

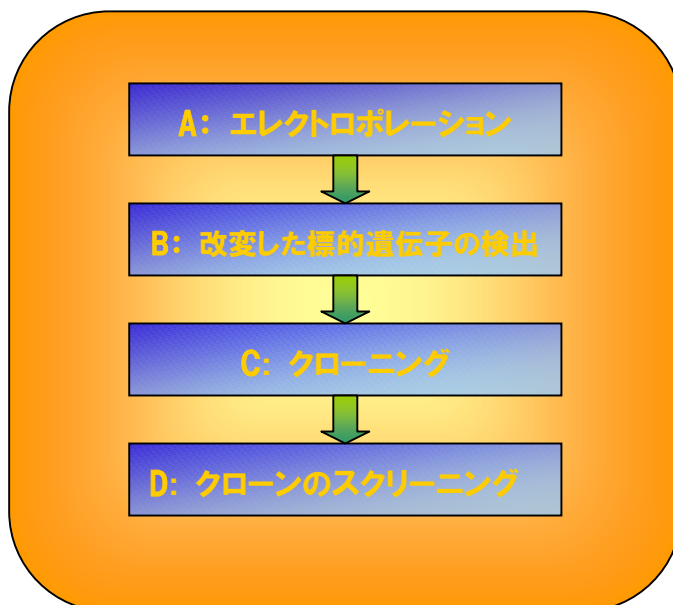
## CompoZr™ Custom Zinc Finger Nuclease (ZFN) 簡易プロトコール

(ノックアウト: エレクトロポレーション法で接着細胞を使用した場合)

本プロトコールは、エレクトロポレーション法で接着細胞を使用した場合のノックアウトに関して説明しています。

他の方法(Nucleofection 法、ノックインなど)や浮遊細胞用のプロトコール(英語版)は別途ご用意しておりますので、製品添付、もしくは弊社テクニカルサポートまでお問い合わせ下さい(TEL: 03-5796-7330, Email: [sialjpts@sial.com](mailto:sialjpts@sial.com))。

また、本プロトコールは製品添付の英語版を元に作成されております。製品を使用される際には、必ず添付の英語版とあわせて御使用下さい。



お問い合わせ先:

製品の技術的なご質問

[sialjpts@sial.com](mailto:sialjpts@sial.com)

価格・在庫のご質問

[sialjpcs@sial.com](mailto:sialjpcs@sial.com)

## コンポーネント(構成品)

名称	製品番号	内容量
ZFN mRNA	MRZFN	1 ea
Plasmid pZFN1	D1ZFN	20 µg
Plasmid pZFN2	D2ZFN	20 µg
ZFN Primer F	PFZFN	25 µmoles
ZFN Primer R	PRZFN	25 µmoles
ZFN Control	CDZFN	1 vial

## 本製品以外にご用意いただく試薬および器具

エレクトロポレーション用の試薬

完全培地

GenElute™ Mammalian Genomic DNA miniprep kit (製品番号: [G1N70](#))

GenElute™ PCR Clean-up kit (製品番号: [NA1020](#))

Extract-N-Amp™ Blood PCR kit (製品番号: [XNAB2](#))

JumpStart™ Taq ReadyMix™ (製品番号: [P2893](#))

酢酸ナトリウムバッファー(製品番号: [S7899](#))

エタノール (製品番号:[09-0770](#))

Surveyor Mutation Detection Kit

制限酵素 *Hind* III and *Xho* I

アガロースゲル

10% TBE PAGE ゲル

## 注意事項と免責事項

CompoZr™ Custom Zinc Finger Nucleaseは試験研究用のみを目的として販売されています。医薬品、家庭用その他試験研究以外の用途には使用できません。本試薬および本キットに含まれる試薬を取り扱う際は、手袋、安全眼鏡、適切な保護服を着用して下さい。危険性や安全な取り扱いに関しては化学物質安全データシート(MSDS)をご覧ください。

## プロトコール

### A: 接着細胞の標準的なエレクトロポレーション

NOTE: 各セルラインは GFP 発現プラスミドなどのレポーターコンストラクトを使用し、エレクトロポレーションのために最適化した方がよいでしょう。本プロトコールはヒトHCT-116細胞やラットC6細胞などに使用し良好な結果を得ています。以下のインストラクションは HTC-116 細胞を使用した場合のプロトコールです。

- 1: トランスフェクションする前日に細胞密度が  $2 \times 10^5$  cells/mLになるように細胞を培養する。
- 2: トランスフェクション当日、細胞を1X PBS で洗い、培地を除去。Trypsin/EDTA で細胞をはがす。
- 3: トリプシン処理を完全に終えた時点で温めた培地 10 mL を加える。
- 4: 細胞密度を血球計数器などで計測する。
- 5: 一回のトランスフェクションに対し  $1 \times 10^6$ 個の細胞を使用する(4 回分 =  $4 \times 10^6$ 細胞)。細胞を  $100 \times g$ で 5 分間遠心し、細胞ペレットを崩さないように培地を取り除く。
- 6: 20 mL の 1x PBS で再懸濁する。
- 7: 上記の遠心手順を繰り返し、PBS を取り除く。
- 8: 各遠心チューブに名称をつける。各チューブにつける名称と添加物の量は以下の通り:

サンプル名称	加える量
GFP	プラスミド 2 $\mu$ g
ZFN mRNA	ZFN mRNA 1 バイアル
ZFN plasmids	ZFNプラスミド それぞれを 2 $\mu$ g*
Cell only	水 5 $\mu$ L

\*ZFNプラスミドはそれぞれのプラスミドを 2 本のチューブに分けてお届けしています。

それぞれのプラスミドは一緒に使うことにより活性を生じますので、反応時には必ず混合して下さい。

- 9: 6 ウェルプレート内の 4 ウェルに 2 mLの培地を入れ、37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターで温める。
- 10: 200  $\mu$ L の GTM-3 培地で細胞を再懸濁する (4トランスフェクション分で 800  $\mu$ L の GTM-3 培地が必要)。  
細胞の種類によって異なるエレクトロポーションの培地を使用することがあります。  
注意: mRNA/DNAを細胞に処理する時間と細胞をキュベットに置く時間を最小にするために各リアクションは別々に行って下さい。
- 11: プラスミドもしくは mRNA を入れたチューブに細胞 200  $\mu$ L を加えてよく混合し、2 mm のキュベットに移し、次の条件でエレクトロポレーションする。  
電圧: 155 V 電気容量(キャパシタンス): 1,000  $\mu$ F
- 12: エレクトロポレーション終了後、手順 9 で用意した 6 ウェルプレートから培地 0.5~1.0 mL をピペットでキュベットに移す。そのキュベットから細胞と培地の混合物を出来る限り元の 6 ウェルプレートに戻す。
- 13: 全ての反応を終えたら、6 ウェルプレートを 37°C、5% CO<sub>2</sub>インキュベーターに戻す。

## B: 改変した標的遺伝子の検出

### 1 : Surveyor Mutation Detection Kit (Surveyor遺伝子変異検出キット)

本検出アッセイは ZFN の切断効率、もしくはお客様の希望の DNA が標的部位に対するインサート効率を確認するためのアッセイです。本アッセイは Cel-I エンドヌクレアーゼ (Surveyor Nuclease S) の特性を利用しています。この酵素は DNA ミスマッチ部分 (mismatch bubbles) で切断し、二本鎖の切断を引き起こします。つまり、後述の手順により ZFN ターゲットサイトを通る PCR を行い、その PCR 産物を変性、再アニールします。これによって、改変のない DNA と変異された DNA がアニールし、ミスマッチ部分が生じます。Surveyor Nuclease S 処理後、産物は分解された泳動パターンとして確認できます。すなわち、DNA ミスマッチ部分がなければ DNA 切断が起こらないため、1 つのバンドしか現れません。もし、非相同末端結合 (non-homologous end-joining; NHEJ) が起こっていれば、切断された産物がゲル上で確認できます。製品に添付されているプライマー (ZFN primer F, ZFN primer R) でこれらの反応を確認することが出来ます。ロットごとの certificate of Analysis (試験成績書) で、Surveyor キットによる産物の予想される泳動パターンと PCR 産物のサイズをご参照下さい。

NOTE: トランスフェクションした細胞からセクションする際には、次のセクションで使用するクローンを確保するために継代し、少量の細胞を別にキープして下さい。

### 2 : ゲノムDNA精製 (接着細胞用)

- トランスフェクションの翌日、プレート内のウェルから培地を取り除く。2 mL の 1X PBS、もしくはハンクス平衡塩溶液 (HBSS) でウェルをリンス。
- 手順 a の PBS または HBSS を取り除き、0.5 mL の 0.5X トリプシン溶液を各ウェルに加え、細胞がプレート (ウェル) から離れるまで 37°C でインキュベートする。
- 手順 b の細胞を 1.5 mL マイクロ遠心チューブに移し、500 X g で 5 分間遠心する。
- 手順 c のチューブの底にあるペレットを乱さないよう注意深くトリプシン溶液を取り除く。
- Sigma GenElute™ Mammalian Genomic DNA miniprep kit (GenElute 哺乳動物用ゲノムDNAミニプレップキット、製品番号: [G1N70](#)) で染色体DNAを精製する。

### 3 : Surveyor 遺伝子変異検出アッセイ

- 精製したゲノム DNA を ZFN Primer F と ZFN Primer R で増幅する。

反応液の組成は次の通り:

試薬 (製品番号)	容量
水、PCR グレード (W1754)	2 µL
2x Jumpstart Taq ReadyMix (P2893)	5 µL
ZFN primer F (PFZFN)	1 µL
ZFN primer R (PRZFN)	1 µL
ゲノム DNA (手順 2 の e より)	1 µL
<b>合計</b>	<b>10 µL</b>

b. 次のサイクリングパラメーターを使用して PCR を行う。

ステップ	温度	時間	サイクル数
一回目の変性	95°C	3 分	1
変性	95°C	30 秒	30
アニーリング	62°C	30 秒	
伸長	72°C	30 秒	
最後の伸長	72°C	7 分	1
ホールド	4°C	無期限	

c. PCR が完了したらミスマッチ二本鎖を作るために以下の条件で再アニールする。

95°C 10 分

2°C/Sec で 85°Cまで冷やす

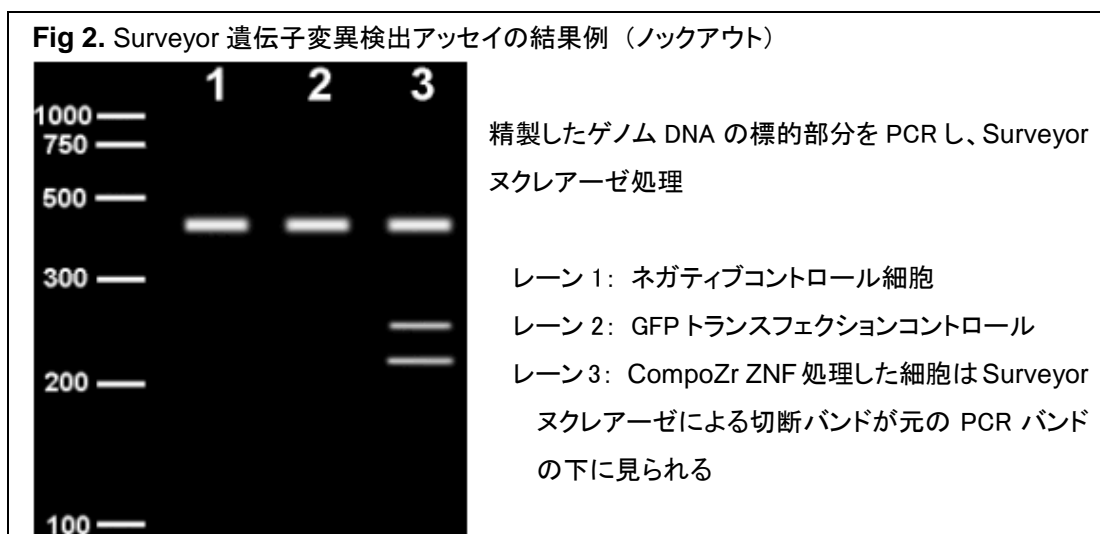
0.1°C/Sec で 25°Cまで冷やす

4°Cでホールド

d. (Surveyor Mutation Detection kit の) Surveyor Nuclease S を 1 μL と Surveyor Enhancer S を 1 μL 加える。

e. サンプルを 42°Cで 45 分間インキュベートする。

f. サンプルを 10% 非変性TBEポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド(製品番号例:[E1385](#))で染色する。ゲルにUV照射して泳動パターンを見る。SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms: 一塩基多型)による複数のバンドが見られる場合は、添付プロトコールのトラブルシューティングガイド部分を参照する。標的部分の改変が確認できたら次のステップ(C: クローニング)に進む。細胞タイプにより遺伝子改変の量は異なる。必ず次のステップに進む前に切断されたバンドをゲル上で確認して下さい。もし現れない場合は、Surveyor で切断されたバンドが見えるまで、上述の手順を繰り返して下さい(参考例 Figure 2)。



## C: クローニング

トランスフェクションの7日後に細胞はクローニングを開始します。クローニングはそれ以前にも可能ですが、7日後の方がよりクローニング効率が高くなります。なぜなら細胞はトランスフェクション後2~3日で死んでしまう場合があるからです。また、トランスフェクションとクローニングの間にオーバーグロースを避け、最適な細胞増殖を維持するのが大切です。Surveyor コントロールによるノックアウト効率によっては、スクリーニングするクローンを増やす必要もあります。

### 限界希釈

細胞をトリプシン処理した後、血清を含んだ培地で中和する。遠心した細胞を完全培地で再懸濁、希釈して浮遊細胞のように撒く。細胞をカウントし4 cell/mLになるように希釈する。希釈した細胞を96 ウェルプレートの1 ウェルあたり各200  $\mu$ L 撒く。

## D: クローンのスクリーニング

クローンが育ってきたら96 ウェルプレートに3つの複製を作ります。一つは凍結ストック用、一つはゲノムDNA検査用、そしてもう一つは維持用にします。

### 1: ゲノムDNAの準備

Extract-N-Amp Blood PCR キット(製品番号:[XNAB2](#))でゲノムDNAを調製する。

- 細胞をトリプシン処理し96 ウェルのPCR プレートに移す。
- 細胞を1000 x gで10分間遠心させて培地を取り除く。
- 20  $\mu$ L のLysis buffer を加え、75°Cで15分間インキュベートする。
- 180  $\mu$ L のNeutralization Buffer を加えよくピペッティングして混合する。

### 2: 標的部分のPCR

クローンの染色体DNAをZFNプライマーでPCRを行う。

- PCR用のマイクロ遠心チューブまたはプレートに下記の試薬を加える。

試薬 (製品番号)	容量
水、PCR グレード (W1754)	10 $\mu$ L
2x Extract-N-Amp Blood PCR Mix	25 $\mu$ L
ZFN primer F (PFZFN)	5 $\mu$ L
ZFN primer R (PRZFN)	5 $\mu$ L
Extract-N-Amp 抽出物	5 $\mu$ L
合計	50 $\mu$ L

b. 以下のサイクリングパラメーターを使用して PCR を行う。

ステップ	温度	時間	サイクル数
一回目の変性	95℃	3分	1
変性	95℃	30秒	30
アニーリング	62℃	30秒	
伸長	72℃	30秒	
最後の伸長	72℃	7分	1
ホールド	4℃	無期限	

### 3 : 改変した標的遺伝子の検査

本パートはセクション B、パート 3 (Surveyor 遺伝子変異検出アッセイ) のステップ c からご覧下さい。

### 4 : PCR産物によるZFN活性の確認

サンプルを 10%非変性TBEポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド(製品番号例:[E1385](#))で染色する。ゲルにUV照射して泳動パターンを見る。SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms: 一塩基多型)による複数のバンドが見られる場合は、添付プロトコールのトラブルシューティングガイド部分を参照する。Surveyor で切断されたバンドによって改変を確かめる。