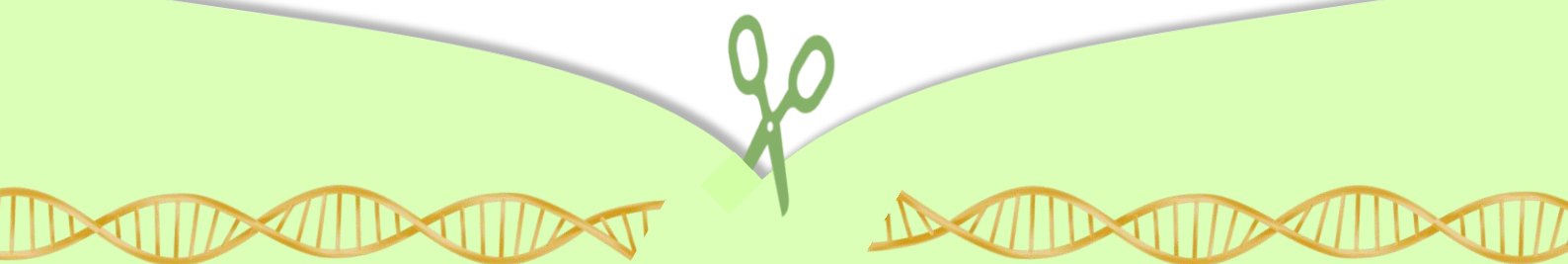


ゲノム編集製品ガイド

2021年9月版



本ガイドを見ればCRISPR/Casで必要な製品やお役立ち製品が分かる！

- ✓ ゲノム編集とは？ ゲノム編集実験フロー
- ✓ CRISPR/Cas9に必須なCas9とsgRNA導入システム
- ✓ ゲノム編集の効率アップにつながるサポートツール
- ✓ ゲノム編集よくあるご質問



本ガイドを読んで、ゲノム編集を始めてみませんか？



本ガイドの関連情報はこちらから！



ゲノム編集とは？

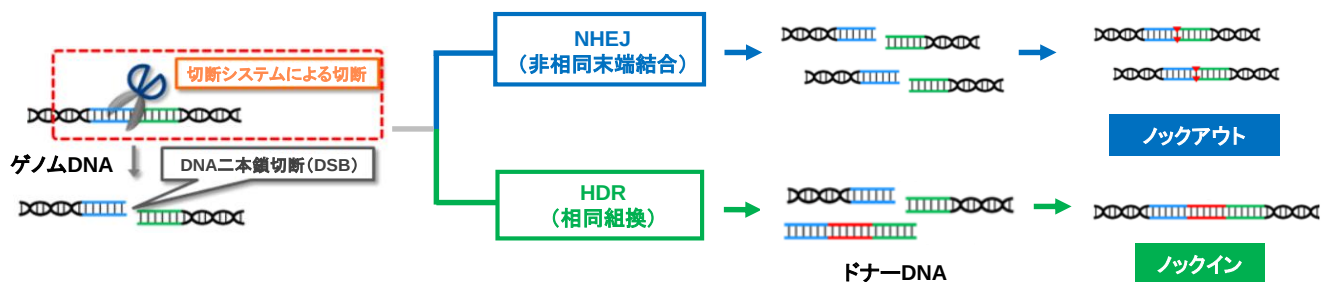
ゲノム編集は、ゲノム上の任意の箇所に対し、ノックアウトやノックインを“自由自在”にしかも効率よく行うことができるため、今やライフサイエンス分野においてなくてはならない技術となっています。

ゲノム編集はゲノム上の改変を行いたい箇所をピンポイントで切断することからスタートし、生物が持つ修復システムをうまく利用することでノックアウトおよびノックインを行います。

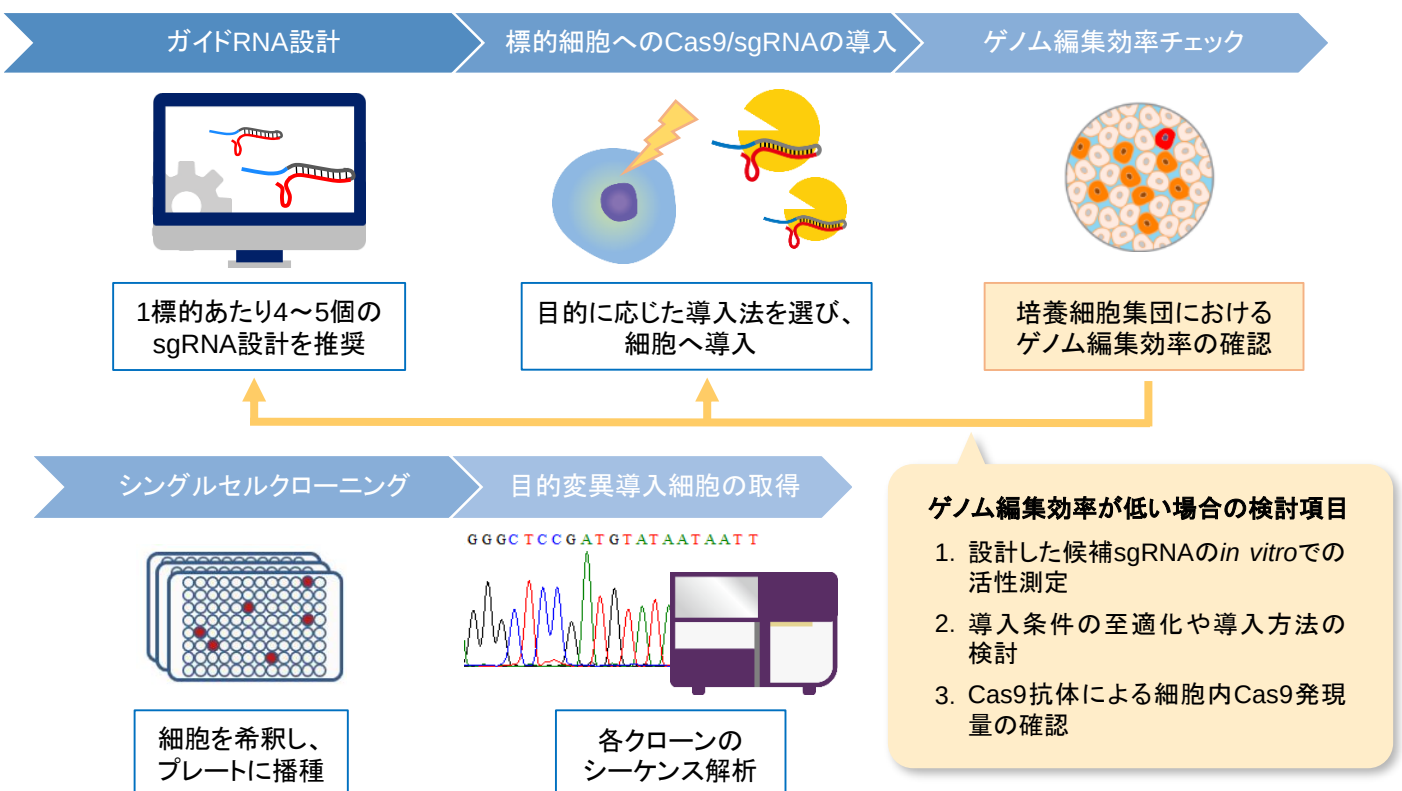
ゲノム編集に利用される修復システムは、主に2つあります。

一つが、非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) と呼ばれる修復です。この修復が起こる際にある一定の割合で、切断箇所を中心に塩基の欠失や挿入など、いわゆるInDelと呼ばれる修復エラーが発生します。このInDelが起こると、フレームシフトが起きてコドンの読み枠がずれ、その遺伝子がコードするタンパク質が正常に作られなくなり機能を失うことで、ノックアウト状態となります。

もう一つが、ノックインの場合に利用される相同組換え (homology-directed repair: HDR) という修復システムです。挿入したいフラグメント配列の左右に、ゲノム上のノックインしたい部分と相同な配列を付加した“ドナーDNA”を反応系に加えておくと、切断後、ドナーDNAの相同配列を参照しながら修復を行うため、結果、狙った箇所に新規フラグメントがノックインされます。



実験フロー ～培養細胞の場合～



本ガイドでご紹介する製品

タカラバイオでは、CRISPR/Cas9用のゲノム編集関連製品 **Guide-it™** シリーズを取り扱っており、ゲノム編集の上流から下流まで手厚くサポートいたします。

本ガイドでは、ゲノム編集に必須な **Cas9/sgRNAの導入システム** と、ゲノム編集の効率をアップさせる **サポートツール** をご紹介します。

● ゲノム編集には必須！ Cas9/sgRNAの導入システム

まずは最適な導入システム選びから！

タカラバイオがおススメする**4つ**のシステムとsgRNA調製キットをご紹介します。

システム1: Cas9タンパク質導入システム

- ☒ **Guide-it™ Recombinant Cas9シリーズ** p.3~4

オフターゲットのリスクが低く変異導入効率は高い、一番おススメの導入システム

- ☒ **Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kit** p.5~6

高品質なsgRNAを簡便に効率よく調製できるキット

システム2: プラスミドベクターシステム

- ☒ **Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green) / (Red)** p.7

sgRNAをクローニングするだけ！ 初心者の方にもおススメのプラスミドベクターシステム

システム3: エキソソーム様小胞によるシステム

- ☒ **Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System** p.8

導入効率が低い細胞に！ エキソソーム様小胞 (Gesicle) を利用したシステム

システム4: ウイルスベクターシステム

- ☒ **AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free Systemシリーズ** p.9~10

アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターによる導入システム

● ゲノム編集の効率をさらにアップさせるサポートツール

上記の導入システムと組み合わせれば、ゲノム編集の成功率や効率がさらにアップ！

- ☒ **Guide-it™ Complete sgRNA Screening System** p.11~12

sgRNAの調製から切断効率のチェックまでできるオールインワンキット

- ☒ **Guide-it™ Mutation Detection Kit** p.13~14

PCRと電気泳動で簡単に変異導入効率をチェック！

- ☒ **Guide-it™ Long ssDNA Production System v2** p.15~16

長い一本鎖ノックインドナー用DNAを簡単に調製

- ☒ **Guide-it™ Cas9 Polyclonal / Monoclonal Antibody** p.17

組換えCas9タンパク質を高感度に検出できる抗体

- ☒ **Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System** p.17

関連遺伝子をゲノムワイドにスクリーニング

● 関連製品

- ☒ **CRE Recombinase Gesicles** 裏表紙

エキソソーム様小胞を利用してCreリコンビナーゼを細胞に直接導入

● Cas9タンパク質導入システム

オフターゲットのリスクが低く変異導入効率は高い、一番おススメの導入システム

☑ Guide-it™ Recombinant Cas9シリーズ

NLS(核移行シグナル)付きなので、効率的な変異導入が可能です。

- ◆ エレクトロポレーションによる導入に最適なCas9タンパク質溶液
- ◆ ベクター導入システムに比べて、オフターゲット効果を抑制
- ◆ C末端にNLS(核移行シグナル)を付加。導入後速やかに核へ移行
- ◆ 高濃度(10 µg/µl)と低濃度(3 µg/µl)の2種類の製品をご用意

Cas9タンパク質を用いるゲノム編集の流れ

① Cas9とsgRNA※を用意



Cas9タンパク質

sgRNA

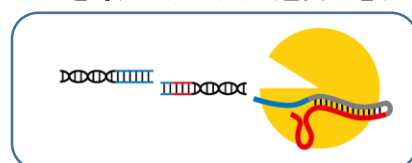
※sgRNAの調製にはGuide-it sgRNA *In Vitro* Transcription Kit (製品コード 632635、5~6ページ掲載)をお使いください。

② Cas9タンパク質とsgRNAの複合体(RNP)を形成



エレクトロポレーション
or
トランスフェクション

③ RNPを導入&ターゲット遺伝子を切断



細胞(株化、初代、iPS、ES etc.)、
組織、受精卵 など...

★ Cas9タンパク質を使用するメリット —プラスミドやウイルスによるCas9遺伝子導入法と比較して—

- ✓ 遺伝子を使わないため継続的なCas9の発現がなく、オフターゲットを抑制
- ✓ 対象生物ごとにプロモーターやコドンの最適化不要
- ✓ 導入するCas9タンパク量をコントロールし、ゲノム編集効率を最適化
- ✓ “転写・翻訳”のタイムラグがないので、迅速・効率的な変異導入が可能

遺伝子改変動物作製においてモザイク変異のリスクが低いいため、受精卵への使用例(★)が増えています！

★ 使用文献の一例

Hashimoto M, Yamashita Y and Takemoto T, Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev Biol.* 2016 Oct 1; **418**(1): 1-9.

■ 製品リスト 高濃度、低濃度の2種類をご用意！

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Recombinant Cas9 (10 µg/µl)	200 µg	632678	¥55,000
	500 µg	632679	¥101,000
Guide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl)	100 µg	632641	¥28,000
	100 µg × 3	632640	¥67,000

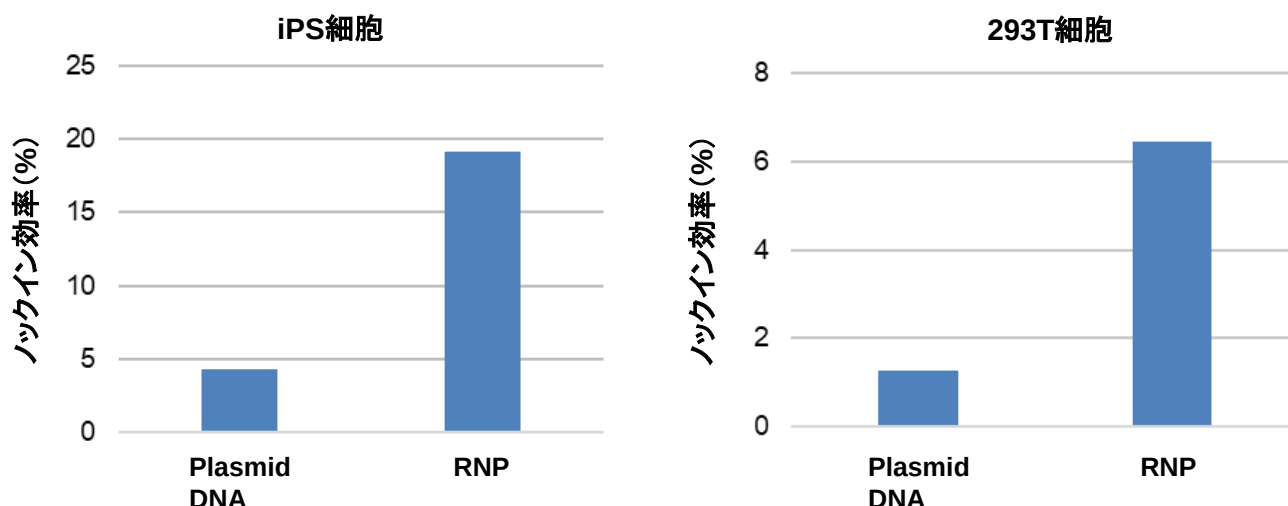
関連製品 Cas9タンパク質OK！ トランスフェクション試薬

培養細胞の場合、Cas9タンパク質とsgRNAの複合体(RNP)の導入にトランスフェクション試薬が有効な場合があります。タカラバイオではRNPの導入にも使用できるトランスフェクション試薬をご用意しています。ぜひお試しください！

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TransIT-X2® Dynamic Delivery System	0.3 ml	MIR6003	¥31,000
	0.75 ml	MIR6004	¥77,000
	1.5 ml	MIR6000	¥124,000

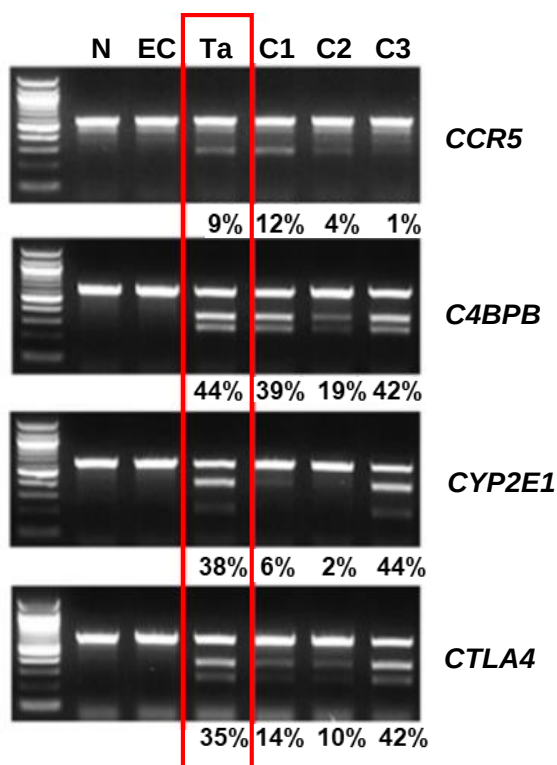
■ 変異導入効率の比較 プラスミドDNA vs Cas9タンパク質 & sgRNA複合体(RNP)

サーモフィッシュサイエンティフィック社のエレクトロポレーション装置Neonを使用して、プラスミドDNAもしくはGuide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl) とsgRNAの複合体(RNP)をZsGreen1低発現細胞(iPS細胞および293T細胞)に導入し、点変異導入(ノックイン)実験を行った。ZsGreen1低発現細胞は、開始コドンに変異を入れてZsGreen1の発現レベルを抑えており、点変異導入実験は開始コドン領域をターゲットとして発現レベルの回復を目的とした。フローサイトメーターによりZsGreen1発現回復細胞をカウントし、ノックイン効率を解析した。



プラスミドDNAより、Cas9タンパク質 & sgRNA複合体(RNP)を使用した方が高いノックイン効率を示しました。

■ 他社Cas9タンパク質との変異導入効率の比較



Guide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl) とGuide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit (製品コード 632635) を用いて作製したsgRNAをエレクトロポレーションでヒトiPS細胞に導入し、各ターゲット遺伝子のゲノム編集実験を行った。変異導入効率の確認にはGuide-it™ Mutation Detection Kit (製品コード 631448) を使用し、各%は切断効率を示している。

(TB USA社比較データ)

N: Negative Control
EC: エレクトロポレーション用コントロール
Ta: Guide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl)
C1: A社製品
C2: B社製品
C3: C社製品

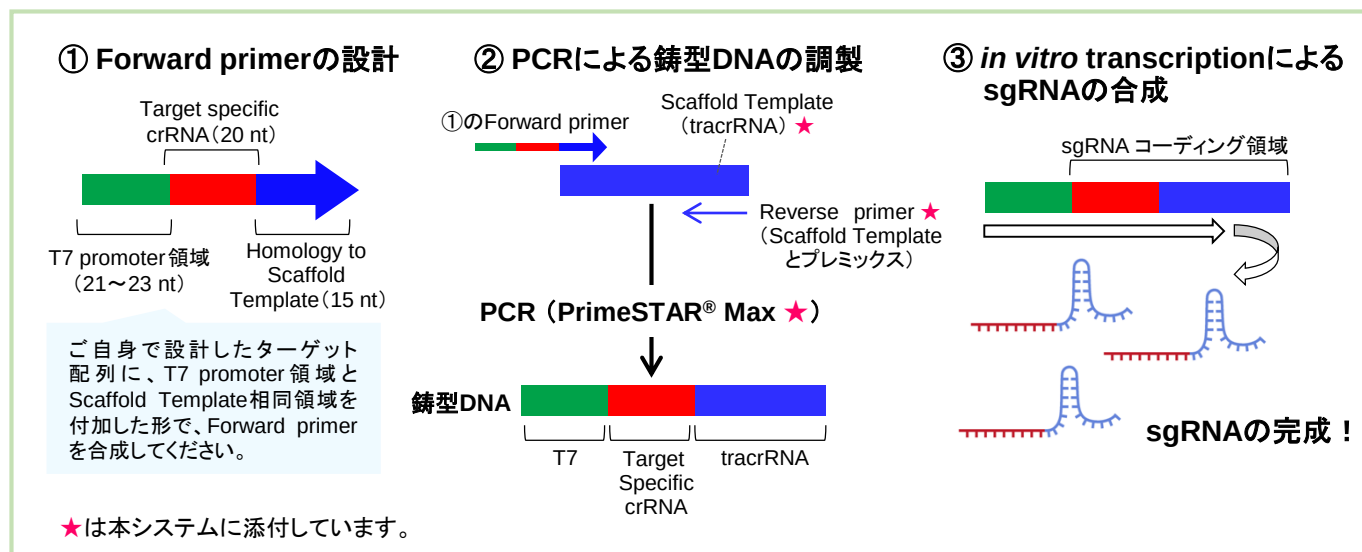


Guide-it™ Recombinant Cas9は、試したすべての遺伝子について効率的な変異導入を行うことができました。

高品質なsgRNAを簡便に効率よく調製

☑ Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit

■ sgRNAの調製フロー



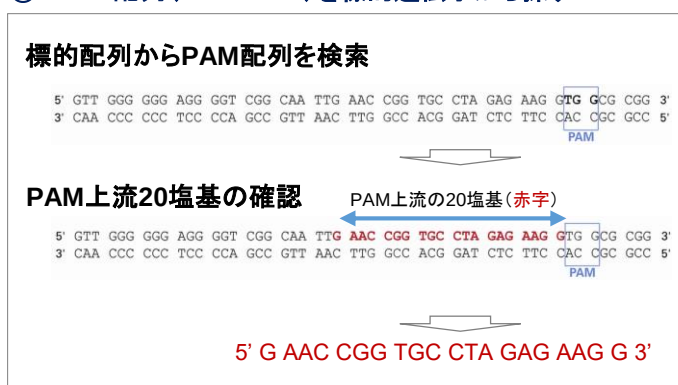
sgRNA設計のポイント

- ① ターゲット配列以外に完全一致配列を持つものは×。他と相同配列部分が少ないものを選ぶ
➡ オフターゲットの抑制
- ② 1遺伝子につき複数のsgRNAを設計する(3つ以上が望ましい)
➡ 効率の良いsgRNAを選択する
- ③ できるだけ変異導入箇所に近いPAM配列を選ぶ(特にノックインの場合)

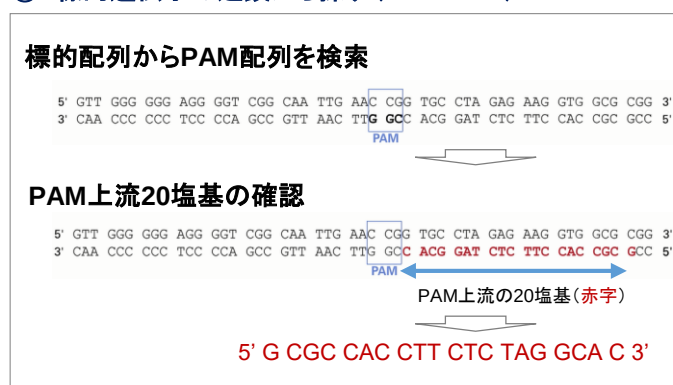


★ マニュアルでのsgRNA設計手順

① PAM配列(5'-NGG-3')を標的遺伝子から探す



② 標的遺伝子の逆鎖から探す(5'-CCN-3')



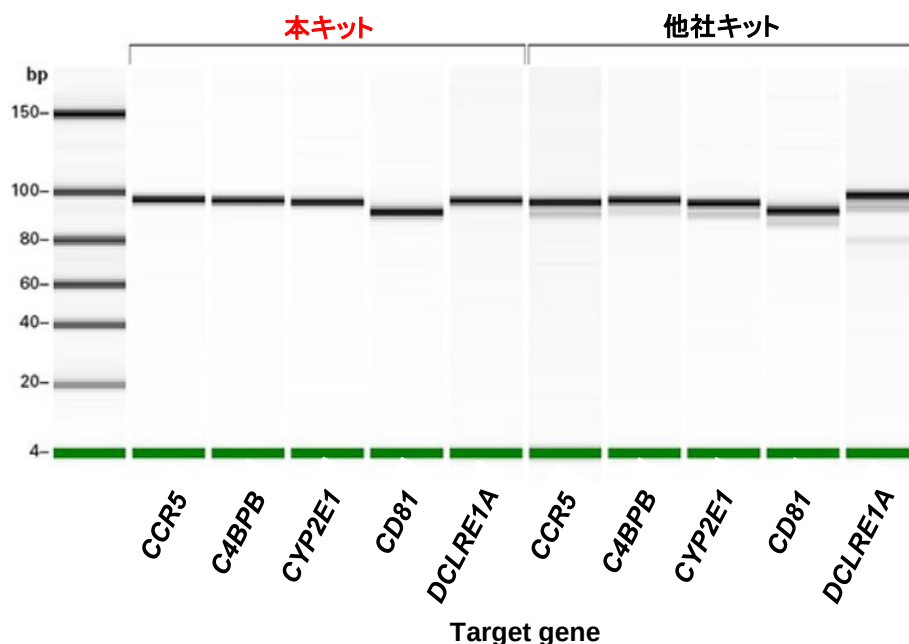
★ Online toolを用いたsgRNA設計

比較的よく使われるオンライン設計ツールと特徴

- CHOPCHOP : 候補となるsgRNAのランキング化。ゲノム配列上の類似配列の数をリスト化
- CRISPRdirect : 標的配列に特異的、かつゲノム上の類似配列が少ない候補sgRNAをハイライトで表示
- GGenome : 短い配列の相同検索が得意

■ 他社キットとの合成sgRNAの品質比較

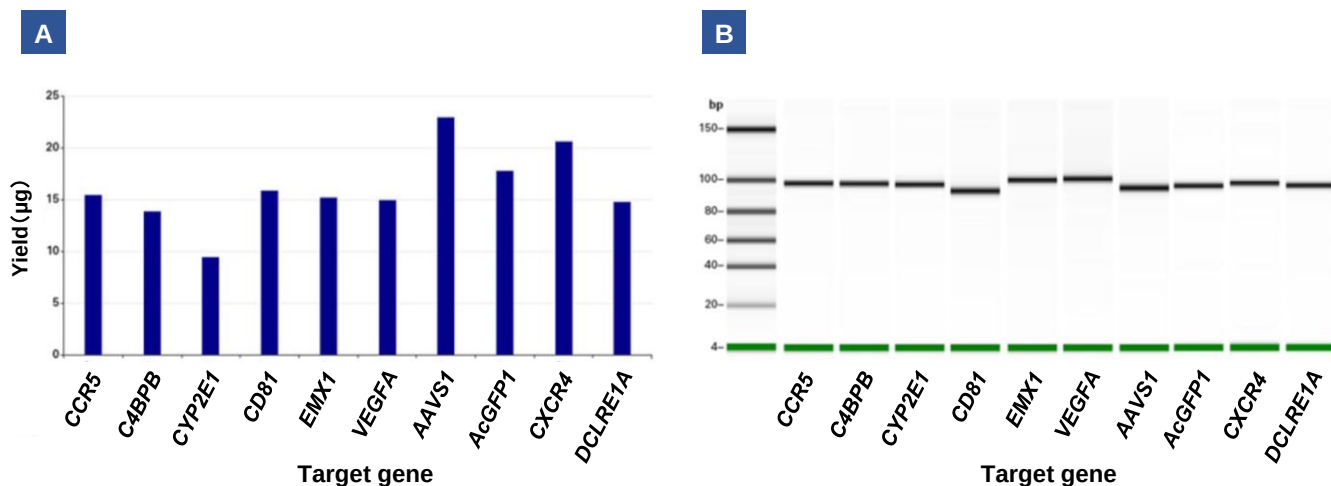
Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitで調製したsgRNAと他社キットで調製したsgRNAを比較した。
(TB USA社比較データ)



Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitで調製したsgRNAは全てシングルバンドとなっており、他社キットに比べて高品質でした。

■ sgRNAの収量と品質

Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitを用いてsgRNAを調製(反応条件: 20 μ l, 37°C, 4時間)し、NanoDrop spectrophotometerでsgRNAの収量を調べた(パネルA)。
また、Agilent Bioanalyzerを用いてsgRNAの品質を調べた(パネルB)。



高品質なsgRNAを高収量で調製できるGuide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitを一度お試しください！

■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	50回	632635	¥166,000

※ 本キットはGuide-it Complete sgRNA Screening System(製品コード 632636、11~12ページ掲載)にも含まれています。

● プラスミドベクターを用いた導入システム

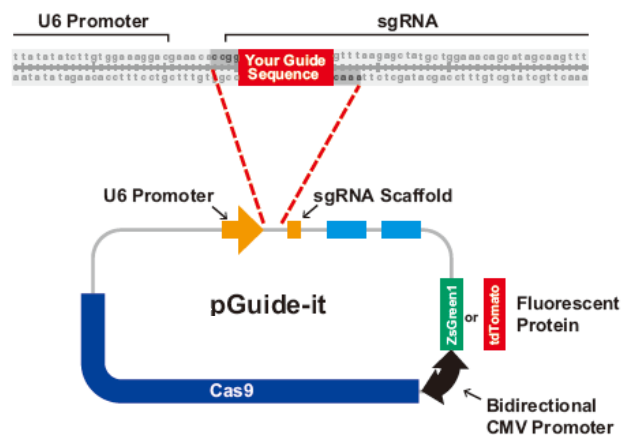
とにかく簡単に変異導入実験をしたいときにおススメのプラスミドベクターシステム

☑ Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green) / (Red)

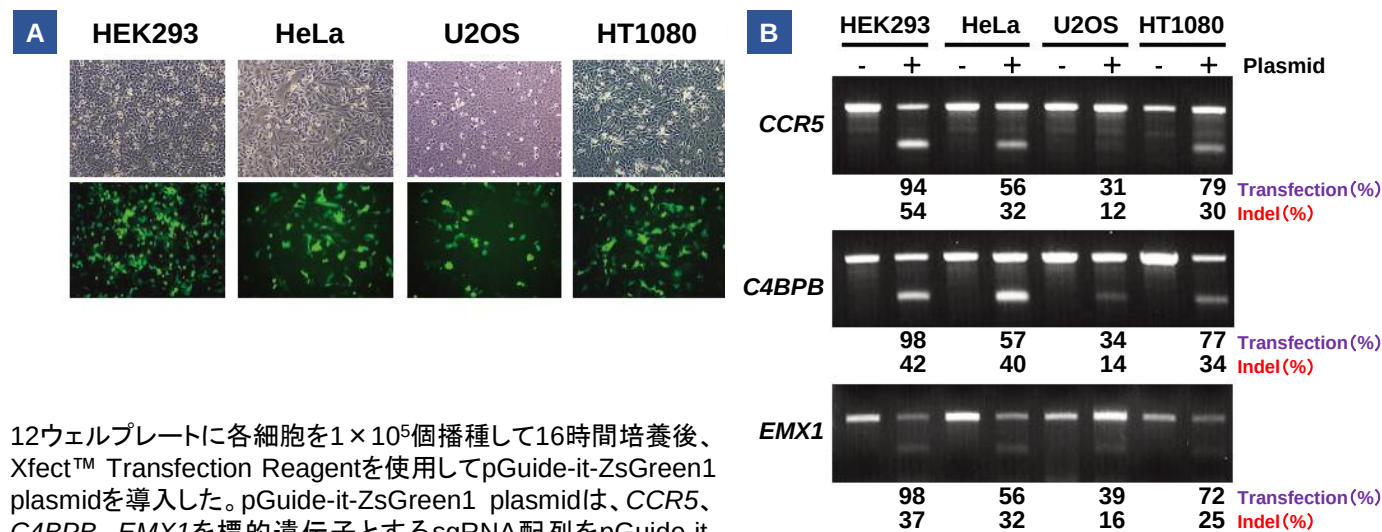
sgRNA配列をベクターにクローニングするだけで、すぐに変異導入実験が開始できます。

- ◆ Cas9とsgRNAを同時に発現できる便利なワンベクタータイプ
- ◆ 予めベクターが線状化されているので、sgRNA発現用オリゴDNAのクローニングも簡単
- ◆ 蛍光タンパク質 (ZsGreen1またはtdTomato) を搭載し、導入効率のモニタリングが可能

pGuide-it Vectorの構造



■ さまざまな細胞に対する編集効率の比較



12ウェルプレートに各細胞を 1×10^5 個播種して16時間培養後、Xfect™ Transfection Reagentを使用してpGuide-it-ZsGreen1 plasmidを導入した。pGuide-it-ZsGreen1 plasmidは、CCR5、C4BPB、EMX1を標的遺伝子とするsgRNA配列をpGuide-it-ZsGreen1 Vectorにクローニングして作製し、各2.5 µgを使用した。トランスフェクションから48時間後にZsGreen1の蛍光を蛍光顕微鏡で確認 (パネルA) し、フローサイトメーターでトランスフェクション効率 (パネルB、Transfection %) を測定した。ゲノムDNAへの変異導入効率の測定には、Guide-it™ Mutation Detection Kit (製品コード 631448) を用いた。アガロースゲル電気泳動を行い、デンストメーターで変異導入の割合 (パネルB、Indel %) を求めた。

Guide-it™ CRISPR/Cas9 Systemを使うことで、トランスフェクション効率のモニタリングを蛍光タンパク質で行いました。また、試したすべての細胞に対して、変異導入を確認できました。

■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green)	1 Kit	632601	¥81,000
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red)	1 Kit	632602	¥81,000

● エクソソーム様小胞 (Gesicle) を用いた導入システム

トランスフェクション効率が低い細胞 (初代細胞、iPS細胞・幹細胞など) でも効率よくゲノム編集が可能

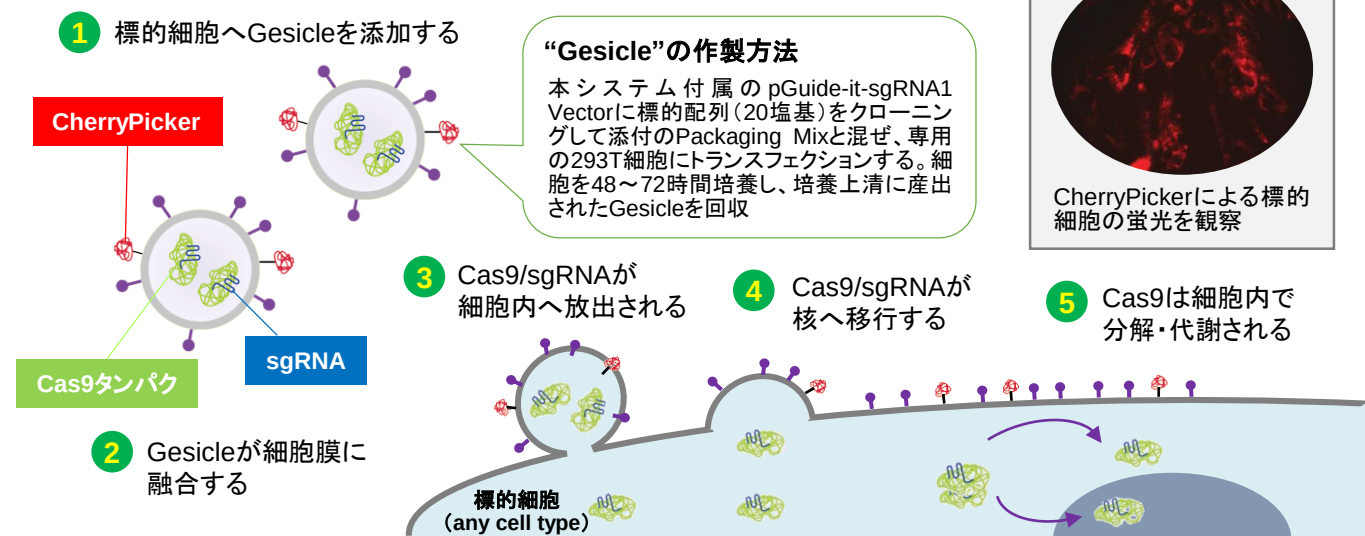
☑ Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System

エクソソーム様小胞を用いてCas9タンパク質／sgRNA複合体を細胞に直接導入します。

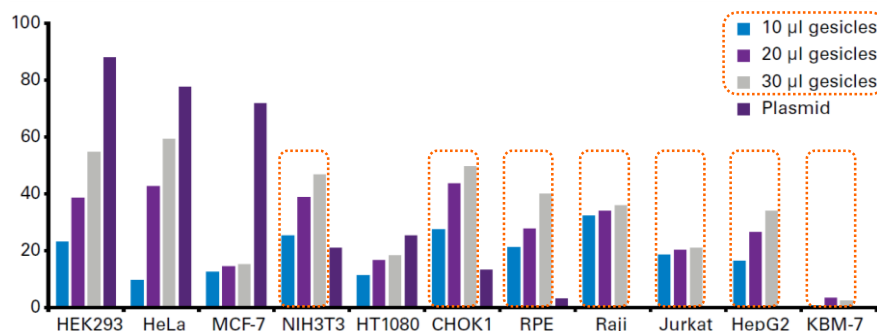
CRISPR/Cas9 Gesicle とは？

- ◆ 細胞膜に親和性を持つエクソソーム様小胞 “Gesicle” にCas9/sgRNA複合体を封入
- ◆ プラスミドベクターでは導入効率の悪い細胞に最適
- ◆ Cas9タンパク質を直接導入するので、オフターゲット効果が低い
- ◆ 表面にCherryPicker™ 赤色蛍光タンパク質がついており、蛍光によるGesicleの産生および導入効率のモニターが可能

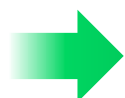
Cas9/sgRNA Gesicleの細胞内での動き



■ さまざまな細胞におけるノックアウト効率の比較



ZsGreen1発現ユニットをゲノム上に1コピー挿入したさまざまな細胞株を樹立し、Cas9/sgRNA Gesicleによるゲノム編集 (遺伝子ノックアウト) を行った。ZsGreen1を標的として設計したCas9/sgRNA Gesicle (それぞれ10 µl、20 µl、30 µl添加)、または比較としてCas9/sgRNAを発現するプラスミドで処理し、フローサイトメーターによりノックアウト (KO) 効率を評価した。



特にプラスミドベクターではノックアウト効率の悪い細胞について、Gesicleでは改善が見られました。

■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格 (税別)
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System	1 Kit	632613	¥166,000
Gesicle Producer 293T Cell Line ※	1 ml	632617	¥67,000

※ Gesicleの作製には、専用の293T Cell (本製品) の使用を推奨しています。

● アデノ随伴ウイルスベクターを用いた導入システム

Cas9タンパク質やプラスミドベクターで入りづらい場合におすすめのシステム

☑ AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free Systemシリーズ

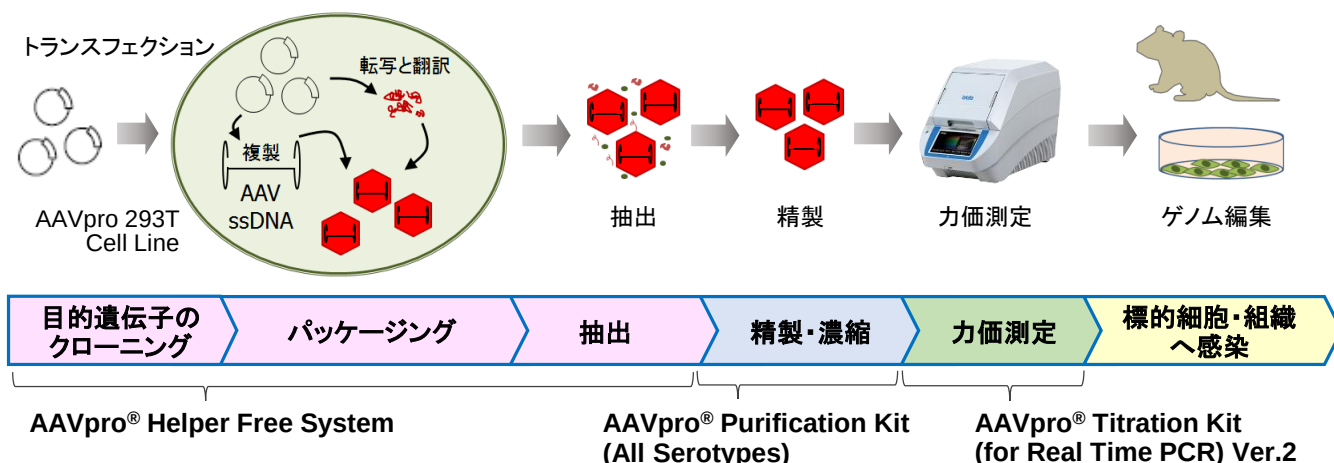
ウイルスの感染力を利用した、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターによるCas9 & sgRNAの導入システムです。特にプラスミドベクターでは編集効率の低い細胞におすすめです。

- ◆ AAVベクターを用いてCas9、sgRNAを導入
- ◆ Cas9のゲノムへの組み込みによる持続的なCas9の発現を排除し、細胞毒性やオフターゲットの影響を軽減
- ◆ AAV CRISPR/Cas9の生成に必要な全てのコンポーネントを含んだAll-in-Oneシステム

AAVベクターの特長

- ✓ P1レベルの施設で取扱いが可能
- ✓ 増殖／非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能
- ✓ 非増殖細胞では長期間の発現が可能
- ✓ 免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも最適
- ✓ 宿主域の広いAAV2ベクターは広範囲の細胞・動物組織に導入可能

AAVベクター作製の実験フローと対応製品



■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
ゲノム編集のためのAAVベクター調製システム（詳細は次ページ）			
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632608	¥166,000
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632619	¥166,000
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Vector System	1 Kit	632618	¥100,000

AAV産生に最適化した293T細胞

AAVpro® 293T Cell Line	1 ml	632273	¥81,000
------------------------	------	--------	---------

さまざまな血清型のAAVベクターに適用できる高効率な精製キット

T225プラスコ5本相当の産生細胞からAAVベクターを精製するために必要なバッファー、濃縮カラムが4回分含まれています。

AAVpro® Purification Kit Maxi (All Serotypes)	4回	6666	¥146,000
---	----	------	----------

さまざまなAAVベクターの力価測定が可能

AAV2由来のITRをターゲットとしてベクターゲノム量を定量します。ウイルス粒子内に封入されているベクターゲノムのITR領域がAAV2由来であれば、血清型に関わらず本製品を使用できます。

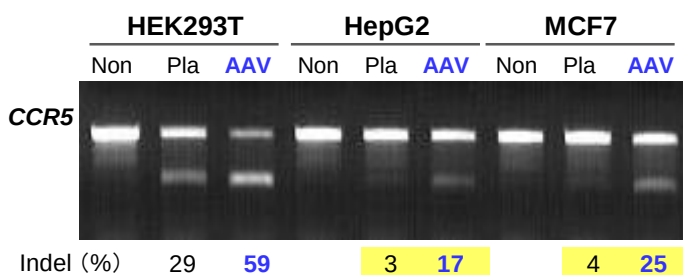
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	100反応分	6233	¥92,000
---	--------	------	---------

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)

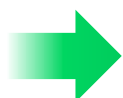
遺伝子サイズが4.1 kbと大きいCas9 (*Staphylococcus pyogenes* 由来: **SpCas9**) 遺伝子を2つのベクターに分割することで、AAVベクターによるCas9導入を可能にしました。

■ AAVpro® CRISPR/Cas9 System (※) とプラスミドベクターのゲノム編集効率の比較

12ウェルプレートに 1×10^5 個の細胞を播種して一晩培養後、CCR5遺伝子をターゲットとしてゲノム編集を行うため、AAV2-UpおよびDownベクターをそれぞれ 1×10^5 タイター分（ベクターゲノム定量法）感染させた。72時間後に細胞を回収し、ゲノムDNAへの変異導入効率をGuide-it™ Mutation Detection Kit（製品コード 631448）を用いて測定した（アガロースゲル電気泳動後、デンストメーターで変異導入の割合を測定）。比較実験として、pGuide-it-ZsGreen1プラスミドベクターをXfect™トランスフェクション試薬を用いて導入した（Pla: 2.5 µg）。



- ※SpCas9 を用いた2ベクタータイプのAAVウイルスベクターシステム
- ※通常のPAM配列(NGG)を用いてsgRNAを設計



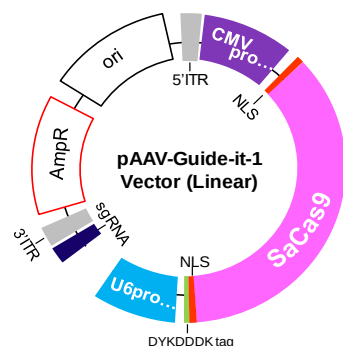
プラスミドベクターではゲノム編集効率が低い細胞株 (HepG2、MCF7) でも、AAVベクターシステムでは高い変異導入効率が得られました。

AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System(AAV2)

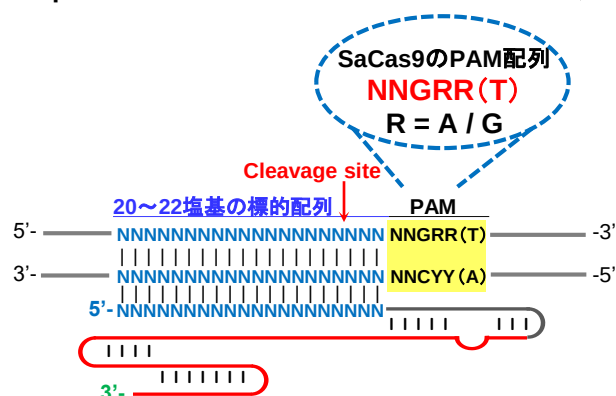
遺伝子サイズが3.3 kbと小さいSaCas9 (*Staphylococcus aureus* 由来: **SaCas9**) の遺伝子を採用することで、**1つのAAVベクター**でのゲノム編集が可能となりました。

小さなCas9 “SaCas9”を用いたAAVpro® CRISPR/SaCas9 System

☑ 1つのAAVベクターでSaCas9遺伝子とsgRNAの発現が可能に！



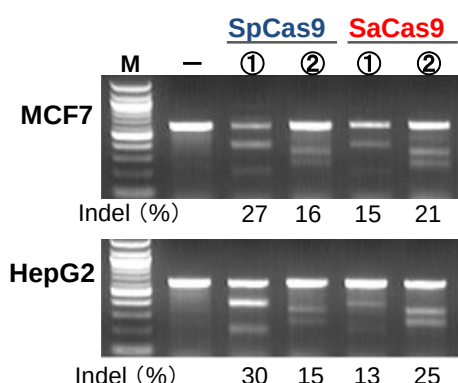
1つのAAVベクター内に、SaCas9遺伝子とsgRNAの搭載が可能になりました。*in vitro*および*in vivo*でさまざまな細胞に対するゲノム編集を行うことができます。

☒ SpCas9とは異なるPAM配列 NNGRR(T)を認識

PAM配列としてNNGRR(T)を認識し、その3塩基上流を切断します。(Nはどの塩基でもよく、RはAまたはG。(T)はできるだけ考慮することを推奨します。)

★ sqRNAは、**オンライン設計ツール**で設計可能です。

■ AAVベクターを用いたSaCas9とSpCas9のゲノム編集効率の比較



AAVpro® CRISPR/Cas9 System (2ベクタータイプ: **SpCas9**)ならびに AAVpro® CRISPR/SaCas9 System (1ベクタータイプ: **SaCas9**)を用いて、CYP2遺伝子Exon1の2か所の配列(①、②)を標的としてsgRNAを設計し、それぞれAAVベクターを作製した。

12ウェルプレートに 1×10^5 個の細胞を播種して一晩培養後、SpCas9の2ベクター、またはSaCas9のAAVベクターをそれぞれ 1×10^5 MOI (ベクターゲノム定量法) で感染させた。ゲノムDNAへの変異導入効率 (Indel%) は、**Guide-it™ Mutation Detection Kit** (製品コード 631448) により比較した。



SpCas9を用いた2ベクタータイプとSaCas9を用いた1ベクタータイプのAAVベクターで実施したゲノム編集では、同程度の変異導入効率が得られました。

● sgRNAの切断効率の確認

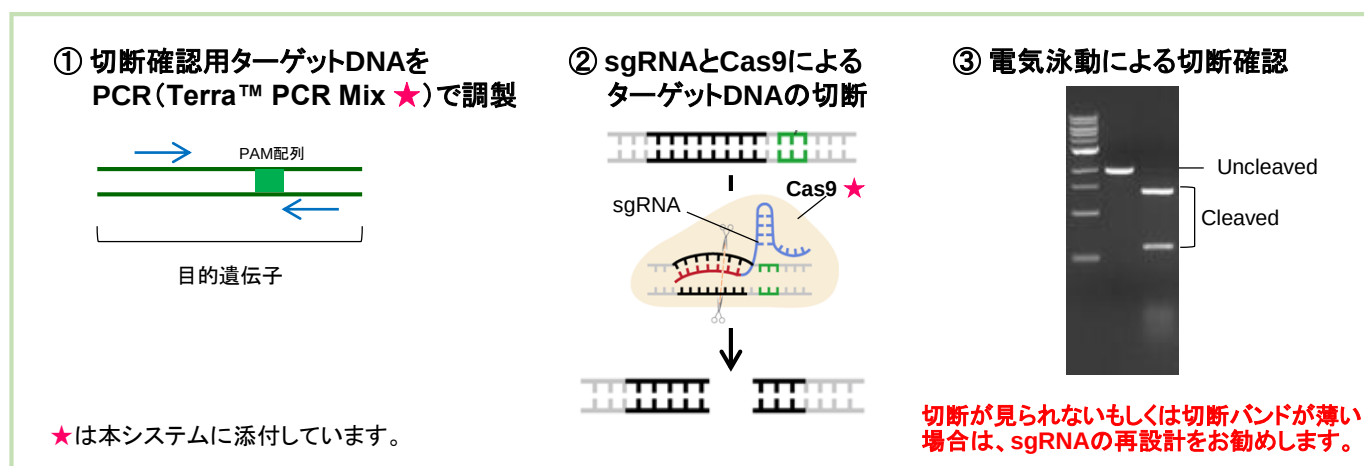
ワークしないsgRNAを使ってしまうリスクを減らし、CRISPR/Cas9の成功率をUp

☑ Guide-it™ Complete sgRNA Screening System

実サンプルを使わずに*in vitro*でsgRNAのスクリーニングを行うことができるキットです。

- ◆ *in vitro*でCRISPR/Cas9を模擬的に再現し、sgRNAの切断効率をダイレクトに確認
- ◆ 組換えCas9タンパク質とsgRNA調製用キットが入ったAll-in-One キット
- ◆ 調製したsgRNAはそのまま本番実験に使用可能

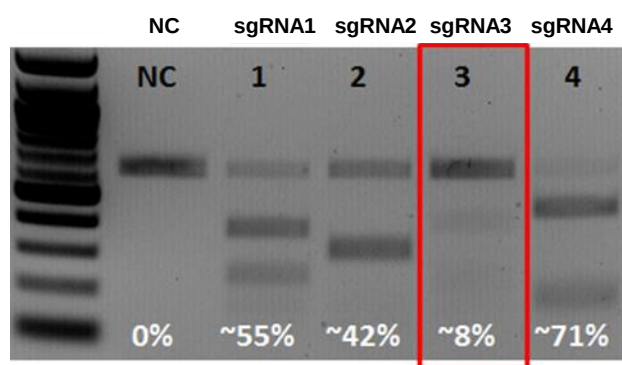
■ 切断効率の確認フロー



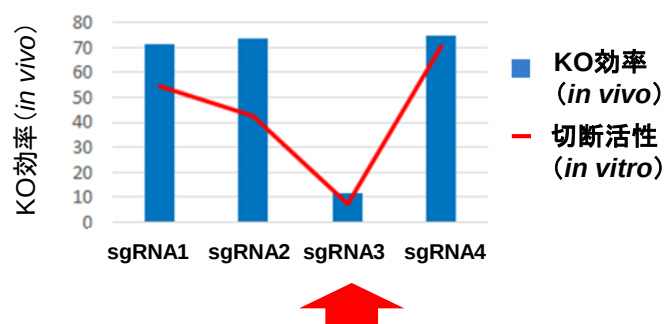
■ Guide-it™ Complete sgRNA Screening Systemを使用した*in vitro*と*in vivo*の相関結果

HeLa細胞のCXCR4を標的とした4つの異なるsgRNAの切断活性を、*in vitro*と*in vivo*で比較した。*in vivo*でのKO効率の測定は、CXCR4を特異的に認識するFITC標識抗体を用いたフローサイトメーターに供したときのCXCR4のKnock Outの割合で示した。

in vitro 切断アッセイ



in vivo knock-out実験



*in vitro*での切断効率が最も悪かったNo.3のsgRNAは、*in vivo*のKO効率も一番悪く、相関した結果となりました。このような効率のよくないsgRNAを大事な本番実験で使ってしまわないためにも、本キットを使用し事前に有効性をご確認ください！

■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	50回	632636	¥199,000
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit ※1	50回	632635	¥166,000
Guide-it™ sgRNA Screening Kit ※1	50回	632639	¥87,000
Guide-it™ IVT RNA Clean-Up Kit ※2	50回	632638	¥81,000

※1はGuide-it Complete sgRNA Screening Systemの構成品です。※2はScreening Systemおよび*In Vitro* Transcription Kitに含まれます。

gRNAの有効性事前確認キットの使用で、変異導入を確かなものに

理化学研究所 脳神経科学研究センター 豊島学様

gRNA(ガイドRNA)の有効性を*in vitro*で事前確認するキット Guide-it™ Complete sgRNA Screening System(製品コード 632636)を使用した実施例を、理化学研究所 豊島学様にご提供いただきました。

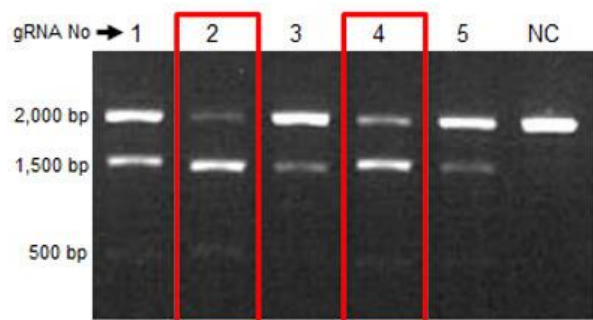
豊島様の詳しいご研究内容やCRISPR/Casに関するお話をお聞かせいただきましたので、是非ご一読ください。

◆ 実験の背景

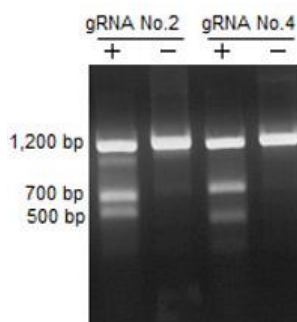
私の研究室では、統合失調症や発達障害の治療や予防のために、疾患メカニズムの解明を行っている。患者由来のiPS細胞から疾患モデル細胞株の樹立を目指し、そのためにゲノム編集技術(CRISPR/Cas)を使用している。ヒトiPS細胞でターゲット遺伝子Aのノックアウトを行う際に、より有効なgRNAを選択することで本番実験での失敗リスクを軽減するために、タカラバイオのGuide-it™ Complete sgRNA Screening SystemでgRNAの切断効率の事前チェックを行った。切断効率のよかったgRNAをヒトiPS細胞でのゲノム編集に使った。

◆ 実験内容および結果

ヒトiPS細胞のターゲット遺伝子Aのノックアウトを目的として5つのgRNAを設計し、Guide-it™ Complete sgRNA Screening Systemで*in vitro*での切断効率の確認を行った(パネルA)。その結果から、切断効率のよかったgRNA 2種類(No.2と4)を選択し、ヒトiPS細胞でのノックアウト実験に供した。変異導入効率をGuide-it™ Mutation Detection Kit(製品コード 631448/631443)で確認したところ、いずれのgRNAを使用した場合も変異導入が見られ(パネルB)、シーケンスでもDeletionが起こっていることが確認できた。



A Guide-it Complete sgRNA Screening Systemによる*in vitro*でのsgRNAの切断効率の確認



B ヒトiPS細胞での変異導入効率の確認結果

◆ 豊島様のご研究内容について教えてください。

統合失調症の病因・病態解明を行っています。具体的には発達障害仮説というものがあり、赤ちゃんが母親のお腹の中にいるときに起こる何かしらの要因によって、頭の中の神経系の発達がおかしくなり、統合失調症になるのではと考えられています。以前からネズミではこの仮説はよく研究されておりますが、ヒト神経細胞を用いた発達障害仮説の研究は、ここ数年で始まったばかりです。我々のところでは、統合失調症の患者様由来の皮膚細胞からiPS細胞を作って神経系細胞に分化させてモデル細胞を樹立し、発達異常が起こるかどうか、そして起こる場合の仕組みはどうなっているのかなどの研究をしています。

◆ ゲノム編集を行う目的は何でしょうか。

統合失調症患者様で同定された遺伝子変異が、本当に統合失調症に関わっているのかを明らかにするためです。健康人由来細胞の特定の遺伝子をゲノム編集でノックアウトして異常が起こるかどうかを見ています。また逆に、患者様由来細胞の遺伝子変異を修復することで異常が直るかどうかも見たいと考えており、ノックインも検討中です。

◆ 弊社のゲノム編集関連製品をお知りになったきっかけは何ですか。

元々、iPS細胞の培地を探しているときに、タカラバイオが扱っているフィーダーフリー用培地のDEF-CSを見つけました。そしてタカラバイオ主催の技術セミナーに参加し、そこでタカラバイオのゲノム編集関連製品を知りました。

◆ 他にも、実際にお使いになっているタカラバイオのゲノム編集関連製品はありますか？

ゲノム編集後の変異導入効率の確認にはGuide-it™ Mutation Detection Kit(製品コード 631448)を使っています。Cas9/gRNAの導入に最初はプラスミドベクターを使っていたのですが、最近はタカラバイオのCas9タンパク質 Guide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl)(製品コード 632641)を使っており、以前使っていた他社Cas9タンパク質よりうまくいっています。

◆ ありがとうございました。

● ゲノム編集効率をざっくり簡単にチェック

変異導入効率をざっくり簡単に確認し、次の詳細な解析に進むかどうかの当たりをつけるキット

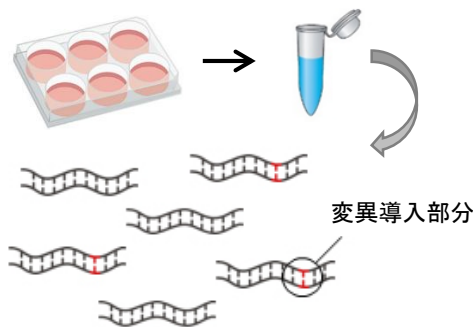
☑ Guide-it™ Mutation Detection Kit

CRISPR/Cas9、ZFNs、TALENsなどによる変異導入効率を簡単＆迅速に確認できるキットです。

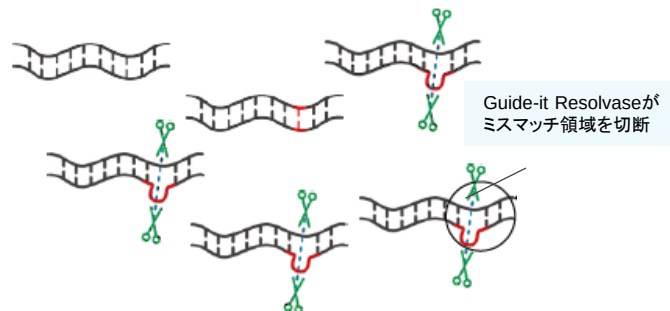
- ◆ PCRと電気泳動という簡単な手法で変異導入効率を確認
- ◆ 他社同タイプキットより高感度アッセイが可能
- ◆ 阻害物質に強いPCR酵素付きで、動植物組織からの直接PCRが可能
- ◆ 実験系が問題ないか確認できるポジティブコントロール付き

■ Guide-it™ Mutation Detection Kitの操作フロー

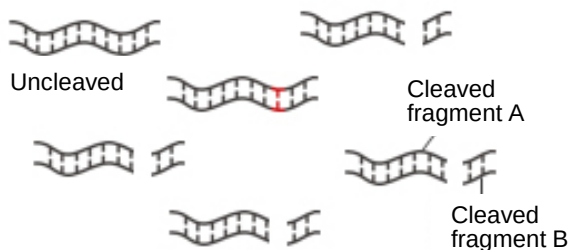
① 細胞ライセートからTerra™ PCR Direct Polymerase Mixを用いて標的配列を直接増幅



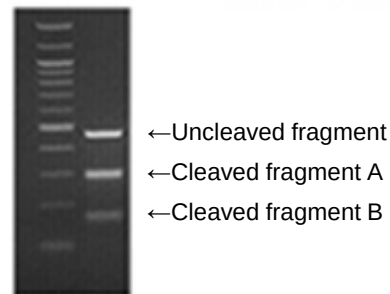
② 変性＆再アニーリングしてGuide-it™ Resolvaseで処理



③ Guide-it™ Resolvaseによって切断されたミスマッチDNA



④ アガロースゲル電気泳動による切断フラグメントの確認(切断＝変異導入あり)



切断が見られない、もしくは切断バンドが薄い場合は、変異導入実験の再試行をお勧めします

こんな場合におススメです！

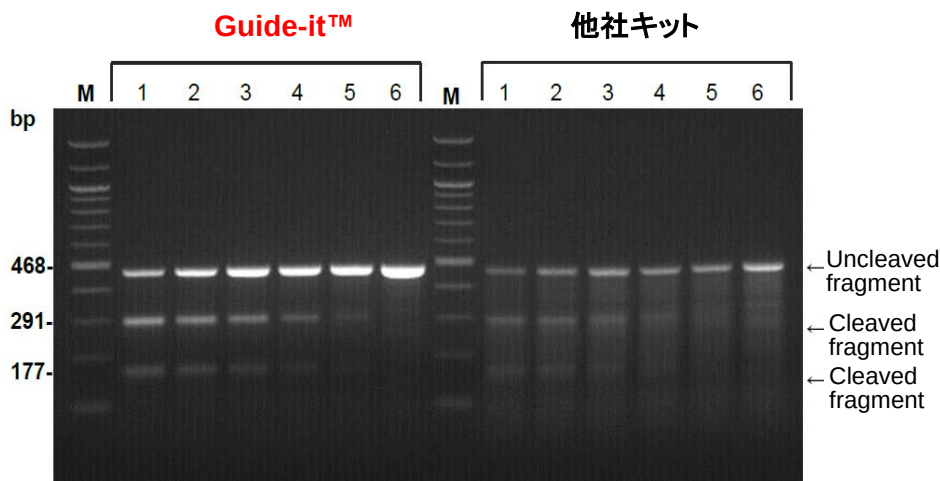
★ 細胞をクローン化しシーケンスする前にゲノム編集効率を確認し、次に進むかどうか当たりをつけたい

目的の変異導入が起こったかどうかは、例えば細胞であればクローン化し、最終的にシーケンスで確認する必要があります。しかし、そもそも変異導入が全く起こっていない、もしくは効率が著しく低ければどうでしょうか？ クローン化の手間やシーケンスの手間の多くが無駄になってしまいます。本キットを使えば、ざっくり簡単に変異導入効率を確認できますので、クローン化やシーケンス解析に進むかどうか、それとも最初からやり直すかの判断ができ、効率Upにつながります！

■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Mutation Detection Kit	25回	631448	¥34,000
	100回	631443	¥98,000

■ Guide-it™ Mutation Detection Kitと他社キットとの比較



Cas9を発現するプラスミドとAAVS1 locusに特異的なsgRNAをコードするプラスミドをトランスフェクションして48時間培養した293T細胞と、トランスフェクションしていない細胞とを6段階の比率で混合した後、変異検出を行った。Terra™ PCR Polymerase Mixを用いてターゲットとなるAAVS1 locusを含む領域を増幅し、PCR産物を精製後、Guide-it™ Resolvaseまたは他社キット中の酵素で切断し、電気泳動に供した。
(TB USA社比較データ)

Guide-it™ Mutation Detection Kitの電気泳動パターンはクリアでしたが、他社製品ではスミアを呈しました。これはミスマッチDNA切断酵素 (Guide-it™ Resolvase) の性能差に起因すると考えられます。

この違いが5倍以上の検出感度の差を生み出します！

Q & A

Q1 Guide-it™ Resolvaseは、SNP (1塩基変異) にも働きますか？

A1 Guide-it™ Resolvaseはミスマッチ部分の構造の違いを認識して切断する酵素で、1塩基変異は構造変化が少ないため切断できません。1塩基挿入や1塩基欠失は検出可能です。SNPの検出には**Guide-it™ Knockin Screening Kit** (製品コード 632659) の使用をお勧めします。

Q2 クローン化した細胞の変異導入の判定に使用できますか？

A2 クローン化した細胞に対して本キットを使用した場合、片アレル変異の場合や、両アレル変異でも異なる変異が入った場合は切断されますが、両アレルに同じ変異が入ったクローンと野生型は切断されません。本キットはゲノム編集後の細胞集団に変異が含まれるかどうかを確認するためのキットで、クローン化した細胞に使用はお勧めできません。クローン化した細胞の同定には**Guide-it™ Genotype Confirmation Kit** (製品コード 632611) の使用をお勧めいたします。

Q3 キットに含まれるGuide-it™ Resolvaseの別売はありますか？

A3 別売はありません。

Q4 PCR産物を精製した場合、Guide-it™ Resolvaseの反応はそのまま使用できますか？

A4 PCR産物を精製した場合は、Guide-it™ Resolvase反応時にサンプルに等量の2×Terra PCR Direct Bufferを加えてご使用ください。

Q5 細胞をExtraction Bufferで溶解した抽出液を、保存することはできますか？

A5 Extraction Buffer 1およびExtraction Buffer 2で抽出してPCR-grade waterを加えた抽出液は、-20℃で約6か月保存可能です。

● 長い一本鎖ノックイン用DNA (Long ssDNA) 調製キット

CRISPR/Cas9での長鎖ノックイン実験の効率をUp

☑ Guide-it™ Long ssDNA Production System v2

PCRと酵素 (Strandase) 処理という簡単な操作で長い一本鎖DNAが調製できます。

- ◆ CRISPR/Cas9のノックイン用長鎖ssDNA調製キット
- ◆ 0.5~5 kbまでのssDNAが調製可能
- ◆ 独自技術の「Strandase処理」で二本鎖を一本鎖化
- ◆ クローニング操作、ゲル抜き精製不要の簡単プロトコール
- ◆ 10 µgのdsDNAから2~4 µgのssDNAを調製

CRISPR/Cas9で効率よく長鎖ノックイン実験を行うためのポイントの一つは、**ドナーDNAを一本鎖DNA (ssDNA) で用意すること(★)**です。本キットを使用すると、簡単な操作で0.5~5 kbの長鎖ssDNAが調製できます。

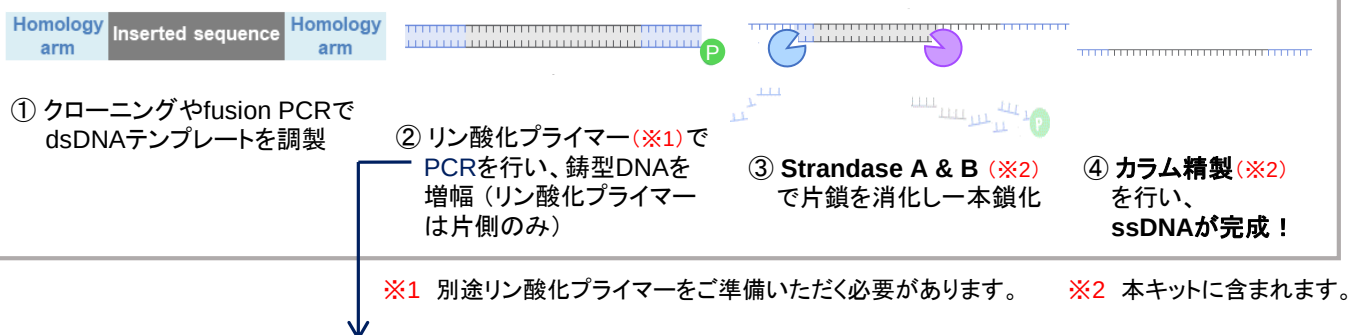
蛍光・薬剤マーカー、loxPサイト、発現カセット、プロモーターなど長鎖DNAのノックイン効率を少しでもUpしたい方はぜひお使いください！

★ ssDNAを使うメリットは？

二本鎖DNA (dsDNA) に比べて・・・

- ✓ ランダムインテグレーションが起きにくい。
- ✓ 特にプラスミドと比べて細胞毒性が低く、ノックイン効率が高い。
- ✓ バックグラウンドが低い。

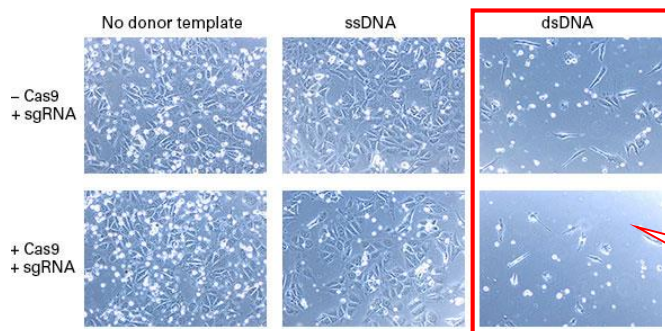
プロトコールの概要



PCRエラーが気になる？

いいえ、大丈夫です。キット添付のPCR酵素「PrimeSTAR® Max」は、50万塩基あたりエラーはわずか10数塩基の高正確性酵素です。ほとんどエラーを心配する必要はありません！

■ Cellartis® hiPSC18を用いたノックイン実験でのdsDNAおよびssDNAドナーテンプレートの細胞毒性比較



Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit (製品コード 632635) で合成したsgRNAを、Guide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl) (製品コード 632641) と複合体 (RNP) を形成させ、エレクトロポレーションでヒトiPS細胞にドナーテンプレート添加・非添加条件で導入した。48時間後、細胞毒性を観察した。

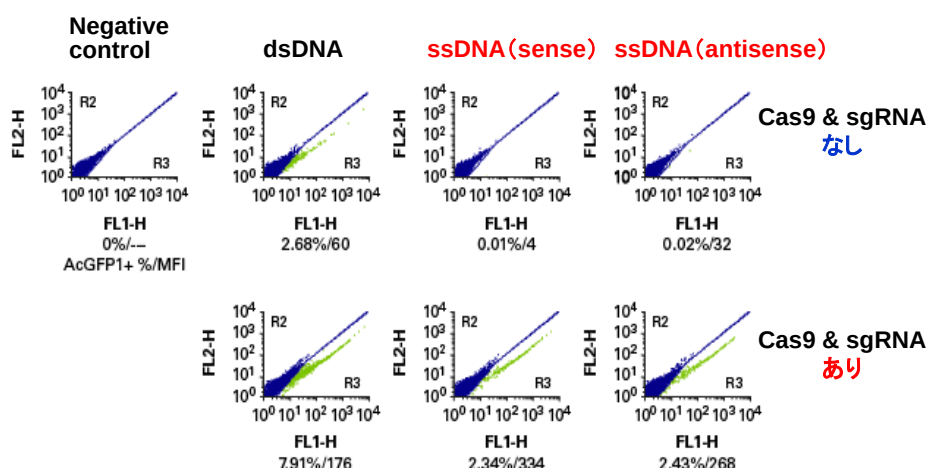
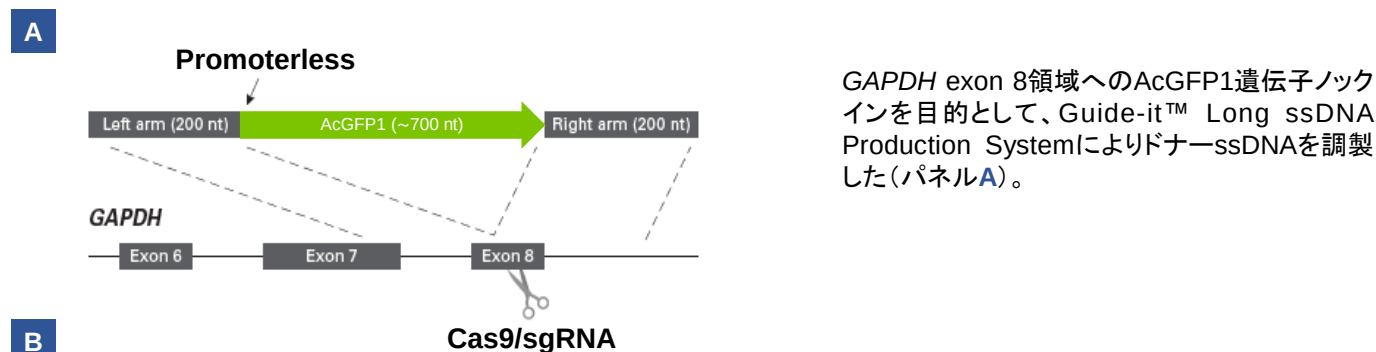
dsDNAドナーを用いた場合は、Cas9存在下・非存在下に拘わらず顕著な細胞毒性が認められました。

■ 製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Long ssDNA Production System v2	50回 ※	632666	¥87,000

※ センス鎖25回、アンチセンス鎖25回分

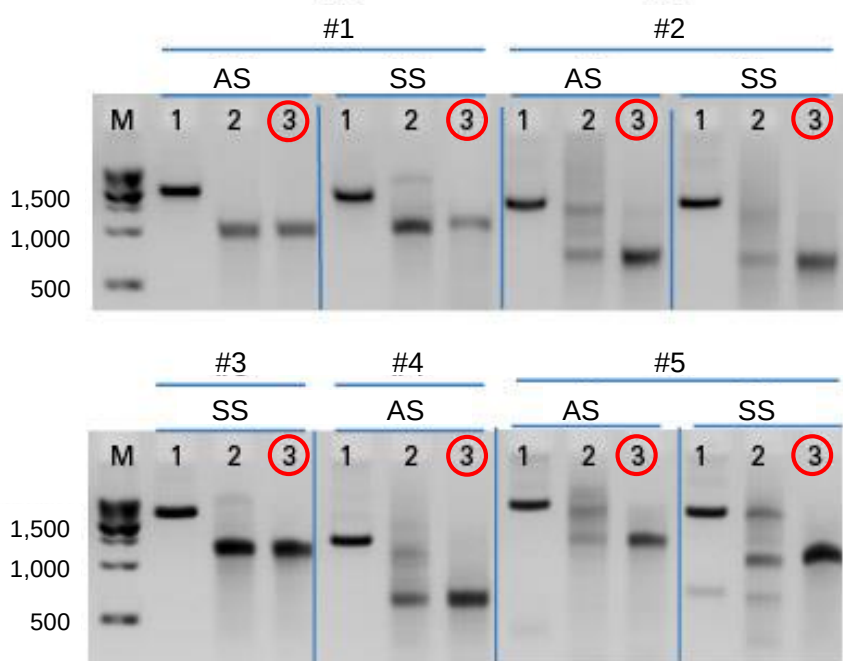
■ AcGFP1遺伝子のノックインによる目的タンパク質の蛍光タグ付け



変異導入後のHEK293細胞をフローサイトメーターで解析した結果、センス、アンチセンスともssDNAドナーを使用した場合は蛍光が観察された。一方、dsDNAを使用した場合は、Cas9とsgRNAの非存在下でも蛍光が観察され、バックグラウンドが高い問題点が示された(パネルB)。

Guide-it™ Long ssDNA Production Systemで調製したssDNAを用いて、蛍光タンパク質によるタグ付けができました。バックグラウンドもほとんどないので、効率のよい目的クローンの取得が可能です！

■ 本製品(v2)と従来製品(v1:終売)とのssDNA作製効率の比較



従来製品 Guide-it™ Long ssDNA Production System (v1) では高純度のssDNAの調製が困難だったいくつかのdsDNAテンプレート(#1~#5)について、本製品(v2)を使用してssDNAを調製し、電気泳動で比較した。

すべてのケースにおいて、Guide-it™ Long ssDNA Production System v2では、従来製品に比べて目的外の産物の少ないクリアなssDNAのバンドが確認でき、より完全で均一な選択的分解ができていることが示唆されました。

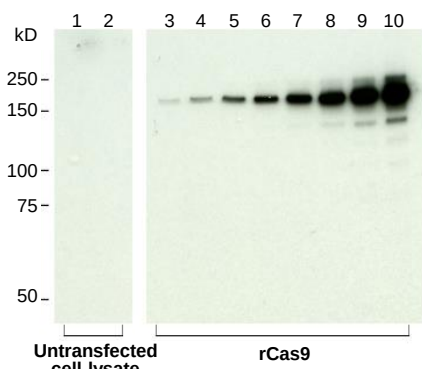
組換えCas9タンパク質の高感度検出が可能な抗体

☑ Guide-it™ Cas9 Polyclonal / Monoclonal Antibody

CRISPR/Cas9に用いる*Streptococcus pyogenes*由来の組換えCas9タンパク質を検出できます。

- ◆ 組換えCas9タンパク質に対するウサギポリクローナル抗体／マウスモノクローナル抗体
- ◆ ポリクローナル抗体はwild-type Cas9だけでなくバリエーションも認識
- ◆ 高感度：ウェスタンブロッティングにより、わずか 0.5～1 ngの組換えCas9が検出可能

■ Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibodyを用いたrCasタンパク質の検出〔ウェスタンブロッティング〕



0.15～20 ngの組換えCas9(rCas9)タンパク質を電気泳動後、ブロッティングし、Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody(1:1,000 希釈)を用いて検出した。二次抗体はHRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody(1:5,000 希釈)を使用し、ECL試薬で検出した。ネガティブコントロールにはHT1080、HEK293細胞の細胞ライセートを用いた。

レーン 1: HT1080細胞ライセート(3.5×10^4 cells)
 2: HEK293細胞ライセート(3.5×10^4 cells)
 3: rCas9 protein 0.15 ng 7: rCas9 protein 2.5 ng
 4: rCas9 protein 0.30 ng 8: rCas9 protein 5.0 ng
 5: rCas9 protein 0.625 ng 9: rCas9 protein 10.0 ng
 6: rCas9 protein 1.25 ng 10: rCas9 protein 20.0 ng

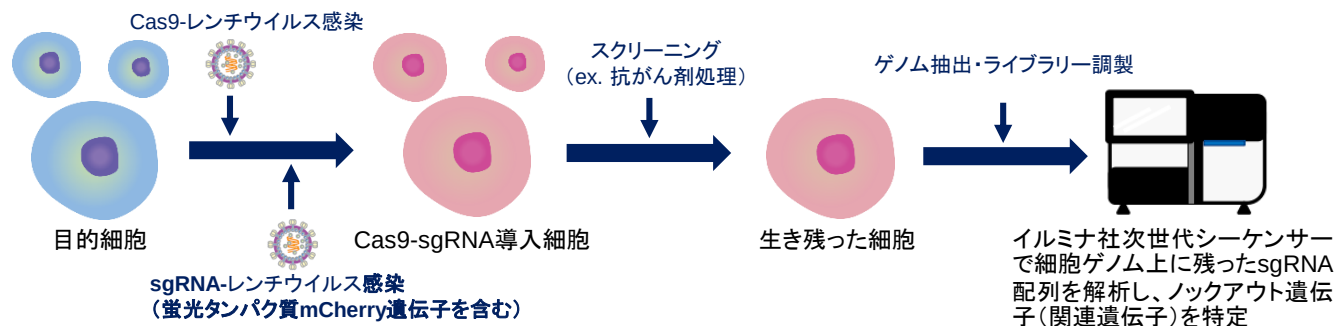
製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody	100 µl	632607	¥45,000
Guide-it™ Cas9 Monoclonal Antibody (Clone TG8C1)	100 µg	632628	¥45,000

ヒト細胞株で表現型の変化に関連する遺伝子をゲノムワイドにスクリーニングできるシステム

☑ Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System

- ◆ CRISPR/Casのノックアウトを利用した関連遺伝子特定のためのスクリーニングシステム
- ◆ Cas9とsgRNAの導入にレンチウイルスを使用しており、幅広い細胞で効率の良い導入が可能
- ◆ プール型なので簡単に網羅的な解析が可能
- ◆ 約19,000種類の遺伝子に対し、オフターゲットを考慮した4種類のsgRNA(約76,000種類)が設計済み

■ スクリーニングのフロー



製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System	5スクリーニング	632646	¥550,000
Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library NGS Analysis Kit ※	10回	632647	¥111,000

※ NGS用ライブラリー調製のために必要です。

ゲノム編集実験に関してよくご質問いただく内容を、「Q&A」としてまとめました。ぜひご一読ください！



Q1. Cas9タンパク質によるゲノム編集はメリットが多いが、プラスミドベクターでの導入にメリットはないの？

A1. いいえ、Cas9タンパク質の導入は難しくてもプラスミドなら入るケースはありますし、sgRNA配列さえクローニングすれば1ベクターでCas9、sgRNA両方の導入ができるというお手軽さも魅力です。タカラバイオでは、1ベクターでCas9とsgRNAの両方を発現でき、さらに蛍光マーカーを搭載したプラスミドGuide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green) / (Red) (製品コード 632601 / 632602)をご用意しています。とにかく簡単にまずはやってみたいときには、プラスミドの使用をおすすめします。

Q2. オフターゲットによる変異が入ったかどうかの確認はどうすればいいの？

A2. 全ゲノムに対して、オフターゲット変異が入ったかどうかを正しく評価することは非常に困難です。ゲノム編集後にオンターゲット配列以外に変異が入っていたとしても、突然変異に因る可能性もあるからです。ゲノム編集を医療に応用する場合はオフターゲットリスクをシビアに検証する必要がありますが、そうでない場合、予めターゲット配列と相同性の高い領域をピックアップしておき、そこに変異が入っていなければオフターゲット変異が入った可能性は低いと判断することが多いようです。

少し話が変わりますが、変異導入実験を行って得られた表現型の変化がオフターゲットに因るものかどうかを確認するには、同一ターゲット遺伝子に対して複数のsgRNAを設計して変異導入実験を行い、同じ表現型が得られればオフターゲットに起因する可能性は低いと考えられます。

Q3. 各アレルにきちんと変異が入ったかどうかを調べるにはどうしたらいいの？

A3. 培養細胞を使ってゲノム編集を行う場合、細胞1個1個に対して独立して変異が入りますが、さらに各アレルへの変異導入も独立して起こります。つまり、2倍体であれば変異無し／変異無し、変異有り／変異無し、変異有り／変異有りのパターンが生じる可能性があります。どのパターンかを調べるためには、細胞をシングルクローン化した後に、TAクローニングなどで片アレル由来のフラグメントが入ったプラスミドを調製・クローン化し、シーケンス解析を行います。経験的に、1アレル当たり4プラスミドクローンをシーケンスすれば十分な場合が多く、2倍体であれば8プラスミドクローンをシーケンスすれば、その細胞のアレルパターン情報が得られると考えています。

Q4. 色々試したが、CRISPR/Casでなかなか変異がうまく入らない。どうすればいい？

A4. CRISPR/Casは非常にシンプルなシステムですが、変異導入がうまくいかない原因として、色々なファクターが考えられます。そこでまずお勧めするのは、変異導入がちゃんと行える系を構築することです。sgRNA配列は変異導入がうまくいくかどうかの重要なファクターの一つですが、いきなりご自身のターゲット配列用にsgRNA設計をして実験を行うのではなく、文献等でノックアウトが起こった実績のあるsgRNA配列を使用して実験を行います。これで宿主のターゲット配列に対して変異導入が起こればワークする系が構築できたことになり、変異導入が起これなければ、実験手法に問題がある可能性が非常に高いということになります。ワークする系が構築できた上で、ご自身が設計したsgRNA配列を使用して実験を行い変異が入らなければ、sgRNA配列に問題があることが考えられます。このようにワークする系を構築しておけば、うまくいかなかった場合の原因を特定しやすくなります。

また、ノックインはノックアウトに比べて成功率が低い場合が多いので、特にいきなりご自身のターゲットに対して実験を行うのではなく、ワークする系を構築されることを推奨いたします。

エキソソーム様小胞を利用してCreリコンビナーゼを細胞に直接導入

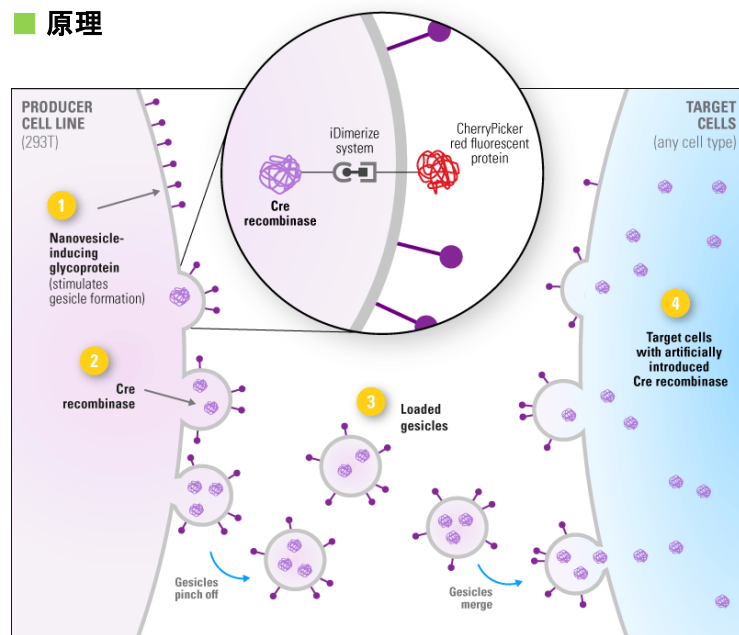
☑ CRE Recombinase Gesicles

- ◆ プラスミドやウイルスベクターを用いた遺伝子導入より簡単
- ◆ 高活性のCreリコンビナーゼを確実、効率的に導入

CRE Recombinase Gesicleとは？

CRE Recombinase Gesicleは、その内部に高濃度のCreリコンビナーゼ酵素タンパク質を包含したエキソソーム様小胞です。

■ 原理

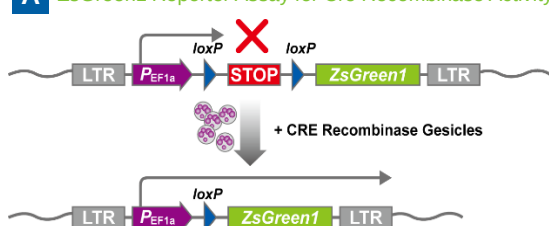


- ① 293T細胞の細胞膜上にグリコプロテインが生成すると細胞内からエキソソーム様小胞の形成が誘導され、Gesiclesが放出されます。
- ② iDimerize技術によりCreリコンビナーゼは赤色蛍光タンパク質CherryPickerと結合し、Gesicles内に包含されます。
- ③ 細胞からGesicleを取り出し、哺乳類の培養細胞に加えると、Gesiclesは細胞膜と融合し、Creリコンビナーゼを細胞内に放出します。
- ④ Creリコンビナーゼは核移行シグナルを持っているため核に輸送され、細胞ゲノム上でloxPサイト間の組換えを起こすことが可能となります。さらに、Creリコンビナーゼの細胞への導入をmCherryの蛍光によりモニターすることも可能です。

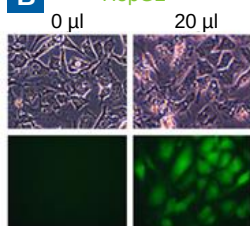
* CherryPicker蛍光タンパク質：赤色蛍光タンパク質mCherryとトランスフェリンレセプター膜アンカードメインの融合タンパク質

■ さまざまな細胞におけるCRE Recombinase GesicleによるZsGreen1 レポーターアッセイの実験例

A ZsGreen1 Reporter Assay for Cre Recombinase Activity



B HepG2



pLVX-LoxP-ZsGreen1は、loxPで挟まれたストップコドンカセットによりZsGreen1 cDNAとEF1αプロモーターが分断されており、Creリコンビナーゼによってストップコドンカセットが取り除かれると、ZsGreen1が高発現する(パネルA)。

HepG2細胞にpLVX-LoxP-ZsGreen1を導入し、蛍光顕微鏡によりZsGreen1の発現を観察した(パネルB)。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
CRE Recombinase Gesicles	200 μl	631449	¥92,000

・イルミナ社とは、Illumina, Inc. (本社：米国カリフォルニア州サンディエゴ)の日本法人であるイルミナ株式会社(本社：東京都港区)をいいます。
 ・本パンフレットで紹介した製品はすべて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。
 ・ライセンスなどに関する最新の情報は弊社ウェブサイトをご覧ください。
 ・本パンフレッ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。
 ・本パンフレット記載の価格は2023年12月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2023年12月修正N

タカラバイオ株式会社

東日本支店・西日本支店
 関西支店・営業第2部
 テクニカルサポートライン

TEL 03-3271-8553
 TEL 077-565-6969

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

Website

<https://www.takara-bio.co.jp>

Facebook

<https://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店