

ガイド RNA 合成キット

CUGA® 7 gRNA Synthesis Kit

別冊 参考資料

Code No. 314-08691

-
- はじめに
 - 転写開始効率に影響する鋳型 DNA 配列について
 - 実験例 1 : sgRNA 用鋳型 DNA 調製 (PCR 法)
 - 実験例 2 : sgRNA 用鋳型 DNA 調製 (Klenow Fragment を用いた伸長反応)
 - 実験例 3 : crRNA、tracrRNA 用鋳型 DNA 調製 (アニール法)
 - 実験例 4 : *in vitro* 切断チェック
-

NIPPON GENE CO., LTD.

はじめに

CUGA® 7 gRNA Synthesis Kit は、ゲノム編集に必要なガイド RNA (guide RNA, gRNA) 等の短鎖 RNA を合成・精製するためのキットです。株式会社ニッポンジーンが独自に開発した CUGA® 7 RNA ポリメラーゼ (変異導入により非特異的な塩基伸長が顕著に減少する特性を獲得した大腸菌ファージ T7 RNA Polymerase) を *in vitro* 転写反応に用いることで、目的のガイド RNA を正確かつ大量に合成することができます。

本キットには、*in vitro* 転写反応用試薬およびスピンドルカラムを用いたガイド RNA 精製用試薬が含まれています。詳しくは製品に添付のマニュアルをご参照ください。

本紙「別冊 参考資料」では、本キットを用いる前に用意していただく鋳型 DNA の調製方法と、合成した gRNA の切断効率を確認する *in vitro* 切断チェックについて実験例をご紹介しています。

【ガイド RNA 標的配列の選択】

本参考資料は、*Streptococcus pyogenes* の Cas9 nuclease のガイド RNA について記載しています。ガイド RNA 設計の際には、PAM 配列 (5'-NGG) 上流に隣接した 20 塩基の標的配列を選択します。

標的配列 (20 塩基)	PAM 配列
5'-----NNN NNN NNN NNN NNN NNN NNN NN NGG -----3'	
3'-----NNN <u>NNN NNN NNN NNN NNN NNN NN</u> NCC-----5'	
標的配列 (相補鎖)	

転写開始効率に影響する鋳型 DNA 配列について

【鑄型 DNA の T7 プロモーター配列】

in vitro 転写反応では転写開始点(+1)から下流のアンチセンス鎖を鑄型 DNA として RNA を合成するため、転写開始点の G (+1)までの T7 プロモーター配列部分が完全に二本鎖を形成している鑄型 DNA を用意する必要があります。



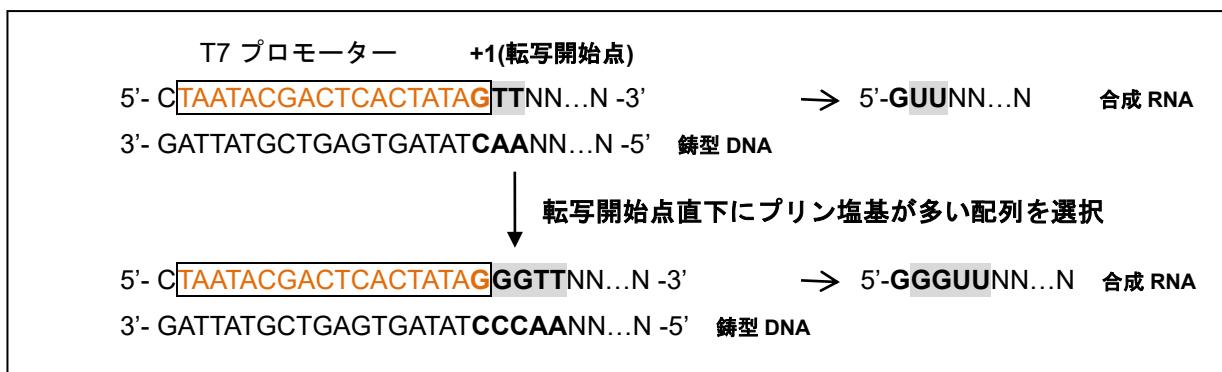
Tips!

- 四角で囲んだ T7 プロモーター配列は転写反応に必須となる配列を示しています。PCR 産物を鑄型 DNA にする場合、プロモーターの 5'末端に欠損が発生した場合を考慮して、塩基を付加して下さい（図では、C を付加しています）。
 - RNA 収量を増やしたい場合には、T7 プロモーター配列部分のみでなく、鑄型 DNA 領域を完全に二本鎖にした鑄型 DNA を使用した方が転写効率を良くすることができます。

【配列依存的な転写開始効率の低下を回避するための対処方法】

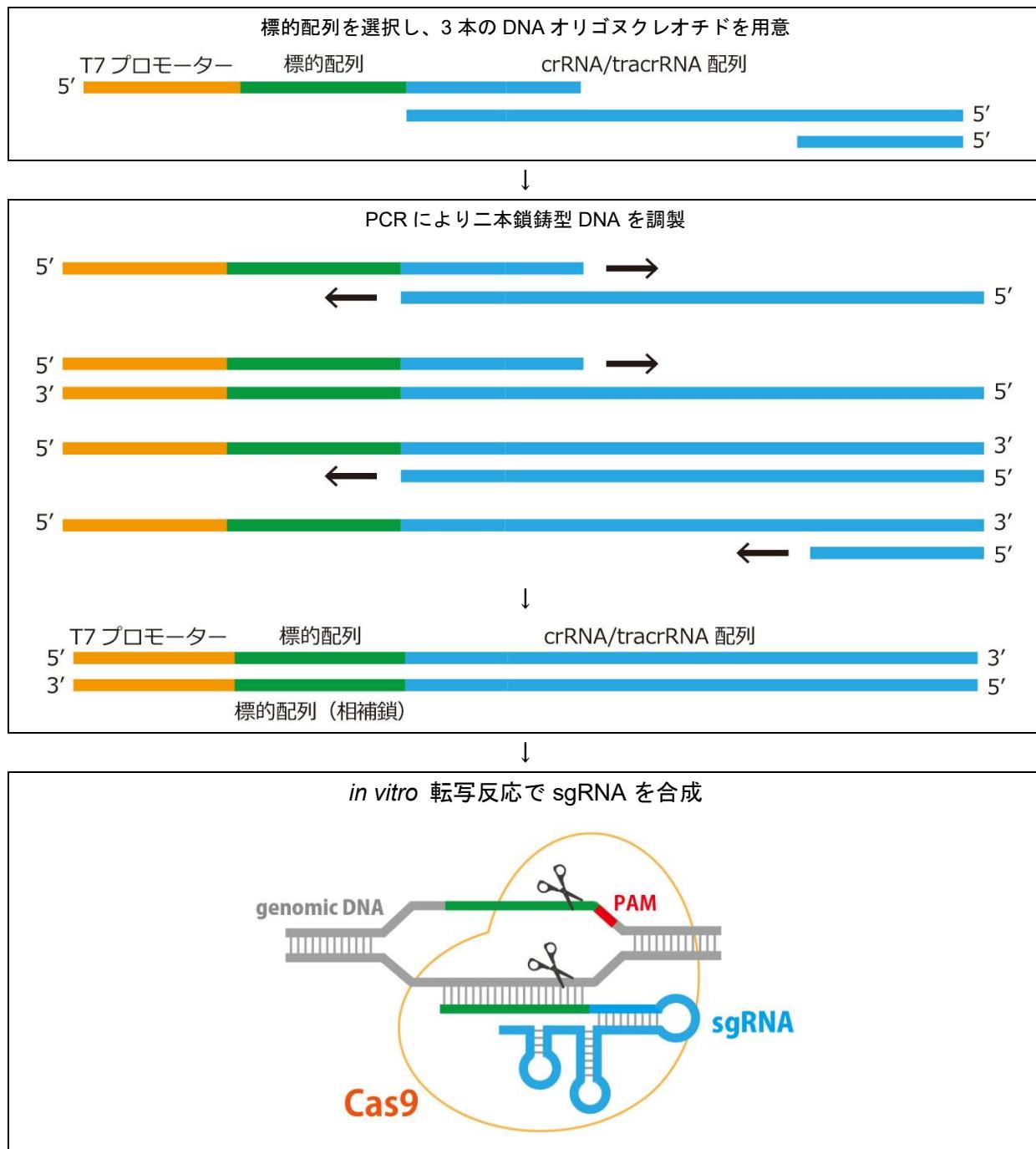
転写開始点 G の直下(+2 から下流)に T が連続する鑄型 DNA を使用した場合、*in vitro* 転写反応産物の配列が GUU---となり、一般的な T7 RNA ポリメラーゼの特性から転写開始の効率が著しく低下することが知られています。

ガイド RNA 設計時に転写開始点直下にプリン塩基 (G, A) が多い配列を選択すると、上記の問題が大幅に改善され安定な転写開始が期待できます。



実験例 1：sgRNA 用鋳型 DNA の調製（PCR 法）

【実験の流れ】



【準備】

- ・ 化学合成オリゴヌクレオチド（カートリッジ精製または PAGE 精製、ニッポンジーン）
 - ・ 高正確性 PCR 酶素 : Go-to DNA Polymerase (Code No. 313-08661、319-08663)
 - ・ ddWater (RNase free) (Code No. 316-90101、312-90103、318-90105、314-09291)
 - ・ スピンカラム PCR 産物精製キット : ISOSPIN PCR Product (Code No. 315-08001)

【プロトコル】実験例 1：sgRNA 用鋳型 DNA の調製（PCR 法）

① 標的配列を選択し、下記の通り、a (60 塩基)、b (80 塩基)、c (20 塩基) のオリゴ DNA を化学合成します。

a : 標的配列を含む DNA

The diagram illustrates the CRISPR-Cas9 target site. It features a green box labeled 'T7 プロモーター配列' (T7 promoter sequence), a grey box labeled '標的配列 (20 塩基)' (target sequence (20 bases)), and a blue box labeled 'crRNA/tracrRNA 配列' (crRNA/tracrRNA sequence). Below these boxes is the target DNA sequence: 5'-CTAATACGACTCACTATAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTTTTAGAGCTAGAAATAGCA-3'. The target sequence is highlighted in red, and the flanking sequences are in black. The crRNA/tracrRNA sequence is shown in blue, matching the target sequence. The PAM sequence is in green, and the T7 promoter sequence is in grey.

b : crRNA/tracrRNA 配列 (下線部は a の下線配列の相補鎖、点線部は c と相同の配列)

5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCT
ATTTCTAGCTCTAAAC-3'

c : crRNA/tracrRNA 配列の一部

5'-**AAAAGCACCGACTCGGTGCC**-3'

② PCR チューブに以下の組成で試薬を調製します。

10 × Go-to Buffer	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
a のオリゴ DNA(10 μ M)	2 μ l
b のオリゴ DNA (0.1 μ M)	2 μ l
c のオリゴ DNA (10 μ M)	2 μ l
Go-to DNA Polymerase	1 μ l
ddWater (RNase free)	34 μ l
Total	50 μ l

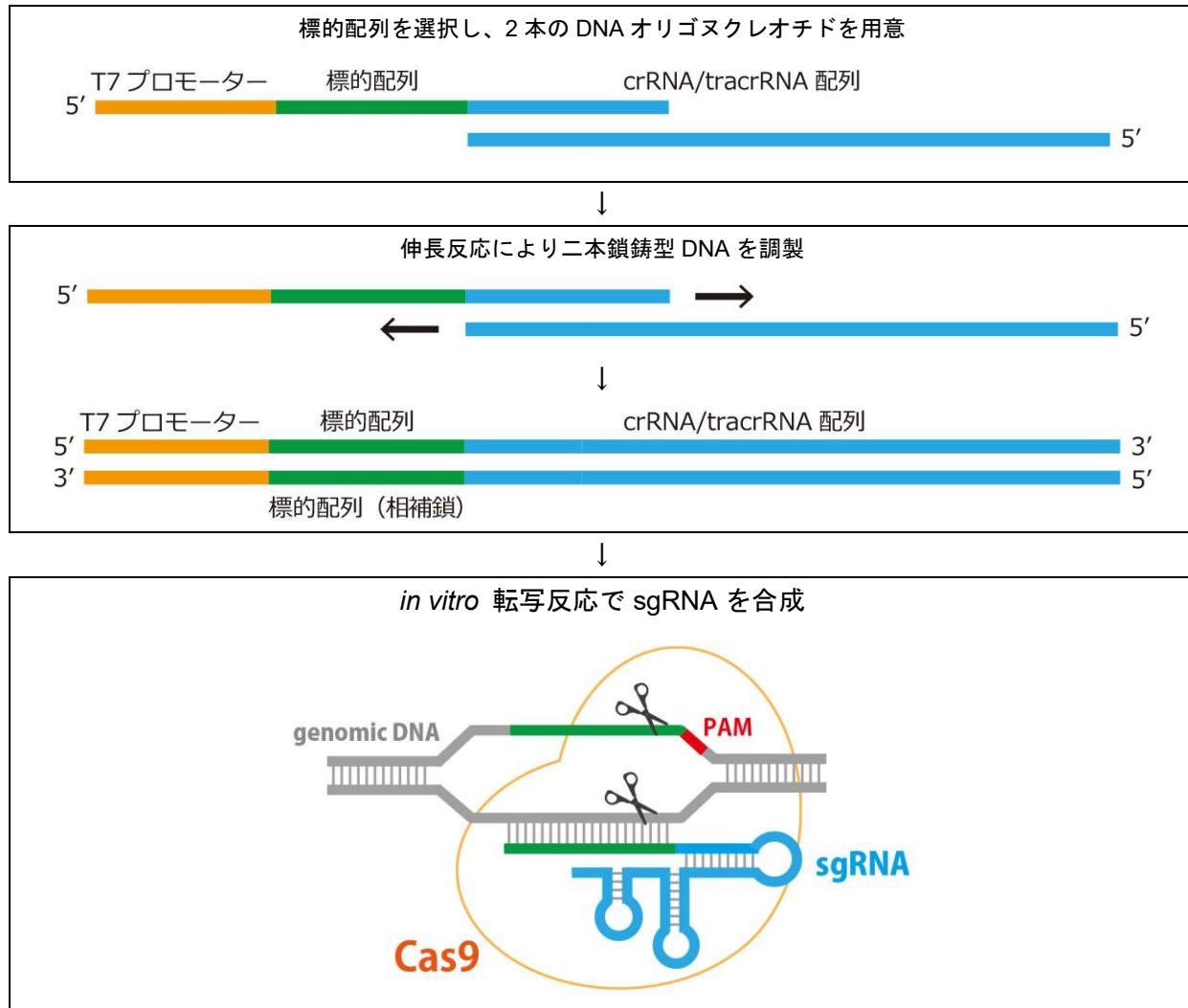
③ 下記の条件で PCR を行います。

95°C	2 分間	× 1 サイクル
↓		
95°C	15 秒間	
55°C	15 秒間	× 35 サイクル
72°C	30 秒間	
↓		
72°C	5 分間	× 1 サイクル

④ 反応液を精製キット「ISOSPIN PCR Product」を用いて精製し、鑄型 DNA を調製します。

実験例 2: sgRNA 用鑄型 DNA の調製 (Klenow Fragment を用いた伸長反応)

【実験の流れ】



【準備】

- ・ 化学合成オリゴヌクレオチド（カートリッジ精製またはPAGE精製、ニッポンジーン）
- ・ DNAポリメラーゼ：Klenow Fragment（Code No. 312-00814、318-00816）
- ・ ddWater (RNase free)（Code No. 316-90101、312-90103、318-90105、314-09291）
- ・ スピンカラムPCR産物精製キット：ISOSPIN PCR Product（Code No. 315-08001）

【プロトコル】実験例2：sgRNA用鑄型DNAの調製（Klenow Fragmentを用いた伸長反応）

① 標的配列を選択し、下記の通り、a (60 塩基)、b (80 塩基) のオリゴ DNA を化学合成します。

a : 標的配列を含む DNA

b : crRNA/tracrRNA 配列 (下線部は a の下線配列の相補鎖)

5'-**AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCT**
ATTTCTAGCTCTAAAC-3'

② PCR チューブに以下の組成で試薬を調製します。

10 × Klenow Fragment Buffer	5 μ l
2.5 mM dNTP	4 μ l
a のオリゴ DNA(10 μ M)	5 μ l
b のオリゴ DNA (10 μ M)	5 μ l
ddWater (RNase free)	30 μ l
Total	49 μl

② 95°Cで2分間熱処理し、室温に5分間放置します。

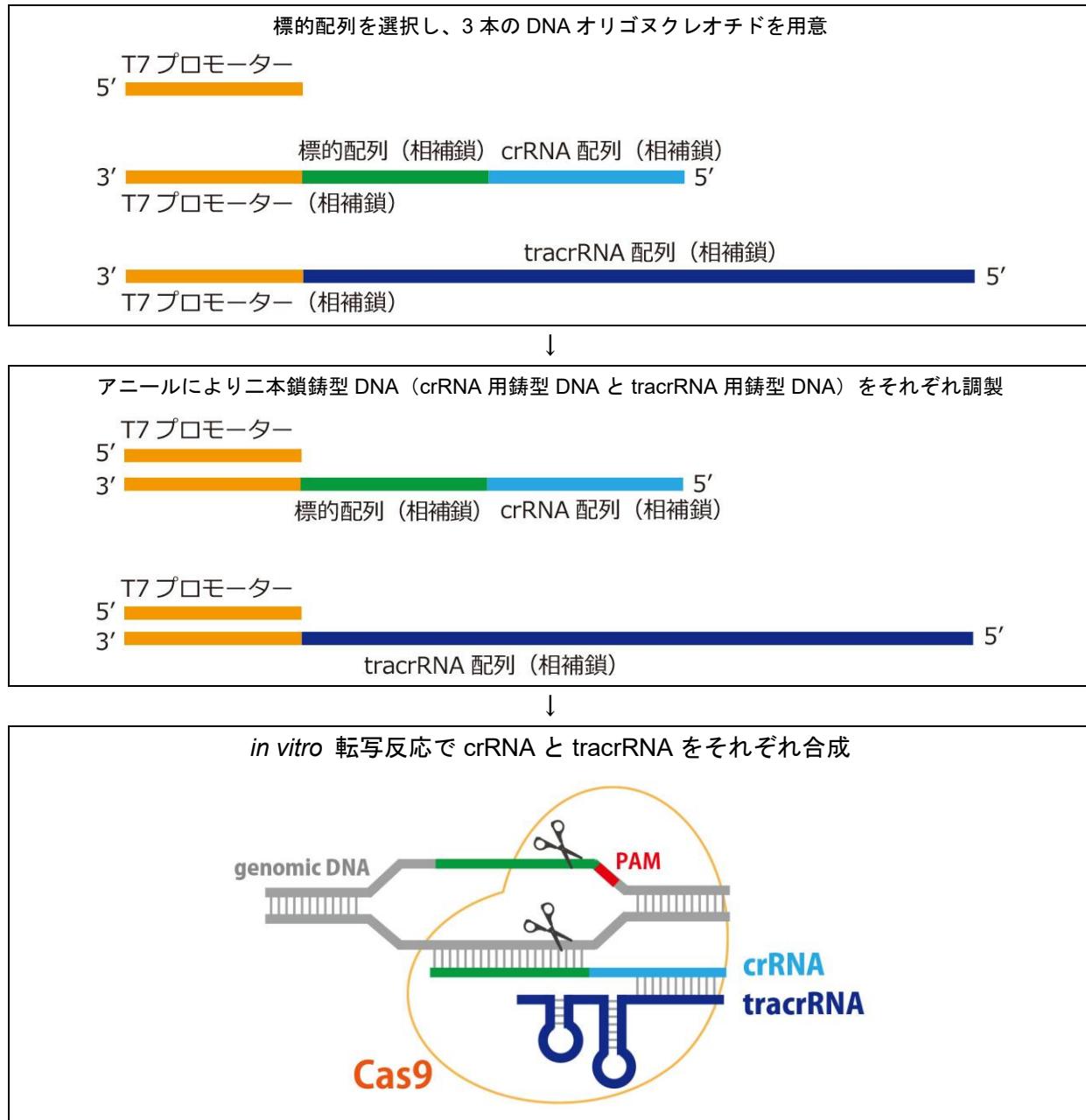
③ Klenow Fragment (1 U/ μ l) を 1 μ l 添加します。

④ 37°Cで30分間反応させます。

⑤ 反応液を精製キット「ISOSPIN PCR Product」を用いて精製し、鑄型 DNA を調製します。

実験例3: crRNA、tracrRNA用鑄型DNAの調製(アニール法)

【実験の流れ】



【準備】

- ・ 化学合成オリゴヌクレオチド (カートリッジ精製またはPAGE精製、ニッポンジーン)
- ・ ddWater (RNase free) (Code No. 316-90101, 312-90103, 318-90105, 314-09291)
- ・ アニーリングバッファー (20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 200 mM NaCl)

【プロトコル】実験例 3 : crRNA、tracrRNA 用鑄型 DNA の調製 (アニール法)

① 標的配列を選択し、下記の通り、a (19 塩基)、b (60 塩基)、c (91 塩基) のオリゴ DNA を化学合成します。

a : T7 プロモーター配列 (crRNA 鑄型用、tracrRNA 鑄型用)

T7 プロモーター配列
5'-CTAATACGACTCACTATAG-3'

b : 標的配列を含む DNA (crRNA 鑄型用)

tracrRNA 配列の一部 標的配列の相補鎖 (20 塩基) T7 プロモーター配列の相補鎖
5'-CAAAACAGCAGTCTAAACNNNNNNNNNNNNNNNNNNCTATAGTGAGTCGTATTAG-3'

c : tracrRNA 配列 (tracrRNA 鑄型用)

5'-AGCACCGACTCGGTGCCACTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTATTTAACTTGCTATG
CTGTTTGAGTATAGTGAGTCGTATTAG-3'
T7 プロモーター配列の相補鎖

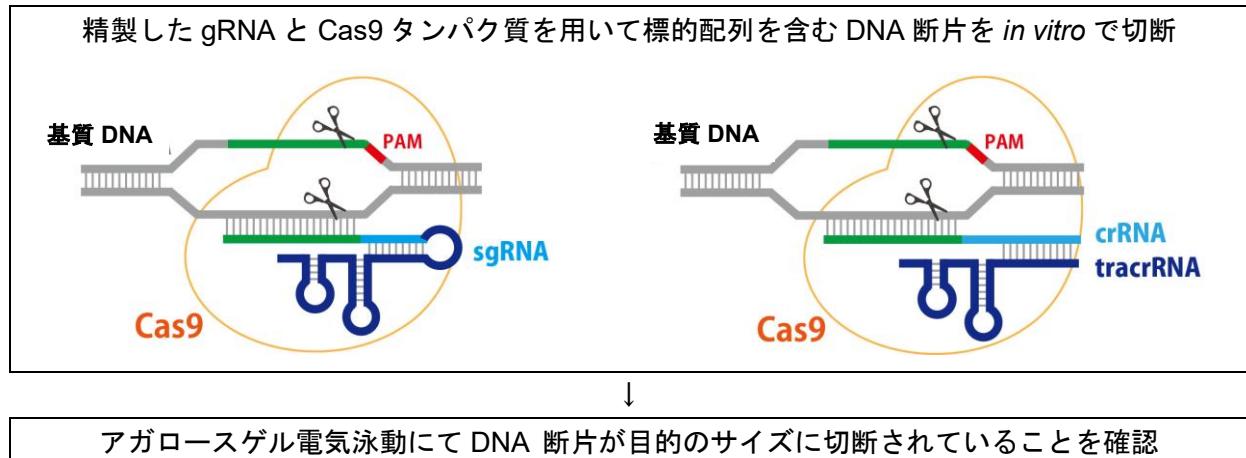
② a のオリゴ DNA と b のオリゴ DNA をアニーリングして、crRNA 用鑄型 DNA を調製します。

③ a のオリゴ DNA と c のオリゴ DNA をアニーリングして、tracrRNA 用鑄型 DNA を調製します。

* アニーリングは、化学合成したオリゴスクレオチドを等量モルずつ同一のチューブに加え、この混合液と等量のアニーリングバッファー (20 mM Tris-HCl、2 mM EDTA、200 mM NaCl) と混和して 75°C で 5 分間加熱し、穏やかに室温 (15~25°C) に戻すことにより二本鎖にします。

実験例 4 : *in vitro* 切断チェック

【実験の流れ】



【準備】

- ・ 本キットで合成・精製したガイド RNA (sgRNA、あるいは crRNA と tracrRNA)
- ・ Cas9 タンパク質 : Cas9 Nuclease protein NLS (Code No. 319-08641, 316-08651, 310-08654)
- ・ 標的配列を含む DNA 断片 (基質 DNA)
- ・ 10×H Buffer (ニッポンジーンの制限酵素に添付) *
- ・ Loading Buffer (Code No. 313-90111) **
- ・ アガロースゲル電気泳動用試薬 (Gene Ladder, Agarose S, TAE など)

* 10×H Buffer 組成 : 500 mM Tris-HCl (pH 7.9)、1M NaCl、100 mM MgCl₂、10 mM DTT

** 正確な泳動結果を得るため、SDS を含む Loading Buffer を使用して下さい。

【プロトコル】実験例4：*in vitro* 切断チェック

- ① 本キットで合成・精製したガイドRNAとCas9 Nuclease protein NLS 0.5 µgを混合し、室温で5分間反応させます。

sgRNAの場合：50 ng

crRNA, tracrRNAの場合：crRNA 25 ng, tracrRNA 45 ng

- ② 反応液に以下の試薬を追加します。

①の反応液 (gRNA+Cas9 タンパク質)	X µl
標的配列を含むDNA断片	100 ng
10×H Buffer	2 µl
ddWater (RNase free)	up to 20 µl

- ② 37°Cで60分間反応させます。

- ③ SDSを含むLoading Bufferを加え、65°Cで5分間反応させます。

- ④ アガロースゲル電気泳動を行い、DNAが目的のサイズに切断されていることを確認します。

*DNA断片が目的サイズに切断されていない場合、ガイドRNAの配列が適していないことが考えられます。その場合は、標的配列を変えてガイドRNAを設計して下さい。

その他のデータは、ニッポンジーンホームページをご参照下さい。

本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

「CUGA」は株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。

＜お問い合わせ先＞

株式会社ニッポンジーン TEL 076-451-6548 (受付：平日 9 時-12 時、13 時-17 時)

ホームページ URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>