

Recombinant Cas9 Protein GMP grade

Code No. T230 **Size:** **0.6 mg**
Conc.: **3 mg/ml**

Description:

Cas9 nuclease (*spCas9*) derived from *Streptococcus pyogenes* is widely used for gene editing in various cell types and organisms. CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9 technology consists of two key components that form a complex: Cas9 nuclease and guide RNA (gRNA) that is a couple of small RNAs directing Cas9 nuclease to cleave a specific double-stranded genomic DNA in a sequence-specific manner^{1, 2, 3}.

Recombinant Cas9 Protein GMP grade is a recombinant wild-type *Streptococcus pyogenes* Cas9 nuclease containing nuclear-localization signal (NLS) at C-terminal expressed and purified from *E.coli*. The Cas9 protein solution has been verified to be well-tolerated by mammalian cells when electroporated or microinjected as a ribonucleoprotein complex (RNP) with a single guide RNA (sg RNA) for knockout experiments. This product is manufactured according to relevant GMP guidelines.

Storage : Store at or below -70°C

Molecular Mass:

159,665 (based on amino acid sequence, 1380 amino acids)

Source:

E. coli expressing recombinant wild-type *Streptococcus pyogenes* Cas9 nuclease with nuclear localization signal(NLS) of simian virus 40 at C-terminal.

Purity: ≥ 90% by HPLC

Packaging: 0.6 mg protein / 0.2 ml in a 1 ml cryovial

Application: gRNA-dependent double-stranded DNA cleavage

Precautions:

Avoid repeated freeze/thaw cycles.

* Takara Bio is not guaranteed the quality of the product after once opened by a customer. However, we have not found any obvious decline in performance after up to five(5) times freezing and thawing, if it is not opened.

Quality Statement:

1. This product is manufactured according to relevant GMP guidelines.
2. No animal- or human-derived components are used in the manufacture of this product.

References:

- 1) Jinek M, Chylinsky K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. (2012) **337 (6096)**: 816-821.
- 2) Liang X *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol*. (2015) **208**: 44-53.
- 3) Sander J D and Joung J K. CRISPR-Cas9 systems for genomic editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol*. (2014) **32**: 347-355.

Related Products:

[Cas9 protein]
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)
(Cat. #632641/632640)

[Others]
Guide-it™ Cas9 Monoclonal Antibody (Clone TG8C1)
(Cat. #632628/632627)

Guide-it is a trademark of Takara Bio Inc.

Note

This product is for research use only. It is not intended for use in therapeutic or diagnostic procedures for humans or animals. Also, do not use this product as food, cosmetic, or household item, etc. Takara products may not be resold or transferred, modified for resale or transfer, or used to manufacture commercial products without written approval from Takara Bio Inc.

If you require licenses for other use, please contact us by phone at +81 77 565 6972 or from our website at www.takara-bio.com.

Your use of this product is also subject to compliance with any applicable licensing requirements described on the product web page. It is your responsibility to review, understand and adhere to any restrictions imposed by such statements.

All trademarks are the property of their respective owners. Certain trademarks may not be registered in all jurisdictions.

Recombinant Cas9 Protein GMP grade

Code No. T230

容量： 0.6 mg

濃度： 3 mg/ml

● 製品概要

Streptococcus pyogenes 由来 Cas9ヌクレアーゼ (SpCas9) は、同細菌の有する特定遺伝子座 (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) より転写される短鎖 RNA (gRNA: guide RNA) と複合体 (RNP: Ribonucleoprotein) を形成し、配列特異的に二本鎖 DNA を切断する¹⁾ ことから、哺乳類細胞をはじめとする様々な細胞のゲノム編集に広く利用されている^{2,3)}。

Recombinant Cas9 Protein GMP gradeは、野生型 SpCas9のC末端に simian virus 40 由来の核移行シグナル (NLS: nuclear-localization signal) が付加されるよう大腸菌を宿主として発現した組換えタンパク質である。また、Recombinant Cas9 Protein GMP grade の溶液組成は、哺乳類細胞への導入時に生じる細胞へのダメージを低減するよう最適化されているため、本タンパク質と gRNA を用いて調製した RNP をエレクトロポレーションやマイクロインジェクション等の手法を用いて細胞内に導入することで、高効率なゲノム編集が可能である。本製品は GMP に関するガイドラインに準拠し、製造および品質管理されている。

● 保存 - 70℃以下

● 分子量 159,665 (アミノ酸配列より算出、1380 アミノ酸)

● 起源
E. coli expressing recombinant wild-type *Streptococcus pyogenes* Cas9 nuclease with nuclear localization signal(NLS) of simian virus 40 at C-terminal.

● 純度 HPLC にて純度 90%以上

● 包装形態
0.6 mg のタンパク質を含む溶液 0.2 ml を 1 ml のクライオバイアルで包装

● 用途 ガイド RNA (gRNA) 依存的な二本鎖 DNA の切断

● 使用上の注意

凍結融解を繰り返して使用することは避けてください。

※ 開封後の本製品の品質については、弊社が定める GMP 基準下での保証の対象外となります。但し製品が未開封の場合、最大 5 回の凍結融解後においても明らかな性能劣化がないことを確認しています。

● 品質について

1. 本製品は GMP に関するガイドラインに準拠し、製造および品質管理されています。
2. 本製品はヒト及び動物由来物質を含んでおりません。

● 参考文献

- 1) Jinek M, Chylinsky K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. (2012) **337 (6096)**: 816-821.
- 2) Liang X *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol.* (2015) **208**: 44-53.
- 3) Sander J D and Joung J K. CRISPR-Cas9 systems for genomic editing, regulation and targeting. *Nat Biotechnol.* (2014) **32**: 347-355.

● 関連製品

[Cas9 タンパク質]
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)
(製品コード 632641/632640)

[その他]
Guide-it™ Cas9 Monoclonal Antibody (Clone TG8C1)
(製品コード 632628/632627)

● 注意

本製品は研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。
タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。
ライセンスに関する情報は弊社ウェブカタログをご覧ください。
本データシートに記載されている会社名および商品名などは、各社の商号、または登録済みもしくは未登録の商標であり、これらは各所有者に帰属します。

v201910

Recombinant Cas9 Protein GMP grade

Experimental Example (Genome Editing of Mammalian Cells):

Reference: Guide-it Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) User Manual

[https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Guide-it%20Recombinant%20Cas9%20\(Electroporation-Ready\)%20User%20Manual_012317.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Guide-it%20Recombinant%20Cas9%20(Electroporation-Ready)%20User%20Manual_012317.pdf)

Target cells / gene : 293T cell / CD81

RNP delivery method : Electroporation [Equipment: Neon Transfer System (Thermo Fisher Scientific)]

Preparation of RNP : 7.5 μ l solutions were prepared by mixed with 0.45 μ g of sgRNA, 0.75 μ g/0.25 μ l of this product and Resuspension Buffer R (or T), incubated at 37°C for 5 minutes and stand at 4°C.

RNP electroporation : Cells were harvested, washed with PBS and resuspended with Buffer R to be 2×10^7 cells /ml. RNPs were electroporated into cells using 7.5 μ l of RNP and 7.5 μ l of cells as prepared above according to equipment manual. Electroporation was conducted in the following three kinds of condition (N=3) (Table 1).

Table 1. Electroporation conditions

Condition	Pulse voltage (V)	Pulse interval (ms)	Pulse time
A	1,300	20.0	2
B	1,200	20.0	2
C	1,100	20.0	2

Efficiency of genome editing:

After the electroporation under the upper conditions, the cells were cultured for 7 days, and then reacted with PE-labeled Anti-CD81 antibody and measured the proportion of CD81 negative (knockout, KO) cells by FCM analysis.

Result:

Comparing Condition A to C, the highest Knockout (KO) efficiency of the CD81 gene (85.4%) was obtained at Condition A.

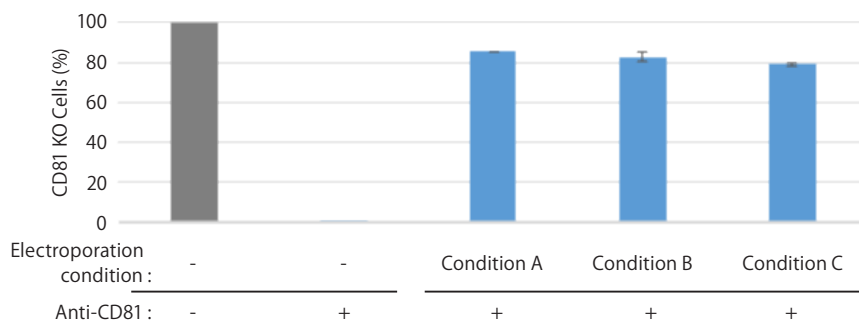


Figure 1. Knockout efficiency

Recombinant Cas9 Protein GMP grade

● 本製品の使用例 (哺乳類細胞のゲノム編集)

参考資料: Guide-it Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) User Manual

[https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Guide-it%20Recombinant%20Cas9%20\(Electroporation-Ready\)%20User%20Manual_012317.pdf](https://www.takarabio.com/assets/documents/User%20Manual/Guide-it%20Recombinant%20Cas9%20(Electroporation-Ready)%20User%20Manual_012317.pdf)

標的細胞/遺伝子: 293T 細胞/ CD81

RNP 導入法 : エレクトロポレーション [使用装置: Neon Transfer System (Thermo Fisher Scientific 社)]

RNP 作製条件 : single guide RNA (sgRNA) 0.45 μ g、本製品 0.75 μ g/0.25 μ l を Resuspension Buffer R (または T) を用いて計 7.5 μ l の溶液を調製し、37°C で 5 分加温後、4°C にて静置した。

RNP 導入条件 : 細胞を回収後に PBS で洗浄し、Buffer R を用いて 2×10^7 cells/ml となるように懸濁した標的細胞 7.5 μ l を RNP 7.5 μ l と混合させた後、装置の使用方法に従いエレクトロポレーションを行った。
ただし、エレクトロポレーションの条件は、以下 3 種の条件を使用 (各 N=3 で実施) した。

条件	パルス電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス回数
A	1,300	20.0	2
B	1,200	20.0	2
C	1,100	20.0	2

ゲノム編集効率の評価方法: 上記導入条件にて RNP を導入した細胞を 7 日間培養後、PE 標識抗 CD81 抗体と反応させ、FCM 解析にて CD81 陰性細胞率 (%) を測定した。

結果: 条件 A ~ C で比較検討したところ、パルス電圧を 1,300 V に設定した条件 A で、最も高い標的遺伝子 CD81 ノックアウト率 (85.4%) が得られた。

