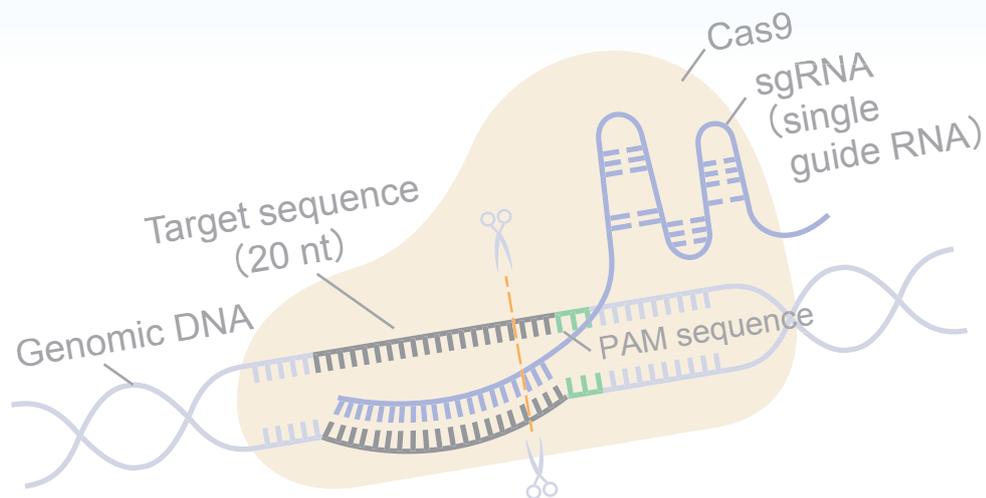


ゲノム編集実験ハンドブック

Handbook for Gene Editing Experiment



ゲノム編集の概要

ガイドRNAの
設計・調製



標的細胞への導入

ゲノム編集効率の
確認

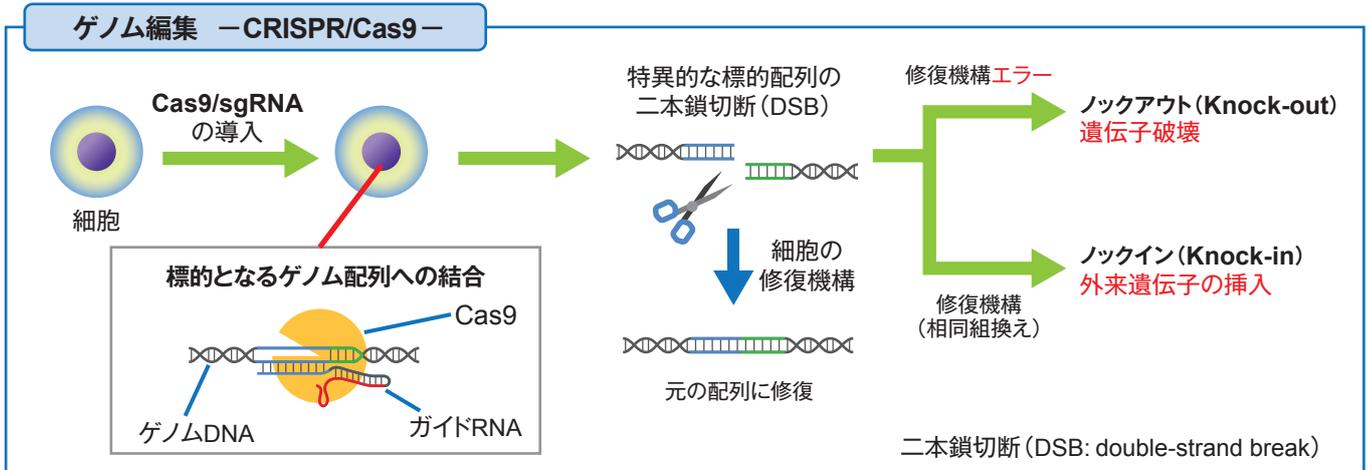


ゲノム編集とは

CRISPR/Cas9システムは、“Cas9”タンパク質とRNA分子である“ガイドRNA”の複合体によって、細胞内でゲノムDNA上の任意の領域を正確に切断することで、遺伝子のノックアウト（遺伝子破壊）やノックイン（外来遺伝子の挿入）を行うゲノム編集技術の1つです。ゲノム編集を用いた遺伝子のノックアウトやノックインは、細胞が本来持っているゲノム二本鎖切断の修復機構を利用した技術です。



ゲノム編集 - CRISPR/Cas9 -



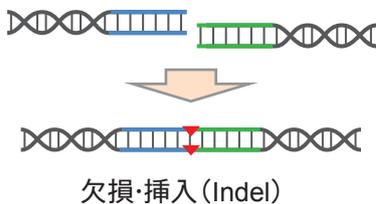
ガイドRNA (gRNA: guide RNA) について

Cas9と複合体を形成したガイドRNAは、標的配列を特異的に認識し、その配列をCas9タンパク質が切断します。

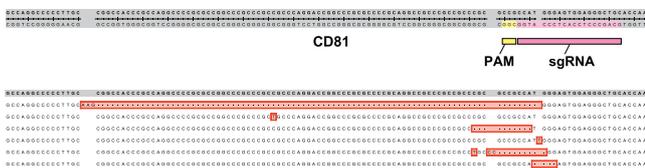
ガイドRNAは、(1) crRNA と (2) tracrRNA の2分子からなります。

この2分子をリンカー配列で1分子化したのが sgRNA (single guide RNA) であり、現在広くゲノム編集で使われています。

Knock-out



ノックアウト実験の例

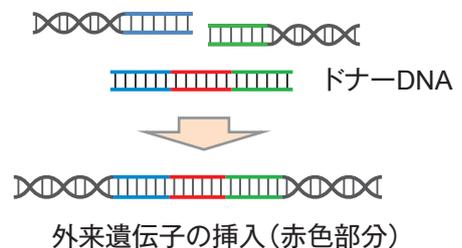


CRISPR/Cas9によるCD81遺伝子のノックアウト (挿入・欠失)

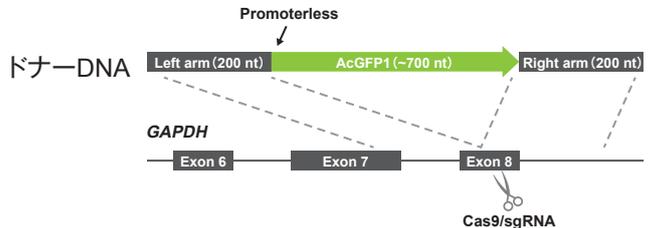


筋肉量を増加させたマダイ
マダイにおいて、ミオスタチン遺伝子をCRISPR/Cas9によりノックアウトすることで、筋肉量を増加させることに成功している。

Knock-in



ノックイン実験の例



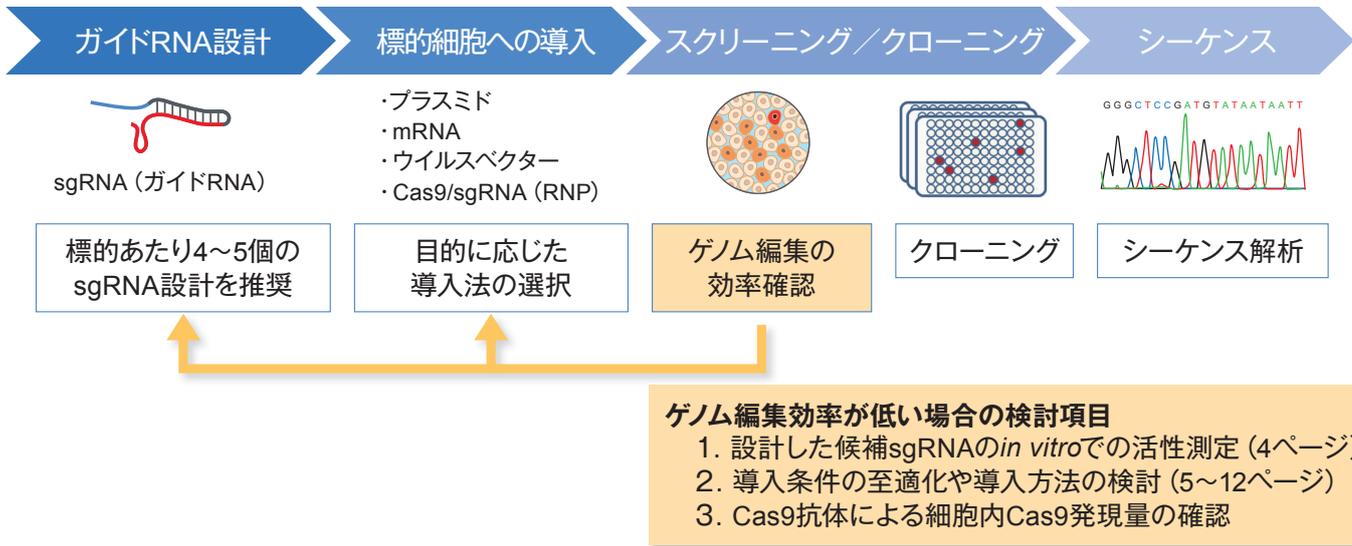
CRISPR/Cas9による蛍光遺伝子 (AcGFP1) の挿入



作物の除草剤耐性
外来遺伝子をゲノムに挿入したトウモロコシが有名である。

- ゲノム編集技術は、医療・食料・農業・エネルギー分野で幅広く利用されています。
- 植物のゲノム編集の例として、アサガオの花や茎の色に関するアントシアニン合成酵素遺伝子をノックアウトすることにより、白花の変異体を作成することに成功しています。

◆ 実験フロー ◆◆◆◆



◆ 最近のゲノム編集研究のトレンド ◆◆◆◆

Cas9タンパク質とsgRNAの複合体 (RNP) を“直接”導入



Cas9タンパク質とsgRNAの複合体 (RNP: Ribonucleoprotein) は細胞導入直後からDNA切断活性が“アクティブ”なため、速やかに標的配列を切断できます。さらに、RNPは細胞内で速やかに分解されるため、**標的配列以外のゲノム上の類似配列の切断 (オフターゲット作用)** を回避する効果も期待できるため、最近のゲノム編集研究のトレンドになっています。
(関連ページ: 5~8ページ)

参考文献

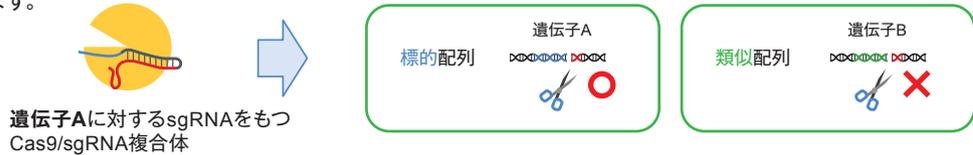
Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions.
Hendriks WT. *et al.*, *Cell Stem Cell* 2016; **18**: 53.

オフターゲット効果 (作用) とは

Off-Target

標的配列 (遺伝子A) に対して設計したsgRNAが遺伝子Aを切断してゲノム編集が起こることを“**オンターゲット**”とした場合、その標的遺伝子以外のゲノム上の類似配列 (例えば 遺伝子B) を切断してゲノム編集が起こることを“**オフターゲット効果**”と呼んでいます。

オフターゲット効果をできるだけ抑えるため、RNPを直接細胞に導入する方法が有効であり、数多くの論文が報告されています。



参考文献

- High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells.
Fu Y. *et al.*, *Nature Biotechnology* 2013; **31**: 822-826.
- Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins.
Sojung K. *et al.*, *Genome Res.* 2014; **24**: 1012-1019.

◆ CRISPR/Cas9の導入法のメリット・デメリット ◆◆◆◆

導入条件	RNP複合体	DNA		RNA
導入法	Cas9タンパク質 + sgRNA	発現プラスミド (Cas9とsgRNA遺伝子)	ウイルスベクター (Cas9とsgRNA遺伝子)	Cas9 mRNA + sgRNA
メリット	・オフターゲット効果の低減 ・受精卵や植物の実績	・初心者でも簡単 ・多検体スクリーニング	・プラスミドで導入困難な細胞 ・In vivo実験 (AAVなど) に有効	受精卵での実績
デメリット	—	・生物種に最適なプロモーターの選別が必要 ・Cas9のコドンの最適化が必要	・ウイルスベクター調製が必要 ・遺伝子組換え実験施設での取扱いが必要	Cas9 mRNAの調製が必要
関連ページ	5~8ページ 12ページ	9~10ページ	11ページ	—

ガイドRNAの設計・調製

ガイドRNAの設計について

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集実験で最初に行うのが、ガイドRNAの設計です。ガイドRNA設計で重要なポイントは、標的遺伝子に対して高い切断活性を有すること、標的遺伝子以外のゲノム上の配列を切断しないことの2点です。ガイドRNA設計には、無料オンライン設計ツールがよく利用されますが、設計手順の説明のため、マニュアルでの設計手順を以下に紹介します。なお、ガイドRNAの設計条件は、Cas9の由来生物種により異なります（PAM配列が生物種により異なるため）。ここでは、現在最も広く用いられている *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*) 由来Cas9*について説明します。

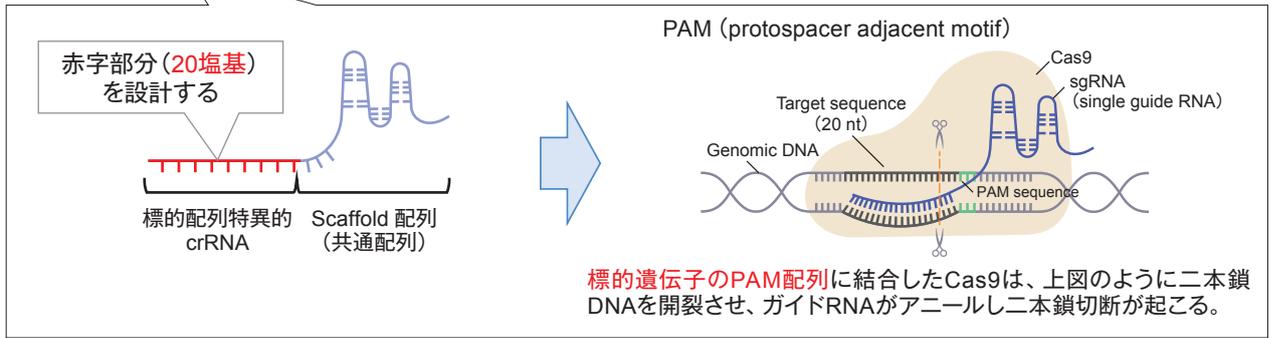
**S. pyogenes* Cas9のPAM配列は、5'-NGG-3' (Nは任意) です。

ガイドRNA設計

標的細胞への導入

スクリーニング/クローニング

シーケンス



ガイドRNA設計手順 (マニュアル)

① PAM配列 (5'-NGG-3') を標的遺伝子から探す

標的配列からPAM配列を検索

```
5' GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG 3'
3' CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC 5'
```

PAM上流20塩基の確認

```
5' GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG 3'
3' CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC 5'
```

5' G AAC CGG TGC CTA GAG AAG G 3'

② 標的遺伝子の逆鎖から探す (5'-CCN-3')

標的配列からPAM配列を検索

```
5' GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG 3'
3' CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC 5'
```

PAM上流20塩基の確認

```
5' GTT GGG GGG AGG GGT CGG CAA TTG AAC CGG TGC CTA GAG AAG GTG GCG CGG 3'
3' CAA CCC CCC TCC CCA GCC GTT AAC TTG GCC ACG GAT CTC TTC CAC CGC GCC 5'
```

5' G CGC CAC CTT CTC TAG GCA C 3'

発見ベクターへのクローニング (詳細は9、12ページ)

ガイドRNA設計 (Online tool)

比較的良好に使われるオンライン設計ツール

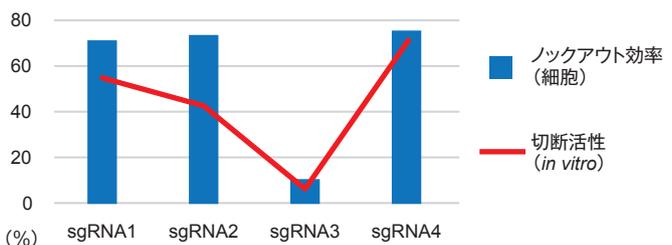
- ▶ **CHOPCHOP**: 候補となるガイドRNAのランキング化。ゲノム配列上の類似配列の数をリスト化
- ▶ **CRISPRdirect**: 標的配列に特異的、かつ、ゲノム上の類似配列が少ない候補ガイドRNAをハイライトで表示
- ▶ **Benchling**: *Staphylococcus aureus* Cas9やCpf1のガイドRNA設計にも対応

！ ポイント

オンラインサイト等で設計したガイドRNAのすべてがゲノム上の標的配列を効率よく切断するとは限りません (右図)。

ゲノム編集実験を開始する前に、*in vitro*でガイドRNAの活性を確認することで、失敗の少ない実験を行うことができます。

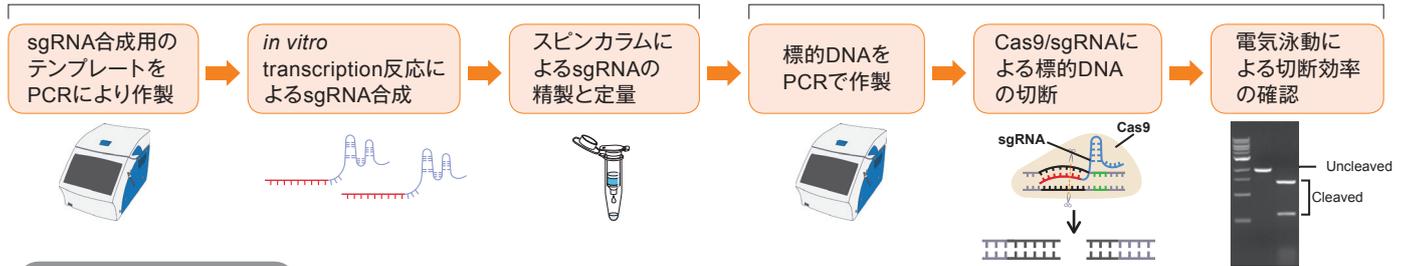
(→次ページで、関連製品をご紹介します)



標的遺伝子に対して4つのガイドRNAを設計し、*in vitro*での切断活性 (赤線) とノックアウト効率 (棒グラフ) を測定した。*in vitro*で切断活性の低かった sgRNA3は、ノックアウト効率も非常に低かった。

sgRNAを合成する

切断効率を確認する



操作方法の概要

(プロトコルの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。)

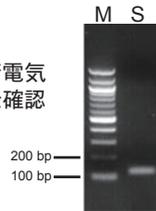
1. sgRNA合成用のテンプレートをPCRにより作製

① 200 μlのPCRチューブに以下の試薬を加え混合

PrimeSTAR Max Premix (2×)	12.5 μl
Guide-it Scaffold Template	1 μl
Your forward primer (10 μM)	0.5 μl
RNase Free Water	11 μl
Total volume	25 μl

98°C 10 sec } 33 cycles
68°C 10 sec }
4°C

② PCR産物5 μlを2%アガロースゲルで電気泳動し、~130 bpのシングルバンドを確認



2. *in vitro* transcription反応によるsgRNA合成

① 200 μlのPCRチューブに以下の試薬を加え混合

PCR産物 (未精製)	5 μl
Guide-it <i>In Vitro</i> Transcription Buffer	7 μl
Guide-it T7 Polymerase Mix	3 μl
RNase Free Water	5 μl
Total volume	20 μl

37°C 4 hr
4°C

② 反応液に2 μlのDNase I (RNase-Free) を加え混合

37°C 15 min
4°C

3. スピнкаラムによるsgRNAの精製と定量

① 反応液にRNase Free Water 78 μlを加え混合

② IVT Binding Buffer 30 μlを加え混合

③ イソプロパノール 130 μlを添加し混合

④ IVT RNA Clean-Up Spin Columnに移し遠心 (11,000×g, 30 sec)

⑤ IVT Wash Buffer 600 μlを添加し遠心 (11,000×g, 30 sec)

⑥ IVT Wash Buffer 250 μlを添加し遠心 (11,000×g, 2 min)

⑦ IVT RNA Clean-Up Spin Columnを新しいチューブに移し、RNase Free Water 20 μlをカラムに添加し室温で1分静置

⑧ 遠心 (11,000×g, 1 min)

⑨ 1 μlを用いて濃度測定

4. 標的DNAをPCRで作製

ゲノムDNAの抽出 (個別サンプル用)

① ウェルから細胞を回収し、下表を参考にExtraction Buffer 1を添加し混合

② 95°C 10 min

③ 下表を参考にExtraction Buffer 2を添加しVortexで混合

④ ライセートとRNase Free Waterを1:9で希釈混合

Plate type (wells)	96	48	24	12
Extraction Buffer 1	36 μl	90 μl	180 μl	360 μl
Extraction Buffer 2	4 μl	10 μl	20 μl	40 μl

標的DNAのPCR増幅

① CRISPR/Cas9の標的領域を増幅するためのプライマーを設計

② 200 μlのPCRチューブに以下の試薬を加え混合

2× Terra PCR Direct Buffer (with Mg ²⁺ , dNTP)	25 μl
Forward primer (10 μM)	1.5 μl
Reverse primer (10 μM)	1.5 μl
Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 U/μl)	1 μl
RNase Free Water	19 μl
Prepared lysate	2 μl
Total volume	50 μl

98°C 2 min
98°C 10 sec } 30~40 cycles
60°C 15 sec }
68°C 1 min/kb }
4°C

③ PCR産物5 μlを1.5~2%アガロースゲルで電気泳動

5. Cas9/sgRNAによる標的DNAの切断

① 200 μlのPCRチューブに以下の試薬を添加

Target-specific sgRNA (50 ng/μl) or Control sgRNA (50 ng/μl)	1 μl
Guide-it Recombinant Cas9 Nuclease (500 ng/μl)	0.5 μl
Total volume	1.5 μl

37°C 5 min
4°C

② 200 μlのPCRチューブに以下の試薬を加え混合

PCR reaction solution (100~250 ng) or Control Fragment	Up to 5 μl
15× Cas9 Reaction Buffer	1 μl
15× BSA	1 μl
RNase Free Water	6.5 μl
Cas9/sgRNA mix (5-①で調製)	1.5 μl
Total volume	15 μl

37°C 1 hr
80°C 5 min
4°C

③ 1.5~2%アガロースゲルで電気泳動し、切断効率を確認

RNP (Cas9タンパク質 / sgRNA) 直接導入システム

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
Cas9タンパク質とsgRNAの複合体 (RNP) を“直接”導入

Cas9タンパク質を用いるゲノム編集の流れ

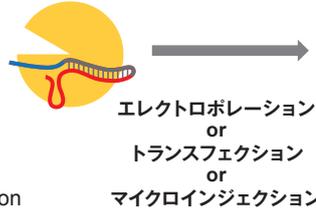
① Cas9とsgRNA※を用意



Cas9タンパク質

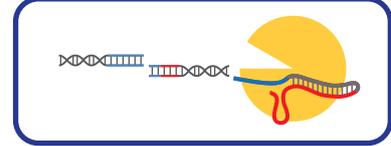
sgRNA

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
or
マイクロインジェクション

③ RNPを導入&ターゲット遺伝子を切断



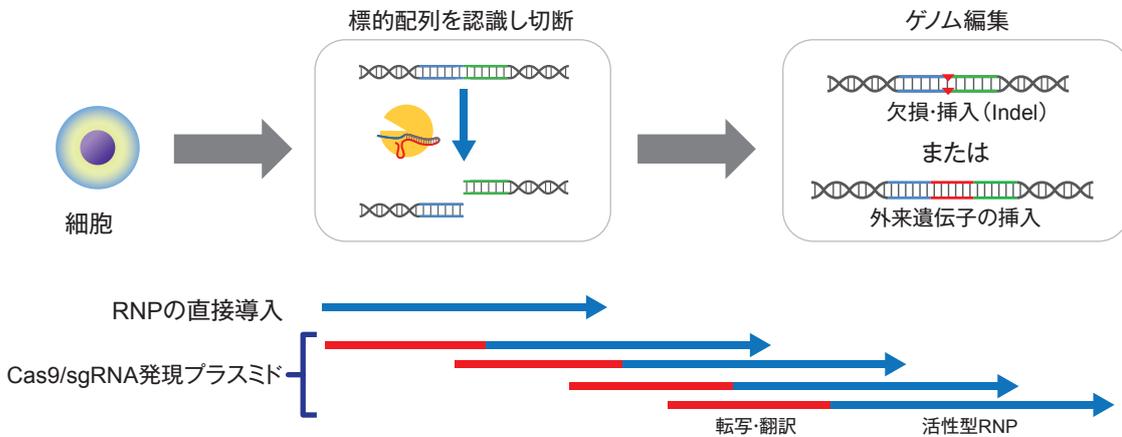
細胞 (株化、初代、iPS、ES etc.)、
組織、受精卵 など...

※sgRNAの調製にはGuide-it sgRNA *In Vitro* Transcription Kit (製品コード 632635) をご使用ください。

★ 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—

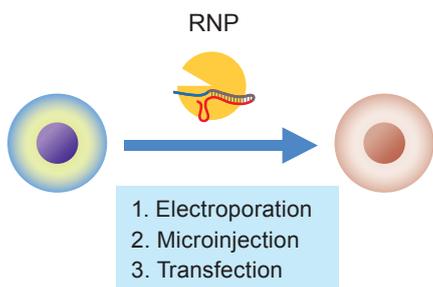
- ✓ 遺伝子を使わないため継続的なCas9の発現がなく、**オフターゲットの抑制効果が期待**できる
- ✓ 対象生物ごとにプロモーターやコドンの**最適化不要**
- ✓ 導入するCas9タンパク質量をコントロールし、ゲノム編集効率を**最適化**
- ✓ “転写・翻訳”のタイムラグがないため、**迅速・効率的**な変異導入が可能

RNPの直接導入法は細胞導入直後からDNA切断活性が“アクティブ”なため、**速やかに標的配列を切断**することが可能です。また、RNPは細胞内で**速やかに分解**されるため、標的配列以外のゲノム上の類似配列の切断 (オフターゲット作用) を回避する効果も期待できることから、最近のゲノム編集研究のトレンドになっています (下図)。

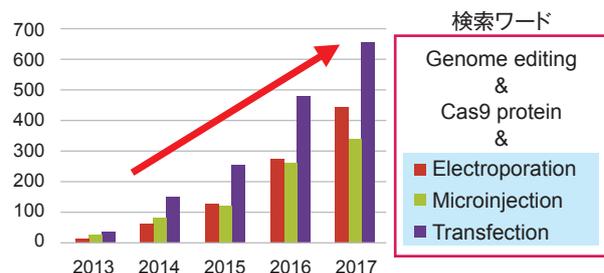


プラスミドによるゲノム編集では、Cas9遺伝子を転写・翻訳 (図の赤線部分) する必要があるため、細胞導入後、Cas9が活性を持つまでに時間がかかる。また、プラスミドが細胞内に存在する間、転写・翻訳が継続するため、細胞内のCas9タンパク質の残存がRNP直接導入法に比べ長くなる傾向がある。

Cas9/sgRNA (RNP) 直接導入の文献検索



(Google Scholarを用いた検索ヒット数)



どの導入法も文献数は年々増加!

エレクトロポレーションによる導入

操作方法の概要

(プロトコルの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。)

Neon Transfection System Kit (Thermo Fisher Scientific社) を用いて、hiPS細胞およびCD34陽性幹細胞におけるノックアウトおよびノックイン実験を行うためのプロトコルをご紹介します。

- ・cell typeによって最適化が必要となります。
- ・Neon Transfection Systemの詳細な操作方法については、製造元のウェブサイトなどを参照してください。

Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) (製品コード 632641/632640) 使用の場合

1. 細胞の調製

- ① 新鮮な細胞を十分量用意
- ② hiPS細胞 (接着細胞) の場合は③に、CD34陽性幹細胞 (浮遊細胞) の場合は⑤に進む。
- ③ 培地を除き、細胞をPBS (Ca²⁺、Mg²⁺不含) で1回洗浄し、TrypLE Select Enzyme (1X) (Thermo Fisher Scientific社 Cat. No.12563011) を用いて細胞を剥離
- ④ 培地を添加し、細胞懸濁液を回収
- ⑤ 細胞懸濁液を一部取り、細胞濃度を測定
- ⑥ 遠心分離 (400×g、5 min) して細胞を回収
- ⑦ 細胞をPBS (Ca²⁺、Mg²⁺不含) で1回洗浄し、hiPS細胞の場合はBuffer R*1で、CD34陽性幹細胞はBuffer T*1で2×10⁷ cells/mlになるように再懸濁 (例えば、1.5×10⁵ cells in 7.5 μl)
- ⑧ 細胞は使用するまでon iceで保存

- ※1 Neon Transfection System Kitのコンポーネント
Buffer R: 接着細胞、浮遊細胞、初代接着細胞
Buffer T: 初代血球系浮遊細胞

2. Cas9とsgRNAの複合体 (RNP) の調製

- ① Guide-it Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) とsgRNA溶液を室温で融解

- ② 200 μlのPCRチューブに以下を用意

sgRNA (e.g., 1 μg/μl)	0.45 μl ^{※2}
Guide-it Recombinant Cas9 (3 μg/μl)	0.75 μl
Resuspension Buffer R or T	6.3 μl ^{※2}
Total volume	7.5 μl

- ※2 sgRNAおよびResuspension Bufferの添加量はsgRNA濃度によって異なります。

- ③ 緩やかにピペティングし、十分に混合
- ④ 予め37°Cにセットしたサーマルサイクラーを用いて、下記条件で反応

37°C 5 min
4°C

- ⑤ (オプション) ドナーDNAを加えon iceで保存

3. エレクトロポレーション

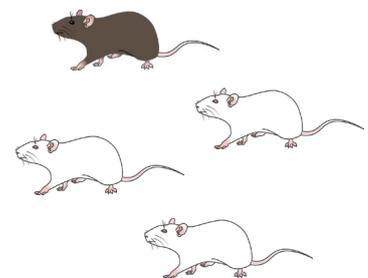
- ① Neon TubeにBuffer E (Neon Kitに同梱) 3 mlを加え、Neon Pipette Stationに挿入
- ② 以下の条件を設定
Pulse voltage / Pulse width / Pulse number
= 1,100 v / 20 ms / 2 pulses
- ③ 7.5 μlの細胞懸濁液を7.5 μlのCas9/sgRNA複合体調製液が入ったチューブに添加
- ④ 緩やかにピペティング (気泡があれば注意深く取り除く)
- ⑤ Neon PipetteをNeon Tipに挿入し、ピペットとチップがしっかりと装着されていることを確認
- ⑥ Neon Pipetteを用いて、細胞混合液をNeon Tipにゆっくりと吸引
- ⑦ Neon Pipetteを設置しプログラムを実行
- ⑧ ピペットを慎重に取り除き、細胞を予め温めた培地に移す。
- ⑨ 細胞が均一になるようにプレートを揺らし、5%CO₂インキュベーターで37°Cで培養

ユーザー様実施例

遺伝子改変マウス作製における各社Cas9タンパク質の比較

Tyrosinase遺伝子座を標的としてエレクトロポレーション法により、Cas9タンパク質でマウス (C57BL/6N) のゲノム編集実験を行った。Cas9タンパク質は、タカラバイオを含む3社のCas9タンパク質を用い、胎生14.5日齢で眼を指標に判定した。アルビノの胎児の数を遺伝子改変マウスの数としてカウントした。

Cas9メーカー	Cas9濃度 (ng/μl)	エレクトロポレーション処理した受精卵数	移植した受精卵数	胎児数	アルビノ数	アルビノ数 / 胎児数
タカラバイオ	25	60	60	12	9	75%
	100	60	60	7	7	100%
D社	25	60	60	13	2	15%
	100	60	60	23	12	52%
	400	40	40	7	4	57%
E社	25	60	59	22	0	0%



遺伝子改変マウスの作製効率は、タカラバイオのCas9タンパク質を使用したときが最も高い作製効率を示しました!

データご提供: 東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 動物資源学部門 研究基盤部門動物資源研究領域 中尾 和貴先生



実施例

ZsGreen1発現293Tクローン細胞でのRNPによるノックアウト

【方法】

試薬の準備

Cas9タンパク質 : Guide-it Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) (製品コード 632641)

sgRNA : Guide-it sgRNA *In Vitro* Transcription Kit (製品コード 632635) によりZsGreen1遺伝子に対するsgRNAを調製

遺伝子導入試薬 : TransIT-X2 (製品コード MIR6003) またはA社遺伝子導入製品

1日目: 細胞の準備

ZsGreen1発現293Tクローン細胞 (ZsGreen1を1 copy/cell保持、以下293T-ZsGreen1細胞) を 3.5×10^5 cells/mlに調製し、0.5 mlずつ24 well plateへ播種した。

2日目: RNPの細胞への導入

1. TransIT-X2

- Opti-MEM I Reduced Serum Media 50 μ l (Thermo Fisher Scientific社) にCas9タンパク質とsgRNAを加えピペティングした後、37°Cで5分間インキュベート
- TransIT-X2を1 μ l添加してピペティング
- 室温で15~30分間インキュベート
- 細胞へ添加

2. A社遺伝子導入試薬

製品プロトコールに準じて実施

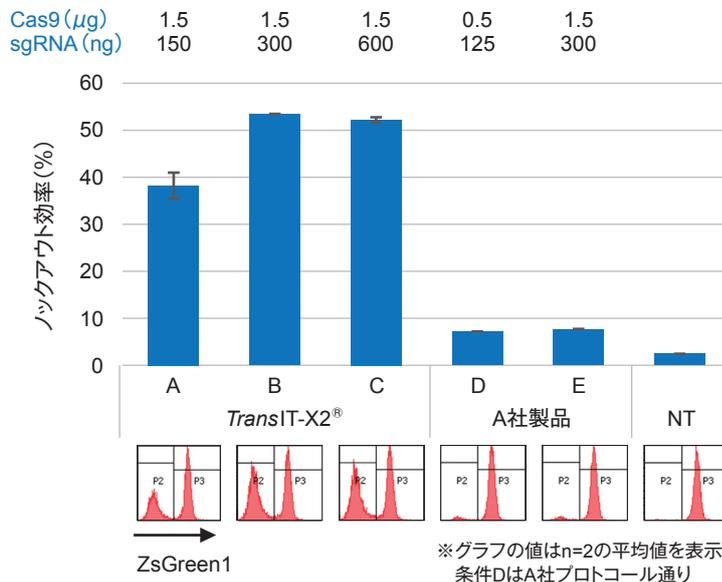
4日目: 細胞の継代

9日目: ノックアウト効率 (ゲノム編集効率) の解析

ZsGreen1陰性細胞率 (ノックアウト効率) をFlow cytometryで解析した。

【結果】

293T-ZsGreen1細胞のZsGreen1ノックアウト効率を評価した。その結果、TransIT-X2では、BおよびC条件で50%以上のノックアウト効率が認められ、A社製品を用いた場合と比較して高いノックアウト効率を示した。NTは無処理の細胞を示す。



マイクロインジェクション法による導入

ユーザー様実施例

Cas9タンパク質とガイドRNAの複合体 (RNP) を用いたマウスのゲノム編集 (ノックアウト/ノックイン)

【経緯と問題点】

複数社のCas9タンパク質を使用していたが、Cas9タンパク質に含まれる高濃度のグリセロールにより、マイクロインジェクション時のキャピラリーに目詰まりを起こし、その度にキャピラリーを交換する必要に迫られたため、作業者は大変ストレスを感じていた。また、製造ロットごとにゲノム編集効率が安定せず、複数社のCas9タンパク質を併用することで対応していたが、安定した活性を示しかつ継続的に入手可能な製品が必要だった。

【結果】

タカラバイオのGuide-it Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) (製品コード 632641) の使用により、キャピラリーでのマイクロインジェクション作業時の目詰まりが改善され、作業時のストレスを大きく低減できた。また、今まで実施した複数ロットでのCas9の性能は安定しており、問題なくゲノム編集を実施することができるようになった。

タカラバイオのCas9タンパク質を用いたマウスのゲノム編集結果

	Type (挿入カセット長、欠失長)	ドナー	産仔数	変更あり産仔数	効率
遺伝子A	KI (insert長=3 kb)	プラスミド	9	4	44%
遺伝子B	KI (insert長=7.5 kb)	プラスミド	11	4	36%
遺伝子C	KO (deletion長=51 kb)	オリゴDNA	14	4	28%
遺伝子D	SNP	オリゴDNA	8	2	25%
遺伝子E	Flox	プラスミド	6	2	33%
遺伝子F	Flox	プラスミド	8	2	25%

データご提供:

東京医科歯科大学 未来ゲノム研究開発支援室 石久保 春美様 平岡 優一様

RNP直接導入法に関するゲノム編集関連の文献情報

受精卵: "RNP"をエレクトロポレーションで直接導入することによりモザイク変異を低減

Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. Hashimoto M. *et al.*, *Dev Biol.* 2016; **418**: 1.

T細胞: "RNP"をエレクトロポレーションで導入し、特定のがん抗原を認識するTCRに改変

Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. Roth TL. *et al.*, *Nature* 2018; **559**: 405-409.

植物:

タバコおよび大豆からプロトプラストを調製し、PEG法にて"RNP"を直接導入

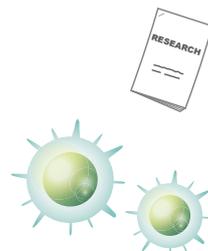
CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing. Kim H. *et al.*, *Nat. Commun.* 2017; **8**: 14406.

トウモロコシの胚にパーティクルガンにて"RNP"を直接導入 (Mirus Bio社 TransIT-2020を金粒子の調製時に使用)

Genome editing in maize directed by CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. Svitashv S. *et al.*, *Nat. Commun.* 2016; **7**: 13274.

緑藻クラミドモナス: エレクトロポレーションで"RNP"を直接導入し、ノックアウト

CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. Shin SE. *et al.*, *Sci Rep.* 2016; **6**: 27810.

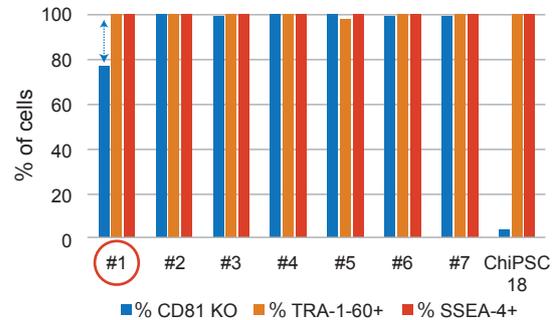
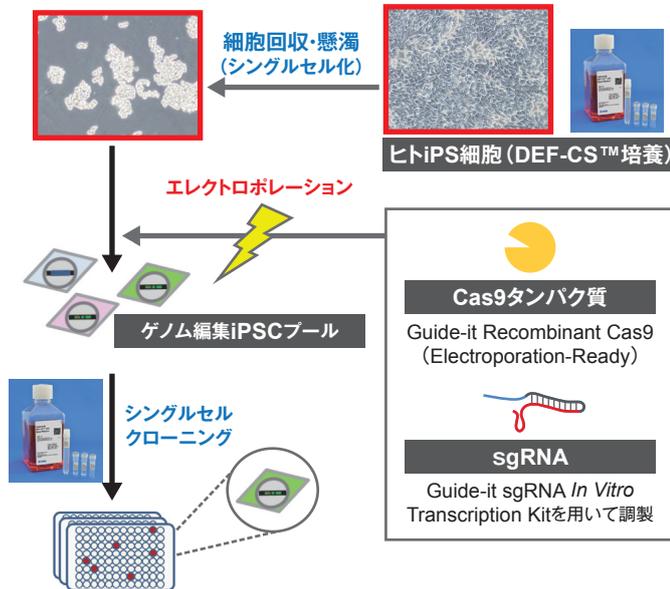


ヒトiPS細胞のゲノム編集

Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (製品コード Y30010)

ヒトiPS細胞のシングルセルクローニングに対応したDEF-CS™培養システムによって、高効率な「シングルセルクローニング」を行うことができます。また、オフターゲット効果の低減が期待され、エレクトロポレーションやGesicle(12ページ参照)を用いた効果的な「Cas9タンパク質 / sgRNA複合体 (RNP)の直接導入」の組み合わせにより、効率的なヒトiPS細胞のゲノム編集が可能となります。

◆ DEF-CS™培養システムによる高効率ゲノム編集クローンの取得



DEF-CS™培養システムとRNPを用いたゲノム編集によるCD81ノックアウト (KO) hiPSCクローンの取得

Guide-it Recombinant Cas9とsgRNAより調製した複合体 (RNP) をhiPSC (ChiPSC18株) にエレクトロポレーションにより導入した後、CD81 KO株をDEF-CS培養システムを用いてクローン化した (左図フロー)。得られたCD81 KO株のCD81、TRA1-60、SSEA-4発現量をFlow cytometry解析で確認したところ、いずれのクローンでも高い未分化マーカー発現が確認された (上図)。※#1は片アレルのみのCD81 KO株

DEF-CS培養システムによる高効率な「シングルセルクローニング」と「Cas9タンパク質 / sgRNA複合体 (RNP) の直接導入」の組み合わせにより、効率的なヒトiPS細胞のゲノム編集が可能です。

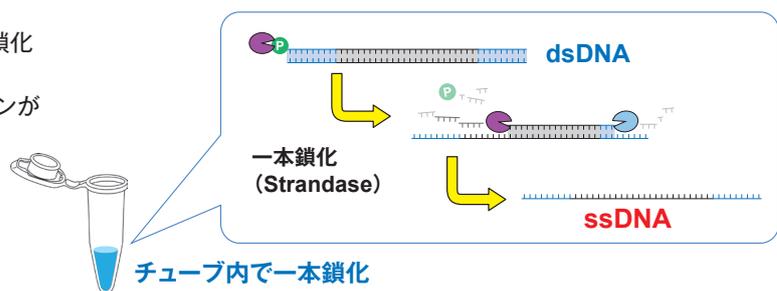
長鎖ノックイン実験の効率Upにつながるキット

Guide-it™ Long ssDNA Production System (製品コード 632644)

ゲノム編集実験で効率のよい長鎖ノックイン実験を行うためのポイントは、ドナーDNAを一本鎖DNA (ssDNA) で用意することです。Guide-it™ Long ssDNA Production Systemでは、簡単操作により長鎖 (5 kbまで) のssDNAを高収量で調製できます。

◆ 特長

- ・ 独自技術の「Strandase処理」で二本鎖を一本鎖化
- ・ クローニング操作やゲル抜き精製は不要
- ・ 二本鎖DNAに比べてランダムインテグレーションが少ないため、ゲノム編集効率Up
- ・ 10 µgのdsDNAから2~4 µgのssDNAを調製

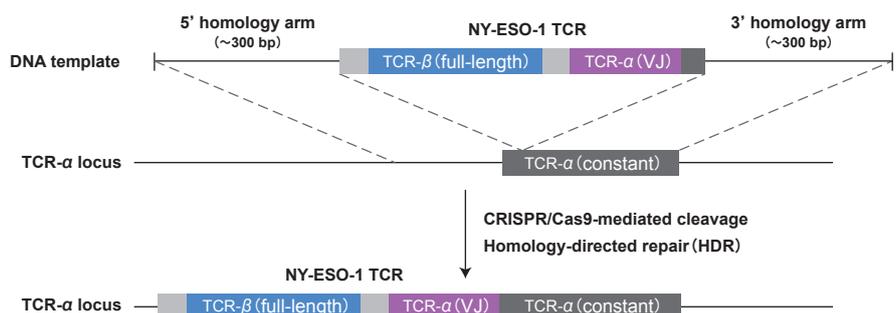


◆ 使用文献のご紹介

Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. Roth TL. *et al.*, *Nature* 2018; **559**: 405-409.

◆ 標的癌細胞に対するT細胞抗原特異性再プログラミング

TCRα遺伝子座でNY-ESO-1抗原に特異的なTCRをコードする配列を挿入した。その後、構築したT細胞が*in vitro*およびマウスモデル実験において、NY-ESO-1発現癌細胞を標的とすることを実証した。



プラスミドベクターによる導入システム

標的遺伝子に対するsgRNA配列を発現プラスミドにクローニングするだけで、非常に手軽にゲノム編集実験を行うことが可能です。タカラバイオでは、ゲノム編集用発現プラスミドとして、Cas9遺伝子とsgRNA配列、さらに蛍光マーカー遺伝子をワンベクターに搭載したGuide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green/Red) をご用意しています。すぐにゲノム編集実験を実施したい場合は、プラスミド発現系の使用をおすすめします。

オリゴDNAの設計、合成



アニーリング



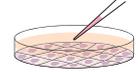
クローニング



プラスミドの単離、解析



トランスフェクション



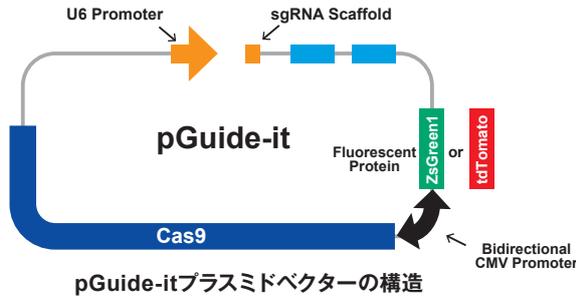
操作方法の概要

(プロトコルの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。)

Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green/Red) (製品コード 632601/632602) 使用の場合

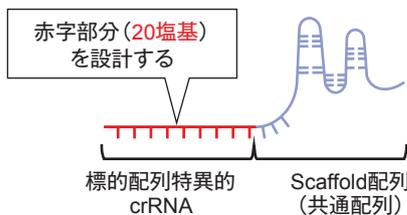
1. オリゴDNAのデザイン

下図の通り、本プラスミドにはsgRNAの共通配列 (Scaffold配列) が含まれているため、sgRNAのクローニングには、標的配列に特異的な20 bpのセンス鎖のオリゴ (Oligo 1) とアンチセンス鎖のオリゴ (Oligo 2) が必要です。



pGuide-itプラスミドベクターの構造

※デザイン方法の詳細は3ページをご覧ください。



<設計のポイント>

- ・オフターゲット効果を低減させるためには、設計する標的配列と類似のゲノム上の配列には3つ以上のミスマッチが含まれることが有効です。
- ・3つ以上のミスマッチの位置は、特にPAM配列内やPAM配列の近傍が効果的です。
- ・遺伝子のノックアウトをする場合は、タンパク質のN末の配列をターゲットとして選択することをお勧めします。

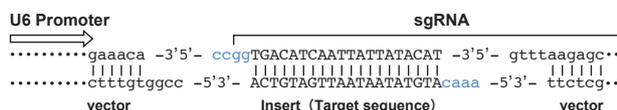
- ① 本キットに含まれるベクターは予め線状化されている。ベクターの末端配列に合わせるために、下図の通り、センス鎖には5'-ccgg-3'に突出配列を、アンチセンス鎖には5'-aaac-3'の突出配列を付加する。

Oligo 1: 5'-ccgg XXX XXX XXX XXX XXX XXX XX-3'

Oligo 2: 5'-aaac YY YYY YYY YYY YYY YYY YYY-3'

Xはターゲット配列、YはXの相補配列

センス鎖 (Oligo 1) の最初のgは、本プラスミドで使用しているU6プロモーターの転写開始点である。



2. アニーリング

- ① 各オリゴを100 μMになるようにTE bufferなどで調製
- ② 200 μlのPCRチューブに以下を用意

Oligo 1 (100 μM)	1 μl
Oligo 2 (100 μM)	1 μl
Guide-it Oligo Annealing Buffer	8 μl
Total volume	10 μl

- ③ サーマルサイクラーでオリゴをアニーリング

95°C 2 min
10 min slope from 85°C to 30°C
25°C hold

- ④ アニーリングされたオリゴ溶液1 μlをGuide-it Oligo Annealing Buffer 99 μlと混合して、100 nM (fmol/μl) 溶液を作製

3. クローニング

- ① 反応液の調製

pGuide-it Vector (Linear) (7.5 ng/μl)	2 μl
Target annealed oligos (100 fmol/μl) or Guide-it Control Annealed Oligos (100 fmol/μl)	1 μl
PCR Grade Water	2 μl
DNA Ligation Mighty Mix	5 μl
Total volume	10 μl

- ② 16°Cで30分間反応

- ③ 氷上で融解したコンピテントセルに上記のライゲーション反応液10 μlを加え軽くタッピング

- ④ 氷中で30分間放置

- ⑤ 42°Cで45秒間インキュベート後、氷中で2分間

- ⑥ SOC培地1 mlを加え、37°Cで1時間振とう

- ⑦ アンピシリン (100 μg/ml) を含むLB選択プレートに適量まき、37°Cで一晩培養

4. プラスミドの単離、解析

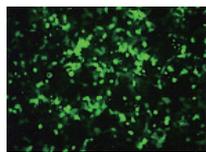
- ① シングルコロニーを選択し、アンピシリンを含むLB培地に適量加えて一晩振とう培養

- ② プラスミドDNAを精製

- ③ プラスミドDNAの濃度を決定後、Guide-it Sequencing Primer 1を用いてシーケンス解析

! 蛍光マーカーについて

本製品に搭載されている蛍光マーカー (ZsGreen1, tdTomato) は、細胞への組み込みを意図したものではなく、トランスフェクション効率のモニタリングやフローサイトメトリーによる導入細胞の濃縮、単離に用いることができます。



!プラスミドDNAの精製におススメ

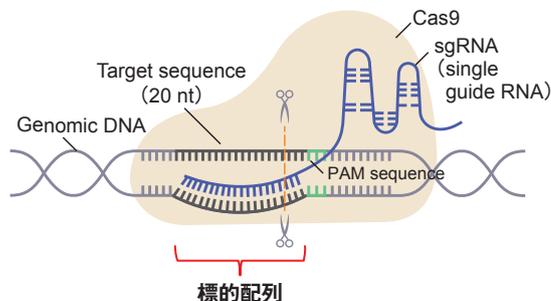
シーケンスグレードの精製には、NucleoSpin Plasmid EasyPure (製品コード 740727.10) をおススメします。
トランスフェクショングレードのプラスミドを調製するには、NucleoBond Xtra Midi (製品コード 740410.10) またはNucleoBond Xtra Maxi (製品コード 740414.10) をご利用ください。



? PAMって?

PAMとは、Proto-spacer adjacent motif (プロトスペーサー隣接モチーフ) の略です。Cas9/sgRNA複合体 (RNP) は、ゲノムDNA上に存在するPAM配列を認識し、PAM配列近傍の二本鎖DNAを開裂させ、ガイドRNAの標的配列とアニールし、Cas9タンパク質による二本鎖切断が起こります。現在、最もよく使われる *Streptococcus pyogenes* 由来のCas9のPAM配列は、5'-NGG-3'です。

Cas9/sgRNA (RNP) 複合体による標的配列の認識と切断



関連製品

“sgRNAライブラリー”による表現型スクリーニングシステムの決定版!

Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System (製品コード 632646)

◆ 本システムでできること

“sgRNAライブラリー (プール型)”で、標的細胞の表現型に関連する遺伝子を、ゲノム編集技術 (ノックアウト) によりゲノムワイドにスクリーニングすることが可能です (表現型スクリーニング)。

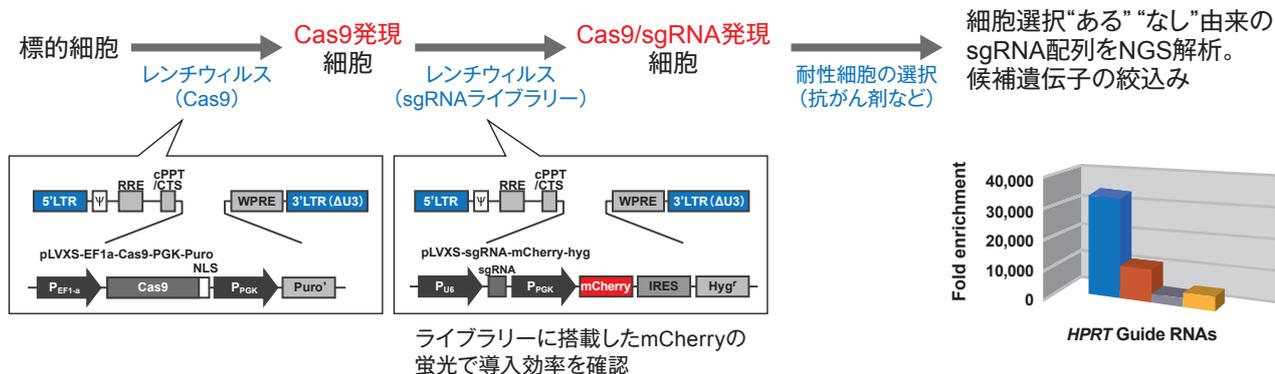
各sgRNAの発現バイアスを最小限に抑えた高品質なライブラリーです。

◆ 本システムの特長

- ・約19,000の各遺伝子に対し、オンターゲットとオフターゲットを考慮した4種類のsgRNA (計約76,000) を設計
- ・本キットライブラリーに含まれるsgRNA配列は、ロット毎にすべて確認済み
- ・sgRNAライブラリーの配列情報はインターネットから入手可能
- ・レンチウイルス作製に必要な試薬※はプレミックスタイプで、迅速に安定したウイルス調製が可能

※本レンチウイルスはSIN型 (self inactivating) ですので、拡散防止措置P2レベルでお使いいただけます。
sgRNA導入用レンチウイルスは、蛍光タンパク質mCherry遺伝子を含みます。

◆ スクリーニングのフロー



! ゲノム編集受託サービス sgRNA設計・作製からゲノム編集細胞・動物の作製まで幅広いサービスをご提供します。

- ・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: Flow cytometry、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、動物飼育の代行

タカラバイオ ゲノム編集 受託

検索



ウイルスベクター（アデノ随伴ウイルス）による導入システム

アデノ随伴ウイルスベクター（AAVベクター）は、特にプラスミドベクターでのゲノム編集効率の低い細胞や*in vivo*実験にオススメです。

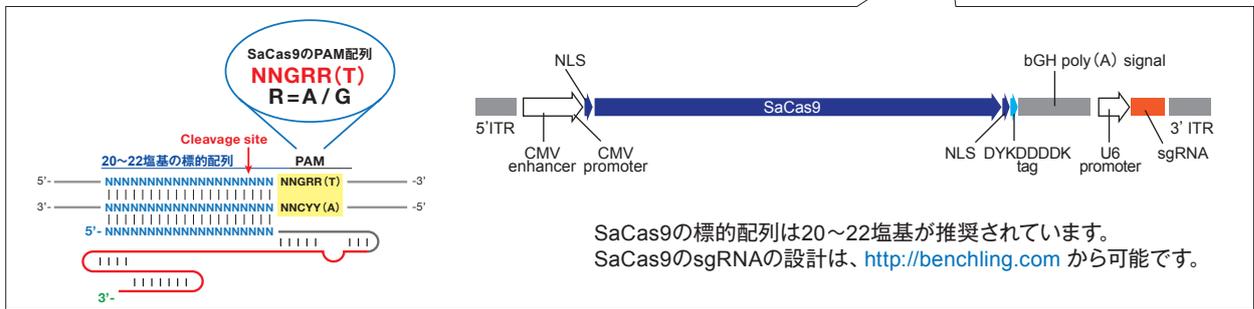
AAVベクターは増殖／非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能であり、特に非分裂細胞においては長期間の目的遺伝子発現が可能です。アデノウイルスベクターやレトロウイルスベクターと比較して、免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも適しています。また、非病原性ウイルスであるため、**P1レベル***の施設でも取扱いが可能であり、安全で取扱いの容易なウイルスベクターとして広く使用されています。タカラバイオでは、*Streptococcus pyogenes*と*Staphylococcus aureus*由来のCas9システムをご用意しています。

*ただし、導入する目的遺伝子によってはレベルの高い設備が必要な場合があります。

SpCas9とSaCas9の比較

製品名	AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)
製品コード	632608	632619
ベクター	2ベクタータイプ	1ベクタータイプ
Cas9の由来	<i>S. pyogenes</i> (化膿性レンサ球菌)	<i>S. aureus</i> (黄色ブドウ球菌)
Cas9のサイズ	1,368 アミノ酸	1,053 アミノ酸
PAM配列*	5'-NGG-3'	5'-NNGRR (T) -3'
特長	最もよく使われるCas9	サイズの小さいCas9を用いることにより1つのAAVベクターでの導入が可能

*Nは任意、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。

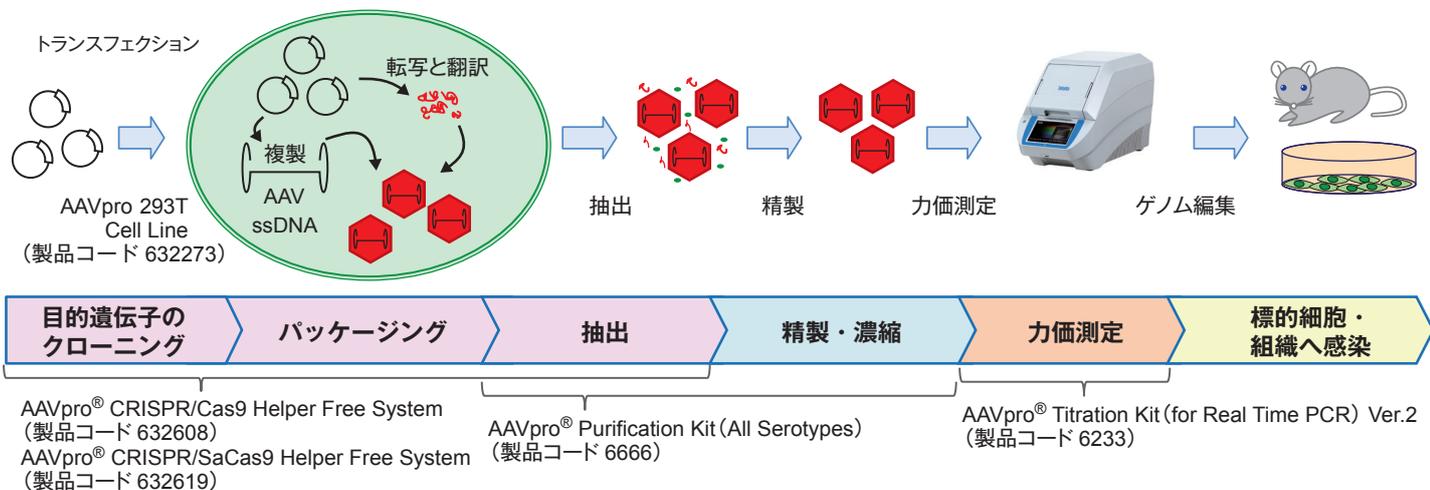


ゲノム編集への応用例 <動物個体のゲノム改変> 文献紹介

- *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. Ran FA. *et al.*, *Nature* 2015; **520**: 186-191.
- *In vivo* genome editing improves muscle function in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. Nelson CE. *et al.*, *Science* 2016; **351**: 403-407.
- CRISPR/Cas9-mediated genome editing via postnatal administration of AAV vector cures haemophilia B mice. Ohmori T. *et al.*, *Scientific Reports* 2017; **7**: 4159.



AAVベクター作製の実験フローと対応製品



オンラインガイドのご紹介 [AAVベクターによる遺伝子導入 Q&A]

右のQRコードからアクセス!



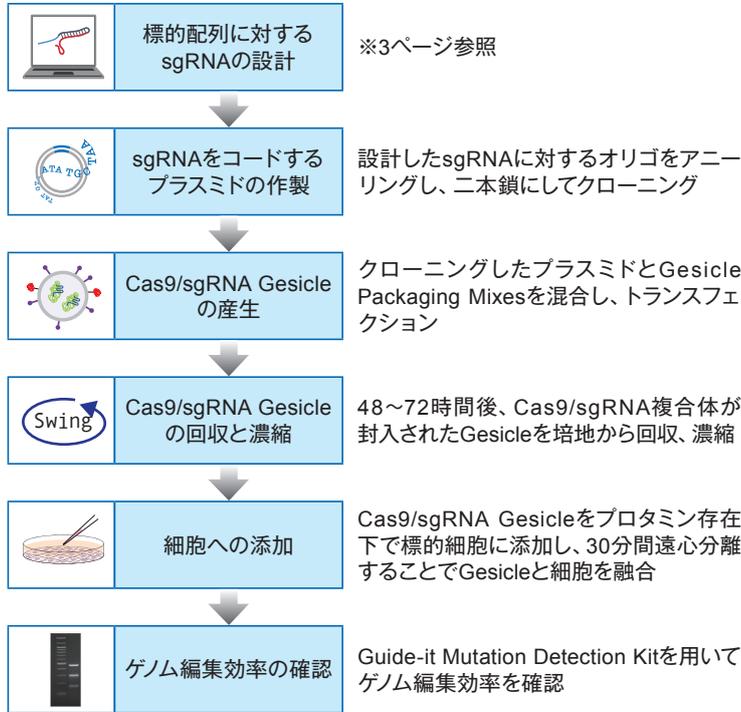
エキソソーム様小胞 (Gesicle) による導入システム

エキソソーム様小胞を利用してCas9タンパク質／sgRNA複合体を細胞に直接導入

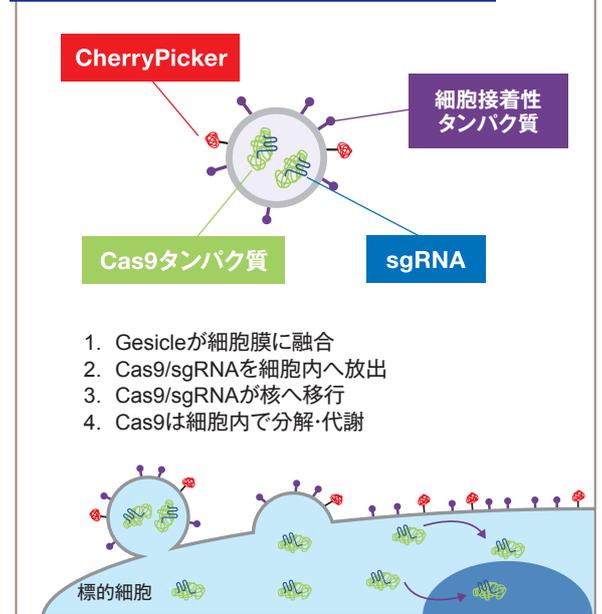
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System (製品コード 632613)

Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production Systemは、ゲノム編集を目的としてCas9タンパク質／sgRNA複合体 (RNP) を哺乳類細胞に導入するためのエキソソーム様小胞 (Gesicle) を産生するシステムです。Cas9/sgRNA Gesicleの利用により、プラスミドやウイルスベクターを用いたゲノム編集と比べて、幅広い細胞種に高効率にCas9タンパク質／sgRNA複合体を導入することが可能です。得られたCas9/sgRNA Gesicleは直接、目的の培養細胞のゲノム編集に使用できます。

Protocol Overview



Cas9/sgRNA Gesicleの細胞内での動き



Gesicle技術を利用した製品

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

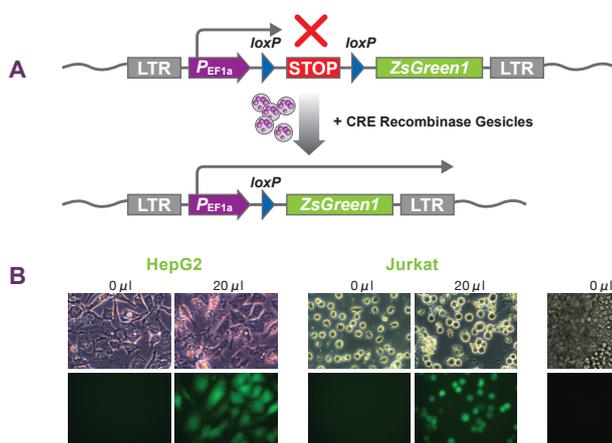
CRE Recombinase Gesicles (製品コード 631449)

- ・欠失、挿入、転位などの部位特異的の組換えに
- ・Creリコンビナーゼ酵素タンパク質を直接細胞に導入
- ・発現プラスミドより迅速で効率的
- ・操作は極めて簡単、細胞に添加するだけ!
- ・酵素遺伝子を導入しないため、Creリコンビナーゼ活性は一過性

文献紹介

Atox1 KO Cell Lineの作製に使用されています!
Copper Chaperone Atox1 Interacts with Cell Cycle Proteins.
Matson Dzebo M. et al., *Comput Struct Biotechnol J.* 2018; 16: 443-449.

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



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遺伝子とEF1αプロモーターが分断されているが、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 (A)。

【実験の概要】

細胞

pLVX-LoxP-ZsGreen1を導入し、puromycinで選択した安定発現株

1. 細胞にCRE Recombinase Gesiclesを添加
2. 32°Cで30分間、1,000×gで遠心
3. 37°Cで3時間培養
4. 培地交換し、さらに48時間培養
5. 蛍光顕微鏡によるZsGreen1の発現観察 (B) および Flow cytometryによるZsGreen1の発現解析 (C)

C

Cell line	RPE	HepG2	CHOK1	NIH3T3	BJ	MCF-7	293	HeLa	HT1080	Jurkat	KBM-7	Raji
Vol (µl)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
% Positive	95.9	86.6	97.7	95.1	79.8	21.6	81.4	64.1	65.3	77.4	30.3	72.6



導入後のサポートツール

ゲノム編集後のノックアウト変異確認キット

Guide-it™ Mutation Detection Kit (製品コード 631448/631443)

ゲノム編集で標的遺伝子に変異が導入されたかを確認するためには、細胞をシングルセルクローニングし、各コロニーをシーケンスする必要があります。もし、変異導入が全く起こっていないもしくは著しく効率が低い場合、解析に要した時間や試薬などの多くが無駄になります。

タカラバイオでは、CRISPR/Cas9の導入後、変異の有無を確認できるGuide-it™ Mutation Detection Kitをご用意しています。本キットは、生物・組織などで幅広く使用できます。

ガイドRNA設計

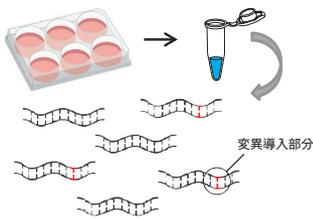
標的細胞への導入

スクリーニング/クローニング

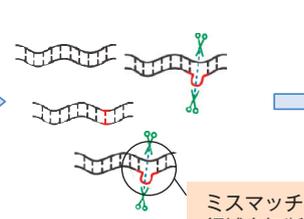
シーケンス

Guide-it™ Mutation Detection Kitの操作ステップ

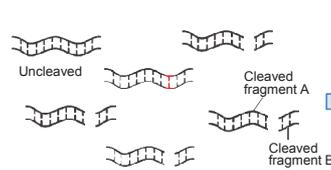
細胞ライセートから標的配列を直接増幅



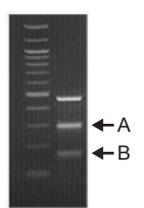
変性&再アニーリングしてGuide-it™ Resolvaseで処理



切断されたミスマッチDNA



電気泳動による切断フラグメントの確認



操作方法の概要

(プロトコルの詳細については必ず取扱説明書を確認してください。)

1. 細胞ライセートからのサンプル調製

- ① $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 細胞に180 μ lのExtraction Buffer 1を添加し、穏やかにピペティングし懸濁 (この時点でサンプルには粘性がある)
- ② 95°C 10 min
- ③ 20 μ lのExtraction Buffer 2を加え穏やかにピペティング (サンプルには粘性がある)
- ④ ③で調製した2 μ lのライセートに14 μ lのPCR-grade waterを添加して、PCRのtemplateとして用いる (※)。

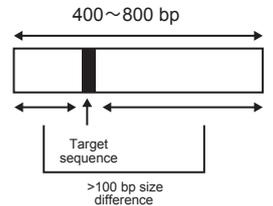
※PCRによる目的断片の増幅が不十分な場合は、PCR-grade waterにより1:2~1:16の範囲で希釈してください。またレンチウイルスベクターやレトロウイルスベクター導入時にポリブレンを使用した場合は、細胞を直接使用するのではなく、ゲノムDNAを精製したものをPCRのtemplateとしてください。

2. 変異領域の増幅

ゲノム編集のターゲット配列を含む領域をPCR増幅する。

<プライマー設計のポイント>

- ・本キットのアッセイに最適なPCR増幅サイズは400~800 bpです。
- ・PCR増幅断片のResolvaseによる切断断片のサイズ差は、100 bp以上を推奨します (電気泳動時の断片確認のため)。



PCR反応

- ① PCRチューブに以下を用意 (各試薬を融解後、軽くVortexまたはピペティングして内容物が完全に溶解していることを確認)

2× Terra PCR Direct Buffer (with Mg ²⁺ , dNTP)	25 μ l
Forward primer	15 pmol
Reverse primer	15 pmol
Sample (cells or diluted lysate)	<5 μ l
Terra PCR Direct Polymerase Mix	1 μ l
PCR-grade water	to 50 μ l
Total volume	50 μ l

- ② 軽くタッピングして混合
・3-Step PCR (増幅サイズが <2 kbの標準条件)

98°C 2 min*	} 35 cycles	*98°C 2 minはHot Start 抗体の熱変性に必須
98°C 10 sec		
60°C 15 sec		
68°C 1 min/kb		

- ・2-Step PCR (増幅断片がGCリッチもしくは ≥ 2 kbの場合)

98°C 2 min*	} 35 cycles	*98°C 2 minはHot Start 抗体の熱変性に必須
98°C 10 sec		
60°C 15 sec		
68°C 1 min/kb		

- ③ 5~10 μ lのPCR産物を2%アガロースゲルにより電気泳動し、シングルバンドであることを確認

! (オプション) ゲノム編集細胞の迅速スクリーニング法

培養したシャーレの細胞を10 μ l用のチップでやさしく掻きとり、適量をPCR反応液に直接加えることで迅速スクリーニングが可能です。ただし、細胞濃度が高すぎるとPCR増幅阻害を起こす可能性があるため、ご注意ください。

ゲノム編集効率の定量評価やゲノム編集効率が低い (<10%) と予想される場合は、上記の「細胞ライセートからのサンプル調製」を実施してください。

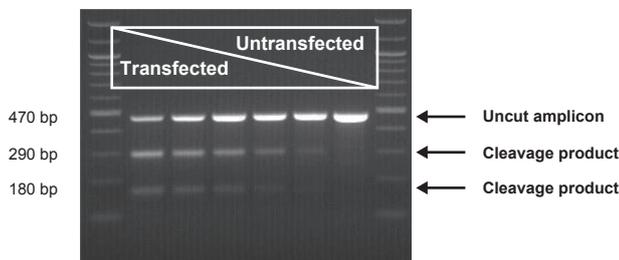
3. アニーリングとミスマッチ領域の切断

- 10 μ lのPCR産物と5 μ lのPCR-grade waterを新しいPCRチューブに添加
- 15 μ lのpositive control DNAを別のPCRチューブ2本に分注 (Resolvase酵素の添加・非添加用として2本用意する)
- 3本のPCRチューブを以下の条件でDNAハイブリダイゼーション反応

95°C 5 min
 95°C-85°C 2°C/sec
 85°C-25°C 0.1°C/sec
 Cool to 4°C
- ③で調製したDNAサンプルに1 μ lのGuide-it Resolvaseを添加し、37°C 15 min反応
- 全量をアガロースゲルに添加して電気泳動を行い、切断効率を確認

【結果例】

293T細胞のAAVS1領域をターゲットとしてゲノム編集を実施し、ターゲット領域を含む470 bpの配列を増幅し、Resolvaseによる切断を行った。ゲノム編集後のPool細胞では、ほとんどの場合、未切断バンド (470 bp) と2本の切断バンド (290 bp, 180 bp) が出現する。



！ 細胞のシングルセルクローニング方法

- Cas9タンパク質とsgRNAの複合体 (RNP) を目的細胞に導入する。
- RNP導入後、4~7日後に継代し、その時に一部細胞を回収してゲノム編集の可否判定を実施する。判定にはGuide-it Mutation Detection Kit (製品コード 631448) を使用する。
- 2でゲノム編集が起こっているpool細胞を用いて、導入後7~10日後からシングルセルクローニングを実施する。

<ヒント>

Cas9遺伝子をPlasmidで導入する場合は、Cas9の活性がしばらく残存している可能性があるため、導入後2週間以上経過してからシングルセルクローニングを開始してください。

- ▶ シングルセルクローニングは、0.5 cell/well程度になるような細胞濃度で96 well plateへ播種する (これは、1 cell/wellで播種すると複数細胞の入ったウェルが多くなるため。ただし、顕微鏡観察で確実に各ウェルを観察するのであれば、1 cell/wellで播種しても差し支えない)。
- ▶ 100 μ l/well程度を分注する。
- ▶ 細胞観察しながら、シングルセル由来のクローンのウェルを確認する。途中で培地を添加し、細胞がある程度増殖したら48 well plateや24 well plate等へ継代し、拡大培養する。

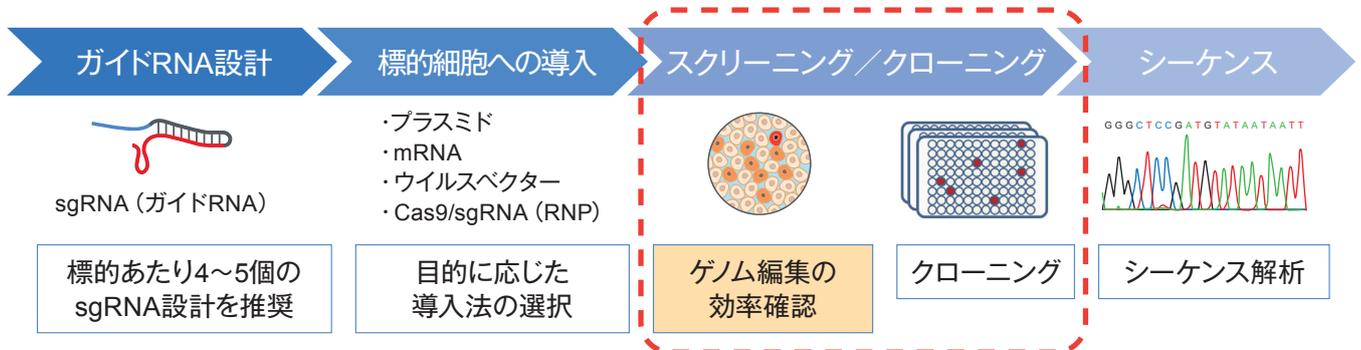
<ヒント>

どうしてもシングルセルクローニングができない細胞の場合は、10 cm plate等に薄く播いてコロニーをクローニングリングで単離する方法もあります。

- 各クローンを増やして凍結細胞ストックを作製し、一部の細胞をシーケンス解析用に分取する。
- Guide-it Indel Identification Kit (製品コード 631444) を使用してシーケンス解析する。

関連製品

その他のサポートツールをご紹介します



ゲノム編集された細胞集団における一塩基置換を検出

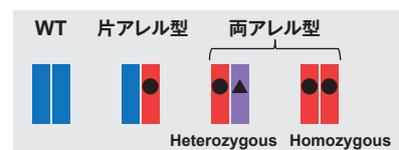
Guide-it™ SNP Screening Kit (製品コード 632652)

- シーケンス不要のハイスループットSNPスクリーニング
- ゲノム全領域の塩基置換を検出可能
- 簡便、迅速な操作、4時間で終了
- 倍数性にかかわらずゲノム編集を同定

遺伝子型 (片アレル、両アレル) を判定

Guide-it™ Genotype Confirmation Kit (製品コード 632611)

- Cas9/sgRNAの*in vitro*切断反応により遺伝子型の判定が可能
- 細胞の粗抽出液から直接PCRで標的配列を増幅
- PCRと電気泳動による簡便な方法を採用、シーケンスは不要



ゲノム編集後のシーケンス用サンプルを簡単に調製

Guide-it™ Indel Identification Kit (製品コード 631444)

- ターゲット部位の増幅、クローニング、シーケンス用サンプルの調製に最適な試薬が All-in-One!
- ダイレクトPCRとIn-Fusionクローニングによる簡便、迅速、そして確実なクローニングを実現



◆ 実験ハンドブック掲載製品リスト

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
sgRNAの調製およびsgRNAの有効性の確認			
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	50回	632635	¥150,000
Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	50回	632636	¥180,000
Guide-it™ sgRNA Screening Kit	50回	632639	¥78,000
Guide-it™ IVT RNA Clean-Up Kit	50回	632638	¥73,000
[Cas9タンパク質] RNP直接導入システムに			
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)	100 µg	632641	¥20,000
	100 µg×3	632640	¥54,000
ノックインドナー用長鎖ssDNA調製キット			
Guide-it™ Long ssDNA Production System	25回	632644	¥75,000
プラスミドベクターによる導入システム			
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green)	 1 Kit	632601	¥73,000
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red)	 1 Kit	632602	¥73,000
ウイルスベクターによる導入システム			
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632608	¥150,000
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632619	¥150,000
エキソソーム様小胞 (Gesicle) による導入システム			
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System	 1 Kit	632613	¥150,000
CRE Recombinase Gesicles	 200 µl	631449	¥82,000
導入後のサポートツール			
Guide-it™ Mutation Detection Kit	25回	631448	¥28,000
	100回	631443	¥88,000
Guide-it™ SNP Screening Kit	100回	632652	¥68,000
Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody	100 µl	632607	¥40,000
Guide-it™ Cas9 Monoclonal Antibody (Clone TG8C1)	100 µg	632628	¥40,000
Guide-it™ Genotype Confirmation Kit	100回	632611	¥88,000
Guide-it™ Indel Identification Kit	10回	631444	¥51,000

◆ 関連製品

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
iPS細胞のゲノム編集にも最適な培養システム			
Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System	1 Kit	Y30010	¥59,800
CRISPR/Casを利用した関連遺伝子のスクリーニングシステム			
Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library System	 5スクリーニング	632646	¥650,000
Guide-it™ CRISPR Genome-Wide sgRNA Library NGS Analysis Kit	10回	632647	¥100,000

 ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

・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。
 ・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。・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。
 ・本パンフレット記載の価格は2019年2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。

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
 関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン
 TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>
 Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店