

ゲノム編集受託サービス

2018年9月改訂

CRISPR / Cas9システムを利用したゲノム編集技術は、従来技術と比較して操作が簡便で効率が良いことから、新たなゲノム改変法として注目されています。

タカラバイオ(株)では、RNA-guided endonucleaseを利用したCRISPR/Cas9システムのゲノム編集ツール(Cas9、sgRNA:single-guide RNA、ドナーベクター等)をご提供するだけでなく、ゲノム編集細胞株やゲノム編集動物の作製も承っています。これまでに培ってきた細胞加工技術や、ゲノム編集試薬開発の経験を活かし、sgRNA設計・作製からゲノム編集細胞株、ゲノム編集動物の作製まで幅広いサービスでお客様の研究を強力にサポートいたします。



CRISPR / Cas9システム作製

sgRNA
設計・作製サービス



sgRNA



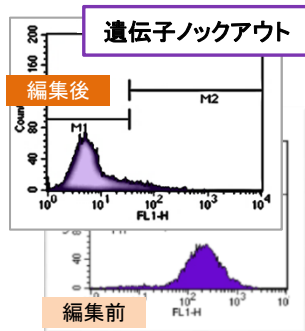
Cas9タンパク質

オフターゲット領域予測 (in silico)

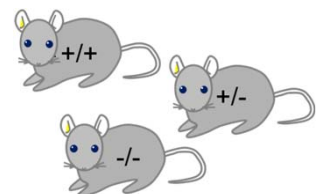
ゲノム編集による細胞株作製

ゲノム編集による動物作製

- ・ノックアウト細胞株作製
- ・細胞表面発現遺伝子ノックアウト細胞株作製
- ・ノックイン細胞株作製
- ・塩基置換細胞株作製 等



- ・ノックアウトマウス
- ・ノックアウトラット
- ・ノックインマウス
- ・ノックインラット 等



ご提供いただく細胞:
iPS細胞、細胞株、初代培養細胞

- | | | |
|-----------|-----|---------------------------------|
| ターゲット領域確認 | ▶▶▶ | ダイレクトシーケンス解析、TAクローニングによるシーケンス解析 |
| オフターゲット解析 | ▶▶▶ | 全ゲノム解析、エクソーム解析 |
| 各種アッセイ試験 | ▶▶▶ | フローサイトメトリー、ウェスタンブロットティング、PCR 等 |
| 動物系統作製 | ▶▶▶ | F1、F2個体の作製、動物飼育代行 |

ゲノム編集による細胞株作製サービス

CRISPR / Cas9システムを利用してノックアウト／ノックインした細胞を作製、納品します

- ◆ sgRNA、ノックイン用オリゴなどの設計・構築から承ります！
- ◆ iPS細胞や各種細胞株で実績あり
- ◆ 米国Broad研究所よりCRISPR / Cas9システムの研究分野における通常実施権を取得済み

ご提供いただくサンプル／情報

- 遺伝子情報／ターゲットサイト情報
- 目的細胞（マイコプラズマ感染が否定されているもの）
- 培養条件の情報、培地 等

作業期間

- ノックアウト
 - ノックインオリゴ (ssODN)
- 4.5か月～

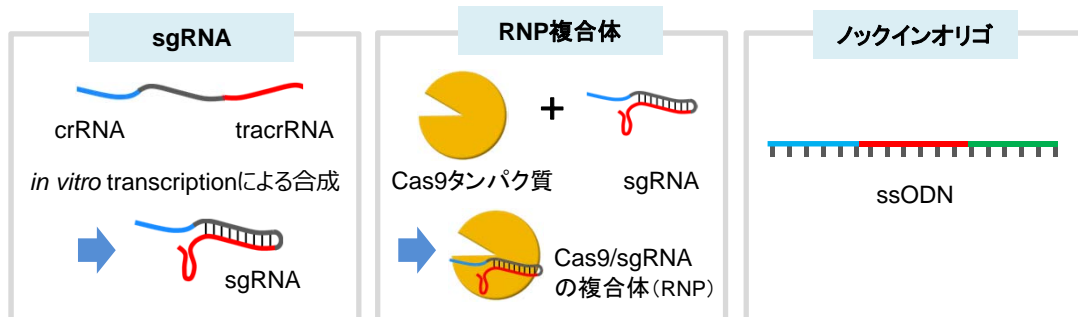
※ 委託費用については作業内容に応じてお見積させていただきます。お気軽にお問い合わせください。

ノックアウト／ノックイン細胞株の作製フロー

設計

- ・sgRNA配列
- ・ノックインオリゴ (ssODN)

- ◆ ご提供いただくターゲット情報から、編集効率が高くオフターゲットをできるだけ除ける最適な配列を設計



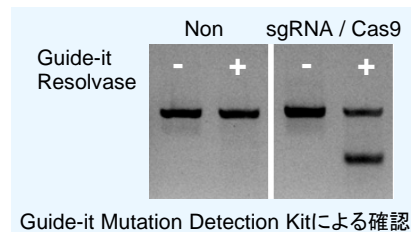
細胞のセットアップ 予備検討

- ◆ ご提供細胞のマイコプラズマ否定確認を行い、ご提供情報を用いて細胞を融解・馴化
- ◆ DNA導入条件およびシングルセルクロニングの検討
- ◆ ゲノム編集領域のPCR増幅およびシーケンス確認

プール細胞での ゲノム編集確認

- ◆ ご指定の細胞に、Cas9タンパク質／sgRNA複合体 (RNP)を導入し、ゲノム編集を確認

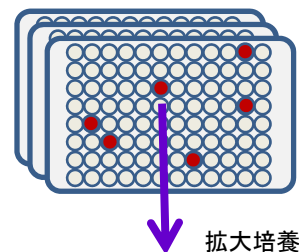
※細胞種やターゲットによって編集が確認できない場合、別途ご相談いたします。



細胞株作製

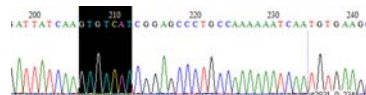
- ◆ 決定した至適条件でRNPを導入し、限界希釈によるクロニングにより細胞株を取得

※クロニング数は事前のご相談により決定します。
ノックアウト株作製の場合、～40クローンが目安です。



ゲノム編集確認

- ◆ ダイレクトシーケンス解析による目的領域の解析



※編集株取得に至らなかった場合は、別途ご相談いたします。

クローン調製

- ◆ 変異株クローンの拡大培養、ストック作製、ダイレクトシーケンス解析

充実のオプション サービス！

- オフターゲット領域予測
- オフターゲット解析(エクソーム解析等)
- TAクローニングによる塩基配列解析
- ウェスタンブロット解析
- 各種アッセイ試験

抗体染色を利用した細胞表面発現遺伝子ノックアウト細胞株作製サービスは、裏表紙でご紹介

ゲノム編集による動物作製サービス

CRISPR / Cas9システムを利用してノックアウト／ノックインしたマウス・ラットを作製、納品します

- ◆ 組換え動物作製で実績のある日本エスエルシー社との提携業務
- ◆ sgRNA + Cas9 mRNAを利用(基本仕様)
- ◆ 疾患モデルへのゲノム編集についてもご相談ください。

ご提供いただくサンプル／情報

- 遺伝子情報／ターゲットサイト情報
- 対象動物等の情報

作業期間

- ノックアウト
 - ノックイン(ssODN)
- 4.5か月～

※ 委託費用については作業内容に応じてお見積させていただきます。お気軽にお問い合わせください。

ノックアウト／ノックインマウス・ラットの作製フロー

sgRNA 配列設計

- ◆ ご提供いただくターゲット情報から、編集効率が高くオフターゲットをできるだけ除ける最適な配列を設計

sgRNA、Cas9 mRNAの調製

- ◆ sgRNA、Cas9 mRNAの調製



※Cas9はタンパク質でも作製可能です。
※ ノックイン動物作製の場合、ノックインベクターやノックインオリゴの設計合成を行います。

受精卵への インジェクション

- ◆ 受精卵(160個程度)にCas9 mRNA、sgRNAをマイクロインジェクションし、仮親の卵管へ移植

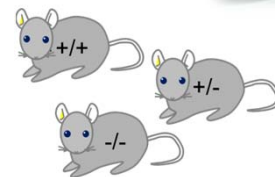
※作製前に組換え動物作製の情報をご提供いただきます。
※【基本仕様の系統】 マウス C57BL / 6NCrSlc ラット Slc:SD
病態モデルなどの系統については別途ご相談ください。
※動物作製で多数の実績を有する日本エスエルシー社にて行います。



産仔(F0)の取得

- ◆ 20匹程度の産仔を取得

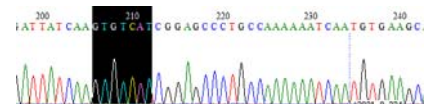
※編集された遺伝子により産仔が少ない場合があります。
※仮親の微生物検査を行います(検査項目は別途ご相談)。



ゲノム編集確認

- ◆ 尾検体を用いて目的領域の塩基配列を解析

※尾検体からの簡易DNA抽出後、ダイレクトシーケンスによる目的領域の配列確認を行います。PCR条件検討やDNA精製を行う場合、追加費用をお願いしています。

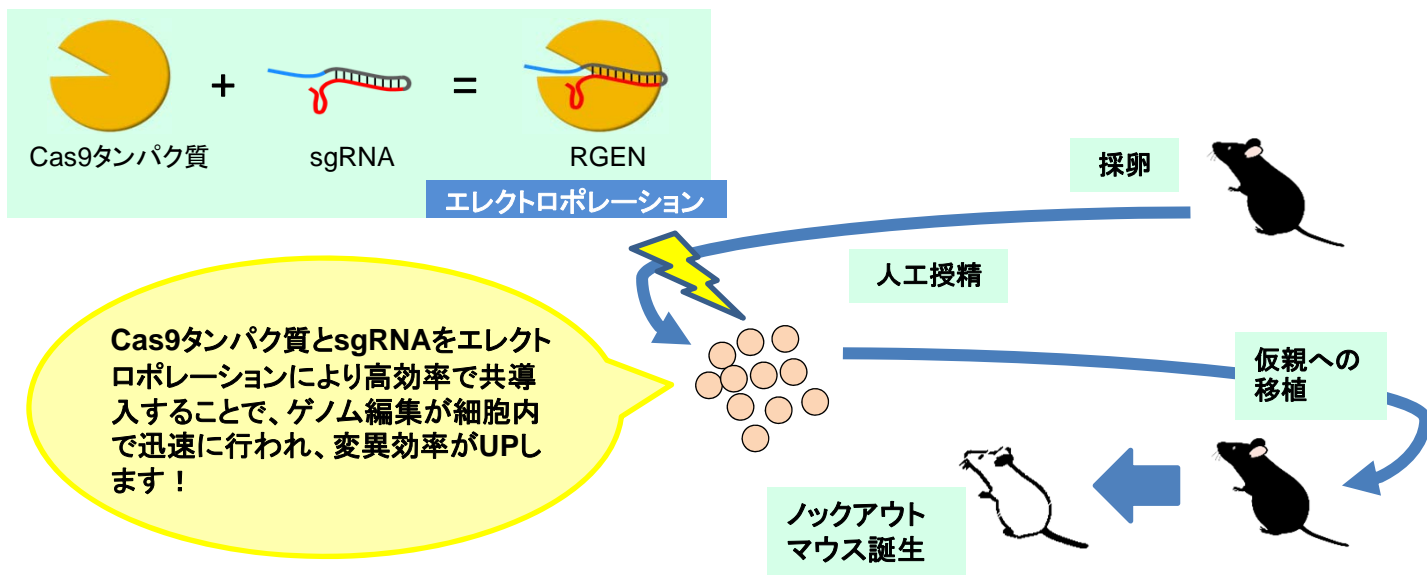


※編集動物取得に至らなかった場合は、ご相談のうえ、本作業工程を減額して費用を申し受けるか、追加作業を行います。
※編集個体は、日本エスエルシー社より納品いたします。

充実のオプション サービス！

- オフターゲット領域予測
- TAクローニングによる塩基配列解析
- 各種アッセイ試験
- オフターゲット解析(エクソーム解析等)
- F1やF2個体の作製
- 変異個体の飼育

エレクトロポレーション法で行う高効率ゲノム編集による動物作製サービスは、裏表紙でご紹介



実施例：メラニン色素をつくり出す酸化酵素 Tyrosinaseのノックアウトマウス作製

【方法】

C57BL / 6NCrSlcマウスの受精卵に、クロンテックのCas9タンパク質とTyrosinaseノックアウト用sgRNAをエレクトロポレーションで共導入した。導入後、2細胞期胚を仮親マウスの卵管に移植して、産子を獲得した。

両アレルにTyrosinase遺伝子座の部分欠損が生じ、Tyrosinaseノックアウトマウス(▼毛が白色、ホモ/ヘテロの両アレル欠損型が混在)の作製効率は、ほぼ100%でした。



細胞表面発現遺伝子ノックアウト細胞株作製サービス

細胞表面に発現する遺伝子を標的とされているお客様にお勧めです。フローサイトメリー(FCM)解析と磁気ビーズを用いた濃縮工程により、低価格で効率よく目的遺伝子ノックアウト細胞株を作製します。

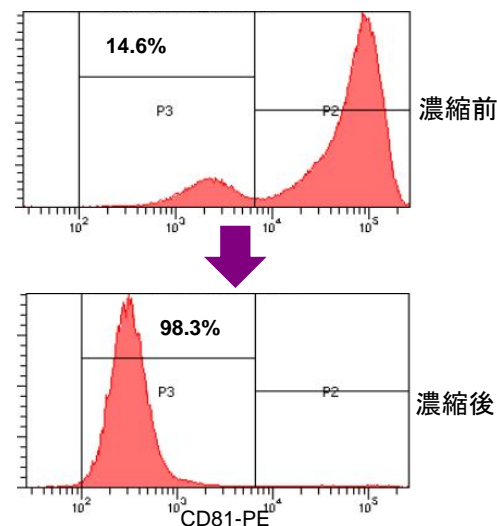
実施例：CD81遺伝子KO細胞株作製

【方法】

sgRNAおよびCas9タンパク質の複合体(RNP)を導入したゲノム編集プール細胞を作製し、磁気ビーズによる標的遺伝子のCD81ノックアウト(KO)細胞の濃縮を行った。濃縮前後のプール細胞からシングルセルクローニングを実施し、得られたクローン細胞におけるCD81の発現をFCM解析で評価した。

サンプル名	取得クローン数	KOクローン数	KO細胞取得率
293T細胞	濃縮前	6	1 16.7%
	濃縮後	6	6 100%

293T細胞では磁気ビーズによるノックアウト細胞株の濃縮を行う事で、CD81陰性細胞率が14.6%から98.3%まで上昇し、より効率的にノックアウト細胞を取得できた。



※本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。 2018年9月作成N

タカラバイオ株式会社

■ 受託サービスに関するお問い合わせ

滋賀県草津市野路東七丁目4番38号 〒525-0058
TEL 077-565-6999

Website <http://catalog.takara-bio.co.jp/jutaku/>

取扱店