

コンストラクトの作製方法 1日目

標的配列のデザイン

TCGATCACACAACAAAGGGG^{PAM}TGG

Webツール:
Cas-Designer

<パラメーターの設定>

PAM Type: **NGG**

Target Genome: *Dictyostelium discoideum*

Target Sequence: **解析したい遺伝子配列**

<設計上の注意点>

なるべく上流で破壊したい

TTTTの連続を避ける

(Cas-OFFinderで) オフターゲット効果の低い配列を選ぶ

コンストラクトの作製方法 2日目午前

オリゴのアニーリング

AGCATCGATCACACAACAAAGGGG
AGCTAGTGTGTTGTTTCCCCAAA

10 x アニーリングバッファー	1 μ l
100 μ M センスオリゴ	0.5 μ l
100 μ M アンチセンスオリゴ	0.5 μ l
H ₂ O	8 μ l
Total	10 μ l

95°Cで5分 → 約1時間かけて25°Cまで下げる

コンストラクトの作製方法 2日目午後

オリゴのアニーリング

AGCATCGATCACACAACAAAGGGG
AGCTAGTGTGTTGTTTCCCCAAA

Golden Gate assembly

Annealed oligo
All-in-one vector
T4 DNA ligase
Bpil

37°C 5 min
16°C 15 min] x5

tRNA Bpil Bpil tracrRNA
GCATCGAGCAAGGGTCTTCGGGAAGACGGGTTTAAGAG
CGTAGCTCGTCCAGAAAGCCCTTCTGCCCAAATTCTC



