猫も杓子も

Geneious Prime でシーケンス解析

第 17 回 ペア CRISPR サイトの検索



CRISPR/Cas9 ターゲティングの特異性を向上させる方法の一つとして、ターゲットサイトの反対側の鎖に相補的な gRNA を持つ変異型 Cas9-D10A ニッカーゼを使用する方法があります。反対側の鎖にある 2 つの個別のニックは、二本鎖切断をシミュレートした後、非相同末端結合を起こします。オフターゲットのニックは、塩基除去修復経路によってより高い忠実度で修復されるため、オフターゲット相互作用を最小限に抑えることができます。

前回([第 16 回 CRISPR サイトの検索結果](#))に引き続き今回も Find CRISPR Sites を使用して、*Saccharomyces cerevisiae* の LYP1 CDS 上のペアサイトを検索します。

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。

LYP1 CDS のドキュメントを選択し、**Annotate and Predict** → **Find CRISPR sites** へ進みます。

前回と同じ設定に加え、**Pair CRISPR sites** のボックスにもチェックを入れます。ペアサイトの最大許容オーバーラップ量と、ペアサイト間の最大許容スペースを指定することができます。ペアサイトの最大オーバーラップ量とサイト間の最大スペースは、CRISPR サイトの 5' PAM 末端から測定されます。デフォルト値はそれぞれ 6 と 16 です。

Paired score で CRISPR トラックを色付けする場合には、**Color CRISPR Sites by Paired Score** に設定します。

これでダイアログボックスは下の画像のようになります。**OK** をクリックすると検索が実行されます。

Find CRISPR Sites
✕

Find CRISPR Targets: Anywhere in sequence Selected region

PAM: NGG (SpCas9, 3' side)

CRISPR Site
?

Target
GN(19)

PAM Site
NGG

Preview: GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGG

Activity scoring: Doench et al. (2016)
?

Specificity Scoring
?

Score against an off-target database: 16 documents (16 sequences) - Yeast genome
Choose...

Maximum mismatches allowed against off-targets: 3

Maximum mismatches allowed to be indels: 0

Pair CRISPR Sites
?

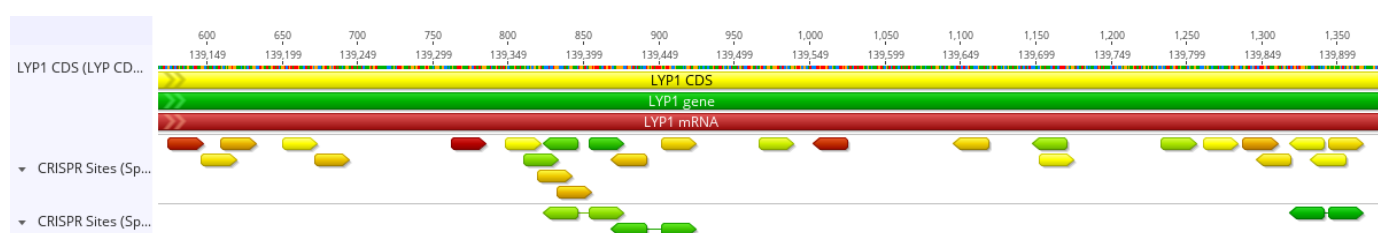
Maximum overlap of paired sites: 6

Maximum allowed space between paired sites: 16

Color CRISPR Sites by: Paired Score

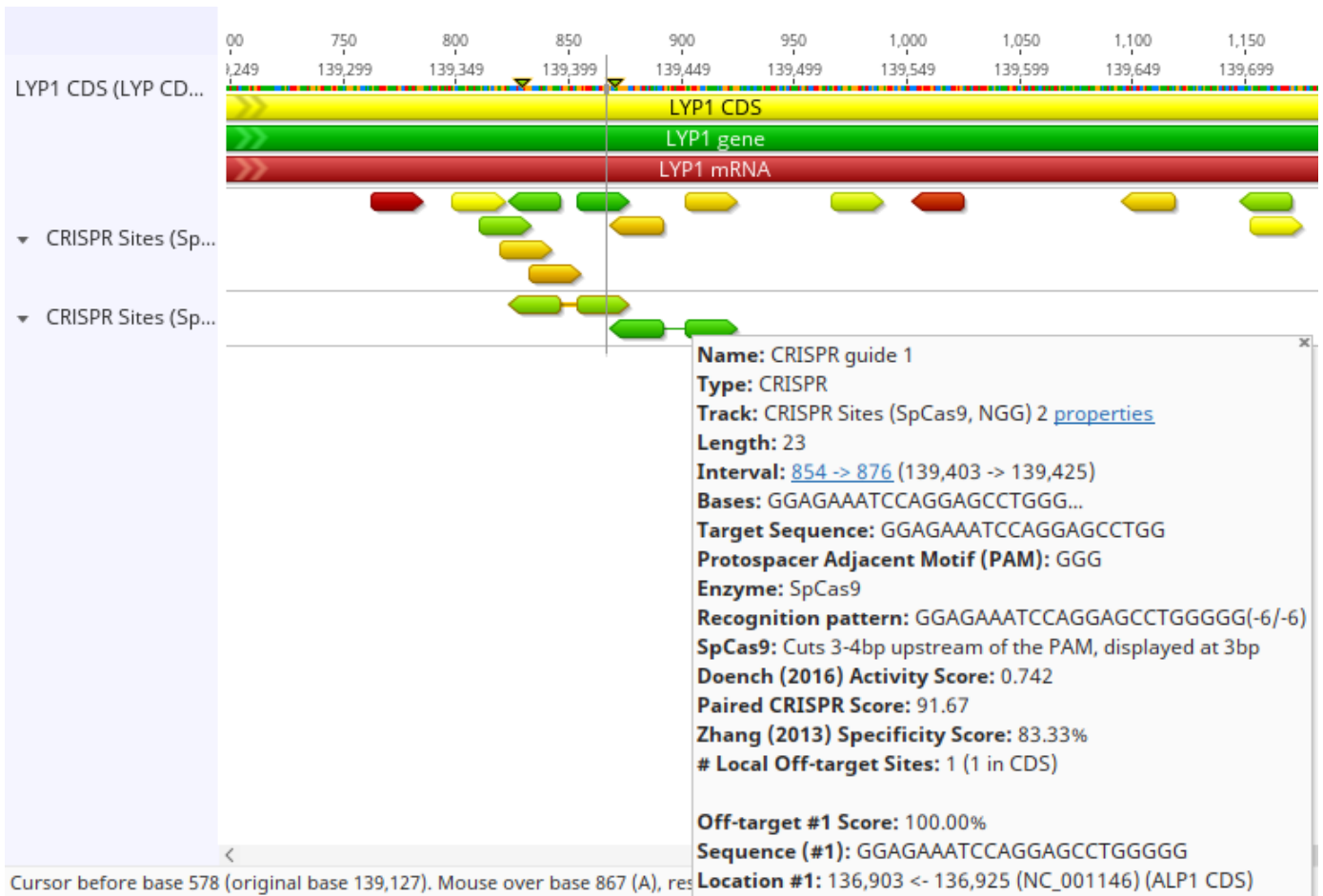
⚙️ ?
OK
Cancel

解析が終了すると、3組の CRISPR サイトを含む CRISPR サイトトラックが表示されるはずですが。



Pair CRISPR sites オプションを使用すると、最大オーバーラップおよびサイト間の最大スペース設定に適合するペアが少なくとも1つある場合にのみ、サイトがアノテーションされます。これらの設定に適合するペアが存在しないサイトはアノテーションされません。

CRISPR サイトの各ペアには、Paired CRISPR score が設定されています。CRISPR アノテーションの1つにマウスオーバーすると、そのサイトのペア CRISPR スコアが表示されます。この複合スコアは、個々の CRISPR サイトの Specificity score の平均値です。複合スコアが最も高い CRISPR サイトのペアがリンクされます。各 CRISPR サイトは、2番目のサイトが他の部位とさらに高いスコアのペアを有していない限り、最も高いスコアのペアサイトにリンクされます。ペアサイトは個々の CRISPR スコアではなく、Paired score に従って色付けされています。



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!](#)