgGCCTCGCCAAGTGA<sup>A</sup>CTCATGTTGGA

NRAS-G12D (c.35G>A) (ClinVar ID: 39648, Accession: VCV000039648.21)

SynDesign (<https://deepcrispr.info/SynDesign>)で設計

Spacer (黄色) Pam (青) PBS-RTT(下線)

Spacer\_oligo\_top: caccGAACTGGTGGTGGTTGGAGgtttt

Spacer\_oligo\_bottom: ctctaaaacCTCCAACCACCACAGTTC

Ext\_oligo\_top: gtgcAACACCATCTGCTCCAACCACC

Ext\_oligo\_bottom: cgcgGGTGGTTGGAGCAGATGGTGTT

Extension Top wSynMut: gtgcAACACCATATGCTCCAACCACC

Extension Bottom wSynMut: cgcgGGTGGTTGGAGCATATGGTGTT

WT sequence:

GTACAAACTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTGGTGGGAAAAGCGCACTGACAATCCAGCTAA  
TCCAGAACCACT

Edited Sequence: GGTGGTTGGAGCAG(G/A)TGGTGTT

Edited Sequence wSynMut: GGTGGTTGGAGCA(G/T)(G/A)TGGTGTT