

猫も杓子も

Geneious Prime でシーケンス解析

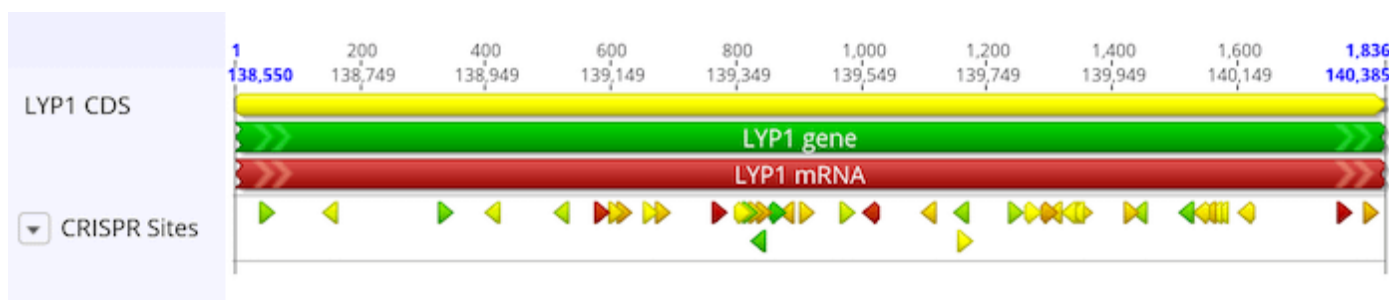
第 16 回 CRISPR サイトの検索結果



Geneious Prime の CRISPR ツールを用いて、*Saccharomyces cerevisiae*(パン酵母)の [LYP1 \(Lysine permease\) 遺伝子](#) の「GN(20)GG」gRNA (CRISPR) サイトを検索し、*Saccharomyces cerevisiae* ゲノムのオフターゲット結合サイトをチェックする手法について、前回(第 15 回 [CRISPR サイトの検索](#))の解析実行までの流れに引き続き、今回は解析結果の見方をご紹介します。

チュートリアル用のデータは[こちら](#)からダウンロードすることができます。

前回の設定で解析を実行した後、表示されたメッセージを **OK** をクリックして消去すると、「GN(20)GG」モチーフを持つ CRISPR サイトを含む新しいアノテーショントラックが表示されます。チュートリアルデータの場合、トラックに 41 個の CRISPR サイトのアノテーションがあるはずですが、



トラック上のアノテーションは、**Activity Score** によって色分けされています。このスコアは 0 から 1 の間の数値で、数値が高いほど期待されるアクティビティが高いことを示します。アノテーションの色付けは、赤から緑へのグラデーションになっており、低い数値は赤、高い数値は緑になっています。

Specificity Score を反映したカラーリングに変更するには、トラック名の横の下矢印をクリックし、**Color by/Heatmap** を選択し、リストから Zhang (2013) Specificity Score を選択します。Activity Score と同様に、低いスコアは赤で、高いスコア(オフサイトターゲットが少ないか弱いことを示す)は緑で色分けされています。Color by/Heatmap ウィンドウでは、ヒートマップの色付けに使用する数値スケールの値を確認したり編集したりすることもできます。

Save ボタンをクリックすると、配列上のアノテーショントラックが保存されます。

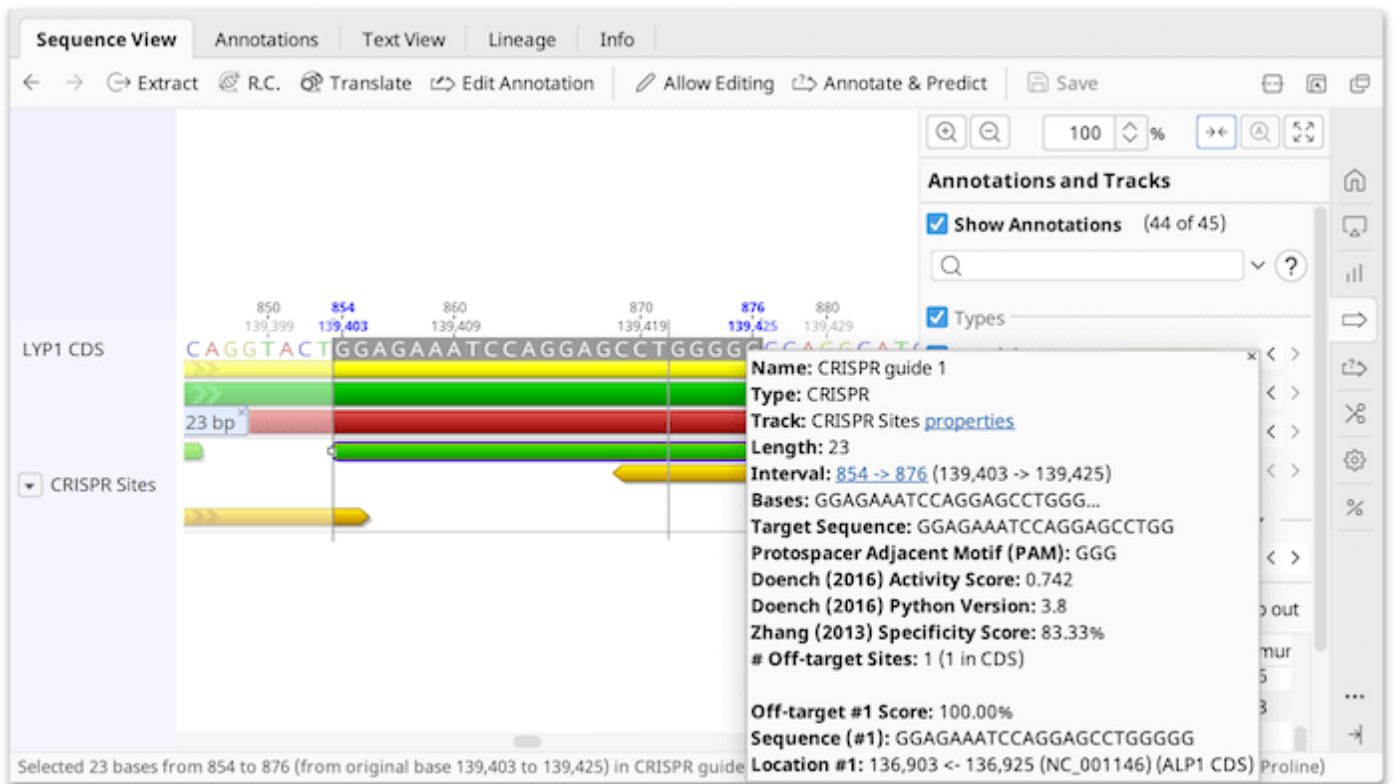
各サイトの実際スコアを見るには、アノテーションにマウスオーバーします。すると、そのサイトに関する情報を含むポップアップウィンドウが表示されます。

表形式でスコアを表示するには、**Annotations** タブを開きます。アノテーションテーブルに CRISPR アノテーションのみを表示するには、**Type** をクリックし、**CRISPR** を選択します。**Columns** をクリックし、**#Off-target sites**、Doench (2016) Activity Score、**Zhang (2013) Specificity score** にチェックを入れます(これらはすでに選択されている可能性があります)。これでアノテーションテーブルにこれらのカラムが表示されるはずですが。

アノテーションテーブルの列の名前をクリックすると、その列の値でテーブルの行を並べ替えることができます。列名の横に小さな三角形が表示され、行が小さい値から大きい値へソートされているか、またはその逆であるかが示されています。列名をもう一度クリックすると、行の並べ替えの方向が逆になります。例えば Specificity Score をクリックして、スコアの低いものから高いものへ並べ替えると以下ようになります。

| Name | Minimum | Maximum | Length | Direction | # Off-target Sites | Zhang (2013) Specificity ... | Doench (2016) Activity Sco... | Doench (2016) Specificity Score |
|-----------------|---------|---------|--------|-----------|--------------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| CRISPR guide 1 | 854 | 876 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 83.33% | 0.742 | 3.8 |
| CRISPR guide 2 | 902 | 924 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 94.33% | 0.454 | 3.8 |
| CRISPR guide 3 | 833 | 855 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 94.59% | 0.414 | 3.8 |
| CRISPR guide 4 | 967 | 989 | 23 | forward | 2 (2 in CDS) | 94.76% | 0.559 | 3.8 |
| CRISPR guide 5 | 763 | 785 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 94.89% | 0.205 | 3.8 |
| CRISPR guide 6 | 1,800 | 1,822 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 95.43% | 0.406 | 3.8 |
| CRISPR guide 7 | 869 | 891 | 23 | reverse | 1 (1 in CDS) | 98.26% | 0.431 | 3.8 |
| CRISPR guide 8 | 1,234 | 1,256 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 99.35% | 0.598 | 3.8 |
| CRISPR guide 9 | 1,345 | 1,367 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 99.58% | 0.460 | 3.8 |
| CRISPR guide 10 | 1,003 | 1,025 | 23 | reverse | 1 (1 in CDS) | 99.79% | 0.258 | 3.8 |
| CRISPR guide 11 | 610 | 632 | 23 | forward | 1 (1 in CDS) | 99.86% | 0.409 | 3.8 |
| CRISPR guide 12 | 40 | 62 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.628 | 3.8 |
| CRISPR guide 13 | 325 | 347 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.663 | 3.8 |
| CRISPR guide 14 | 575 | 597 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.262 | 3.8 |
| CRISPR guide 15 | 597 | 619 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.467 | 3.8 |
| CRISPR guide 16 | 651 | 673 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.498 | 3.8 |
| CRISPR guide 17 | 672 | 694 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.434 | 3.8 |
| CRISPR guide 18 | 799 | 821 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.505 | 3.8 |
| CRISPR guide 19 | 811 | 833 | 23 | forward | 0 (0 in CDS) | 100.00% | 0.645 | 3.8 |

この表から、検索された多くの CRISPR サイトの Specificity score が 100%であることがわかります。これは、インデルがなく、gRNA とのミスマッチが 3 つ以下という基準に適合するオフターゲットマッチがないことを示しています(ただし、ミスマッチが 3 つ以上あるオフターゲットサイトが存在する可能性はあります)。例えば、CRISPR guide 1 のオフターゲットスコアが最も低いので、表中からこの行を選択し、シーケンスビューに戻ると、連動して「CRISPR guide 1」アノテーションが選択された状態になります。マウスをアノテーションの上に持っていくと、ポップアップウィンドウが表示され、この CRISPR サイトに関する詳細な情報を表示します。



この部位の Specificity score は 83.33%です。*Saccharomyces cerevisiae* ゲノムには、この配列のオフターゲット結合サイトが 1 つだけ存在し、CRISPR ガイドと完全に一致するため、オフターゲットスコアは 100%となります。また、このサイトは第 14 番染色体上の 136,903←136,925、ALP1 CDS 内にあることが示されています。

複数のオフターゲットサイトを持つ CRISPR guide の場合、ツールチップには上位 5 つが表示されます。この情報は **Annotations** タブから表示、ソート、エクスポートすることも可能です。

【最新版】 [Geneious Prime2023 機能概要](#)



Geneious 製品概要・フリートライアルリクエストについては[こちら](#)

『Geneious Prime でシーケンス解析』の過去の記事は[こちらでチェック!](#)