

# TAKE 法 マウス・ラット受精卵ゲノム編集 52

— Cas9 Nuclease, crRNA・tracrRNA, ssODN, lssDNA 等を使用 —

2017-7-14

## 1) 必要機器及び消耗品

### 【機器類】

1-1) NEPA21 : 遺伝子導入装置 本体

1-2) **CUY505P5 (改良型) : MS 白金ブロック電極 5mm gap 容量 : 50  $\mu$ l**

\*マクロスライド型 (受精卵一度に 最大 150 個処理)

\*片方のシリコンの高さが半分なので、**卵の操作が容易。**

1-3) CUY5001P1-1.5 : シャーレ白金ブロック電極 1mm gap 容量 : 5  $\mu$ l

\*シャーレ型 (受精卵一度に 最大 30 個処理) --- **標準タイプ**

**CUY501P1-1.5 : MS 白金ブロック電極 1mm gap 容量 : 5  $\mu$ l**

\*マクロスライド型 (受精卵一度に 最大 30 ~ 50 個処理)

**CUY501P1-1.5L : MS 白金ブロック電極 1mm gap ロングタイプ 容量 : 5  $\mu$ l  $\times$  5**

\*マクロスライド型ロングタイプ (受精卵一度に 最大 150 個処理)

1-4) C115CB 又は C115CB-2 : ケーブル (装置本体に接続)

1-5) C117 : ケーブル (C115CB を経由して、白金プレート電極に接続)

### 【試薬類】

1-6) **Nuclease・RNA 溶液等の希釈、受精卵洗浄用のバッファー :**

粉末 Opti-MEM (Thermofisher) Opti-MEM Reduced Serum Medium, powder

品番 : 22600-050 10 x1L

\*調整方法

10x Opti-MEM (1.36 g / 10 ml) を作製し、最終調整時に 0.8 ~ 1.2x Opti-MEM と  
なるようにする。

1-7) Nuclease-Free Water

転写キットに添付された水、または Nuclease-Free Water。

1-8) Cas9 Nuclease, crRNA・tracrRNA, ssODN, lssDNA 溶液は、**エレクトロポレーション  
の時に Opti-MEM で調整し、最終溶液濃度を 1 x Opti-MEM にする。**

1-9) オリジナルの Cas9 Nuclease, crRNA・tracrRNA 濃度 : 2 ~ 4  $\mu$ g/ $\mu$ l

1-10) オリジナルの ssODN 濃度 : 1 ~ 2  $\mu$ g/ $\mu$ l

1-11) Cas9 Nuclease・crRNA・tracrRNA 等の準備

それぞれの溶液は Opti-MEM で調整し、最後に 0.8 ~ 1.2x Opti-MEM かそれと同等の  
浸透圧、抵抗値になるようにする

1-12) Cas9 Nuclease は、IDT 社製 : Cas9 Nuclease 3NLS を推薦します。  
50%グリセロールに溶解してあります。

Cas9 Nuclease 3NLS (濃度は 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) : 100  $\mu\text{g}$  (¥23,400)、500  $\mu\text{g}$  (¥83,400)  
CRISPR crRNA : 2 nmol (¥9,800)、10 nmol (¥13,000)  
CRISPR tracrRNA : 5 nmol (¥12,000)、20 nmol (¥25,000)、100 nmol (¥64,000)

\*使用前に crRNA を tracrRNA とハイブリダイズさせて gRNA complex を作成し、  
更に Cas9 Nuclease と混合し RNP 複合体 (リポタンパク質) にします。

\*溶液は、Opti-MEM で調整し、受精卵と等張 (1 x Opti-MEM) にする。

## 2) 受精卵の準備

2-1) マウス・ラットから前核期受精卵を採取し、受精卵用の培地で培養する。  
2-2) 透明帯除去処理及び菲薄化処理はしない。  
2-3) あらかじめ前核が見える受精卵のみを選抜する。

2-4) 受精卵は、フレッシュ卵でも凍結卵でもよいが、フレッシュ卵の方が効率がよい。

2-5) 5mm gap 電極で一度に処理できる卵の数  
20個から 150個 電極へランダムに入れる。

2-6) 1mm gap 電極で一度に処理できる卵の数は、  
5個から 50個で、電極へランダムに入れる。

## 3) ノックアウト、ノックイン

### 3-1) 5mmgap 電極使用

3-1-1) 電極のバスタブ内に、Cas9 Nuclease, crRNA・tracrRNA, ssODN, lssDNA 溶液  
等を、ノックアウトかノックインかにより、それぞれを次に述べる容量を入れる。

3-1-2) 溶液の抵抗値を測定する。

3-1-3) 抵抗値を 500 $\Omega$  (480 ~ 520) に調整する必要がある。

受精卵を入れると抵抗値が若干下がるので、500 $\Omega$  より少し高い方がよい。

3-1-4) 抵抗値の調整方法

抵抗値が 400 $\Omega$ であった (500 $\Omega$ 前後に揃えたい)。

溶液を少し吸引して、再度抵抗値を測定し 500 $\Omega$  (480 ~ 520) にする。

抵抗値が 600 $\Omega$ であった (500 $\Omega$ に揃えたい)。

1 x Opti-MEM を添加して、再度抵抗値を測定し 500 $\Omega$  (480 ~ 520) にする。

3-1-5) 受精卵をミネラルオイル下培養液から取りだし、dish に入れた Opti-MEM で一度  
洗浄する。

3-1-6) 次に、電極バスタブ内の液中に入れる。

3-1-7) 再度抵抗値を測定する。

3-1-8) EP

抵抗値が **500Ω (480 ~ 520)** を確認後、直ちにスタートボタンを押し EP する。

3-1-9) EP 処理後、受精卵を取り出す。

3-1-10) 受精卵を培地に入れる。

3-1-11) 繰り返す。

### ノックアウト 例 (Cas9 Nuclease 3NLS )

まず、crRNA 15  $\mu$ l と tracrRNA 15  $\mu$ l をハイブリダイズさせて gRNA complex を作製します。そこに Cas9 Nuclease 3NLS 30  $\mu$ l 加えて合計 60  $\mu$ l にする。  
電極のバスタブ内に、混合溶液 47 ~ 50  $\mu$ l を入れる。余分な 10  $\mu$ l は抵抗値調節用。

**Cas9 Nuclease 3NLS は、12  $\mu$ g/30  $\mu$ l (400 ng/ $\mu$ l)**

**crRNA は、12  $\mu$ g/15  $\mu$ l (800 ng/ $\mu$ l)**

**tracrRNA は、12  $\mu$ g/15  $\mu$ l (800 ng/ $\mu$ l)**

実施例：

#### 1) Cas9 Nuclease 3NLS

最終希望濃度の 2 倍濃度である 400ng/ $\mu$ l になるように Opti-MEM で調整する。

#### 2) crRNA と tracrRNA

それぞれ最終希望濃度の 4 倍である 800ng/ $\mu$ l になるように Opti-MEM で調整する。

#### 3) 混合溶液の作成

crRNA と tracrRNA ハイブリダイズした溶液 30  $\mu$ l と Cas9 Nuclease 30  $\mu$ l を加えて合計 60  $\mu$ l にする。

両方とも濃度が 1/2 になるので、シャーレ内の溶液濃度は、

**Cas9 Nuclease 3NLS は、12  $\mu$ g/60  $\mu$ l (200 ng/ $\mu$ l)**

**crRNA は、12  $\mu$ g/60  $\mu$ l (200 ng/ $\mu$ l)**

**tracrRNA は、12  $\mu$ g/60  $\mu$ l (200 ng/ $\mu$ l) の溶液が出来上がる。**

#### 4) 注意点

最終溶液は受精卵と等張であることが重要です。

よって、Cas9 Nuclease、sg RNA 溶液等は、最終 1 x Opti-MEM 濃度に調整する。

ミリ Q で溶出した場合、それらの溶液を Opti-MEM で希釈し、最終 1 x Opti-MEM になる様に調整する。

-----  
**ノックイン 例 (Cas9 Nuclease 3NLS)**

crRNA 10  $\mu\text{l}$  と tracrRNA 10  $\mu\text{l}$  をハイブリダイズさせて gRNA complex を作製します。  
そこに Cas9 Nuclease 20  $\mu\text{l}$  と ssODN 20  $\mu\text{l}$  加えて合計 60  $\mu\text{l}$  にする。  
電極のバスタブ内に、混合溶液 47 ~ 50  $\mu\text{l}$  を入れる。 余分な 10  $\mu\text{l}$  は抵抗値調節用。

**Cas9 Nuclease 3NLS は、 12  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  (600 ng/ $\mu\text{l}$ )**

**crRNA は、 12  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  (1200 ng/ $\mu\text{l}$ )**

**tracrRNA は、 12  $\mu\text{g}/10 \mu\text{l}$  (1200 ng/ $\mu\text{l}$ )**

**ssODN は、 12  $\mu\text{g}/20 \mu\text{l}$  (600 ng/ $\mu\text{l}$ ) または、 lssODN**

\*ssODN の代わりに濃度の薄い lssODN を使用する場合は、 Cas9 Nuclease 3NLS、  
crRNA、 tracrRNA、 の濃度を濃くして調整する。

実施例：

1) Cas9 Nuclease

最終希望濃度の 3 倍濃度である 600ng/ $\mu\text{l}$  になるように Opti-MEM で調整する。

2) crRNA と tracrRNA

それぞれ最終希望濃度の 6 倍濃度である濃度 1200ng/ $\mu\text{l}$  になるように Opti-MEM  
で調整する。

3) ssODN

最終希望濃度の 3 倍濃度である濃度 600ng/ $\mu\text{l}$  になるように Opti-MEM で調整する。

4) 混合溶液の作成

crRNA と tracrRNA をハイブリダイズした溶液 20  $\mu\text{l}$  に、 Cas9 Nuclease 3NLS 20  $\mu\text{l}$ 、  
ssODN 20  $\mu\text{l}$  加えて合計 60  $\mu\text{l}$  にする。

それぞれの濃度が 1/3 になるので、シャーレ内の溶液濃度は、

**Cas9 Nuclease 3NLS は、 12  $\mu\text{g}/60 \mu\text{l}$  (200 ng/ $\mu\text{l}$ )**

**crRNA は、 12  $\mu\text{g}/60 \mu\text{l}$  (200 ng/ $\mu\text{l}$ )**

**tracrRNA は、 12  $\mu\text{g}/60 \mu\text{l}$  (200 ng/ $\mu\text{l}$ )**

**ssODN は、 12  $\mu\text{g}/60 \mu\text{l}$  (200 ng/ $\mu\text{l}$ ) \*または、 lssODN が 12  $\mu\text{g}/60 \mu\text{l}$  (200 ng/ $\mu\text{l}$ )  
の溶液が出来上がる。**

3-2) **1mmgap 電極使用**

3-2-1) 電極のバスタブ内に、 Cas9 Nuclease 3NLS、 Cas9 mRNA、 sgRNA、 ssODN、 ssDNA  
等を、ノックアウトかノックインかにより、それぞれを次に述べる容量を入れる。

3-2-2) 溶液の抵抗値を測定する。

3-2-3) 抵抗値を **200 $\Omega$  (180 ~ 220)** に調整する必要がある。

受精卵を入れると抵抗値が若干下がるので、**200 $\Omega$  より少し高い方がよい。**

### 3-2-4) 抵抗値の調整方法

抵抗値が 150Ωであった (200Ω前後に揃えたい)。

溶液を少し吸引して、再度抵抗値を測定し 200Ω (180 ~ 220) にする。

抵抗値が 250Ωであった (200Ωに揃えたい)。

1 x Opti-MEM を添加して、再度抵抗値を測定し 200Ω (180 ~ 220) にする。

3-2-5) 受精卵をミネラルオイル下培養液から取りだし、dish に入れた Opti-MEM で一度洗浄する。

3-2-6) 次いで、電極バスタブ内の液中加入る。

3-2-7) 再度抵抗値を測定する。

### 3-2-8) EP

抵抗値が **200Ω (180 ~ 220)** を確認後、直ちにスタートボタンを押し EP する。

3-2-9) EP 処理後、受精卵を取り出す。

3-2-10) 受精卵を培地に入れる。

3-2-11) 繰り返す。

以下 5mmgap 電極と同様に操作する。

### ノックアウト 例 (Cas9 Nuclease 3NLS)

まず、crRNA 1.5 μl と tracrRNA 1.5 μl をハイブリダイズさせて gRNA complex を作製します。そこに Cas9 Nuclease 3NLS 3 μl 加えて合計 6 μl にする。

電極のバスタブ内に、混合溶液 5 μl を入れる。

**Cas9 Nuclease 3NLS は、1.2 μg / 3 μl (400 ng/μl)**

**crRNA は、1.2 μg / 1.5 μl (800 ng/μl)**

**tracrRNA は、1.2 μg / 1.5 μl (800 ng/μl)**

実施例：

#### 1) Cas9 Nuclease 3NLS

最終希望濃度の 2 倍濃度である 400ng/μl になるように Opti-MEM で調整する。

#### 2) crRNA と tracrRNA

それぞれ最終希望濃度の 4 倍である 800ng/μl になるように Opti-MEM で調整する。

#### 3) 混合溶液の作成

crRNA と tracrRNA ハイブリダイズした溶液 3 μl と Cas9 Nuclease 3NLS 3 μl を加えて合計 6 μl にする。両方とも濃度が 1/2 になるので、シャーレ内の溶液濃度は、

Cas9 Nuclease 3NLS は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )  
crRNA は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )  
tracrRNA は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) の溶液が出来上がる。

#### 4) 注意点

最終溶液はマウス受精卵と等張であることが重要です。

よって、Cas9 Nuclease 3NLS、crRNA と tracrRNA 溶液等は、最終  $1 \times$  Opti-MEM 濃度に調整する。

ミリ Q で溶出した場合、それらの溶液を Opti-MEM で希釈し、最終  $1 \times$  Opti-MEM になる様に調整する。

---

#### ノックイン 例 (Cas9 Nuclease 3NLS)

まず、crRNA  $1 \mu\text{l}$  と tracrRNA  $1 \mu\text{l}$  をハイブリダイズさせて gRNA complex を作製します。

そこに Nuclease 3NLS  $2 \mu\text{l}$  と ssODN  $2 \mu\text{l}$  加えて合計  $6 \mu\text{l}$  にする。

電極のバスタブ内に、混合溶液  $47 \mu\text{l}$  を入れる。

Cas9 Nuclease 3NLS は、 $1.2 \mu\text{g} / 2 \mu\text{l}$  ( $600 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

crRNA は、 $1.2 \mu\text{g} / 1 \mu\text{l}$  ( $1200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

tracrRNA は、 $1.2 \mu\text{g} / 1 \mu\text{l}$  ( $1200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

ssODN は、 $1.2 \mu\text{g} / 2 \mu\text{l}$  ( $600 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) または、lssODN

実施例：

##### 1) Cas9 Nuclease 3NLS

最終希望濃度の 3 倍濃度である  $600 \text{ ng}/\mu\text{l}$  になるように Opti-MEM で調整する。

##### 2) crRNA と tracrRNA

それぞれ最終希望濃度の 6 倍濃度である濃度  $1200 \text{ ng}/\mu\text{l}$  になるように Opti-MEM で調整する。

##### 3) ssODN

最終希望濃度の 3 倍濃度である濃度  $600 \text{ ng}/\mu\text{l}$  になるように Opti-MEM で調整する。

##### 4) 混合溶液の作成

crRNA と tracrRNA をハイブリダイズした溶液  $2 \mu\text{l}$  に、Cas9 Nuclease 3NLS  $2 \mu\text{l}$ 、ssODN  $2 \mu\text{l}$  加えて合計  $6 \mu\text{l}$  にする。

それぞれの濃度が 1/3 になるので、シャーレ内の溶液濃度は、

Cas9 Nuclease 3NLS は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

crRNA は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

tracrRNA は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

ssODN は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ ) または、lssODN は、 $1.2 \mu\text{g} / 6 \mu\text{l}$  ( $200 \text{ ng}/\mu\text{l}$ )

の溶液が出来上がる。

#### 4) 電気条件表

別紙の電気条件表を参照

#### 5) 作業工程

5-1) マイクロインジェクションだと、技術習得に時間が掛かり、受精卵の処理も長時間を必要とし、装置セットの価格も高額である。

5-2) TAKE 法であれば、技術習得が不要で、誰でも同じ結果になります。

非常に簡便で、100 ～ 200 個の受精卵を数分で処理でき、価格はマイクロインジェクション装置より廉価である。

#### 6) 特許について

下記特許が成立しています。

名称：エレクトロポレーションを利用した哺乳類の遺伝子改変方法

登録番号「特許第 5774657」（27 年 7 月 10 日）

出願番号「特願 2013-209184」

京大：金子先生、真下先生（現：阪大）とのネッパジーン（株）の共同出願