

オフターゲットへの対応と 導入遺伝子が除かれたことに関する 証明について

農研機構生物機能利用研究部門
遺伝子利用基盤研究領域
田部井豊



CRISPR-P 2.0: an improved CRISPR/Cas9 tool for genome editing in plants

<http://crispr.hzau.edu.cn/CRISPR2/>

中華農業大学
(Huazhong Agricultural University) in China



<https://crispr.dbcls.jp/>

ライフサイエンス統合データベースセンター
(Naito et al.)



© 2016 DBCLS 統合TV / CC-BY-4.0
<http://togotv.dbcls.jp/ja/20140412.html>

CRISPR direct

Enter an accession number (e.g. NM_006299) or genome location (e.g. hg19:chr7:900000-901000): ?

retrieve sequence

or Paste a nucleotide sequence: ?

```
>sample sequence
atgccgcgctgctgccccgaccagagaagcaagtctgagaacgaggagtttttaggaag
ctgagccgcgagtgtagattaagtacacgggcttcagggaccggccccacgaggaacgc
caggcacgcttcagaacgcctgcccgcgacggccgctcggaaatcgcttttgaggccaca
ggaaccaatctgtctctccagtttttccggccagctggcagggagaacagcgacaaca
cctagccgagagtatgtcgacttagaaagagaagcaggcaaggatattgaaggctccc
atgattctgaatggagctgtgttatctggaaaggctggattgatctcaaagactggat
ggtatgggctgtctggagtttgatgaggagcgagccagcaggaggatgcattagcacia
caggcctttgaagaggctcggagaaggacacgcgaatttgaagatagagacaggtctcat
cgggaggaaatggaggcaagaagacaacaagaccctagtcctgggtccaatttaggtggt
ggtgatgacctcaaacttcgtaa
```

配列を入力

PAM

or upload sequence file: ? 選択... ファイルが選択されていません。

PAM sequence requirement: NGG (e.g. NGG, NRG) ?

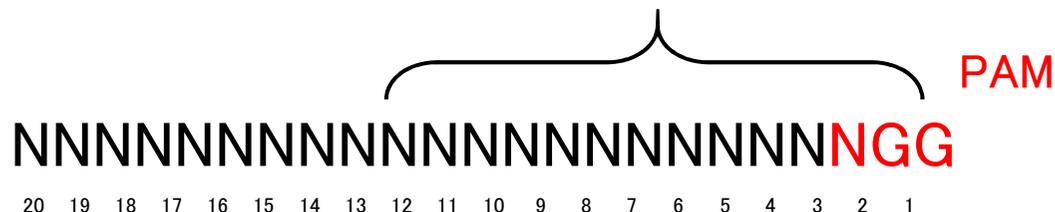
生物種を選択

Specificity check: Rice (*Oryza sativa* ssp. *japonica*) genome, Os-Nipponbare-Reference-IRGSP-1.0 (Oct, 2011) ?

design

標的配列の特異性を調べる

from 1 to 8 or 12 (seeds sequence)



超絶高速ゲノム配列検索 [Help](#) | [English](#)

GGGenome

検索 Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)

許容するミスマッチ/ギャップの数: (検索する塩基配列の長さの25%まで)

双方向を検索 +方向のみ検索 -方向のみ検索

標的配列を入力

最初, 0で試し増やしてみる

ゲノムの生物種を選択

<http://gggenome.dbcls.jp/ja/>

GGGenome by @meso_cacase at DBCLS

This page is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC BY 4.0).

標的配列の特異性をGGGenomeで調べる 農研機構

TGCTGGGAACAACACAGAGC Oryza sativa Indica genome, ASM465v1 (Jan, 2005)

許容するミスマッチ/ギャップの数: (検索する塩基配列の長さの25%まで)

双方向を検索 +方向のみ検索 -方向のみ検索

2017-11-06 18:55:43, GGGenome : Human genome, GRCh37/hg19 (Feb, 2009)

Summary:

- [TGCTGGGAACAACACAGAGC \(48\)](#)
- [GCTCTGTGTGTTCCAGCA \(46\)](#)
- **TOTAL (94)**

Results:

検索語に色がつきます (ミスマッチ・挿入欠失)。

[chr1:108393653-108393672](#) 108393653
AGCAGAAAGAGCAGCAGGGGCCAAGGTAAGCTGGGAACAACACAGAGCTGAGAAGAAGTGCAGAGAAGCAACTGCCAC

[chr2:53804004-53804021](#) 53804004
CATGGACCCAGGGCCAAACACCATGCTAAGTGGGAA-AACACAGA-CGCAGCCTCAGTGATGAACTGGGAAAATAGG

[chr2:143329192-143329210](#) 143329192
TCTCCAAGTAAATATTTGGGAAGAAAATACGGGAA-GACACAGAGCATATGTGAGGAACTGACATGGGCAAACCTCT

[chr2:222238021-222238040](#) 222238021
CAGAGAAAGATGGTCAGGATTGGAGGGGCTGGGAACAACA-ATGAGCTCCTCTCGCCATGAGTGTGCAGGCAGAGTG

[chr2:235534172-235534192](#) 235534172
TAAGTTTCTCCTTATAGACCATCGTGTGGTGGGAACAACACAGTAGCTGGAGACAAGAAAAGAGGACACCTAGAGGA

[chr2:237020486-237020503](#) 237020486
GGGTCCATCCCGGTATCAGGCAATGTGAAGTGGGAAC-ACACAGA-CTGCCATGGCATCCCCAGTCACTTGAGG

[chr2:239983879-239983897](#) 239983879
CTGAACATGGAACTATTAATAAAATGGTGGGAACAACACAG-GCCTCCAGACCTACGCGCTGAAGACAGAGGGG

[chr2:240453072-240453090](#) 240453072
GTAATGTGCTGTTAATGGAATGAAACAAGTTGGGAAAAACACAGAGACAATCCTGTTTATAAACATCTTGGTGCTC

[chr3:3400318-3400337](#) 3400318
TAATTGTATGAGGAAATAGACATCTTAATTGGTGAACACACAGAGCAATTCACTGAACATGAATACACACACGCAC

[chr3:68851834-68851851](#) 68851834
CTGCTTTGAAGAGCAGCCAAAACACAATAGTCT--GAACAACACAGAGCACACAGAGAACTGTCTGACACATATAGAGA

サザンハイブリダイゼーション法

- ・一般的な遺伝子解析法で導入遺伝子の確認に利用されている。
- ・検出感度はPCRより低いですが、プローブがカバーする範囲であれば、比較的小さな断片も確認できる。
- ・検出感度は数十bp以上で、20bp程度の小さな断片の検出は難しい。

PCR法(ポリメラーゼ連鎖反応法)

- ・遺伝子解析法で特定のDNA配列を高効率に増幅する。
- ・検知法としては高感度であるが、増幅には目的とするDNA断片の両端で、2種類の相補的な短いDNA断片(プライマー)と結合する必要がある。ランダムに切断されたDNA断片の検出は難しい。

次世代シーケンサー

- ・ゲノムDNAを解読する方法
- ・リファレンスになる配列が必要のため高精度にDNA解析できる植物種は限られている。