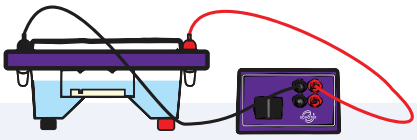
실험 가이드북

CRISPR를 이용한 낭포성 섬유증 치료

Using CRISPR to Treat Cystic Fibrosis

ED135



KOREA SCIENTIFICS (주)한국과학

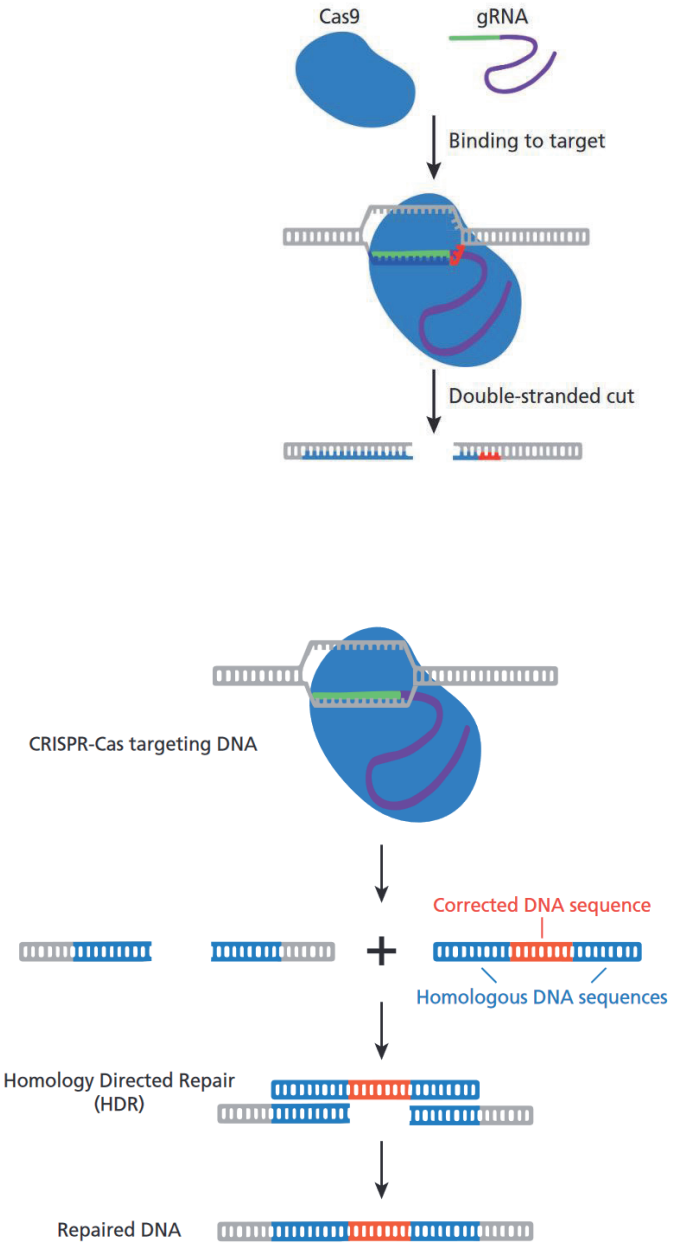
02-929-1110 info@koreasci.com

www.koreasci.com

※ 이 문서는 교육적 목적으로만 사용되어야 하며 그 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

실험 목표

낭포성 섬유증을 앓고 있는 환자에게서 발견되는 돌연변이 유전자를 표적으로하는 CRISPRCas9 유전자 가위를 이해하는 실험입니다. 가이드RNA(gRNA) 설계를 이해하고 전기영동을 통해 교정된 DNA샘플을 관찰합니다.



제품 구성품

A DNA Standard Marker

B gRNA #1

C gRNA #2

D gRNA #3

E gRNA #4

F gRNA #5

UltraSpec-Agarose

Electrophoresis buffer (50x)

FlashBlue DNA stain

필요 장비 및 준비물

전기영동 장치, 전원공급장치, 피펫과 피펫팁, 전자저울, 전자레인지(핫플레이트), 250mL삼각플라스크, 안전장갑, 증류수, 염색용 트레이

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

CFTR을 목표로하는 gRNA 설계하기

CFTR 유전자가 지워진 환자의 DNA 시퀀싱 데이터를 사용해 가이드 RNA(gRNA)를 설계합니다. 이 돌연변이는 엑손13의 601bp 부분을 제거하여 CFTR단백질을 완전히 비활성시킵니다. gRNA를 설계하려면 먼저 표적 시퀀스에서 PAM 부위를 구별합니다. 이 실험을 위해서 "NGG" PAM 부위를 사용하는 streptococcus pyogene의 Cas9 효소를 사용한다고 가정합니다. 여기에서 사용되는 "N"은 뉴클레오티드를 나타냅니다. 이것은 Cas9이 AGG, TGG, GGG 시퀀스의 바로 업스트림에 있는 시퀀스에만 결합한다는 것을 뜻합니다. Cas9은 상보적 DNA 가닥 중 하나에 결합할 수 있기에 PAM 시퀀스에 대해 둘 다 검사해야 합니다.

아래 gRNA 예제에서 PAM 시퀀스는 "AGG" 이며 역방향 가닥에 위치합니다. 그러므로 PAM 부위의 5′ 방향에서 20nt가 타켓 시퀀스입니다.

1. 아래의 CFTR 시퀀스에 상보적 뉴클레오타이드를 기록합니다. 실험자를 위해 미리 채워진 시퀀스도 있습니다("Example gRNA"로 표기) **주의: 빨간색은 지워진 부위지만 DNA염기서열은 하나의 연속적인 구간입니다.**

2. Streptococcus pyogenes Cas9을 위한 5개의 PAM 부위를 찾습니다. 동그라미를 치거나 형광펜으로 DNA 염기서열 내 그 부위를 체크합니다. **주의: 이 Cas9은 PAM 시퀀스로써 "NGG"를 인지한다는 것을 기억하십시오.**

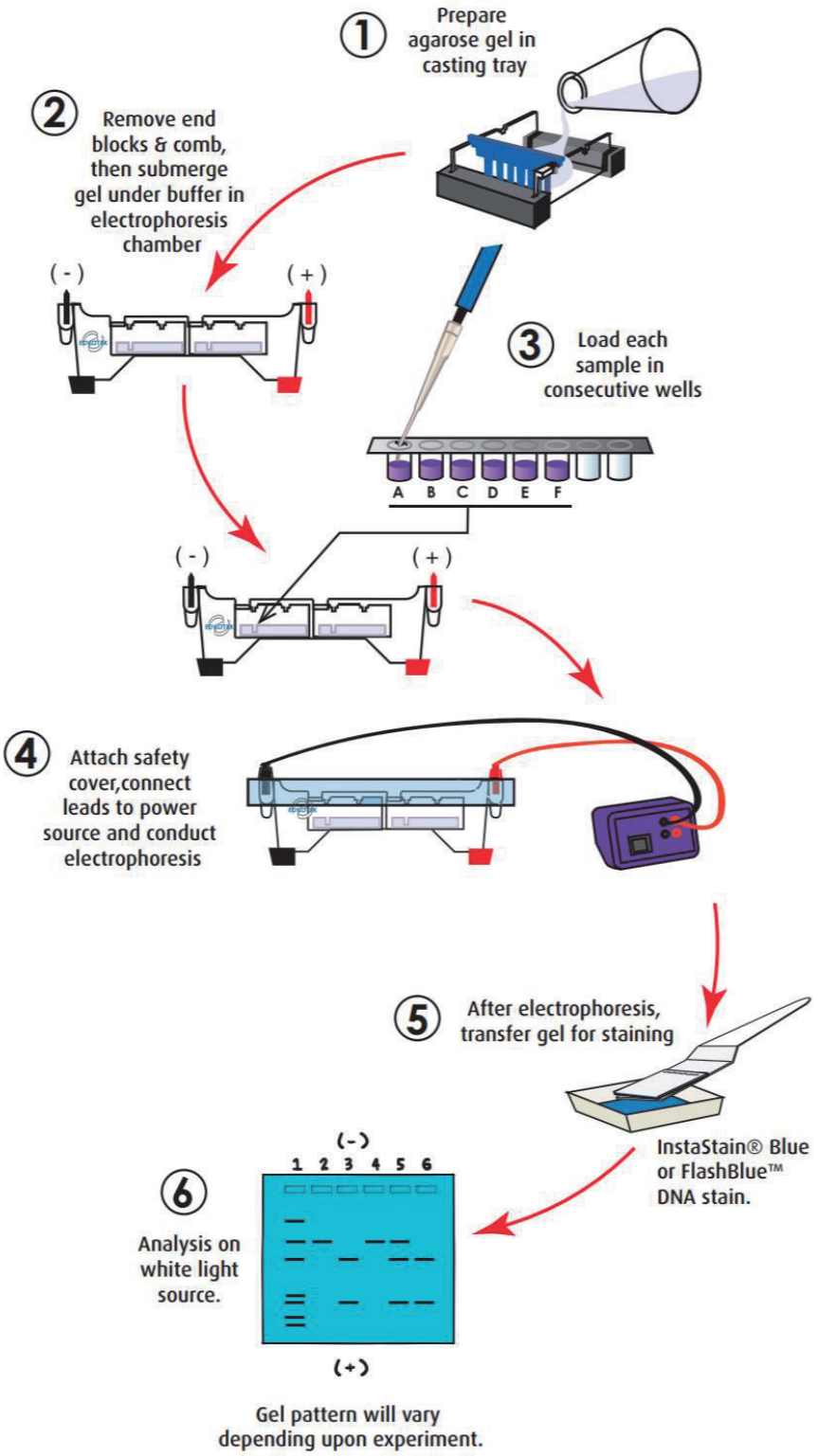
```
5′ TACCTAGATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGAA
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
3′ ATGGATCTACAAAATTGTCTTTTTC
                Example gRNA
   AGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCT|GCCCCTCAGGC
   ||||||||||||||||||||||||  ||||||||||||

   AAACTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTT
   ||||||||||||||||||||||||||||||||||||

   ATCTCAAGAAACT 3′
   ||||||||||||||
                 5′
```

3. 각 PAM 부위의 (5′방향) 업스트림에 20개 뉴클레오티드를 즉시 확인합니다. 이것은 타켓 시퀀스입니다. 다음표에 이것을 기록합니다.

Sample Name	Target Sequence (spacer)	PAM Sequence
Example	CTTTTTCTGTTAAAACATCT	AGG
gRNA #1		
gRNA #2		
gRNA #3		
gRNA #4		
gRNA #5		

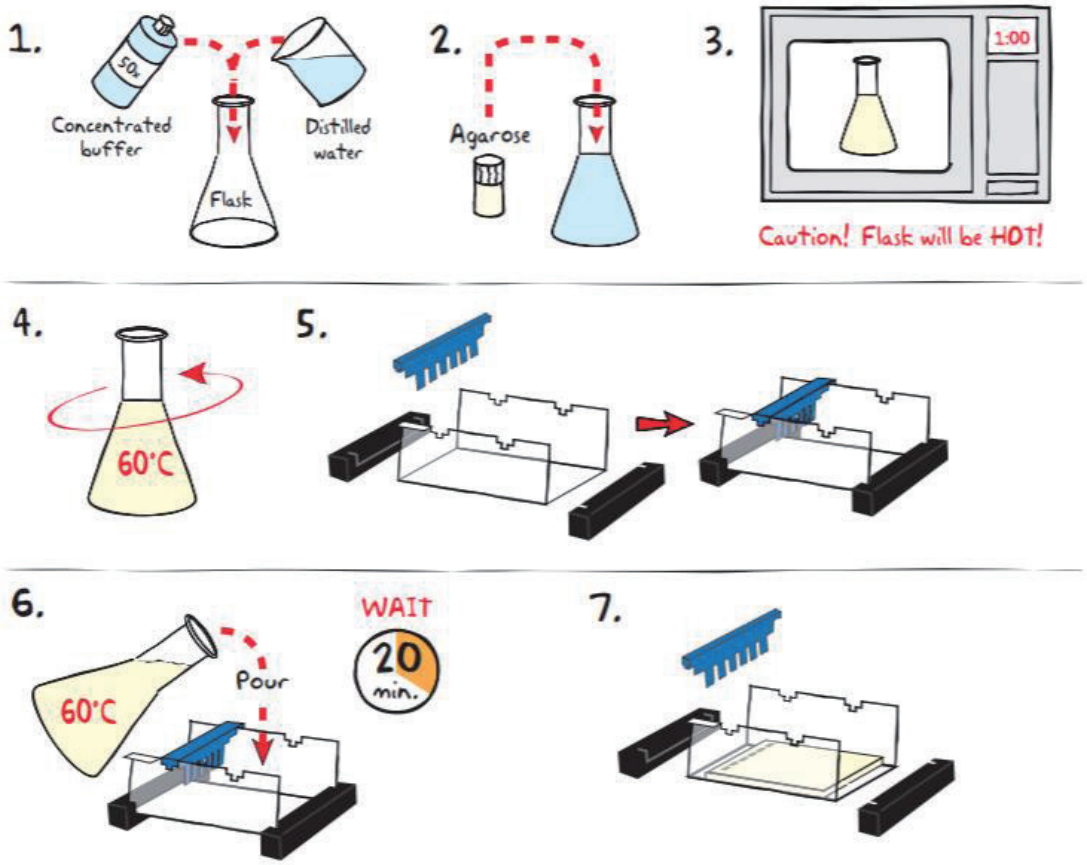
★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

전체 실험 개요



★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

아가로스 겔 전기영동

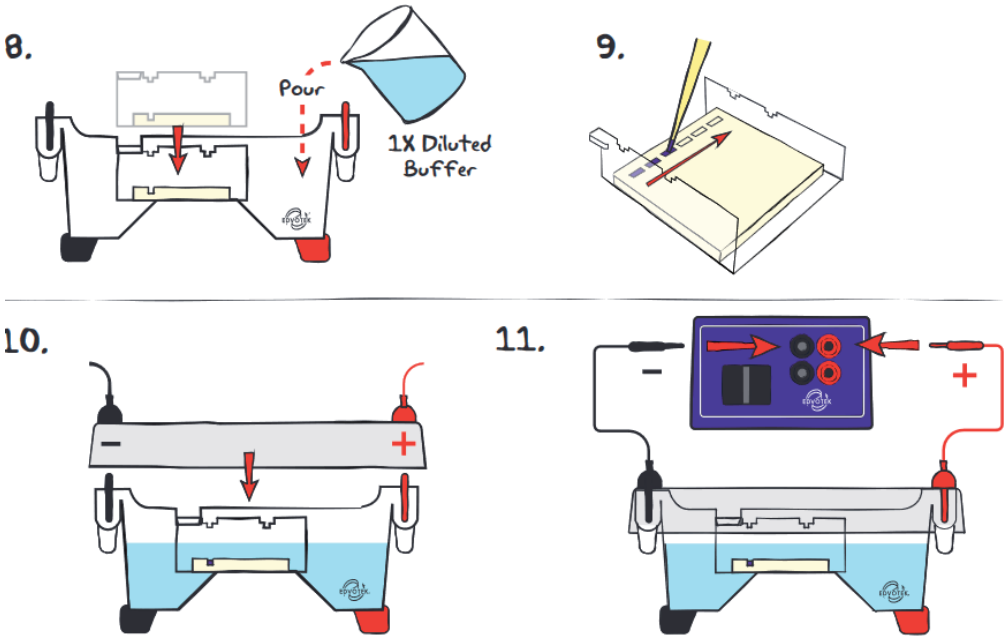


1. Concentrated buffer(50X)를 1X버퍼로 만들기 위해 Table A 표를 참고하여 희석합니다.
2. 250ml 플라스크에 1X 버퍼를 넣고 agarose powder를 섞습니다. (Table A참조)
3. 플라스크를 전자레인지에 1분간 넣고 돌립니다. 플라스크를 돌려가며 아가로스 분말이 충분히 녹아 안보일 때까지 15초 간격으로 전자레인지에 돌려 완전히 용해시킵니다.
4. 완전히 용해된 후 60℃ 까지 식혀줍니다.
5. 용액이 식는 동안 겔 캐스팅 트레이에 고무 마개와 comb을 결합합니다. Comb 결합 방향을 트레이에 표시된 노치 쪽으로 잘 맞춰 끼워 샘플로딩 well의 위치가 (-)극에 위치하게 합니다.
6. 어느 정도 용액이 식으면 트레이에 붓고 20분 이상 놔둬 굳게 합니다.
7. 완전히 굳은 후 고무 마개와 comb을 제거합니다. 이 때 조심하여 겔에 손상이 가지 않게 합니다.

Table A — Individual 0.8% UltraSpec-Agarose™ Gel

Size of Gel Casting tray	Concentrated Buffer (50x)	+	Distilled Water	+	Amt of Agarose	=	TOTAL Volume
7 x 7 cm	0.6 ml		29.4 ml		0.23 g		30 ml
7 x 10 cm	1.0 ml		49.0 ml		0.39 g		50 ml
7 x 14 cm	1.2 ml		58.8 ml		0.46 g		60 ml

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.



8. 전기영동 챔버에 겔과 트레이를 고정시키고 준비된 용량만큼의 버퍼(Table B. 참조)를 붓습니다. 겔이 충분히 잠겨야합니다.

9. 35μL Standard Dye Marker를 첫 번째 well에 분주합니다. 준비한 샘플 5개를 나머지 well에 분주합니다.

10. 전기영동장치의 덮개를 덮습니다. 전극의 방향(+, -)이 알맞게 연결되었는지 확인합니다.

11. 전원공급장치에 연결하여 전기영동을 시작합니다. (Table C. 의 공급전압과 구동 시간 참조)

12. 모두 마치고 나면 겔과 트레이를 빼내 결과를 관찰합니다.

Table 1: Gel Loading

Lane		
1	Tube A	Standard DNA Marker
2	Tube B	gRNA #1
3	Tube C	gRNA #2
4	Tube D	gRNA #3
5	Tube E	gRNA #4
6	Tube F	gRNA #5

Table B — 1x Electrophoresis Buffer (Chamber Buffer)

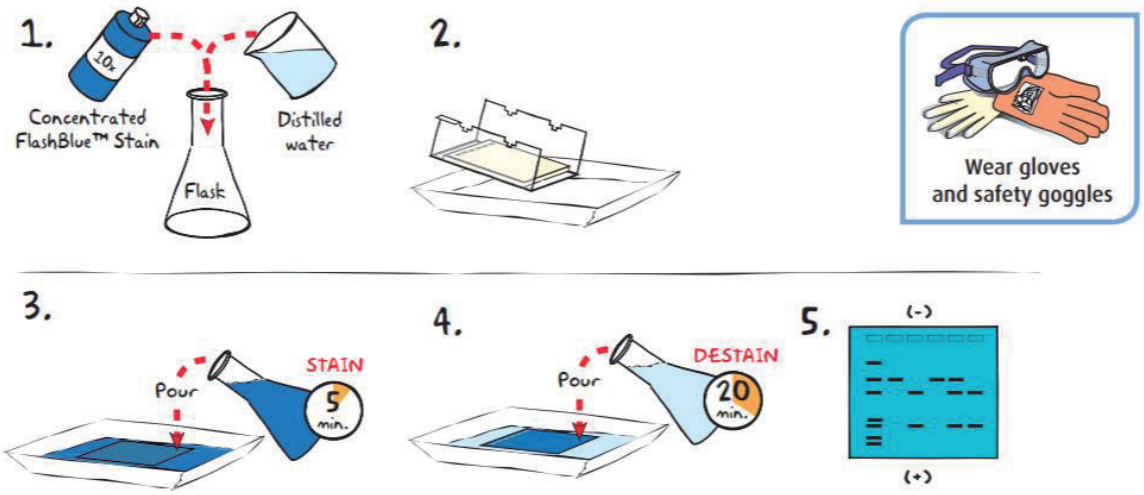
EDVOTEK Model #	Total Volume Required	Dilution: 50x Conc. Buffer	+ Distilled Water
M6+ & M12 (new)	300 ml	6 ml	294 ml
M12 (classic)	400 ml	8 ml	392 ml
M36	1000 ml	20 ml	980 ml

Table C — Time and Voltage Guidelines (0.8% Agarose Gel)

	Electrophoresis Model: M6+	M12 (new)	M12 (classic) & M36
Volts	Min. / Max.	Min. / Max.	Min. / Max.
150	15/20 min.	20/30 min.	25 / 35 min.
125	20/30 min.	30/35 min.	35 / 45 min.
75	35 / 45 min.	55/70 min.	60 / 90 min.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.

FlashBlue 를 이용한 아가로스 겔 염색



1. FlashBlue (10배 농축) 10ml와 증류수 90ml를 플라스크에 넣고 희석시킵니다.
2. 아가로스 겔과 캐스팅 트레이를 전기영동 장치에서 빼냅니다. 깨끗한 염색용 트레이 위에 겔만 미끄러뜨려 떨어뜨립니다.
3. 섞어놓은 Staining(염색)용액을 겔이 충분히 담길 정도로 붓고 5분간 놔둡니다. 5분을 넘어가게 되면 더 많은 destaining(탈색) 시간을 요구하게 됩니다.
4. 다른 트레이로 겔을 옮긴 후 증류수를 붓습니다. destaining은 최소 20분동안 이뤄져야합니다. 시간을 단축하려면 물을 자주 교체하십시오.
5. 겔을 꺼낼 때는 손상되지 않게 조심히 꺼냅니다. 더 나은 겔 결과 관찰을 위해 transilluminator 에서 관찰합니다.

★ 이 문서의 사용은 교육적인 목적으로만 사용되어야 하며 권리는 EDVOTEK, Inc. 에 있습니다.