臺大醫學院第一共研電子報

2014年8月第16期

基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core

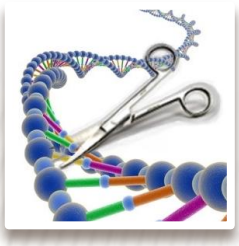
本期編輯：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室 黃呈彥

編輯委員：鄧述諄 詹迺立 吳明賢 林淑華 林泰元

本期目錄：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介

基因剔除(剔入)實驗方法介紹

靶位設計 基因轉殖 活性測試



基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介

為協助醫學校區學術研究，醫學院研究發展分處第一共同研究室在2014年4月於人類疾病模式生物中心(Human disease modeling center)底下增設基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室(Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core)，由黃呈彥博士負責相關業務，目前正在進行四間實驗室(五個基因)委託案。服務與收費方式詳見醫學院研發分處第一共研網頁:

http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/ntu2/firstcore6.asp

設置地點：醫學院基礎醫學大樓R1448, R1442 & R1439

開放時間：週一至週五 9:00~17:00

使用資格：本校各科系所實驗室或計畫及附設醫院各科部負責人為主

服務項目：基因剔除(剔入)靶位設計

載體構築

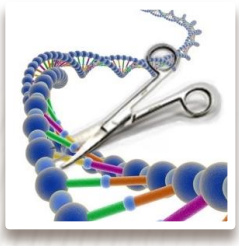
基因剔除(剔入)活性測試

基因剔除(剔入)細胞株篩選

聯絡方式：電子郵件 cyh0729@ntu.edu.tw

分機 88930或88507

(請多利用電子郵件聯絡，謝謝。)



申 請 方 式 與 服 務 流 程

於第一共研網頁下載委託調查表，
傳送電子郵件予黃呈彥博士

靶位設計後預約面談並填寫申請表

載體構築

細胞轉殖測試與基因剔除(剔入)活性測試

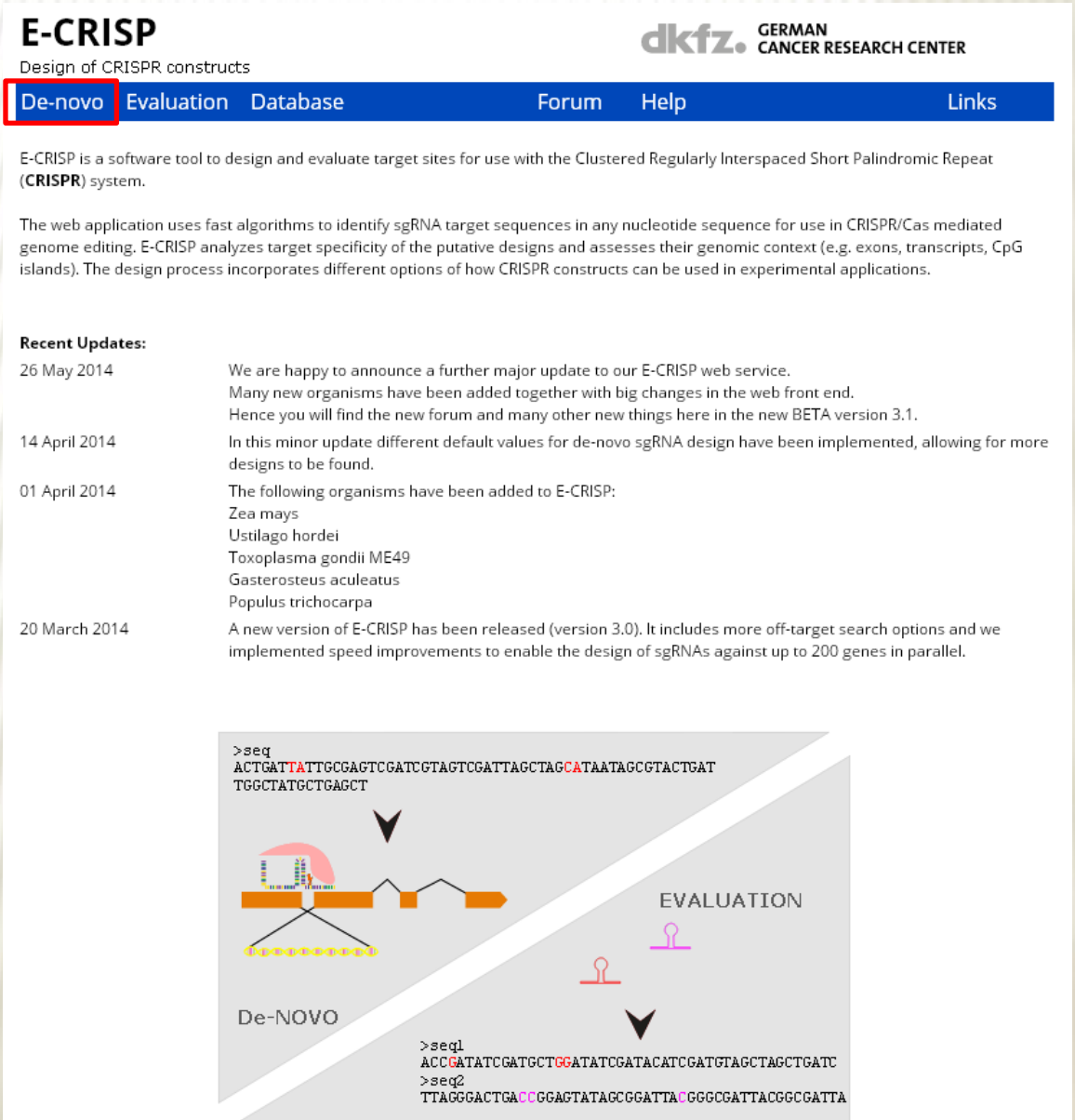
基因剔除(剔入)細胞株篩選

基因剔除(剔入)實驗方法介紹

靶位設計

利用E-TALEN(http://www.e-talen.org/E-TALEN/)或E-CRISPR (http://e-crisp-test.dkfz.de/E-CRISP/)幫助尋找合適位點，以下以E-CRISPR為例介紹:

進入網頁後按De-nove進入設計頁面



首先選擇物種，之後可於FASTA Reset空格輸入基因的ENSEMBL accession numbers或直接將序列貼入，第一行需輸入(>基因名稱)。第3步先選擇Strict設定較為嚴苛條件，之後可按第4步Search鍵開始或點選Display advenced options做進階設定。

進階設定

click here to change CRISPR properties

17-20的長度為佳

17 bp Minimum guide RNA length after PAM [HELP]

20 bp Maximum guide RNA length after PAM [HELP]

1 % < G < 80 %

1 % < A < 80 %

1 % < T < 80 %

1 % < C < 80 %

500 bp 3' flanking sequence length [HELP]

500 bp 5' flanking sequence length [HELP]

500 bp Expected flank size (for restriction site analysis)

50 bp Tagging window downstream of the codon

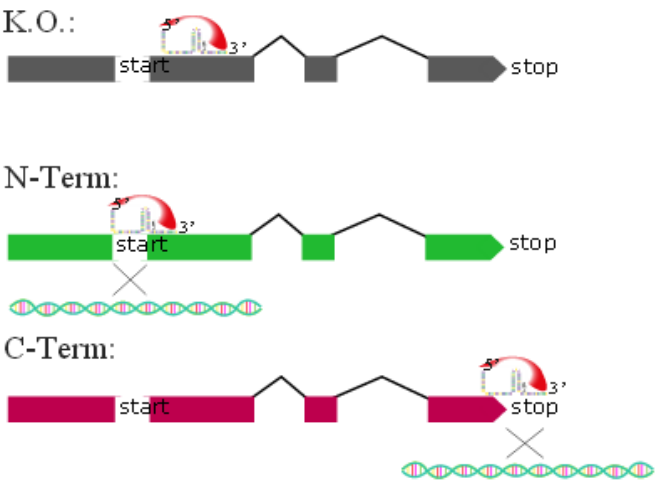
50 bp Tagging window upstream of the codon

1 Number of coding exons downstream the start codon for K.O.

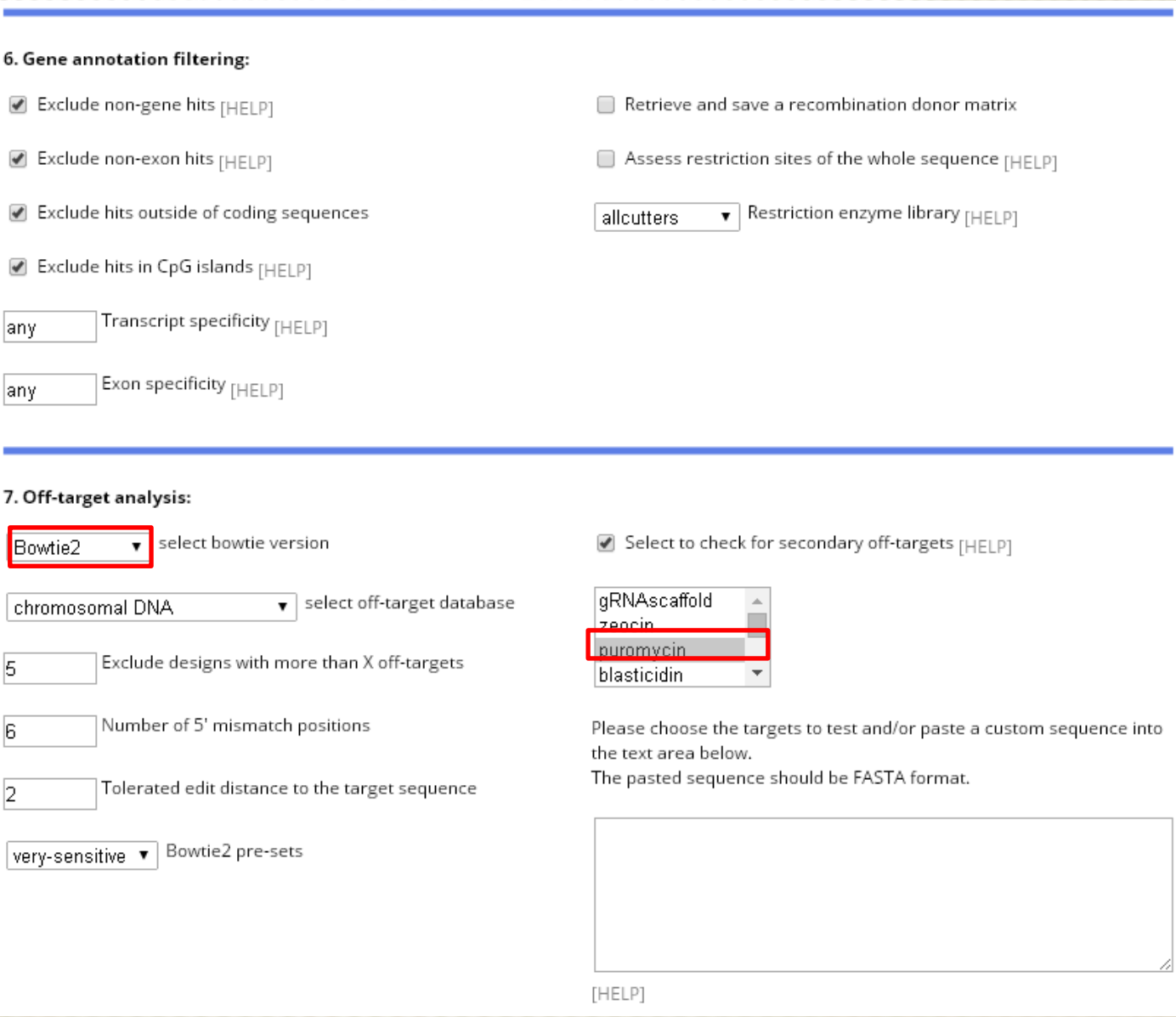
5 bp Minimal spacer length for paired designs

20 bp Maximum spacer length for paired designs

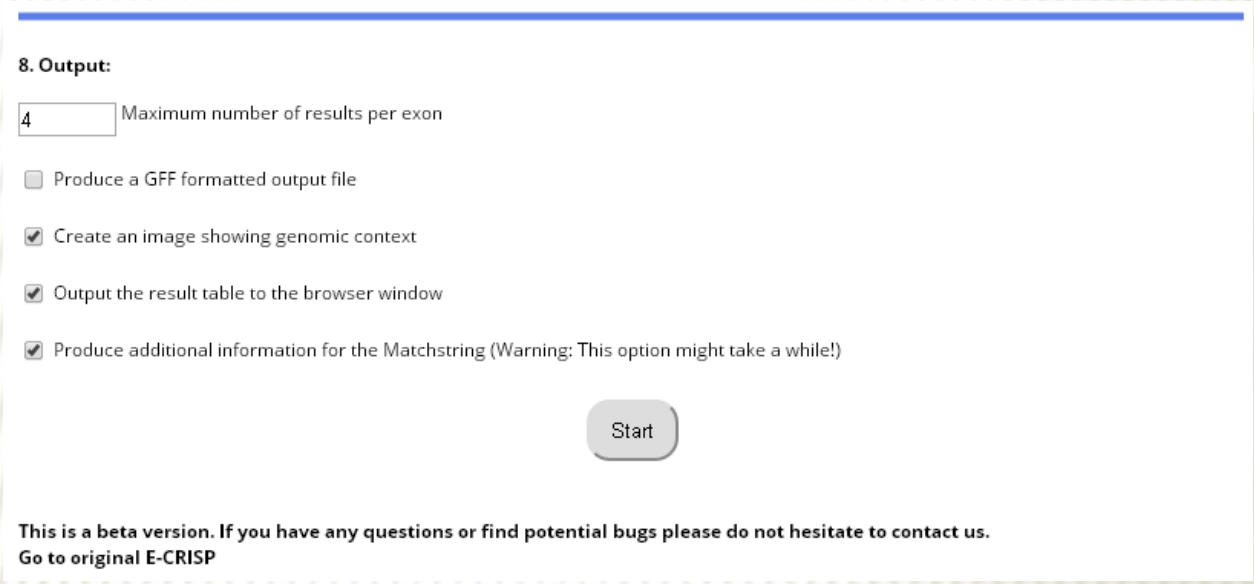
any 5' preceding Base requirement



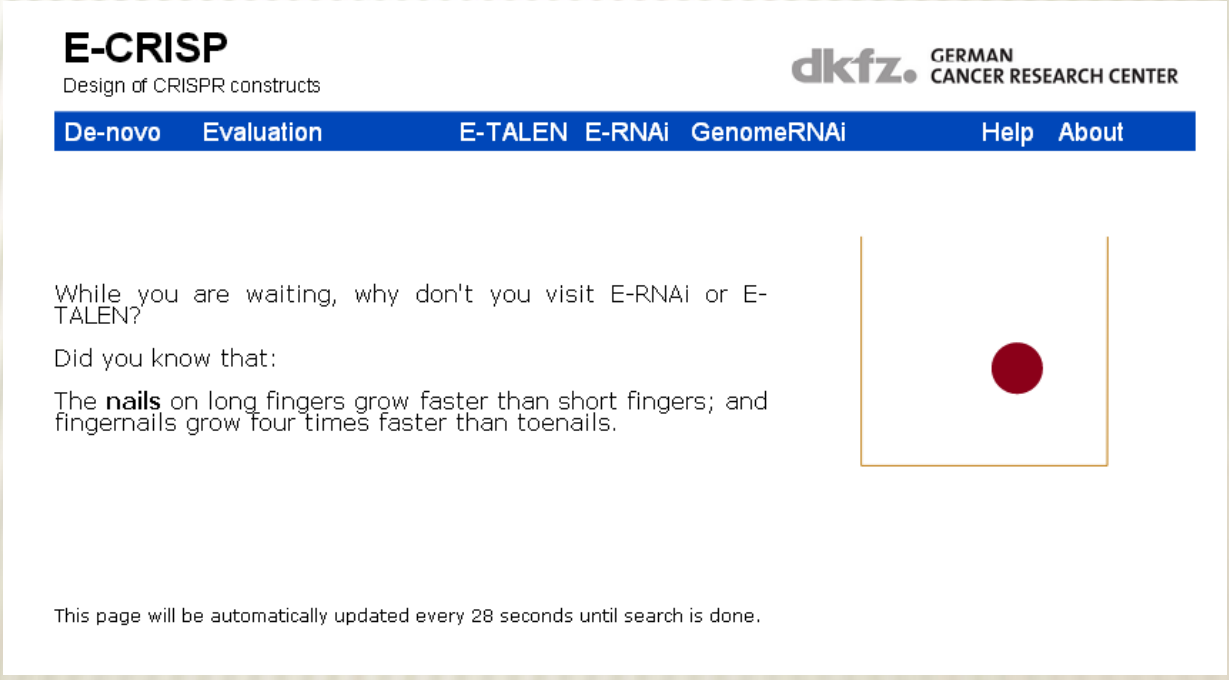
在第3步驟選擇Strict則第6步會自動全選，主要是第7步驟選擇排除off-targets條件，可選Bowtie或Bowtie2做比對，也可利用右方排除puromycin或GFP等等篩選標誌基因被剔除的機會。



全部設定完成後，按下方start鍵。



等待中.....



設計完成後，可能沒有合適靶位，此時可以回到第3步驟選擇較不嚴苛的條件(Medium或Relaxed)再試一次，有可能會出現多個off-target位點的結果。

E-CRISP

Design of CRISPR constructs

dkfz. GERMAN CANCER RESEARCH CENTER

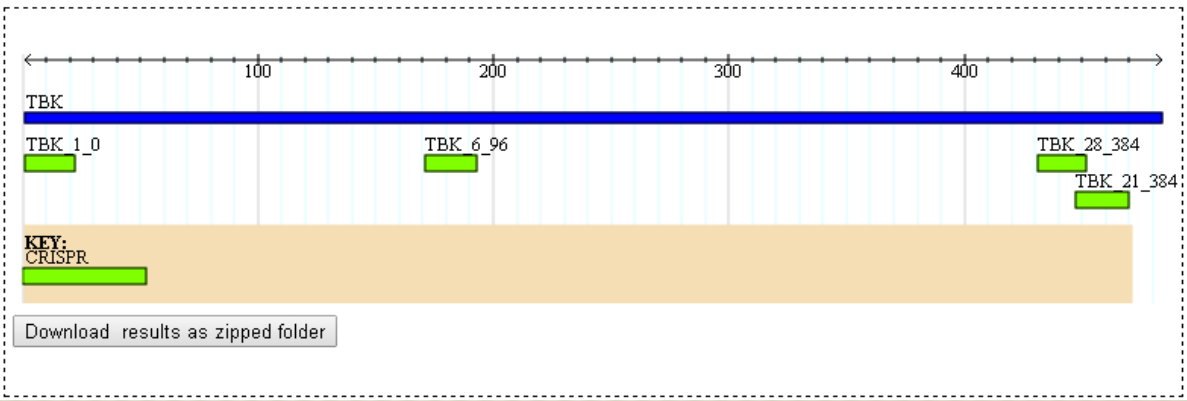
De-novo Evaluation E-TALEN E-RNAi GenomeRNAi Help About

Download a tabular report for all query sequences together

Query name: TBK Query length: 483 Query location: ::0::0

Total number of possible designs = 174
Number of successful designs = 4
Number of designs that hit a specific target = 71
Number of designs excluded because they hit multiple targets or none = 37
Number of designs excluded because their nucleotide composition was too invariable or contained TTTTT = 3
Number of designs excluded because the maximum of designs per exon was exceeded = 67

Name	Nucleotide sequence	Ranking	Target	Matchstring	Number of Hits
TBK_6_96	TTCTTCCCCCTTATCG TGAGG	109.52	ENSG00000058668::A TP2B4	Matchstring Info	1
TBK_28_384	AACTAGCACCACTAGG TAGG	100	5	Matchstring Info	2
TBK_28_384	AACTAGCACCACTAGG TAGG	100	ENSG00000145675::PI K3R1	Matchstring Info	2
TBK_21_384	AGTTTCTGAGTTTACA GAATGG	87.27	8	Matchstring Info	3
TBK_21_384	AGTTTCTGAGTTTACA GAATGG	87.27	ENSG00000175497::D PP10	Matchstring Info	3
TBK_21_384	AGTTTCTGAGTTTACA GAATGG	87.27	1	Matchstring Info	3
TBK_1_0	AAACACTATCTCCAGA	70	11	Matchstring Info	5



Download results as zipped folder

基因轉殖

靶位設計完成後，仍然需要進行人工判讀以及篩選，一般要讓基 因不表現，靶位設計越接近start codon越好，也可以設計在此基因的重要區域(domain)使其失去應有的功能。

設計完成即可進行載體構築，TALEN以及CRISPR -D10A因為是一組靶位的設計，因此需要同時構築兩個質體，而 CRISPR –Wt則只需要構築一個質體。在進行細胞轉殖時，轉入一個質體會比兩個質體共轉容易的多，若是細胞本身轉殖效率不高，共轉的成功率將極低，一般轉殖效率要大於50%為佳。除此之外，載體上若帶有篩選標誌基因，如puromycin可進行藥物篩選，或是GFP螢光蛋白可以將表現螢光的細胞分選出來，都可以提高基因轉殖成功率。

當我們進行TALEN或是CRISPR實驗時，要注意細胞轉殖成功並不代表內切酶發揮作用，由於送進去表達的TALEN或是CRISPR必須辨認並結合細胞染色體上的特定位點，不同的位點上可能存在結構或是特殊修飾而影響結合，因此在進行單株細胞篩選之前，必須先確定所送入的TALEN或是CRISPR具有活性並測試其突變效率高低，以下介紹幾種活性測試方法：

基因剔除(剔入)實驗方法介紹

活性檢測

方法一、 T7E1 or Surveyor assay

原理：T7 endonuclease 1 或 Surveyor Nuclease辨認並切割不完美黏合的DNA。

方法：

質體轉染細胞

↓

篩選、收集細胞並純化Genomic DNA

↓

PCR擴增

↓

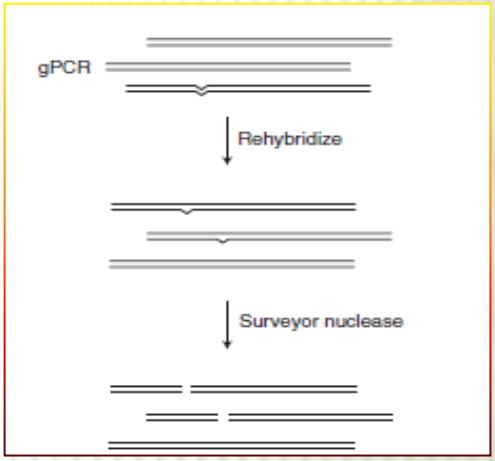
PCR產物於94℃變性之後慢慢降回室溫

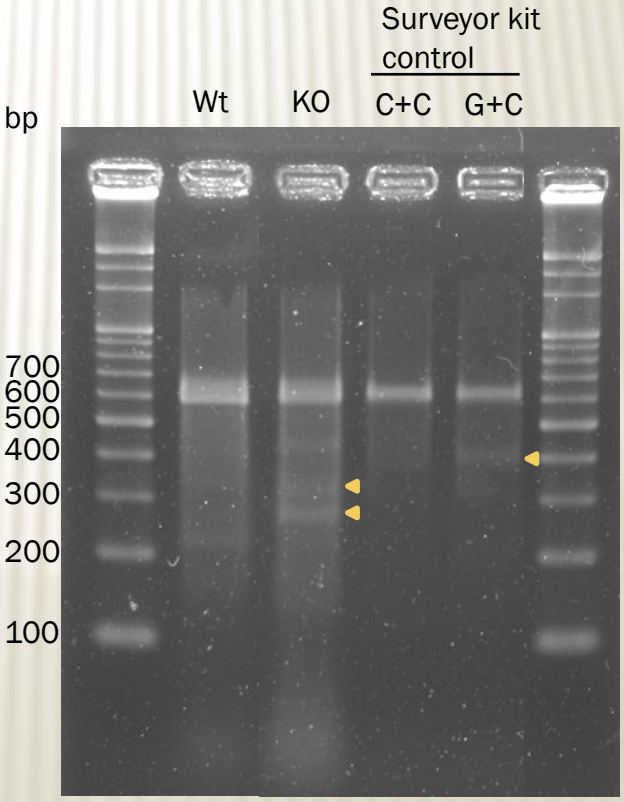
↓

酶作用

↓

瓊脂凝膠電泳檢測





方法二、 Restriction Enzyme (RE) digestion assay

原理：因TALEN或CRISPR作用後導致特定限制酶切點消失

方法：

質體轉染細胞

↓

篩選、收集細胞並純化Genomic DNA

↓

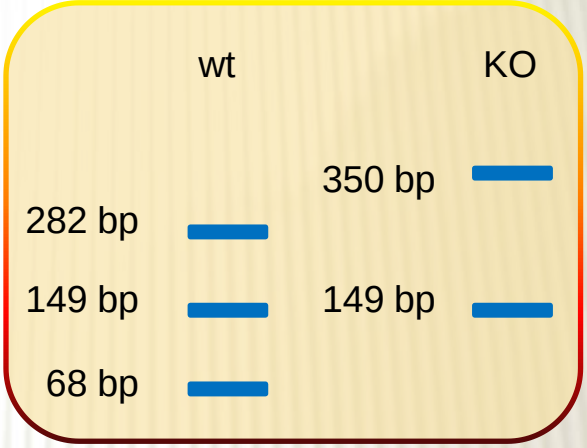
PCR擴增

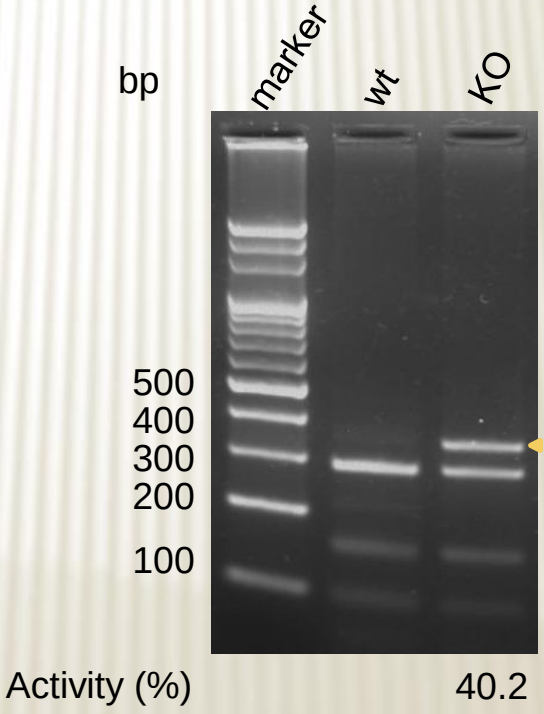
↓

限制酶剪切

↓

瓊脂凝膠電泳檢測





方法三、 qPCR Dissociation assay or HRM

原理：因TALEN或CRISPR作用後導致序列突變，而影響Tm值

方法：

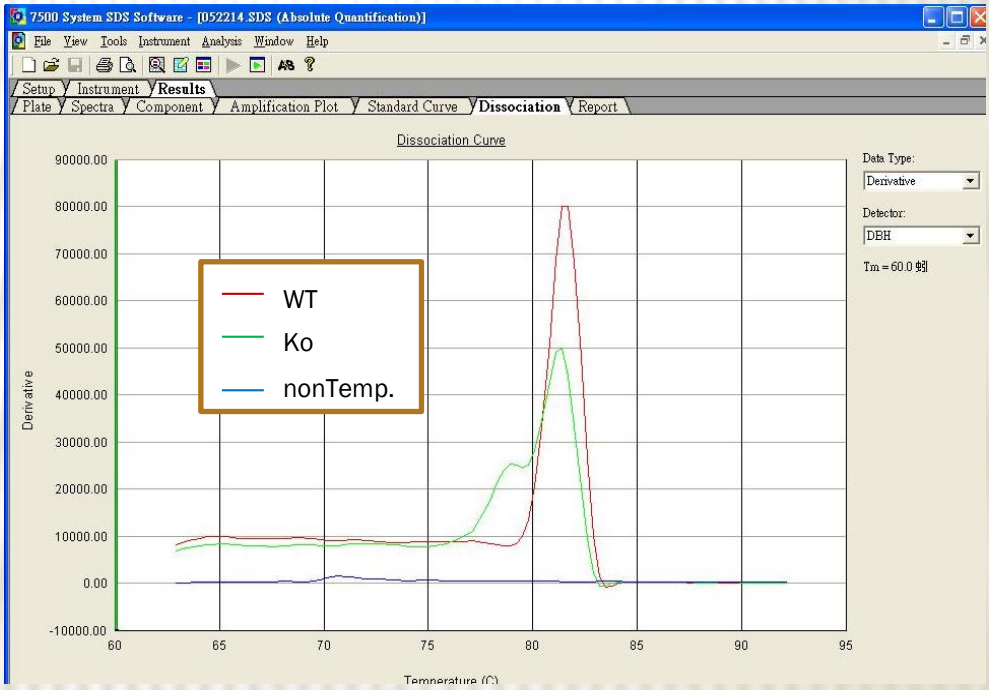
質體轉染細胞

↓

篩選、收集細胞並純化Genomic DNA

↓

PCR擴增並得到解離曲線結果



附註：第一共研目前有qPCR機器，並無HRM機器。

方法四、 sequencing assay

方法A：

質體轉染細胞

↓

篩選、收集細胞並純化Genomic DNA

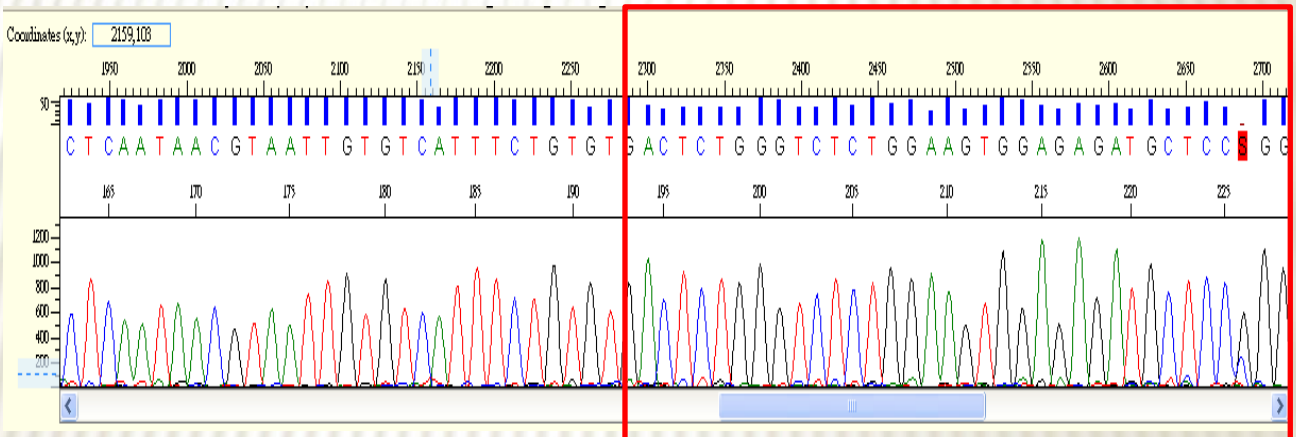
↓

PCR擴增

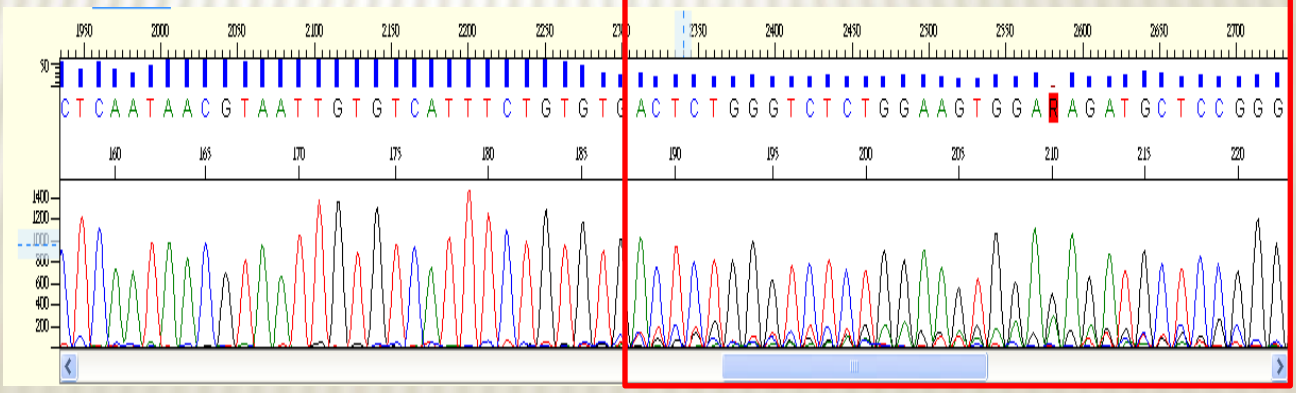
↓

PCR產物直接送定序

wt



Ko



方法B：

質體轉染細胞

↓

篩選、收集細胞並純化Genomic DNA

↓

PCR擴增

↓

PCR產物連接到TA載體，挑選50個(或100個)單一菌落進行定序，確定剔除效率

目前較為常用的方法為T7 E1分析法，因為設計靶位時不需存在限制酶切點，同時可量化突變效率，至於利用qPCR分析解離曲線或是HRM的方法其優點是經濟快速，但是無法量化突變效率，最佳應用方式是在進行單株細胞篩選時可進行初步快篩。至於定序的方法A在進行突變效率分析時只能依照分析圖上基因突變區圖形紊亂程度做定性分析，無法量化，但是運用在單一細胞株篩選時可以直接將序列進行解讀為其優點。至於方法B則過於耗時費力，適用於最後確定單一細胞株的基因序列。

相 關 生 技 公 司 網 站 連 結

冷泉港生物科技

http://www.fjbio.com.tw/index.php?do=prod&toppid=195&pid=197&id=352

力鈞生物科技

http://www.zgenebio.com.tw/

威新生物科技

https://www.facebook.com/wethinkbio

圖爾思生物科技

http://www.toolsbiotech.com/

Sigma-Aldrich

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/crispr?lang=en&region=TW&cm_guid=1-_-10000000000000038491-_-50835121278&cm_mmc=Google_Biosilencing-_-CRISPR-_-CRISPR-_-sigma%20crispr_Phrase_50835121278

lifetechnologies

http://www.lifetechnologies.com/tw/zt/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-precision-tals/geneart-crispr.html?s_kwcid=AL!3652!3!43210957038!b!!g!!+crispr&ef_id=U1c6-wAAAPaivQiT:20140728043100:s

System Bioscience

http://www.systembio.com/cas9?gclid=CIGJ4IGM778CFVh6vQodoxsArA

ASC: Applied StemCell

https://www.appliedstemcell.com/services/cell-line-models/cell-line-modification/

Cellectis bioresearch

http://www.cellectis-bioresearch.com/content/custom-talen%E2%84%A2

Haplogen genomics

https://www.haplogen-genomics.com/crispr?gclid=CJHG5dWa578CFZQAvAodA4MAkw