ヒト iPS 細胞 ゲノム編集（Cas9 Nuclease、crRNA・tracrRNA 、ドナーDNA 使用）プロトコール　-3

2017-7-15

1）準備するもの

[iPS 細胞]

- 電圧 12 条件を検討する場合、最低でも 10cm ディッシュにセミコンフルエントのヒト iPS 細胞（1.5×10^7 以上）が必要。
  フィーダーフリーの条件（Matrigel + mTeSR）で一度継代しておくのが望ましい。
- 電圧 2 条件を検討する場合は、10cm ディッシュにセミコンフルエントのヒト iPS 細胞（3×10^6 以上）が必要。
- 6-well plate または 12-well plate にフィーダー細胞を用意（薬剤選択を行いたい場合は、薬剤のフィーダー細胞を用意）。

[機器類]

- スーパーエレクトロポレーター　NEPA21（本体）
- CU500　キュベット電極用チャンバー
- CU600　キュベット電極用ラック
- EC-002S　NEPA キュベット電極セット　2mm gap　容量：40～400 μℓ
  ピペット（スポイト）付（以下、キュベット電極）
  ・全容量：付属のキュベット電極用ピペット
  ・ピペットで一定容量：ゲルローディングチップ（Quality Scientific Plastics 社）
  010-R204S　G 滅菌 + パイロジェン・エンドトキシンフリー
  ※通常のチップでは、キュベット電極の底まで届かないので
- 実験系に合わせた培養用マルチウェルプレートや 10 cm ディッシュ

[試薬類]

- Opti-MEM I Reduced Serum Media：血清、抗生物質不含のこと
- オリジナルの Cas9 Nuclease 3NLS（IDT 社）・CRISPR crRNA・CRISPR tracrRNA・ドナーDNA の準備。

1-1）　Cas9 Nuclease 3NLS 等のオリジナル濃度：1 ～ 5 μg/μℓにする。
Opti-MEM でオリジナル濃度 3 μg/μℓ 又は 5 μg/μℓに調整を推薦します。

1-2）　キュベットに入れる細胞・Cas9 Nuclease 等の混合溶液は、1 x Opti-MEM の浸透圧が望ましい。

● 2mm キュベット（細胞数：1×10^6）に入れる Cas9 Nuclease 3NLS 等の量

Cas9 Nuclease 3NLS：5 μg

crRNA：5 μg

tracrRNA：5 μg

ドナーDNA：5 μg

● Cas9 Nuclease は、IDT 社製の製品を推薦します。

1）Cas9 Nuclease 3NLS

50%グリセロールに溶解してある。

2）価格

Cas9 Nuclease 3NLS （濃度は 10 μg/μℓ）：100 μg（¥23,400）、500 μg（¥83,400）

crRNA：2 nmol（¥9,800）、10 nmol（¥13,000）

tracrRNA：5 nmol（¥12,000）、20 nmol （¥25,000）、100 nmol（¥64,000）

3）crRNA・tracrRNA の分子量

crRNA(分子量 11,700）2 nmol＝23.4 μg,

tracrRNA(分子量 22,182.3）5 nmol＝111 μg

4）濃度の調整

Opti-MEM で下記濃度に調整する。

Cas9 Nuclease 3NLS 濃度：3 μg/μℓ

crRNA 濃度：3 μg/μℓ

tracrRNA 濃度：3 μg/μℓ

ドナーDNA：3 μg/μℓ

5）RNP 複合体とドナーDNA 混合溶液調整（濃度それぞれ 3 μg/μℓ）

5-1）キュベット　1 個分

crRNA と tracrRNA を各 1.7 μℓハイブリダイズさせて gRNA complex を作製し、更に Cas9 Nuclease 1.7 μℓと混合し RNP 複合体（リポタンパク質）5.1 μℓを作製します。　その溶液にドナーDNA を 1.7 μℓ加え合計 6.8 μℓとします。

5-2）キュベット　3.2 個分

キュベット 3.2 個分（EP：2 個分、コントロール：1 個分）を調整する。

0.2 個分はロスを見込む。

crRNA と tracrRNA を各 5.3 μℓハイブリダイズさせて gRNA complex を作製し、更に Cas9 Nuclease 5.3 μℓと混合し RNP 複合体（リポタンパク質）15.9 μℓを作製します。　その溶液にドナーDNA を 5.3 μℓ加え合計 21.2 μℓとします。

● ROCK 阻害剤 Y-27632：ヒト ES/iPS 細胞は、単細胞に分離すると Rho-associated kina-se（ROCK）が活性化されアポトーシスが誘導される。

この経路を阻害することで、単細胞分離時の細胞死を防ぐ。

● ヒト iPS 細胞

● CTK 溶液

● TrypLE （または、Accutase）

2）当日の準備

① ヒトiPS細胞培地中へY-27632を最終濃度10μMで添加（10 mM stockを×1000で添加）し、CO_2インキュベーター内で1時間以上培養する。
＊ROCK経路を阻害し、ヒトiPS細胞を懸濁した際の細胞死を抑制する。

② 6-well plateフィーダー細胞の培地も、Y-27632を10μM含むヒトiPS細胞培地に交換して、37℃ のインキュベーターへ入れて培地を保温しておく。

③ 10 cmディッシュのヒトiPS細胞を10 mℓ PBSで1回洗浄する。

④ CTK溶液を0.5 mℓ 添加し、細胞全体に行き渡らせてから、37℃で1 ～ 2分ほどインキュベートする。（5分以上は処理しないこと。）

⑤ ディッシュを揺らし、残存フィーダー細胞が剥がれてきたらCTK溶液ごとフィーダー細胞を吸引除去する。

⑥ PBSを5 mℓ 加え、なるべくフィーダー細胞を洗い流し吸引除去する。
（フィーダー細胞が混入するとDNAを吸収し、iPS細胞への導入効率が下がる。）

⑦ TrypLE Select （Accutase）を0.5 mℓ 加え、37℃で3 ～ 5分処理し、ヒトiPS細胞コロニーを剥がす。（Trypsin/EDTA でも代用可能だが、AccutaseまたはTrypLEの方が細胞に優しい）

⑧ ヒトiPS細胞培地を5 mℓ 加え、ピペッティングで細胞をバラバラにする。または1 mℓ だけ培地を先に加えて、ピペットマンで細胞をバラバラにしてもよい。
細胞塊があると塊内部の細胞へは遺伝子導入されないので、なるべく単細胞レベルまでほぐす。 但し、無理にピペティングし過ぎると生存率が悪くなるので注意。
大きめの細胞塊が残る場合は、40 ～ 75μmポアサイズのCell Strainer（BD Falcon）に通して細胞塊を除去しても良い。

⑨ 細胞を遠心管に移し、室温で800 rpm（120 G）、5分間遠心する。

⑩ この間にNEPA21の配線をセットアップする。

⑪ 上清を捨て、Opti-MEM培地を5 ～ 10 mℓ 加え懸濁。

⑫ 再び室温で800 rpm（120 G）、5分間遠心する。

⑬ 細胞数を計測

⑭ 1.3×10^7細胞（12キュベット分+α）を15 mℓ 遠沈チューブに入れる。
または、3.5×10^6細胞（3キュベット分+α）を15 mℓ 遠沈チューブに入れる

⑮ 800 rpm（120 G）、5分間遠心する。

⑯ この間、NEPA21の電圧条件をセット。

＜NEPA21の基本パルス設定＞

穿孔パルス（Poring Pulse）

Pp電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性
(A)	(B)	50	2	10	+

Pp パルスの（A）および（B）の条件は細胞株に応じて変わる。
Pp パルスの他数値、及び Tp パルスの数値は固定で変わらない。

No.	Pp 電圧	Pp パルス幅	回数	減衰率（%）	コメント
1	コントロール				電気パルス無し
2	125V	5 msec	2	10	京大 CiRA で主に使用する条件
3	150V	5 msec	2	10	

導入パルス（Transfer Pulse）

Tp 電圧（V）	パルス幅（ms）	パルス間隔（ms）	回数	減衰率（%）	極性
20V	50	50	5	40	+/－

⑰ 遠心した細胞（3.5×10^6 細胞）上清をピペットマンで丁寧に除く。 iPS 細胞培地が入り込むと電流条件が変わってしまうので注意。
⑱ 細胞ペレットに Opti-MEM 培地を 300 μℓ と 1-4）で調整した RNP 複合体とドナーDNA 混合溶液 21.2 μℓ を加えて懸濁する。（21.2 μℓはロス分を見込む）

⑲ 2 mm gap のキュベットに細胞/ RNP 複合体/DNA 混合溶液を 100 μℓ 添加。
（泡が入ると火花が飛び細胞が死ぬので、絶対に入らないようにする。）
⑳ 抵抗値をメモする。 通常は 0.035～ 0.050 KΩ付近。
㉑ NEPA21 キュベットチャンバーにセットし、電気パルスを加える。
㉒ キュベット内にヒト iPS 細胞培地（37℃， Y-27632 添加）を 1 mℓ 添加し、付属のスポイトを用いて細胞を吸出し、素早く準備しておいたフィーダープレート 1 well（6-well プレート、Y-27632 添加済）に播く。

㉓ 翌日培地交換。 Y-27632 を 2 ～ 3 日間は添加し続けた方が細胞の生存率が上がる。薬剤選択を加えなければ、5 ～ 7 日後には継代できるようになる。
㉔ 一般的に、電圧（A）やパルス幅（B）が高い程導入効率が高くなるが、細胞の生存率は下がる。
㉕ 最初に上記方法でパルス電圧及びパルス幅を検討した後は、基本的に同じ電圧条件で導入すればよい。