

Construction and Evaluation of TALENs in Medaka

安齋 賢* 木下 政人*

2013年1月

概要

近年、次世代の標的遺伝子改変手法として、標的配列の改変が可能な人工ヌクレアーゼを利用したゲノム編集 (Genome Editing) 技術が脚光を浴びている。人工ヌクレアーゼは、その標的配列近傍に DNA 二重鎖切断 (Double Strand Breaks, DSB) を誘導する。DSB は主に、非相同末端連結 (Non-Homologous End Joining, NHEJ) もしくは相同組換え修復 (Homology-Directed Repair, HDR) の2つの経路のどちらかによって修復され、NHEJ では塩基の欠失や挿入による標的遺伝子破壊が、HDR ではドナーベクターを利用した標的遺伝子組換えが、それぞれ誘導される [1]。人工ヌクレアーゼの中でも、転写因子に広く見られる C₂H₂ 型 zinc-finger ドメインと制限酵素 FokI のヌクレアーゼドメインを融合して作製した Zinc-Finger Nuclease (ZFN) [2] は、先行して研究やその利用が進んできた。2000 年代初頭にショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) での標的遺伝子改変の成功が報告 [3,4] されて以降、既に動物個体から植物、哺乳類培養細胞まで、幅広い生物において成果が報告されている [1,5]。しかしながら、標的配列に対して高い結合能を持つ zinc-finger domain の作出に、技術的に大きな困難を伴うことから、ZFN を用いた研究はあまり広がっていないのが現状である [6]。

そこで、新たに人工ヌクレアーゼとして登場した Transcription activator-like effector nuclease (TALEN) [6–8] が注目を集めている。TALEN は、FokI ヌクレアーゼドメインを、植物病原細菌 *Xanthomonas* 属由来のエフェクタータンパク質 Transcription activator-like (TAL) effector の DNA 結合ドメインと融合させて構築した人工制限酵素である [7]。TAL effector は内部に、1 リピートが 33-35 アミノ酸残基となるリピート構造を持つ。Repeat variable di-residue (RVD) と呼ばれる各リピートの 12 及び 13 番目の残基に多型が存在し、その配列によって認識する塩基が決定される [9,10]。各リピートは認識塩基と 1 対 1 で対応し、RVD が “NI” の場合は “A”、“NG” の場合は “T”、“NN” の場合は “G” 又は “A” と、“HD” の場合は “C” となる [9,10] *1。そのため各リピートを任意の順序で連結することで、任意のゲノム配列に結合する TAL effector domain を容易に作製できることから [11–13]、TALEN 技術は様々なモデル動物において有効な逆遺伝学的手法として広まりつつある [14–21]。

本プロトコールでは、我々のグループで確立した TALEN の作製法、並びに作製した TALEN のメダカにおける活性の評価方法について述べる。TALEN 作製では、“Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit” [11] を 6 モジュール連結に改良した佐久間らの手法 [22] を基に、一部を改変した手法を採用している。この手法は簡便かつ迅速な構築手法であり、最短 6 日で TALEN をコードする RNA 合成までを完了し、メダカ胚への導入が可能となる。始めに TALEN 作製システムの立ち上げから、システムの運用手順までを述べる。続いてメダカにおける TALEN の活性評価について、我々が実際に行なっているマイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA (島津製作所) を用いた変異解析手法について述べる。

* 京都大学大学院 農学研究科 応用生物科学専攻 Email: ansai@kais.kyoto-u.ac.jp (安齋), kinoshit@kais.kyoto-u.ac.jp (木下)
Copyright © 2013 Satoshi Ansai and Masato Kinoshita, Kyoto University. All rights reserved.

*1 なお最近では、“NH” が “G” を特異的に認識する RVD として使用されつつある。

目次

1	Materials	3
1.1	TALEN Assembly	3
1.2	Injection 用 RNA の調製	5
2	TALEN Assembly システムの立ち上げ	7
2.1	Module (HD1-6, NG1-6, NI1-6, NN1-6) の調製	7
2.2	Array Backbone Vector (pFUS) の調製	7
2.3	Last Repeat Module (pLR) の調製	8
2.4	Expression Backbone Vector (pCS2TAL3DD/RR) の調製	9
3	TALEN Assembly システムによる TALEN の設計・構築	11
3.1	概要	11
3.2	TALEN のデザイン	11
3.3	TALEN 発現ベクターの構築	15
3.4	メダカ導入用 RNA の合成	21
4	Appendix: MultiNA を用いた変異解析	24
4.1	Introduction	24
4.2	Material	24
4.3	Methods	24

1 Materials

1.1 TALEN Assembly

1.1.1 ベクター

■ Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit*² [Addgene cat#1000000016]*²

Voytas グループ (University of Minnesota) から Addgene を通じて提供されている TALEN 作製キットの 1 つ。オリジナルプロトコルの詳細は Cermak らの論文 [11] を参照。本プロトコルでは、キット中に含まれている 72 個*²のプラスミドのうち、pHD1-6、pNG1-6、pNI1-6、pNN1-6、pLR-HD、pLR-NG、pLR-NI、pLR-NN、pFUS_B1-6 の計 34 個のみを使用する。キット内容物や分与方法に関しては、Addgene web site (<http://www.addgene.org/TALeffector/goldengateV2/>) を参照のこと。

■ pCS2TAL3DD, pCS2TAL3RR [Addgene plasmid 37275, 37276]

Grunwald グループ (University of Utah) によって作製された、ゼブラフィッシュ用 TALEN 発現ベクター (詳細は Dahlem らの論文 [23] を参照)。pCS2+ ベクターを Backbone とすることで、SP6 promoter からの RNA 転写を容易に行うことができる。Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 内の pTAL1-4 の代替として使用する。

■ pFUS_A1A, pFUS_A2A, pFUS_A2B, pFUS_A3A, pFUS_A3B, pFUS_A4A, pFUS_A4B

山本グループ (広島大学) によって作製された Backbone ベクター。Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit のオリジナルの手法では 10 モジュールを一度に連結するが、本ベクターセットを使用することで一度に連結するモジュール数を 6 に減らすことができる。6 モジュール連結を行った場合 10 モジュール連結と比べて、1) Ligation の成功率が上昇する、2) 用意する Module Vector の数が少なくなる (40 → 24)、といった利点がある。詳細は佐久間らの論文 [22] を参照のこと。Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 内の pFUS_A、pFUS_A30A、pFUS_A30B の代替として使用する。

1.1.2 プライマー

■ 1st Assembly 用

pCR8_F1 5'- TTGATGCCTGGCAGTTCCCT -3'

pCR8_R1 5'- CGAACCGAACAGGCTTATGT -3'

■ 2nd Assembly 用

TAL_F1 5'- TTGGCGTCCGCAAACAGTGG -3'

TAL_R2 5'- GGCGACGAGGTGGTCGTTGG -3'

1.1.3 酵素類

■ 制限酵素

Bsal-HF (New England Biolabs)

*² 2013 年 1 月現在、Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit Ver.2 [Addgene cat#1000000024] が提供されており、計 86 個のプラスミドとなっている。なお本プロトコルでは、“G” への特異性が高いとされる NH リピート、特異性が低いとされる NK リピートはどちらも採用していない。

HF 無しのもも販売されているが、よりオーバーナイト (O/N) 消化に適した HF ver. の方が良い。

Esp3I (BsmBI) (Fermentas/Thermo Fisher Scientific)

NEB でも同様の制限酵素 (BsmBI) が販売されているが、反応温度が違うので注意。Tango Buffer は付属だが、20 mM DTT は付属ではないので、自分で用意する必要がある。

XbaI, XhoI, HindIII

確認用制限酵素。一般的に入手できるもので良い。別の酵素を使っても良い。

■ Ligase

Ligation High Ver.2 (TOYOBO)

本プロトコルでは、アガロースゲルより切り出し精製した制限酵素断片を使用するため、Ligase の使用制限は特に無い。オリジナルプロトコルの T4 DNA Ligase (NEB) は失活しやすく、扱いに注意が必要なので、扱いが容易な 1 液タイプの Ligation High Ver.2 を使用している。効率は同等。試してはいないが、他の製品でも上手く行くと思われる。

■ PCR 酵素

HybriPol DNA Polymerase (BioLine)

コロニー PCR 用。特に 2nd Assembly 時の PCR は条件が厳しいので、なるべく伸びやすい酵素を使用する必要がある。我々の研究室では最も実績があるのが本酵素で、安価なものも特長。TaKaRa Ex Taq (Takara) でも一応伸ばせるが、HybriPol の方がよりクリアに伸びる傾向がある。伸びればどの酵素でも良い。

■ Bacterial Alkaline Phosphatase (脱リン酸化酵素)

しっかりと脱リン酸化処理をしたいので、CIAP より BAP の方が良い。一般的に入手出来る物で問題ない。Alkaline Phosphatase (*E. coli* C75) (Takara) 等。

1.1.4 キット類

■ プラスミド精製キット

特に指定は無いが、スピнкаラム精製 (シークエンスグレード) 以上の精製度が必要。フェノール・クロロホルム法、PEG 沈殿法など、自作でやるのは厳禁 (精製度が悪さや PEG の混入によって BsaI や Esp3I による切断効率が非常に低下するため)。NucleoSpin Plasmid QuickPure (MACHEREY-NAGEL) 等。Module Plasmid 等の調製では、QIAGEN Plasmid Midi Kit (Qiagen) 等を使って midi prep をしても構わない。

■ 切り出しゲル精製キット

同じく特に指定はないが、スピнкаラム精製 (シークエンスグレード) 以上の精製度が良い。NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) 等。精製断片の定量が困難であるため、回収量がばらつくのを避ける意味で、本実験では使うキットを統一することを推奨する。

1.1.5 大腸菌培養関連

■ 菌株

DH5 α や XL1-Blue 等、通常のクローニング用コンピテントセルを使用すれば OK。ただし Module Plasmid (pHD1-6, pNG1-6, pNI1-6, pNN1-6) は tet 耐性プラスミドの為、tet 耐性株 (XL1-Blue 等) の使用には十分注意すること。

■ 抗生物質

アンピシリン Ampicillin (amp)

ストック: 50 mg/ml、終濃度: 50 µg/ml。通常のラボプロトコルに従えば問題なし。

テトラサイクリン Tetracycline (tet)

ストック: 5 mg/ml、終濃度: 10 µg/ml。遮光保存。通常のラボプロトコルに従えば問題なし。

スペクチノマイシン Spectinomycin (spec)

スペクチノマイシン二塩酸塩五水和物 (Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate) として、和光純薬や Sigma-Aldrich 等から購入可能。蒸留水に溶解した 10 mg/ml のストック溶液を、フィルター滅菌後分注して -20 °C で保存する。終濃度は 100 µg/ml として使用。SOC 培地等による回復培養は不要。

■ 培地

基本的にはそれぞれの抗生物質を含む LB 培地を使用する。ただし、収量の悪い Module Plasmid の精製時には、液体培地として TB 培地やプラスグロウ (ナカライテスク) の使用を推奨する。

■ Blue/White Selection

無くても作製は可能だが、一応やったほうが確実。

IPTG (isopropylthio-β-D-galactoside)

20% ストック溶液 in H₂O を作製して使用。

X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside)

20 mg/ml ストック溶液 in ジメチルホルムアミドを作製して使用。遮光保存。

1.1.6 器具・試薬その他

■ 冷却用アルミブロック

Module Assemble 時に使用すると良い。AB-24D、AB24W-02 (イナ・オプティカ) 等の、1.5 ml チューブが 6 列並ぶものが最適。

■ フリーズボックス

切り出し精製後の Module 断片のストック用。FB-72 (B) (イナ・オプティカ) 等、底が外れるタイプの物がオススメ。

1.2 Injection 用 RNA の調製

1.2.1 キット類

■ mMessage mMachine SP6 kit (Ambion/Life Technologies)

メダカ卵に導入し、発現させる為のキャップ付き RNA 合成キット (*in situ* hybridization プローブ合成用の SP6 polymerase では不可)。同等品 (キャップ付き RNA 転写キット) であれば他のものでも構わないが、本製品が最も一般的に用いられるキットである。高価なので半量にスケールダウンして使用する。

■ RNeasy mini kit (Qiagen)

キットに付属の“RNA clean-up”プロトコルを用いて、合成 RNA のスピンカラム精製を行う。RNA 精製カラムであれば、恐らく他の製品でも問題ない (使用した経験がないので不明)。なお、mMessage mMachine 付属の LiCl を用いたりチウム沈殿での精製も可能である。

1.2.2 酵素類・その他試薬

制限酵素 NotI

10% SDS

Proteinase K 溶液

3M CH₃COONa [pH 5.2]

0.5M EDTA [pH 8.0]

エタノール沈殿用共沈剤 (グリコーゲン等)

これらの試薬については、一般的な分子生物学用グレードの試薬を用いれば問題ない。

2 TALEN Assembly システムの立ち上げ

2.1 Module (HD1-6, NG1-6, NI1-6, NN1-6) の調製

1. 各 Module の入った Vector 計 24 個 (pHD1-6, pNG1-6, pNI1-6, pNN1-6) を、スピнкаラム以上のグレードで精製する。**tet 耐性なので注意**。多少増えにくい (**最低 5 µg の回収を目標に**)。吸光度測定等によって、回収した溶液の DNA 濃度を測ること。なお、アガロースゲル切り出し精製後の回収産物については定量できないので、**制限酵素処理に使う DNA 量を一定にすることで回収 DNA 量を統一**しているため、プラスミド溶液の DNA 量を測定しておく必要がある。

2. BsaI Digestion

Plasmid (5 µg)	x µl
NEBuffer #4	3 µl
10x BSA (Takara)* ³	3 µl
BsaI-HF (NEB)	0.5 µl
DW	up to 30 µl
Total	30 µl* ⁴ → 37 °C O/N

3. 30 µl 全量を電気泳動 (**2% Agarose, 100V, 20 min**) 通常の Loading Dye だと BPB と切り出しバンド (約 100 bp) がかぶって見えにくいので、**BPB が薄めの Loading dye** を作製する。液量を増やさないため、濃いめのグリセロールの添加を推奨。
4. Gel Extraction Kit で精製。**30 µl** で溶出。**Wash Buffer に含まれるエタノールのコンタミに注意** する (遠心乾燥を長めにする、カラムを 70 °C で incubation するなど)。分子量が小さく、吸光度測定や電気泳動による濃度推定が困難であるため、DNA 濃度は測定していない。濃度等がばらつくと、Assembly の成功率が低下しやすいので、基本的に同じキットを使うこと (出来ればやる人も揃っている方が良い)。
5. -20 °C に保存して、Library として使用する。この時、フリーズボックスに入れて Module 毎に別色のラベルを貼ると使いやすい (Figure 1)。**常温放置厳禁!**

2.2 Array Backbone Vector (pFUS) の調製

1. 必要な pFUS vector (我々の系では, A2A, A2B, B3, B4, B5 のみで良い) を、スピнкаラム以上のグレードで精製する。**spec 耐性**。吸光度測定等によって、回収した溶液の DNA 濃度を測ること。

2. BsaI Digestion

Plasmid (5 µg)	x µl
NEBuffer #4	5 µl
10x BSA (Takara)* ²	5 µl
BsaI-HF (NEB)	0.5 µl
DW	up to 50 µl
Total	50 µl → 37 °C O/N

*³ NEB 添付の物は 100x になっており使いにくいので、10x になっている Takara の物を使用する。

*⁴ 同時泳動可能数を増やすために 30 µl 系で行っているが、泳動に手間をかければ、50 µl 以上の系でも問題はない。



Figure 1 Module ストック: 6列のプラスチックフリーズボックス (底が外れるタイプ) に、色分けしたラベルを貼って並べると使用しやすい。コンタミ等のミスを減らすことができる。

- EtOH 沈殿による Buffer 交換後、**BAP 処理** を行う。脱リン酸化によって青コロニーが減少し、Assembly 成功率が格段に向上する。

EtOH ppt. in DW	44.5 μ l
10x Alkaline Phosphatase Buffer (Takara)	5 μ l
Alkaline Phosphatase (<i>E. coli</i> C75) (Takara)	0.5 μ l
<hr/> Total	50 μ l → 37 °C 30 min

- 50 μ l 全量を電気泳動 (1% Agarose で良い)。2.5kb 位のバンドを切り出す。
- Gel Extraction Kit で精製。**30 μ l** で溶出。**Wash Buffer に含まれるエタノールのコンタミに注意** する。DNA 濃度は測定していない。
- 20 °C に保存して、Library として使用する。この時、フリーズボックスに入れて Module とは別色のラベルを貼ると使いやすい (Figure 1)。**常温放置厳禁!**

2.3 Last Repeat Module (pLR) の調製

- 計 4 個の pLR vector (HD, NG, NI, NN) を、スピнкаラム以上のグレードで精製する。**spec 耐性**。吸光度測定等によって、回収した溶液の DNA 濃度を測ること。

2. Esp3I Digestion

Plasmid (3 µg)	x µl
10x Tango Buffer (Fermentas)	2 µl
20 mM DTT	1 µl
Esp3I (Fermentas)	0.5 µl
DW	up to 20 µl
<hr/>	
Total	20 µl → 37 °C 1 時間 *5

- 20 µl 全量を電気泳動 (**2% Agarose, 100V, 20 min**) 通常の Loading Dye だと BPB と切り出しバンド (約 100 bp) がかぶって見えにくいので、**BPB が薄めの Loading dye** を作製する。液量を増やさないため、濃いめのグリセロールの添加を推奨。
- Gel Extraction Kit で精製。15 µl で溶出。**Wash Buffer に含まれるエタノールのコンタミに注意** する。分子量が小さく、吸光度測定や電気泳動による濃度推定が困難であるため、DNA 濃度は測定していない。
- 20 °C に保存して、Library として使用する。**常温放置厳禁!**

2.4 Expression Backbone Vector (pCS2TAL3DD/RR) の調製

- pCS2TAL3DD 及び pCS2TAL3RR を、スピнкаラム以上のグレードで精製する。**amp 耐性**。吸光度測定等によって、回収した溶液の DNA 濃度を測ること。
- Esp3I Digestion

Plasmid (3 µg)	x µl
10x Tango Buffer (Fermentas)	2 µl
20 mM DTT	1 µl
Esp3I (Fermentas)	0.5 µl
DW	up to 20 µl
<hr/>	
Total	20 µl → 37 °C 1 時間 *5
- EtOH 沈殿による Buffer 交換後、**BAP 処理** を行う。脱リン酸化によって青コロニーが減少し、Assembly 成功率が格段に向上する。

EtOH ppt. in DW	44.5 µl
10x Alkaline Phosphatase Buffer (Takara)	5 µl
Alkaline Phosphatase (<i>E. coli</i> C75) (Takara)	0.5 µl
<hr/>	
Total	50 µl → 37 °C 30 min
- 50 µl 全量を電気泳動 (1% Agarose で良い)。5kb 位のバンドを切り出す。
- Gel Extraction Kit で精製。15 µl で溶出。**Wash Buffer に含まれるエタノールのコンタミに注意** する。DNA 濃度は測定していない。
- 20 °C に保存して、Library として使用する。**常温放置厳禁!**

*5 Esp3I は長時間反応させると、Ligation 成功率が落ちることがあるので、反応は 1 時間程度に抑える。その分大量の DNA を切断するのを避ける。

TALEN Construction Kit

Modules [Tetracycline]

Cermak *et al. Nucleic Acid Res.* (2011)

	1	2	3	4	5	6	
pHD	HD1	HD2	HD3	HD4	HD5	HD6	C
pNG	NG1	NG2	NG3	NG4	NG5	NG6	T
pNI	NI1	NI2	NI3	NI4	NI5	NI6	A
pNN	NN1	NN2	NN3	NN4	NN5	NN6	G

Array Backbone (A) [Spectinomycin]

Sakuma *et al. Genes Cells* (2013)

Repeats	A	B	C	D
8-13	pFUS A1A			
14-19	pFUS A2A	pFUS A2B		
20-25	pFUS A3A	pFUS A3B	pFUS A2B	
26-31	pFUS A4A	pFUS A4B	pFUS A3B	pFUS A2B

Array Backbone (B) [Spectinomycin]

Cermak *et al. Nucleic Acid Res.* (2011)

	1	2	3	4	5	6
B	pFUS B1	pFUS B2	pFUS B3	pFUS B4	pFUS B5	pFUS B6

Last Repeat [Spectinomycin]

Cermak *et al. Nucleic Acid Res.* (2011)

	HD	NG	NI	NN
pLR	pLR- HD	pLR- NG	pLR-NI	pLR- NN

Expression Backbone [Ampicillin]

Dahlem *et al. PLoS Genet.* (2012)

	DD	RR
pCS- TAL3	pCSTAL 3DD	pCSTAL 3RR

Figure 2 本 TALEN 作製システムで調製が必要なベクターの一覧

3 TALEN Assembly システムによる TALEN の設計・構築

3.1 概要

本プロトコルでは、前述したシステムの立ち上げが完了している場合、最短 6 日間で TALEN の設計から発現 RNA の合成までを終えることが出来る (Figure 3)。実質的には、Assembly 後の産物をシーケンス解析に供するため、3 日間 (1st Assembly) + 3 日間 (2nd Assembly) + 2 日間 (発現 RNA の *in vitro* transcription) のセットとなる場合が多い。

本プロトコルでは、one-tube 反応型の Golden Gate Assembly を採用せず、切り出した DNA 断片をベースに作業を行うため、通常のサブクローニング操作とほぼ同様の操作で TALEN Assembly が可能となっている。

3.2 TALEN のデザイン

1. 標的とする遺伝子のゲノム配列 (エクソン・イントロン) を用意し、ドメイン構造等から目的に応じて標的エクソンを考える。d-rR 系統や Cab 系統では、多くの場合エクソン配列上に SNP は無いことが多い。ただし別の系統 (北日本集団等) や標的配列に非コード領域を含む場合は、あらかじめ候補配列周辺の多型解析を行っておく必要がある。
2. TALE-NT (<https://tale-nt.cac.cornell.edu/>) にアクセス。「TALEN Targeter」をクリック。本プロトコルでは、他のツールは使用しない。^{*6}
3. 標的遺伝子のゲノム配列 (配列にもよるが、100-300 bp 前後を入れれば十分) を入力し、各種パラメータを設定した後、候補配列の検索を行う。詳しくは Figure 4 を参照。
4. しばらく待つと候補配列一覧が表示される (Figure 5)。目視で確認してもよいし、タブ区切りテキスト

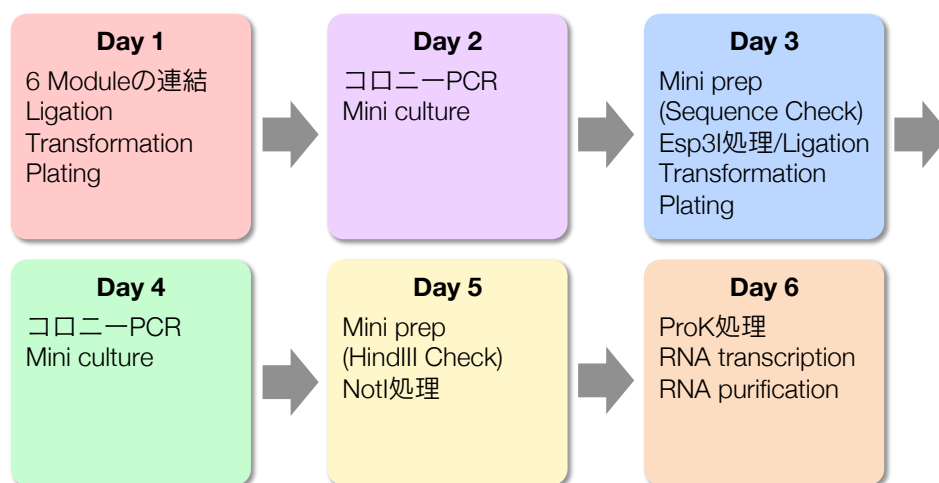


Figure 3 TALEN Assembly システムの概要図 (最短で作製した場合)

^{*6} “TALEN Targeter (old version with design guidelines)” では、Cermak らの論文 [11] で提唱された 5 つのガイドラインを守った TALEN の設計が可能である。我々の経験上、活性のある TALEN 構築のためにガイドラインの全てを満たす必要はないので、このモードも使用する意味はない。

Submit TALEN Targeter | TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0

Cornell University
TAL Effector Nucleotide Targeter 2.0

Tools About TALE-NT Resources Software FAQs Tutorials Contact Us

Submit TALEN Targeter

Test the tool using sample data

① 標的遺伝子のゲノム配列を入力

注: 必ずFASTA形式で入れること
例 >配列の名前 (改行)
ATGC....

```

Sequence
>DJ-1_exon2
TCATTCCCTTTCAAATAAGAGTGTCACTGCATTTCTCTGTTGTTGGTAGATCGCTGTGACTGTAGCGGGTCTGACCGGAAAGAGCCCGTCCAG
TGCAGCAGAAACGTGGTCATCTGTCCGATACTAGCTTGGAAGAGGCCAGCAAACAGgtgagtctcttgcattctcacatcatcaggcaaaagtgatg
gcaattgcgacg

```

Enter up to 5000 total bases. E.g., you may have 1 sequence of 5k bases, 5 sequences with 1k bases, or any such combinations. Sequences should be in FASTA format and include a header line that starts with a '>'. For larger data sets, attach a file instead of pasting text in.

Sequence File

Files must be less than 2 MB.
Allowed file types: fasta.

② “Provide Custom Spacer/RVD Length” タブをクリック
デフォルトは “Use a Present Architecture” になっている

Use a Preset Architecture Provide Custom Spacer/RVD Lengths

Spacer

Minimum Spacer Length

Maximum Spacer Length

③ Spacer Lengthを設定: 14から17 bp
Minimum Spacer Length ⇒ “14”
Maximum Spacer Length ⇒ “17”

Repeat Array

Minimum Repeat Array Length

Maximum Repeat Array Length

④ Repeat Array Lengthを設定: 16から18 bp
Minimum Repeat Array Length ⇒ “16”
Maximum Repeat Array Length ⇒ “18”

G Substitute * ⑤ “NN” タブを選ぶ デフォルトは “NH” になっているが、本プロトコルでは “NN” のみを使用
New data show that NH binds G more specifically than NN (which the tool used previously). See [Cong et al. \(2012\)](#) and [Streubel et al. \(2012\)](#).

Filter Options * 触らない

Streubel et al. guidelines * 触らない
Require at least 1/4 of bases in each TALE to be C+G and disallow runs of 6 or more A+T in each TALE, as suggested by [Streubel et al. \(2012\)](#).

Off-Target Sequence 触らない メダカのoff-target siteは検索できないので
Genome / promoterome to count off-target sites for.

Upstream Base * 触らない 標的配列のすぐ5'側の “T” は、設計に必須である
Select the base that should precede target sites on the 5' end.

Email

You can, but are not required to, enter an email address here to notify once your results are ready.

Expires *

How long your results will be available for downloading from the server. After this time, your results will be permanently deleted.

⑥ 全ての入力後に “Submit”

Figure 4 TALEN Targeter への入力例

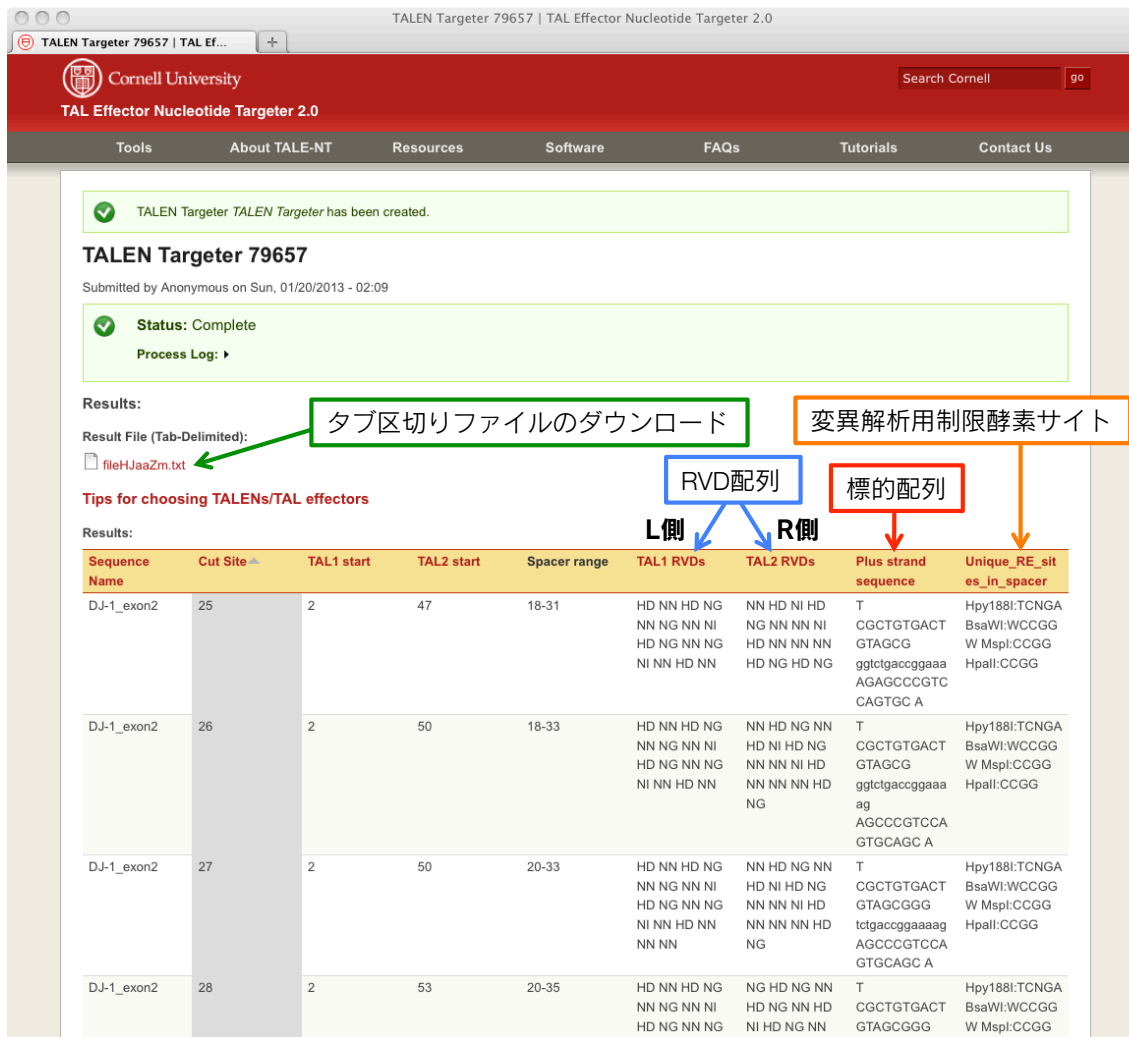


Figure 5 TALEN Targeter による出力結果の例

ファイルとしてダウンロードした後、Excel 等に読み込んでも良い。この時、付属の Excel ファイル「TALEN 設計候補一覧.xlsx」のようなファイルを作って管理すると後で確認しやすいので便利。(表示数が多すぎる／少なすぎる場合には、結果に応じて入力配列鎖長を増減させると良い。)

- 得られた候補一覧の中から、実際に設計する場所を決定する。この時、以下の3点程を基準に選択している。ただし、明確な根拠はないのであくまで参考程度に。
 - 同じ RVD が何個も連続して並ぶ箇所を避ける (特に“NN”が3個以上続くものを避ける)。
 - Spacer 配列内に“良く切れそう”な制限酵素サイトがあること (変異解析用)。
 - Affinity が高いとされる“HD”リピートが全体に散らばるように。
- 選定した標的配列から必要な Module 及び Repeat Array を決める。この時付属の Excel ファイル「TALEN Assembly Sheet.xlsx」を使い、所定の位置に自分で設計した配列を入れると、自動的に必要な Module 及び、1st Assembly で出来る Repeat Array の配列を求める事が出来る (例は Figure 6)。ただし、このファイルは RVD Length が“14”から“19”のものにしか対応していないので注意。

DJ1-TALENs

Site No. 1

CTGTCCCGATACTAGCTTggaagaggccagcaaACAGGTGAGTCTCTGC

Left 18 bp
CTGTCCCGATACTAGCTT

	1	2	3	4	5	6	
pFUS_A2A	HD	NG	NN	NG	HD	HD	CTGTCC
pFUS_A2B	HD	NN	NI	NG	NI	HD	CGATAC
pFUS_B5	NG	NI	NN	HD	NG		TAGCT
pLR	NG						T

Right 16 bp
GCAGAGACTCACCTGT

	1	2	3	4	5	6	
pFUS_A2A	NN	HD	NI	NN	NI	NN	GCAGAG
pFUS_A2B	NI	HD	NG	HD	NI	HD	ACTCAC
pFUS_B3	HD	NG	NN				CTG
pLR	NG						T

Figure 6 「TALEN Assembly Sheet.xlsx」を使用して求めた必要 Module 及び Repeat Array の例

3.3 TALEN 発現ベクターの構築

3.3.1 1st Assembly (6 modules array の構築)

■ Day1: Module Assembly

1. -20 °Cで保存されている、Module 及び Backbone Vector のストックを溶かす。on ice または 4 °Cの冷蔵庫に 1 時間程置いておく。常温放置厳禁!
2. 以下の分量で Ligation Solution を調製する。Module は順番や RVD を間違いやすいので、必要な 6 個のモジュールをアルミブロック上で順番通りに並べると良い。設計シートと何度も見比べてチェック!

pFUS_A2A, A2B の場合 (6 modules)

pFUS vector	0.5 µl ^{*7}
Modules	0.5 µl x6
Ligation High Ver.2 (TOYOBO)	3.5 µl
<hr/>	
Total	7 µl

pFUS_B3, B4, B5 の場合 (3-5 modules)

pFUS vector	0.5 µl ^{*7}
Modules	0.5 µl xn
DW	0.5 µl x(6-n)
Ligation High Ver.2 (TOYOBO)	3.5 µl
<hr/>	
Total	7 µl

3. 16 °Cで 30 分間、Ligation 反応を行う^{*8}。
4. Ligation 反応中に、以下の組成の IPTG+X-gal^{*9}溶液を作製し、LB+spec プレート培地に 1 枚あたり 50 µl を塗布する (慣れで amp プレート等を使用してしまう場合があるので注意!)。塗布後のプレートはクリーンベンチ内でよく乾燥させる。

20% IPTG	25 µl
20 mg/ml X-gal	25 µl
<hr/>	
Total	50 µl
5. Ligation 反応液を用いて、定法に従い heat shock により形質転換を行う。我々の方法では、1 µl の Ligation 反応液を、8 µl の Competent Quick DH5α (TOYOBO) に加え、5 分間氷上に静置した後、42 °Cのお湯で 45 秒間ヒートショックを与える。
6. ヒートショック後の菌液を、LB+spec+IPTG/X-gal プレートに播く。この時 Figure 7 のように 1 枚あたり 1 セット (3 array) を播くと、プレートの節約になる。
7. 37 °Cで一晩培養する。amp 耐性菌の場合と同じく、14 から 16 時間で十分。

■ Day2: Colony PCR/Mini Culture

1. プレートの回収。全く生えていない場合、極端にコロニーが少ない場合等は、Assembly が上手くいっていないケースがほとんどなので、始めからやり直す。

^{*7} Backbone Vector を入れ忘れやすいので最初に入れること!

^{*8} Ligation 反応後に実験を中断し、-20 °Cで保存しても構わない

^{*9} 大腸菌株が XL1-Blue 等 *lac I^q* 株の場合は IPTG 添加が必須であるが、DH5α 等の場合は添加は必須ではない。



Figure 7 プレートへの播き方の例: よく乾燥させたプレートに、スプレッターの端を使って区切った区画中で塗り拡げる。数個 pick up 出来れば十分。

2. PCR 反応液の調製 (1st Assembly では、PCR 反応液に菌体を直接溶いても問題ない *10)

10x Reaction Buffer	1 μ l
100 mM dNTP mix	0.8 μ l
50 mM MgCl ₂	0.3 μ l
Primer pCR8_F1 (2 μ M)	1 μ l
Primer pCR8_R1 (2 μ M)	1 μ l
HybriPol DNA Polymerase (Bioline)	0.05 μ l
DW	5.85 μ l
Total	10 μl

3. 白コロニーを拾い、マスタープレート (**LB+spec**) に移した後、分注した PCR 反応液に直接溶く *10。ただし菌体が多すぎると伸びないことがあるので注意。各 Array につき 2 から 4 クローン拾えばほぼ確実に当たりが取れる。
4. PCR 反応を行う。95 °C 2 min、95 °C 20 sec → 55 °C 30 sec → 72 °C 30 sec × 30 サイクル
5. マスタープレートは 37 °C でコロニーが大きくなるまで培養。
6. PCR 反応後のサンプルを 2% アガロースを用いた電気泳動に供し、正しく増幅されたクローンを同定する。この時、期待される増幅産物の鎖長を Table 1 に示す。泳動像は Figure 8 のようになる。
7. 正しく増幅されたクローンをマスタープレートから拾い、**spec+** の液体培地で一晩培養する (2 mL 程度の mini scale で良い)。

*10 Day5 で述べる「滅菌蒸留水に菌体を溶く方法」で行っても問題はない。ただし、Day2 の PCR は増幅産物が短いため失敗が少ないことから、「PCR 反応液に直接菌体を溶く方法」でも問題なく増幅が可能である。分注の手間を減らせることから、本セクション (Day2) では直接溶く手法をおすすめしている。

Table 1 pCR8.F1 と pCR8.R1 による 1st Assembly コロニー PCR 結果

Vector	Repeat Number	Amplicon size (bp)
pFUS_A2A	6 repeats	845
pFUS_A2B	6 repeats	833
pFUS_B3	3 repeats	557
pFUS_B4	4 repeats	659
pFUS_B5	5 repeats	761

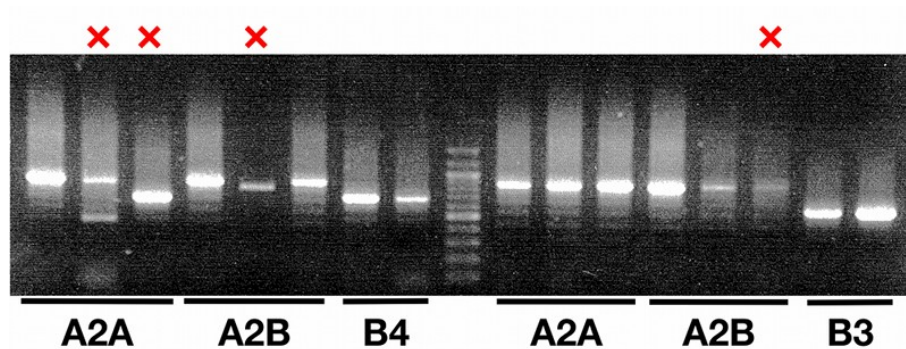


Figure 8 1st Assembly コロニー PCR 産物の電気泳動像。各バンド上部の赤色の×は、正しく連結されていないクローンを示す。リピート配列のため、高分子量側にスメアバンドが、低分子量側に 100 bp 間隔のラダーバンドが見えることがある。

Table 2 1st Assembly 産物の XbaI/XhoI 処理によって生じる断片の鎖長

Vector	Repeat Number	Fragment size (bp)
pFUS_A2A	6 repeats	1938/1153
pFUS_A2B	6 repeats	1926/1153
pFUS_B3	3 repeats	1650/1153
pFUS_B4	4 repeats	1752/1153
pFUS_B5	5 repeats	1854/1153

■ Day3: Mini Prep/Construct Check

1. 培養した菌液から大腸菌を回収し、プラスミド精製キットを使って Array Vector を回収する。回収後の各溶液について、吸光度測定等で DNA 濃度を決定しておく。なお、このまま以下の手順を省略し Day4 に進むことで、最短手順での構築 (Figure 3) となる。
2. XbaI/XhoI の Double Digest によって、正しい産物が得られているか確認する。この時、消化によって生じる断片の長さを Table 2 に、泳動像の例を Figure 9 に示す。
3. プライマー pCR8.R1 によるシーケンス解析を行う。この時内部のリピート構造の為、シーケンサーの種類等によっては上手く読めないことがある (ABI の物であれば概ね大丈夫)。もし自前でうまくいか

XbaI/XhoI Digest

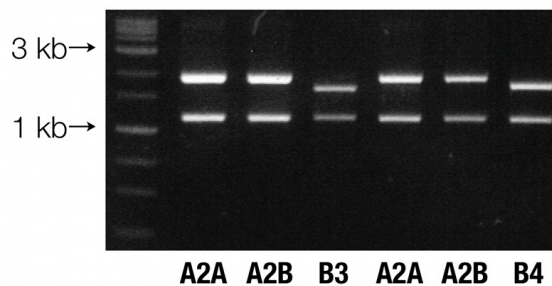


Figure 9 1st Assembly 産物の XbaI/XhoI 処理後の電気泳動像。

ない際は、外注すれば確実に読める。

4. シークエンス結果の確認を行う。アミノ酸翻訳を行って RVD 部分の配列を確認するのが良い^{*11}。

3.3.2 2nd Assembly (発現ベクターの構築)

■ Day4: Module Array Assembly

1. Esp3I 処理

Plasmid (1 µg)	x µl
10x Tango Buffer (Fermentas)	2 µl
20 mM DTT (Invitrogen)	1 µl
Esp3I (NEB)	0.5 µl
DW	up to 20 µl
Total	20 µl → 37 °C 1 時間 (1% アガロースを作製)

2. 1% アガロースを用いた電気泳動を行い、300-600 bp の断片を切り出す。特に写真を残しておく必要はない。
3. Gel Extraction Kit で精製。この時、L 側 R 側の産物それぞれ 3 種類ずつを、1 つのカラムでまとめて精製する (カラムの節約)。NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (MACHEREY-NAGEL) の場合、溶出量は 15 µl とする。
4. 以下の分量で Ligation Solution を調製。Backbone Vector は L 側を DD、R 側を RR にすると間違わない (好みの問題だが)。

pCS2TAL3DD or pCS2TAL3RR ^{*12}	0.5 µl
Last Repeat (Esp3I 処理済)	0.5 µl
Module Array Mix (Esp3I 処理済) ^{*13}	1 µl
Ligation High Ver.2 (TOYOBO)	2.5 µl
Total	5 µl

^{*11} 正しい配列を *in silico* で組み上げてから、シーケンスによって得られた配列を配列解析ソフトウェアのアラインメント機能によって並べて確認すると、よく似たモジュールのリピート構造のために正しい配列であってもうまく並ばない事がある。

^{*12} Backbone Vector を入れ忘れやすいので最初に入れること！

^{*13} 先程アガロースゲル切り出し精製をして得られたもの。

- 16 °Cで 30 分間、Ligation 反応を行う*14。
- Ligation 反応中に、以下の組成の IPTG+X-gal 溶液を作製し、**LB+amp** プレート培地に 1 枚あたり 50 μ l を塗布する。塗布後のプレートはクリーンベンチ内でよく乾燥させる。

20% IPTG	25 μ l
20 mg/ml X-gal	25 μ l
Total	50 μ l
- Ligation 反応液を用いて、heat shock により形質転換を行う。我々の方法では、1 μ l の Ligation 反応液を、8 μ l の Competent Quick DH5 α (TOYOBO) に加え、5 分間氷上に静置した後、42 °Cのお湯で 45 秒間ヒートショックを与える。
- ヒートショック後の菌液を、**LB+amp+IPTG/X-gal** プレートに播く。
- 37 °Cで一晩培養する。14 から 16 時間で十分。

■ Day5: Colony PCR/Mini Culture

- プレートの回収。全く生えていない場合、極端にコロニーが少ない場合等は、Assembly が上手くいっていないケースがほとんどなので、2nd Assembly からやり直す。
- 白コロニーを拾い、マスタープレート (**LB+amp**) に移した後、50 μ l ずつ分注した滅菌蒸留水に溶く。2nd Assembly では増幅産物が長い場合、Day2 で述べたように PCR 反応液に菌体を直接溶いた場合、増幅に失敗する事が多い。そのため、一旦 水に菌体を溶いた菌液 (E. coli solution) を調製し、その液をプレートに PCR を行う必要がある。各 Vector につき 2 から 4 クローン拾えばほぼ確実に当たりが取れる。
- PCR 反応液を調製する。

<i>E. coli</i> solution	1 μ l
10x Reaction Buffer	1 μ l
100 mM dNTP mix	0.8 μ l
50 mM MgCl ₂	0.3 μ l
Primer TAL_F1 (2 μ M)	1 μ l
Primer TAL_R2 (2 μ M)	1 μ l
HybriPol DNA Polymerase (Bioline)	0.05 μ l
DW	4.85 μ l
Total	10 μ l
- PCR 反応を行う。95 °C 2 min、95 °C 20 sec \rightarrow 63 °C 30 sec*15 \rightarrow 72 °C 90 sec \times 30 サイクル
- マスタープレートは 37 °Cでコロニーが大きくなるまで培養。
- PCR 反応後のサンプルを 1% アガロースを用いた電気泳動に供し、正しく増幅されたクローンを同定する。この時、期待される増幅産物の鎖長を Table 3 に示す。泳動像は Figure 10 のようになる。
- 正しく増幅されたクローンをマスタープレートから拾い、**amp+** の液体培地 (2 ml 程度) で一晩 mini culture。

*14 Ligation 反応後、-20 °Cで保存しても構わない

*15 1st PCR よりもアニーリング温度が高く設定されているので注意！

Table 3 TAL.F1 と TAL.R2 による 2nd Assembly コロニー PCR 結果

Repeat Number	Amplicon size (bp)
16 repeats	1847
17 repeats	1949
18 repeats	2051

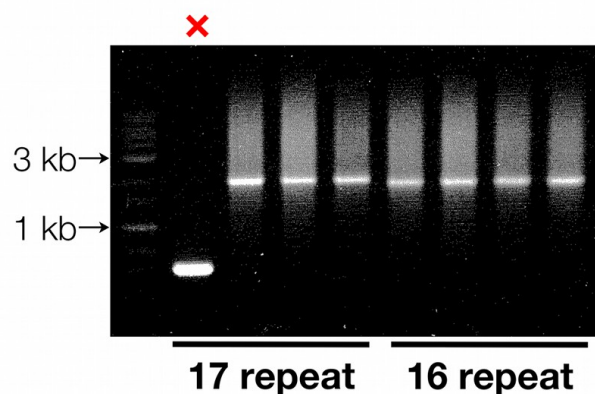


Figure 10 2nd Assembly コロニー PCR 産物の電気泳動。各バンド上部の赤色の×は、正しく連結されていないクローンを示す。リピート配列のため、高分子量側にスメアバンドが、低分子量側に 100 bp 間隔のラダーバンドが見られることが多い。

Table 4 TALEN 発現ベクターの HindIII 消化によって生じる断片の鎖長

Repeat Number	Fragment size (bp)	
	DD (Left)	RR (Right)
16 repeats	4347/2611	4347/2641
17 repeats	4347/2713	4347/2743
18 repeats	4347/2815	4347/2845

■ Day6: Mini Prep/Construct Check

1. 培養した菌液から大腸菌を回収し、プラスミド精製キットを使って Expression Vector を回収する。回収後の各溶液について、吸光度測定等で DNA 濃度を測定しておく。
2. HindIII Digest によって、正しい産物が得られているか確認する。この時、消化によって生じる断片の長さを Table 4 に示す。
3. 発現ベクターの完成。シーケンス解析は行っていない。RNA 合成へ。

3.4 メダカ導入用 RNA の合成

3.4.1 RNA の *in vitro* 合成

■ Template の調製

1. NotI 処理による TALEN 発現ベクターの線状化を行う。

TALEN vector (5 or 10 µg ^{*16})	x µl
10x H buffer (Takara)	10 µl
BSA (Takara)	10 µl
Triton-X 100 (Takara)	10 µl
NotI (10 U/µl) (Takara)	1 µl
DW	up to 100 µl
<hr/>	
Total	100 µl → 37 °C O/N

2. 反応液のうち 3 µl を用いて 0.8% アガロースによる電気泳動を行い、プラスミドが完全に消化されていることを確認する。問題なく消化が完了していれば、7 kb 付近に 1 本のバンドが見られる。上手く消化出来ていない場合は、スミア状になる事が多い。
3. Proteinase K を終濃度 200 µg/ml となるように、SDS を終濃度 0.5% となるように加え、タッピングで混合した後、50 °C で 30 分間反応させる (RNase の除去)。
4. 以降、RNA レベルに操作を切り替える。フェノール・クロロホルム溶液 100 µl を加えてから Vortex でよく混合し、遠心分離 (12,000 rpm, 5 min) 後、上清を回収する。
5. クロロホルム 100 µl を加えて Vortex で混合し、遠心分離 (12,000 rpm, 5 min) 後、上清を回収する。
6. 3M CH₃COONa を 10 µl、0.5M EDTA を 5 µl、グリコーゲンを 1 µl 加え、Vortex でよく混合した後、100% エタノールを 250 µl 加える。Vortex で混合した後、遠心分離 (12,000 rpm, 10 min) を行い、沈殿を回収する。
7. 70% エタノール 300 µl を加え、Vortex でよく混合した後、遠心分離 (12,000 rpm, 10 min) を行い、沈殿を回収する。この洗浄操作を 2 回行う。
8. 回収した沈殿を軽くスピンドウンし、残存エタノールを完全に吸い取った後、風乾させる。
9. 蒸留滅菌水 (キットにも付属しているが、普段使用している物でも良い) 10 µl に溶解し、続く transcription 反応のテンプレートとする。すぐに転写しない場合は、-20 °C で保存しておく。

■ *in vitro* transcription 反応

mMessage mMachine SP6 kit (Ambion/Life Technologies) の手順・試薬を採用している。但し、反応容量、転写時間等を一部を変更している。

1. “2x NTP/ARCA”、“10x Reaction Buffer” をそれぞれ Vortex で溶かす。溶解後、“2x NTP/ARCA” は氷上に、“10x Reaction Buffer” は室温に静置する。
2. 以下の順序 (上から下) で各試薬をマイクロチューブに入れ、*in vitro* transcription 反応液を調製する。反応液量は、キット付属のプロトコルの半量としている。

^{*16} DNA の収量によって決める。多めに切ったほうが安心。

DW	2 μ l
2x NTP/ARCA	5 μ l
10x Reaction Buffer	1 μ l
Template DNA (約 1 μ g/ μ l)*17	1 μ l
Enzyme Mix	1 μ l
<hr/> Total	<hr/> 10 μ l

- 37 °Cで **3.5 時間***18 反応させる。(ブロックインキュベーターが良い)
4. キットに付属の TURBO DNase を 1 μ l 加え、タッピングで混合した後、37 °Cで 15 分間反応させる。

3.4.2 RNA 精製

■RNeasy mini kit による精製 “RNA Cleanup” プロトコルに準拠する

1. DNase 後の反応液 (11 μ l) に 89 μ l の蒸留滅菌水を加え、全量を 100 μ l とする。
2. Buffer RLT 350 μ l を加え、Vortex でよく混合する。
3. 100% エタノール 250 μ l を加え、加えたチップを使ってそのままピペッティングを行い溶液を緩やかに混合した後、溶液全量をスピнкаラムに流し入れる。
4. 遠心分離 (8,000 xg, 30 sec) を行い、溶出液を捨てる。
5. Buffer RPE 500 μ l を加え、遠心分離 (10,000 xg, 30 sec) を行った後、溶出液を捨てる。この洗浄操作を 2 回繰り返す。
6. カラムを新しい collection tube に移し、遠心乾燥 (10,000 xg, 5 min) を行う。この時、Qiagen RNeasy mini のスピнкаラムは、フィルターの「ふち」に溶液が残りやすいので、Buffer RPE の残存が無いよう、目視で確認する。(opt. エタノールの残存が気になる場合は、遠心乾燥後のスピнкаラムを 70 °Cで 数分間加熱し、エタノールを蒸発させると良い。)

Synthesized RNA with 1% Agarose in TAE

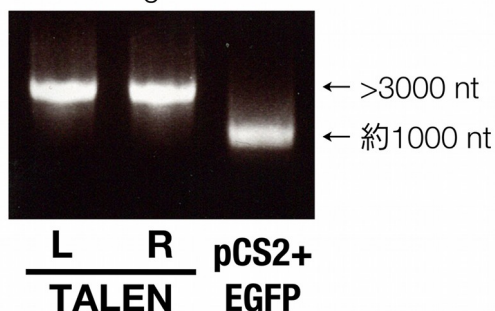


Figure 11 通常のアガロース電気泳動による RNA 産物の確認。はっきりとしたバンドがみえれば良い。変性電気泳動を行う必要はない。転写・精製が上手くいかなかった場合、プライマーダイマーのような低分子バンドのみが見られる事が多い。右のレーンはコントロールとして作製した EGFP をコードする RNA 産物である。

*17 濃度を測定しているわけではない。NotI 処理に使用した DNA 量から算出した、推定 DNA 濃度である。

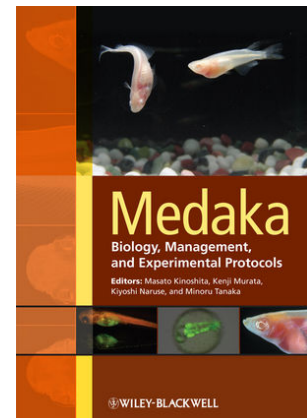
*18 この時間に根拠はないが、上手く動いているので変えていない

7. RNase-free water 30 μ l を加え、1 分程静置した後、遠心 (10,000 xg, 2 min) によって溶出させる。
8. 溶出液のうち、2 μ l は吸光度測定による RNA 濃度測定 (取量は Total で 10 μ g 弱になることが多い) に、2 μ l はアガロース電気泳動による産物の確認 (Figure 11) に回す。残りは速やかに -80 °C に入れて保存。

3.4.3 メダカへのマイクロインジェクション

それぞれ別々に転写した L 側/R 側の RNA を適当に希釈して混ぜ、インジェクション溶液を作製する。念のため RNA グレードの山本リンガー液を用意している。マイクロインジェクションそのものに関しては、メダカプロトコル集 (右図) を参照。

Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols, edited by Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M. Wiley-Blackwell, Iowa, USA. ISBN: 978-0-8138-0871-0, 2009



4 Appendix: MultiNA を用いた変異解析

4.1 Introduction

TALEN は前述した手法で容易に構築でき、かつ構築した TALEN の多くが変異導入活性を持つことから、メダカにおける変異体作出の難易度は非常に低下しているといえる。しかしながら、TALEN 導入 (G0) 世代やその F1 世代における欠失・挿入変異の同定が難航するようでは、TALEN による変異体作出は依然として労力のかかる仕事となってしまう。

本付録では、現在我々が採用しているマイクロチップ電気泳動装置 MultiNA (島津製作所) を用いた、2 つの簡便かつ迅速な変異検出手法について概説する。同時に、変異解析の際に負担となる実験手順の 1 つである、メダカ胚からのゲノム抽出方法についても 3 種類の方法を紹介する。

4.2 Material

■ MultiNA 関連

- DNA/RNA 用マイクロチップ電気泳動装置 MCE-202 MultiNA (島津製作所)
- DNA-500 キット (島津製作所)
- SYBR Gold (Invitrogen/Life Technologies)
- 25 bp DNA ladder (Invitrogen/Life Technologies)

■ 酵素類・その他試薬

- PCR 酵素: HybriPol DNA Polymerase (Bioline) 等
- 標的配列周辺を増幅するプライマー (後述)
- 各種制限酵素・バッファー
- Proteinase K (20 mg/ml)
- DNA 抽出バッファー (150 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA [pH 8.0], 10 mM Tris-HCl [pH 8.0])
- 10x ExTaq Buffer (Takara)
- アルカリ溶解バッファー (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA [pH 8.0]) [用時調製]
- 中和バッファー (40 mM Tris-HCl [pH 8.0])
- フェノール・クロロホルム溶液、エタノール、酢酸ナトリウム等、標準的な分子生物学実験試薬

4.3 Methods

■ 解析用プライマーの設計

標的配列を挟むように設計する。変異解析の方法によって増幅鎖長の長さを変えた方がよい。制限酵素切断による解析では **200-350 bp**、Heteroduplex のパターンによる解析では **80-150 bp** が良い。

自力で設計しても問題ないが、Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) 等のプライマー設計ソフトを使用したほうが楽。

■ ゲノム DNA の調製

ゲノムの品質に特にこだわりはないので、次の 3 種類の中から適当な物を選ぶ。

フェノール・クロロホルム法

最も丁寧。3 日胚 1 個体から成魚全身まで対応 (ただし ProK 処理液量を変えるべし)。変異量を定量したい時、比較的組織量が多くなる時に向いている。

1. DNA 抽出バッファー (150 mM NaCl, 0.5% SDS, 25 mM EDTA [pH 8.0], 10 mM Tris-HCl [pH 8.0]) に、1/100 量の Proteinase K (20 mg/ml) を加える。組織量に合わせた適量をサンプルに加える (胚 1 個体では 100 μ l、10 個体では 400 μ l、成魚 1 匹では 3 ml など)。
2. サンプルをペッスルや解剖バサミでホモジナイズする (特に卵膜は溶けないので、必ず潰すこと)。
3. 55 °C で 1 から 3 時間反応させる。Vortex 等で時々混和しながら反応させる。混和組織がドロドロになるまで。
4. 遠心分離 (16,000 xg, 5 min) を行い、メラニン及び残存組織を沈降させる。
5. 回収した上清に、等量のフェノール・クロロホルム溶液を加え、Vortex による混合後、遠心分離 (16,000 xg, 5 min) によって上清を回収する。
6. 等量のクロロホルムを加え、Vortex による混合後、遠心分離 (16,000 xg, 5 min) によって上清を回収する。
7. 回収した上清に、2 から 2.5 倍量の 100% エタノールを加え^{*19}、よく混合した後、遠心分離 (16,000 xg, 10 min) を行い、沈殿を回収する。得られた沈殿は、70% エタノールで 1, 2 回リンスを行う。
8. 沈殿を風乾させた後、適量の滅菌蒸留水に溶解させ、PCR テンプレートとする。1 個体の時は 50 μ l、10 個体の時は 100-400 μ l 等。

ProteinaseK 法

ペッスルを使用できるので、胚やヒレの Genotyping 向き。

1. 余っている ExTaq Buffer (Takara) を使用する。1x に希釈した後、1/100 量の Proteinase K (20 mg/ml) を加え、溶解液とする。組織量に合わせて適量加える (1 個体やヒレでは 100 μ l、10 個程度の胚では 400 μ l 等)。
2. ペッスルで組織を潰す (特に卵膜は必須)。
3. 55 °C で 1 時間反応させる。Vortex 等で時々混和しながら反応させる。
4. 95 °C で 10 分間反応させ、Proteinase K を失活させる。
5. 遠心分離 (16,000 xg, 5 min) を行い、メラニン及び残存組織を沈降させる。その上清を PCR テンプレートとする。

アルカリ溶解法

アルカリ溶液にペッスルを入れたくないので、つぶす必要のない孵化仔魚の Genotyping 向き。一番速い。

1. サンプルに用時調製したアルカリ溶解 Buffer (25 mM NaOH, 0.2 mM EDTA [pH 8.0]) を 25 μ l 加える。液量は増やしても良い。やはり卵膜は分解されないため、胚の場合はピペットの先等で卵膜を破ってお

^{*19} DNA 抽出バッファーに十分量の塩が含まれているため、新たに塩を加える必要はない。

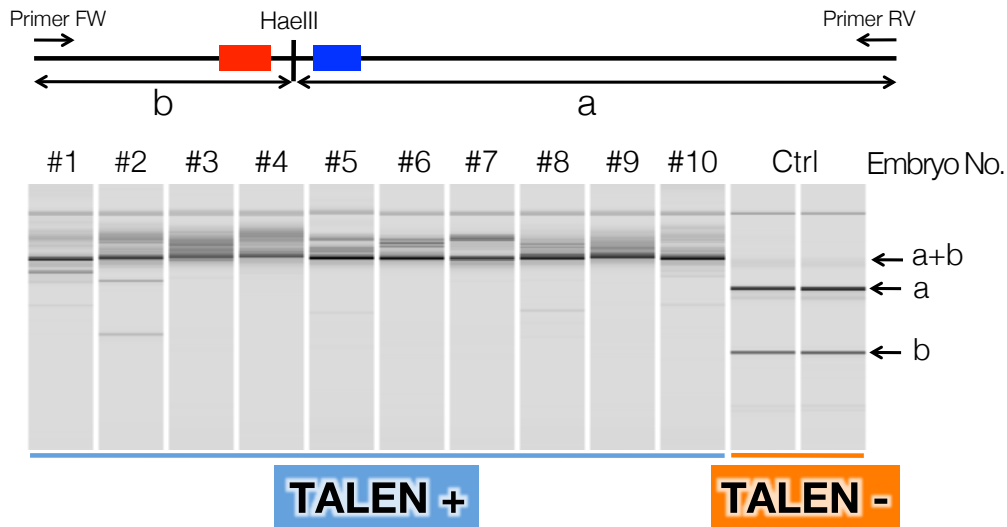


Figure 12 DJ1-TALEN 導入個体から増幅した PCR 産物を HaeIII で切断し、MultiNA によって分析した結果。TALEN 非導入のコントロール個体では、増幅された PCR 産物は、HaeIII によって a と b の 2 つに切断される。一方、TALEN 導入個体では切断によって生じる 2 つのバンドはほとんど見えなくなり、非切断バンド (a+b) が見られる。

く必要がある。

2. 95 °C で 10 分間反応させる。Vortex 等で時々混和しながら反応させる。
3. 等量の 40 mM Tris-HCl [pH 8.0] を加えて Vortex で混合し、中和する。
4. 遠心分離 (16,000 xg, 5 min) を行い、メラニン及び残存組織を沈降させる。その上清を PCR テンプレートとする。

■ 制限酵素切断による変異解析手法

TALEN 設計時に、Spacer 配列中に制限酵素サイトを置いた際、PCR 後の制限酵素切断の有無によって変異解析が可能である。CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 解析とも呼ばれる。通常のアガロース電気泳動による分析も可能だが、MultiNA を使用することで、1) 微量なバンドの検出が可能、2) バンドの定量が容易、という特長がある。

1. ゲノム DNA をテンプレートに PCR を行う。20 から 30 μ l の系で十分。非特異バンドが出ると結果が見にくくなる恐れがあるので、アニーリング温度等を検討すること。
2. エタノール沈殿によって、PCR 産物を沈殿させる。フェノール・クロロホルム処理は必要ない。
3. 風乾させた沈殿に、あらかじめ調製した制限酵素反応液 10 μ l を加える。酵素量はできるだけ過剰な量を入れたほうが良い。
4. 酵素にもよるが、切れ残りがあるとよくないので、可能な限り O/N で消化する。
5. 各酵素に合わせた熱失活処理^{*20}を行った後、MultiNA にかける。結果の例は Figure 12 に記載。

^{*20} 酵素に活性が残存している場合、MultiNA の高分子量マーカーを切断してしまい、補正がキレイに出来なくなることがあるので、失活処理を必ず行う。

gDNA pool from 5 F1 embryos

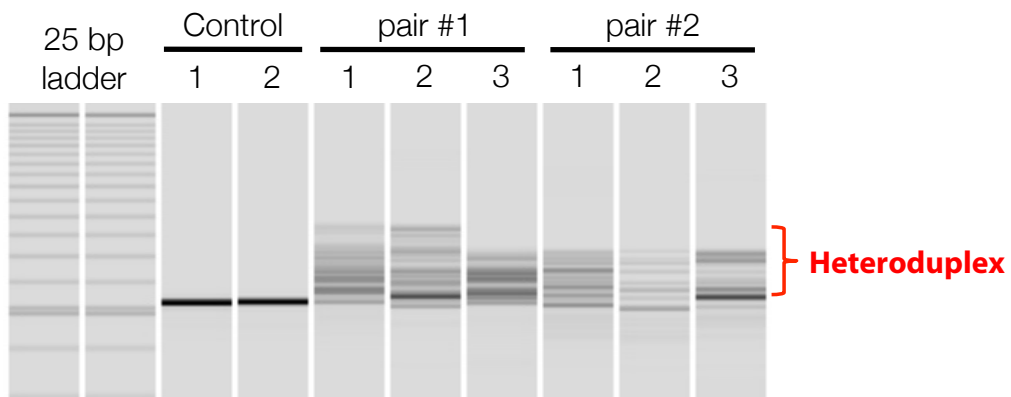


Figure 13 フェノール・クロロホルム法によって、F1 胚 5 個体から精製したゲノムをテンプレートとして増幅した PCR 産物の MultiNA 解析結果。コントロールでは 1 つのはっきりしたバンドが確認できるが、変異の導入されているサンプルでは、ヘテロ二重鎖由来と考えられる高分子量側に複数のバンドが見られる。

■ 変異によって生じる Heteroduplex を MultiNA で検出する手法

原理等、詳しくは川原グループのプロトコル・論文 [24] を参照のこと (我々の所では始めたばかりなので)。我々のグループでは PAGE の代わりに MultiNA システムを使って同様の変異検出が可能であることを示した。手順は 10 μ l 系で PCR 反応を行った後、MultiNA にかけるだけである。結果の例は Figure 13 に記載。

参考文献

- [1] Urnov, F. D, Rebar, E. J, Holmes, M. C, Zhang, H. S, & Gregory, P. D. (2010) Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* **11**, 636–46.
- [2] Kim, Y. G, Cha, J, & Chandrasegaran, S. (1996) Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 1156–60.
- [3] Bibikova, M, Golic, M, Golic, K. G, & Carroll, D. (2002) Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases. *Genetics* **161**, 1169–75.
- [4] Bibikova, M, Beumer, K, Trautman, J. K, & Carroll, D. (2003) Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases. *Science* **300**, 764.
- [5] Carroll, D. (2011) Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773–82.
- [6] Bogdanove, A. J & Voytas, D. F. (2011) TAL effectors: customizable proteins for DNA targeting. *Science* **333**, 1843–6.
- [7] Christian, M, Cermak, T, Doyle, E. L, Schmidt, C, Zhang, F, Hummel, A, Bogdanove, A. J, & Voytas, D. F. (2010) Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757–61.
- [8] Miller, J. C, Tan, S, Qiao, G, Barlow, K. A, Wang, J, Xia, D. F, Meng, X, Paschon, D. E, Leung, E, Hinkley, S. J, Dulay, G. P, Hua, K. L, Ankoudinova, I, Cost, G. J, Urnov, F. D, Zhang, H. S, Holmes, M. C, Zhang, L, Gregory, P. D, & Rebar, E. J. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* **29**, 143–8.
- [9] Boch, J, Scholze, H, Schornack, S, Landgraf, A, Hahn, S, Kay, S, Lahaye, T, Nickstadt, A, & Bonas, U. (2009) Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509–12.
- [10] Moscou, M. J & Bogdanove, A. J. (2009) A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501.
- [11] Cermak, T, Doyle, E. L, Christian, M, Wang, L, Zhang, Y, Schmidt, C, Baller, J. A, Somia, N. V, Bogdanove, A. J, & Voytas, D. F. (2011) Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for dna targeting. *Nucleic Acids Res* **39**, e82.
- [12] Reyon, D, Tsai, S. Q, Khayter, C, Foden, J. A, Sander, J. D, & Joung, J. K. (2012) FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nat Biotechnol* **30**, 460–5.
- [13] Sanjana, N. E, Cong, L, Zhou, Y, Cunniff, M. M, Feng, G, & Zhang, F. (2012) A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nat Protoc* **7**, 171–92.
- [14] Huang, P, Xiao, A, Zhou, M, Zhu, Z, Lin, S, & Zhang, B. (2011) Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 699–700.
- [15] Sander, J. D, Cade, L, Khayter, C, Reyon, D, Peterson, R. T, Joung, J. K, & Yeh, J. R. (2011) Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 697–8.
- [16] Tesson, L, Usal, C, Ménoret, S, Leung, E, Niles, B. J, Remy, S, Santiago, Y, Vincent, A. I, Meng, X, Zhang, L, Gregory, P. D, Anegon, I, & Cost, G. J. (2011) Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs. *Nat Biotechnol* **29**, 695–6.
- [17] Lei, Y, Guo, X, Liu, Y, Cao, Y, Deng, Y, Chen, X, Cheng, C. H, Dawid, I. B, Chen, Y, & Zhao, H. (2012) Efficient targeted gene disruption in *Xenopus* embryos using engineered transcription activator-like effector

- nucleases (TALENs). *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 17484–9.
- [18] Liu, J, Li, C, Yu, Z, Huang, P, Wu, H, Wei, C, Zhu, N, Shen, Y, Chen, Y, Zhang, B, Deng, W. M, & Jiao, R. (2012) Efficient and specific modifications of the *Drosophila* genome by means of an easy TALEN strategy. *J Genet Genomics* **39**, 209–15.
- [19] Ma, S, Zhang, S, Wang, F, Liu, Y, Xu, H, Liu, C, Lin, Y, Zhao, P, & Xia, Q. (2012) Highly efficient and specific genome editing in silkworm using custom TALENs. *PLoS One* **7**, e45035.
- [20] Watanabe, T, Ochiai, H, Sakuma, T, Horch, H. W, Hamaguchi, N, Nakamura, T, Bando, T, Ohuchi, H, Yamamoto, T, Noji, S, & Mito, T. (2012) Non-transgenic genome modifications in a hemimetabolous insect using zinc-finger and TAL effector nucleases. *Nat Commun* **3**, 1017.
- [21] Ansai, S, Sakuma, T, Yamamoto, T, Ariga, H, Uemura, N, Takahashi, R, & Kinoshita, M. (2013) Efficient targeted mutagenesis in medaka using custom-designed transcription activator-like effector nucleases (TALENs). *Genetics*. in press.
- [22] Sakuma, T, Hosoi, S, Woltjen, K, Suzuki, K, Kashiwagi, K, Wada, H, Ochiai, H, Miyamoto, T, Kawai, N, Sasakura, Y, Matsuura, S, Okada, Y, Kawahara, A, Hayashi, S, & Yamamoto, T. (2013) Efficient TALEN construction and evaluation methods for human cell and animal applications. *Genes Cells*. in press.
- [23] Dahlem, T. J, Hoshijima, K, Juryne, M. J, Gunther, D, Starker, C. G, Locke, A. S, Weis, A. M, Voytas, D. F, & Grunwald, D. J. (2012) Simple methods for generating and detecting locus-specific mutations induced with TALENs in the zebrafish genome. *PLoS Genet* **8**, e1002861.
- [24] Hisano, Y, Ota, S, Arakawa, S, Muraki, M, Kono, N, Oshita, K, Sakuma, T, Tomita, M, Yamamoto, T, Okada, Y, & Kawahara, A. (2013) Quantitative assay for TALEN activity at endogenous genomic loci. *Biology Open*. in press.