

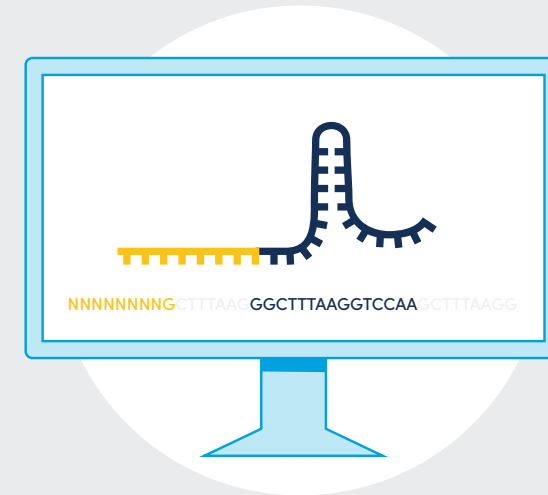
# 大規模かつシングルセル分解能での 機能的CRISPRスクリーニング

CRISPRスクリーニングは、特定の遺伝子の発現量が細胞の複雑な表現型およびプロセスにどのように影響するかを研究するための強力な手法です。10x GenomicsのChromiumシングルセルCRISPRスクリーニングでは、数百種類のCRISPR擾動をプロファイリングして、シングルセル分解能で遺伝子発現の表現型に直接関連したシングルガイドRNA (sgRNA) を検出できます。この包括的なアプローチにより、バルク単位のCRISPRスクリーニングや個別のノックアウト実験と比べて、高スループットに高い実験効率と高分解能で、遺伝子の擾動が全トランスクリプトームに及ぼす影響を解析できます。

01

## CRISPR ライブラリー の設計

- ターゲット遺伝子を選定
- 1遺伝子あたり2~5種類のsgRNAを使用
- 1ガイドあたり100~250細胞を回収
- オンラインツールを利用してガイドを設計、または検証済みのデータベースから選択

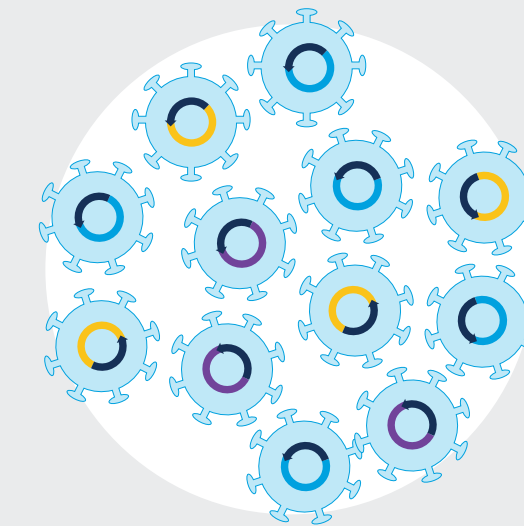


注意：10x Genomicsのキャプチャー配列を含むようにガイドを設計してください。詳細は[こちら](#)をご覧ください。

02

## レンチウイルスの アセンブル

- 10x Genomicsの対応ベクターでガイドをクローニング
- ベクターをウイルスに組み込むか、または直接細胞に感染
- レンチウイルスの作製プロトコルは[こちら](#)を参照
- または、Sigma-Aldrich\*から10x Genomics対応CRISPRレンチウイルスライブラリーを購入

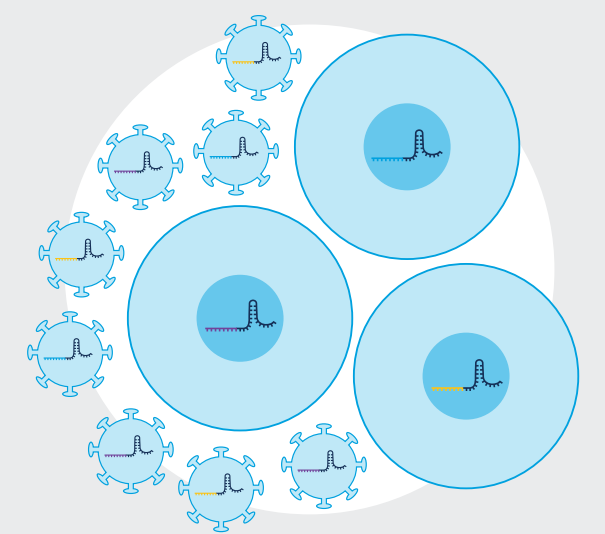


注意：10x Genomics対応プラスミドは[こちら](#)および[こちら](#)のサイトから入手可能です。

03

## 細胞への感染 および選定

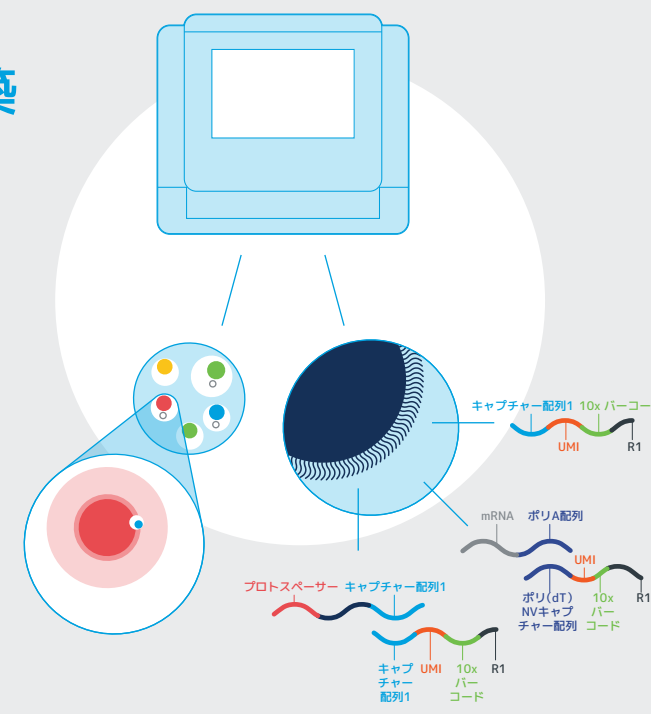
- レンチウイルスライブラリーを細胞に感染させてsgRNAを導入
- FACS法または抗生物質耐性に基づいて、ガイドを発現している細胞を選定
- 細胞を刺激して興味のあるプロセスまたはパスウェイを活性化
- 遺伝子導入プロトコルの詳細は[こちら](#)から



04

## 10x Genomics ライブラリーの構築

- Chromium Controllerにシングルセル懸濁液をロード
- キャプチャーしたsgRNAと細胞内mRNAは共通の細胞バーコードを持つため、ガイドとトランスクリプトームへの影響が結びつけられる

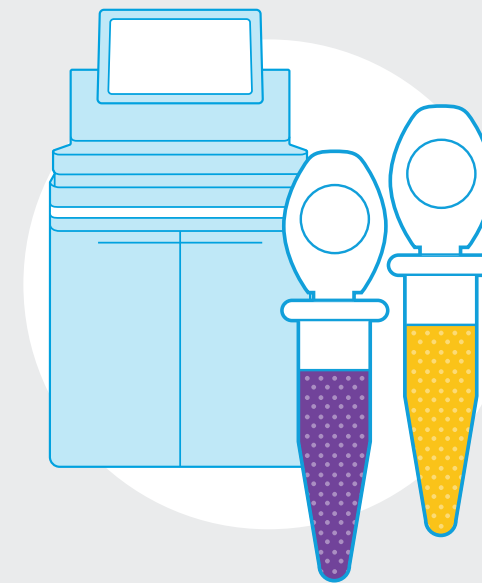


\*Sigma-AldrichはMerck KGaA(ドイツ、ダルムシュタット)またはその系列企業の商標です。その他のすべての商標は、それぞれの所有者に帰属します。商標の詳細情報は、公開されたリソースから入手可能です。

05

## ライブラリーの 配列決定

- Chromiumのワークフローから、遺伝子発現ライブラリーとCRISPR (Feature Barcode)ライブラリーを調製
- ユーザーガイドに示されているシングルセル遺伝子発現ワークフローに従い、対応するショートリードシーケンサーで両ライブラリーの配列を決定



06

## 新たな知見を 探る

- 10x Genomicsの使いやすいソフトウェアであるCell RangerおよびLoupe Browserでシングルセルのデータを解析
- さまざまな細胞プロセスでの遺伝子機能の解析、疾患への遺伝子の寄与を評価、新薬ターゲットの検証など

