

化学合成ガイドRNAを使用したCRISPRを介したノックアウトおよびノックインの濃縮のための蛍光Cas9 mRNA

Megan Basila, John A. Schiel, Travis Hardcastle, Melissa L. Kelley
Dharmacon, A Horizon Discovery Group Company, Lafayette, CO, USA

はじめに

CRISPR-Cas9遺伝子編集システムは、細胞のゲノムDNAに変更を加えるための強力なツールです。S. pyogenes Cas9ヌクレアーゼとDNAターゲティングガイドRNAの同時デリバリーは、標的とされた二本鎖切断を引き起こし、内因性の細胞機構によって不完全に修復され、目的の遺伝子座に変異をもたらします(1、2、3、4)。CRISPR-Cas9と、抗生物質マーカーまたは蛍光レポーターを用いて編集済み細胞を選択する機能を組み合わせることにより、遺伝子編集された細胞集団の濃縮が可能です。複数のレポートで、CRISPR-Cas9遺伝子編集プラットフォームと蛍光活性化セルソーティング(FACS)を使用して、遺伝子編集細胞の濃縮が実証されています(5、6、7)。Cas9ベクターに蛍光レポーターを含めることにより、トランスフェクトされた細胞が収集され、蛍光強度に基づいて並べ替えられます。これにより、遺伝子編集された細胞が、蛍光強度の高い集団に濃縮されます。ただし、プラスミドベースの遺伝子編集試薬の使用には、ゲノムへの意図しない組み込みイベントのリスクや、細胞選別により長い時間がかかるという問題があります。

ここでは、EGFPまたはmKate2のいずれかの蛍光レポーターを含むEdit-R Cas9 Nuclease mRNAの改変バージョンを利用したDNA-freeの濃縮システムを紹介します。2A自己切断ペプチドを利用することにより、同じmRNA鎖内にコードされた蛍光レポーターとCas9の両方が、2つの別々のタンパク質に翻訳されます。

化学合成ガイドRNAと蛍光Cas9 mRNAを組み合わせた以下のような複数の使用法を示します。

- Cas9と蛍光タンパク質のmRNA翻訳の経時的観察
- 遺伝子ノックアウトを目的とした、mKate2およびEGFPレポーターによるトランスフェクト細胞の濃縮
- mKate2レポーターによる、相同組換え修復(HDR)プロセスを受けている細胞の濃縮

結果

蛍光Cas9 mRNA発現の決定と遺伝子編集

経時的にmRNAから翻訳される蛍光タンパク質とCas9タンパク質の両方の動態を理解するために、K-562細胞にEdit-R mKate2 Cas9 nuclease mRNAとSLAMF7遺伝子をターゲットとするcrRNA:tracrRNAをエレクトロポレーションしました。エレクトロポレーションによる即時かつ効率的なデリバリーのため、タイムポイントはエレクトロポレーション後4時間後から始め、8、12、24、48、72時間後としました。各時点で、蛍光顕微鏡を使用して細胞のmKate2蛍光を観察し、細胞の一部を取り出して、ウエスタンブロットティングとDNAミスマッチ検出アッセイ(T7EI)を行いました。エレクトロポレーションの24時間後にピーク蛍光が観察され(図1A)、これはまた、ウエスタンブロットにおいて、Cas9ヌクレアーゼとmKate2の両方の最高タンパク質レベルと相関しました(図1B)。4時間の時点で、遺伝子編集が検出され(約26%)、24時間でほぼ2倍になり(約44%)、72時間の時点で有意な増加は観察されませんでした。

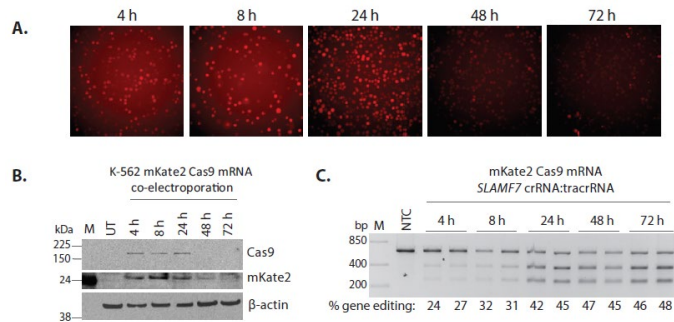


図1. mKate2およびCas9タンパク質の発現および24時間での遺伝子編集活性のピーク

A. mKate2 Cas9 mRNAとSLAMF7 crRNA:tracrRNAの同時エレクトロポレーション後の、K-562細胞におけるmKate2蛍光の経時変化 **B.** ローディングコントロールとしてβ-アクチンを使用した、Cas9とmKate2の経時的なウエスタンブロット分析 **C.** SLAMF7をターゲットとするcrRNAおよびmKate2 Cas9 mRNAの経時的なDNAミスマッチ検出アッセイ

FACSを使用した蛍光mRNA濃縮

上記の時間経過実験に基づいて、トランスフェクション後24時間が、蛍光を使用して細胞を選別するのに理想的な時間であると判断されました。K-562細胞をmKate2 Cas9 mRNA、Edit-R化学合成PPIBコントロールcrRNAおよびtracrRNAでエレクトロポレーションしました。エレクトロポレーションから24時間後、全細胞集団の一部が異なるmKate2蛍光強度レベル（負、薄暗、および上位10%）に分類されました。次に、これらの個々の細胞集団をさらに48時間培養し、遺伝子編集についてアッセイしました。コントロールの並べ替えられていない集団は約36%の遺伝子編集をもたらしましたが、蛍光が陰性の細胞は無視できるレベルの編集を生成し、薄暗い並べ替えられた細胞集団は並べ替えられていないものと同様のレベルの編集（約33%）を生成しました（図2A）。一方、mKate2の蛍光が上位10%の細胞集団を分析すると、遺伝子編集の増加が観察されました（約45%、図2A）。

さまざまな導入方法を使用して蛍光Cas9 mRNAで遺伝子編集イベントを強化する機能をさらに判断するために、EGFP Cas9 Nuclease mRNAを使用して、最適ではない条件下（less-than-optimal）と最適な条件下（optimal）でリピッドトランスフェクションを行いました。less-than-optimalでは、optimalのトランスフェクション条件と比較して、より多くの細胞集団がEGFP蛍光陰性でした（図2B）。optimalのトランスフェクション条件においては、より多くの細胞集団の蛍光が陰性から陽性にシフトしました（薄暗い10%蛍光ピン、図2B）。less-than-optimalのソートされていない集団およびソートされた集団について遺伝子編集について調べると、ソートされていない集団では編集レベルが低く（～9%）、遺伝子編集は、蛍光強度の低いEGFP陽性集団（18%）および蛍光強度の上位10%のEGFP陽性集団（38%）にソートすることで遺伝子編集が増加します（図2C）。optimalのリピッドトランスフェクション条件においてEGFP蛍光に基づいて細胞をソートすると、蛍光強度の低いEGFP集団の編集は、ソートされていない細胞集団（16%）と比較してほぼ2倍（30%）になります（図2C）。上位10%のEGFP陽性集団（38%;図2C）をソートすると、遺伝子編集がさらに強化されます。

蛍光mRNAを使用したHDR濃縮

U2OS細胞は、DharmaFECT Duoトランスフェクション試薬、mKate2 Cas9 mRNA、EMX1 crRNA、tracrRNA、およびドナーオリゴでトランスフェクションされました。ドナーオリゴは、30ヌクレオチド（nt）の相同性アームを使用し、単一のFLAGタグとNheI制限酵素認識配列をEMX1のC末端に挿入するように設計されており、オリゴの両端に2つのホスホロチオエートを含みます（図3A）。トランスフェクションの24時間後、FACSを使用してmKate2発現の細胞を濃縮し、24ウェル培養皿にプレーティングし、さらに48時間培養しました。トランスフェクトされた細胞は、挿入された配列のノックインについて制限断片長多型（RFLP）アッセイによってアッセイされました（図3B）。最高の量のHDRノックインは、未ソート（15%ノックイン）、低mKate2発現（9%ノックイン）および中程度のmKate2発現（16%ノックイン）と比較して、上位10%の最高のmKate2（30%ノックイン）を発現するソートされた細胞に対応する条件で観察されました（図3B）。

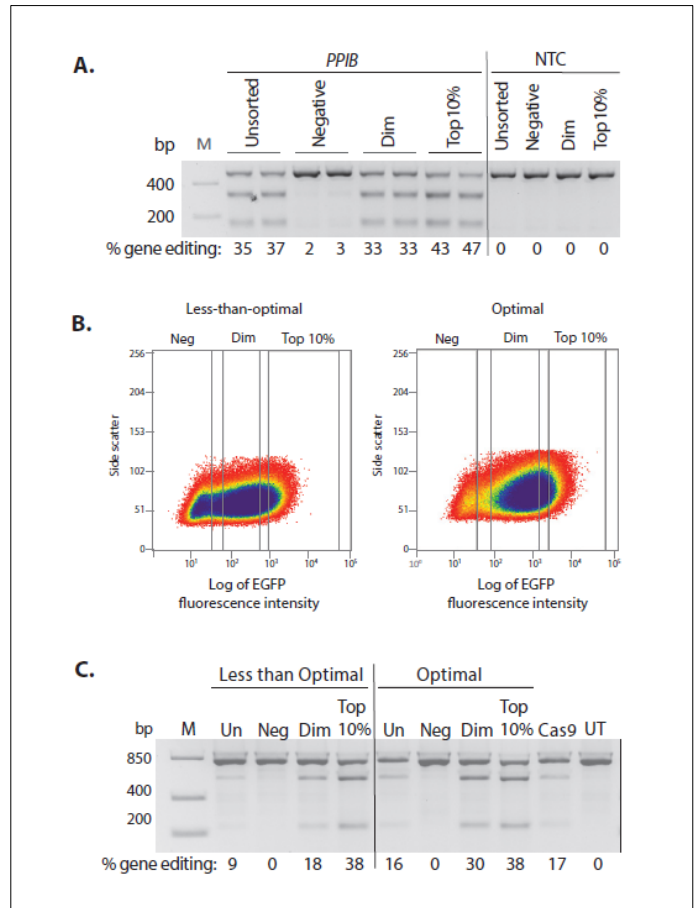


図2. 蛍光Cas9 mRNAによる遺伝子ノックアウトの濃縮

A. mKate2 Cas9 mRNAおよびポジティブコントロールPPIB crRNA：tracrRNAと共にエレクトロポレーションされ、mKate2蛍光に基づいてソートされたK-562細胞集団のミスマッチ検出アッセイ **B.** EGFP Cas9 mRNAからのFACSデータは、最適ではない条件（less-than-optimal）と最適な条件（optimal）でリピッドトランスフェクションしたU2OS細胞集団をソートしました。 **C.** EGFP Cas9 mRNAソートU2OS細胞集団のミスマッチ検出アッセイ

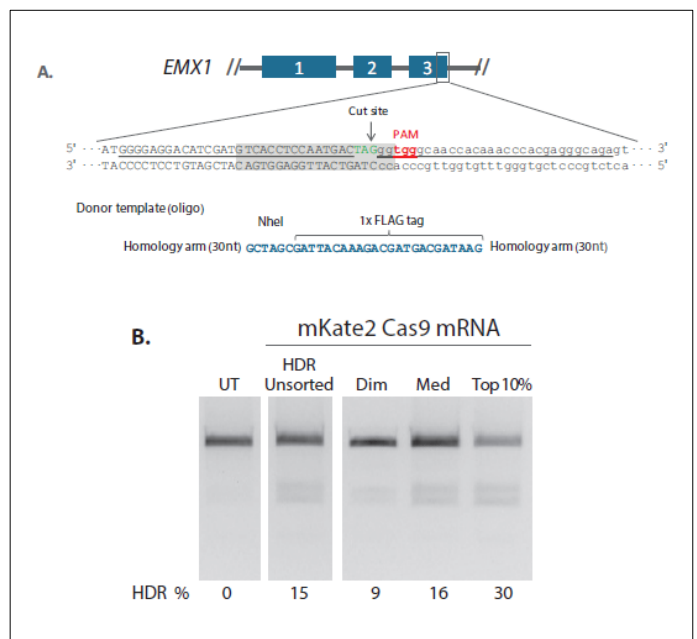


図3. mKate2 Cas9 mRNAによるHDR編集細胞の濃縮

A. EMX1遺伝子のC末端にNheIおよびFLAGタグを挿入するHDRドナーの設計 **B.** mKate2蛍光に基づいてソートされたHDR編集済み細胞のRFLP分析

ディスカッション

ここでは、Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNAを使用して、遺伝子ノックアウトとノックイン実験の両方でトランスフェクトまたはエレクトロポレーションした細胞を濃縮する方法を示しました。蛍光Cas9 mRNAを使用することにより、Cas9の翻訳およびタンパク質レベルを、蛍光タンパク質を観察することで経時的に調べることができます。これはCas9タンパク質の翻訳と相関しており、エレクトロポレーション後24時間でタンパク質レベルがピークになることを示唆しています。エレクトロポレーション（変更する変数がほとんどない、高度に最適化された導入方法）で蛍光Cas9 mRNAを使用する場合、上位10%の蛍光細胞を収集することによる濃縮は控えめです。最適ではないリピッドトランスフェクション条件を使用して、トランスフェクションが困難な細胞で観察される可能性のある結果をシミュレートしました。これらの条件下では、上位10%の蛍光細胞の濃縮により、遺伝子編集がoptimal条件でのトランスフェクション後の同様のソーティングで観察されたレベルに還元されます。ここで提示されたデータは、Edit-R

Fluorescent Cas9 Nuclease mRNAの使用後にFACSエンリッチメントを行うと、より高い遺伝子編集効率で細胞集団を分離でき、より確実な実験結果を得ることを示唆しています。

上位10%の蛍光集団を選択することに加えて、クローンの分離と目的の突然変異のスクリーニングのために、単一細胞をソートできます。蛍光Cas9 mRNAを使用することにより、Cas9ヌクレアーゼの存在する細胞の選択が可能になり、目的の変異を見つける可能性が高まる可能性があります。これは、蛍光Cas9 mRNAとHDR実験用のガイドRNAを含むssDNAオリゴの導入でも明らかです。上位10%を選択すると、RFLPを介したオリゴ挿入が2倍向上しました。単一の細胞を選別する場合、これは望ましい遺伝子修正を見つける可能性を高め、スクリーニングする必要があるクローンの数を減らします。

結論

Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNAは、Cas9を発現するトランスフェクト細胞の濃縮を可能にします。2つの蛍光オプション、mKate2とEGFPは、実験変数と顕微鏡機能に応じて異なる波長に柔軟性を提供します。Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNAを使用すると、蛍光タンパク質の発現、したがってCas9ヌクレアーゼの発現は、顕微鏡および蛍光細胞の濃縮を使用して、経時的に観察できます。上位10%の蛍光陽性集団を選択することにより、遺伝子ノックアウトと遺伝子修正/挿入の両方を強化できます。

材料および方法

組織培養：K-562細胞（ATCC, CCL-243）をRPMI 1640培地（GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30096.01）で維持しました。この培地には、10%ウシ胎児血清（FBS; GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30071.03）、2 mM L-グルタミン（FBS; GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30071.03）、1 mMピルビン酸ナトリウム（GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30239.01）、非必須アミノ酸（NEAA）（GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30238.01）および10 mM HEPES（GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30237.01）をサプリメントとして加えています。U2OS（ATCC, HTB96）細胞を、10% FBS、2 mM L-グルタミンを添加したダルベッコの改変イーグル培地で培養しました。

エレクトロポレーション：エレクトロポレーションの際、反応ごとに2×10⁶個のK-562細胞を回収し、500×gで2分間遠心分離しました。細胞ペレットをDPBS（GE Healthcare Hyclone, Cat #SH30264.01）で洗浄し、500×gでさらに2分間遠心分離しました。Edit-R Cas9 Nuclease mRNAエレクトロポレーションプロトコールに記載されているように、細胞を100 μLのバッファV（Lonza, Cat #VCA-1003）に再懸濁しました。次に、細胞を、5.36 μM predesign Edit-R SLAMF7 crRNA（Dharmacon Cat #CM-017122-02-0020）または5.36 μM Edit-R crRNA Non-targeting Control #1（Dharmacon Cat #U-007501-01-20）と共に、Edit-R mKate2 Cas9 mRNA（5 μg, Dharmacon Cat #CAS11859）および5.36 μM tracrRNA（Dharmacon Cat #U-002000-120）と混合しました。エレクトロポレーションは、メーカーのプロトコールに従って、Lonza Nucleofector 2bのいずれかを使用して行いました。

DNAミスマッチ検出アッセイ：細胞（サンプルあたり1×10⁵）を、5 μLのProteinase K（Thermo Scientific, Cat #E00492）とRNase A（Thermo Scientific, Cat #EN0531）を含むPhusion GC buffer（Thermo Scientific, Cat #F-549S）に溶解し、56°Cで1時間インキュベートした後、98°Cで10分間熱失活させました。0.5 μLのPhusion Hot Start II DNAポリメラーゼ（Thermo Scientific, Cat #F-549S）、5X Phusion HFバッファ（Thermo Scientific, Cat #F-549S）、各200 μMのdNTP（Thermo Scientific, Cat #F-549S）、0.5 μMフォワードおよびリバープライマー（SLAMF7：フォワード5'-GCTGATGAAGATGGGGAGCA-3'、リバー5'-GCCCTCAAAGAGGAGAGAAGGC-3'；PPIB：フォワード5'-ACCGTGTATTTTGCCTACGAAT-3'、リバー5'-AAACATTCGTAGGTCAAATACA-3'）および5 μLの直接細胞溶解テンプレートを用いて、50 μLの容量でPCRを行いました。各サンプルについて、タッチダウンPCRと次の熱サイクルステップを伴うアニーリングプログラムを実行しました：98°Cで3分間の変性/酵素活性化、その後98°Cで10秒、72°Cで15秒（-1°C/サイクル）、72°Cで30秒間を10サイクル、その後、98°Cで10秒間、62°Cで15秒間、72°Cで30秒間を25サイクル、最後に72°Cで10分間の伸長。サンプルを95°Cで10分間加熱し、徐冷して再アニールしました。次に、10 μLのアニーリング済みPCR産物を5ユニットのT7E1酵素とNEBuffer 2（New England Biolabs, Cat #M0302L）と組み合わせ、37°Cで25分間インキュベートしました。3 μLの6X Orange Loading Dye（Thermo Scientific, Cat #R0631）をT7E1反応に加え、全量を2%アガロースゲルにロードして泳動しました。詳細については、Edit-R Synthetic crRNA Positive Controls Protocolを参照してください。編集のレベルはImage Jソフトウェアによりデンストメトリー（%遺伝子編集）を使用して計算され、遺伝子編集は式 $(1-\sqrt{(1-(a+b)/(a+b+c)))}$ *100 (9)を用いて見積もりました。

イムノブロットング：細胞（サンプルあたり5×10⁵）を、1xプロテアーゼインヒビターミックス（GE Healthcare, Cat #80-6501-23）を添加した50 μLのRIPAベースの溶解バッファを用いて氷上にて溶解しました。ゲル電気泳動までサンプルを-80°Cで凍結しました。サンプル前処理の前に、サンプルを最高速度（13,300 rpm）で4°Cで10分間遠心分離しました。上清を事前に冷却したチューブに移し、NuPAGE 4X LDSサンプルバッファとNuPAGE サンプル還元剤（10X）（Thermo Scientific, Cat #NP0008, #NP0009）で変性させました。次に、サンプルを70°Cで5分間加熱した後、Novex 4-20%Trisグリシンミニプロテインゲル（Thermo Scientific, Cat #EC6025BOX）で125 Vで85分間泳動しました。Invitrogen Xcell IIプロットモジュール（Thermo Scientific, Cat #EI0002）を使用して、タンパク質を0.2 μmのAmersham Protran ニトロセルロースメンブレン（GE Healthcare, Cat #10600104）に湿式転写しました。転写後、膜をSuperBlock（PBS製剤; Thermo Scientific, Cat #37515）で30分間ブロックしました。膜をタンパク質のサイズに基づいてストリップに切断し、それぞれの一次抗体でプローブしました。一次抗体 [マウス抗Cas9ポリクローナル1：1000希釈（Novus Biologicals, Cat #NBP2-36440）、マウス抗TagRFP 1：1000希釈（Thermo Scientific, Cat #MA5-15257）また

はマウス抗ベータ-アクチン1：2000希釈 (Abcam, Cat #6276)] をSuperBlockで希釈し、4°Cで一晩それぞれの膜とインキュベートしました。メンブレンをPBSで希釈した0.05%Tween 20で5分間4回洗浄しました。二次抗体 [ヤギ抗マウスIgG (H + L) 二次抗体、HRP conjugate (Thermo Scientific, Cat #32430)] を、0.05%Tween 20を含むSuperBlock (PBS製剤) で1:20,000に希釈し、膜を室温で2時間インキュベートしました。次に、メンブレンをSuperSignal West Dura Substrate (Thermo Scientific, Cat #34016) 溶液 (ベータアクチンの場合) あるいはWest Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Scientific, Cat #34095) 溶液 (Cas9およびmKate2の場合) に浸し、5分間振とうし、フィルムに感光させました。

FACS分析：U2OSおよびK-562細胞の両方を選別するために、U2OS細胞をトリプシン処理し、各ウェルプレートの3/4を両方の細胞株について収集した。収集した細胞を遠心分離し、細胞選別培地 (400 µL) に再懸濁し、選別するまで氷上で保存しました。コロラド大学癌センターのFlow Cytometry Core [Cancer Center Support Grant (P30CA046934)] によるMoflo XDP 100細胞分類器具を使用して、FBS濃縮培地 (50%FBSおよび適切な基本培地) を使用して細胞をチューブに分類しました。選別後、収集した細胞数に応じた適切なサイズのウェルに細胞を播種しました。細胞は、DNAミスマッチ検出アッセイを使用して選別してから48時間後に、遺伝子編集について評価されました。完全なプロトコルの詳細については、「Dharmacon Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNA を使用したトランスフェクションされた細胞の濃縮-プロトコル」を参照してください。

遺伝子編集のためのリピッドトランスフェクション：U2OS細胞をトランスフェクションの1日前に6ウェルプレートに300,000細胞/ウェルで播種しました。トランスフェクション時に、5 µgのEdit-R EGFP Cas9 Nuclease mRNA (Dharmacon Cat#CAS11160) および、25 nM tracrRNA (Dharmacon Cat#U-002000-120) 、25 nM Edit-R PPIB Synthetic crRNA Control (Cat#U-007000-01-20) またはEdit-R crRNA Non-targeting Control #1 (Dharmacon Cat#U-007501-01-20) を、3 µL (less-than-optimal) または9 µL (optimal) のDharmaFECT Duoトランスフェクション試薬 (Dharmacon Cat#T-2010-02) と混合し、無血清培地中で20分間インキュベートしました。インキュベーション後、完全血清培地を脂質複合体に加え、細胞プレートから培地を取り除き、脂質複合体で置き換えました。細胞を、37°C、5%CO₂のインキュベーターに24時間置き、次にソートしました。HDR脂質トランスフェクションは、10 nMの最終ドナーオリゴ濃度で上記のように実行されました。詳細については、「HDRを介した遺伝子編集のためのssDNAドナーオリゴヌクレオチドのトランスフェクション-プロトコル」を参照してください。

ssDNAドナーオリゴ：標準的な固相DNA合成および脱塩手順を使用して、DNAオリゴを合成しました。使用した各DNAオリゴには、最初の2つのDNA塩基と最後の2つのDNA塩基の間に2つのホスホロチオエート結合が含まれていました。オリゴをエタノール沈殿し、10 mM Tris-HCl (pH 7.5) に再懸濁 (100 µM) し、トランスフェクション前にさらに1 µMに希釈しました。

制限断片長多型アッセイ：トランスフェクションの72時間後に、上記のようにゲノム分離を行いました。PCRは、制限酵素ノックインサイトに隣接し、各ドナーDNAオリゴ (フォワード5'-GGAGCAGCTGGTCAGAGGGG-3'、リバーズ5'-GGGAAGGGGGACACTGGGGA-3') に使用される相同性アームの外側のプライマーを使用して実行されました。PCR産物をさらに精製し、水で溶出しました。PCR産物 (500 ng) をFastDigest バッファーで1 UのFastDigest NheI酵素 (Thermo Scientific Cat FD0974) を用いて37°Cで30分間消化し、サンプルを2%アガロースゲルで分離しました。各サンプルのHDRノックインは、ImageJソフトウェアを使用して計算されました。

References

1. E. Deltcheva, K. Chylinski, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor Nuclease III. *Nature*. 471(7340), 602-607 (2011).
2. M. Jinek, K. Chylinski, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337(6096), 816-821 (2012).
3. P. Mali, L. Yang, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. 339(6121), 823-826 (2013).
4. L. Cong, F. A. Ran, et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/ Cas Systems. *Science*. 339(6121), (2013).
5. K. Duda, L. A. Lonowski, et al. High-efficiency genome editing via 2A-coupled co-expression of fluorescent proteins and zinc finger nucleases or CRISPR/Cas9 nickase pairs. *Nucleic Acids Res.* 42(10), (2014).
6. L. M. Grav, J. S. Lee, et al. One-step generation of triple knockout CHO cell lines using CRISPR/Cas9 and fluorescent enrichment. *Biotechnol. J.* 10, 1446-1456 (2015).
7. J. S. Lee, L. M. Grav, et al. Accelerated Homology-Directed Targeted Integration of Transgenes in Chinese Hamster Ovary Cells via CRISPR/Cas9 and Fluorescent Enrichment. *Biotechnol. Bioeng.* 113, 2518-2523 (2016).

For more information

ホライゾン・ディスカバリー株式会社
horizondiscovery.com/contact-us

©2022 Horizon Discovery Group Ltd and its affiliated companies. All rights reserved.

PerkinElmer is a trademark of PerkinElmer, Inc., registered in the United States and other countries. Horizon Discovery is a trademark mark of Horizon Discovery Ltd. Dharmacon is a trademark of Dharmacon, Inc.. All PerkinElmer, Inc., Horizon Discovery Ltd and Dharmacon, Inc. trademarks are used with permission. Other product names and brand names may be trademarks or registered trademarks of their respective owners.

本文書は英語版プロトコルを元にした日本語版です。内容は英語版プロトコルの最新バージョンとは異なることがあります。

B027-2005-v2

horizon
a PerkinElmer company