

明日からはじめるゲノム編集

－ 効率のよいCRISPR/Casを行うために大事なこと －

2022年9月改訂

遺伝子のノックアウトやノックインが行える「CRISPR/Cas」は、基本的にCas9とsgRNAさえ用意すればスタートできるともシンプルな技術で、その簡単さと有効性から多くの研究室で実施されています。ただ、シンプルなかでも効率Upのために大事なポイントがいくつかあります。

本書では、効率と成功率の高いCRISPR/Casを行うためのポイントや必要な製品について、Q&A方式で分かりやすくご紹介します。

また、弊社製品をお使いいただいたユーザー様の実施例や、弊社ウェブサイトに掲載しているゲノム編集関連の人気ブログもご紹介しています。

CRISPR/Casに興味はあるけど試したことがない方は、本書をきっかけにぜひ「明日から」始めてみてください！



Contents

(1) Cas9 & sgRNA導入システムの選択

(2) sgRNAの設計・合成・有効性の確認

(3) 効率のよいノックイン実験のために

(4) Cas9 & sgRNA導入後の変異導入確認方法

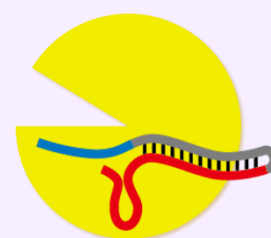
(5) ユーザー様実施例

- ・Cas9タンパク質を用いたマウスのゲノム編集
- ・sgRNA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

(6) ゲノム編集関連ブログ

- ・CRISPR/Casシステムってなに？
- ・簡単だけど難しい?? CRISPR/Casによるゲノム編集成功への近道

(7) CRISPR/Cas関連試薬まとめ

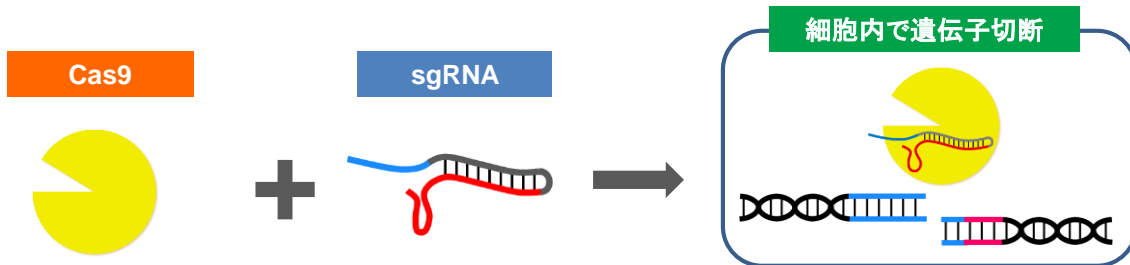


that's
GOOD
science!

(1) Cas9 & sgRNA導入システムの選択

Q1. CRISPR/Casは何？

A1. CRISPR/Casは、ゲノムDNA切断酵素「Cas9」とゲノム上の狙った箇所を認識するRNA分子「sgRNA」を使用し、ゲノムDNA上の任意の領域を切断することによって遺伝子変異導入を行う技術です。ゲノムDNAの切断を受けると生体内における修復過程で塩基の欠失・挿入が高確率で生じ、アミノ酸をコードするDNAのフレームシフトが起こり、結果、ターゲット遺伝子が破壊（ノックアウト）されます。つまり、なんらかの形でCas9とsgRNAを導入するだけで遺伝子のノックアウトが行えます。（p.10 ブログも併せてご覧ください）



Q2. CRISPR/Casを使ってノックインするためにはどうすればいいの？

A2. Cas9、sgRNAと一緒にノックインしたい配列を含む「ドナーDNA」を導入すれば、ノックインに系が動きます。効率を少しでもUpするノックインのポイントについては、p.5のQ12で説明しています。

Q3. Cas9、sgRNA の導入には、プラスミドベクター、ウイルスベクター、Cas9タンパク質そのものを使う方法などいろいろあるけど、どれが一番いいの？

A3. Cas9タンパク質そのものを使う方法が第一推奨です。なぜなら下記の通り、多くのメリットがあるからです。

- プラスミドシステムよりゲノム編集効率が高い
- Cas9遺伝子が残存してCas9を発現し続けることによるオフターゲットリスクが少ない
- ほとんどすべての生物で同じCas9タンパク質を使用できる
- タンパク質への転写・翻訳・発現にかかるプロセスがないのでタイムラグがなく効率的
- 低コスト

タカラバイオでは、使いやすく変異導入効率の高いCas9タンパク質を濃度違いで2種類ご用意しています。タンパク質が導入できる系をお持ちであれば、ぜひCas9タンパク質をお試しください。

■ 核移行シグナル(NLS)付き、高効率のCas9タンパク質

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

Q4. Cas9タンパク質を使うとき、sgRNAはどう準備すればいいの？

A4. sgRNAを別途調製し、Cas9タンパク質と複合体(RNP)を形成した上で導入します。sgRNAの調製には、*in vitro* transcription (IVT)を利用してユーザー様ご自身で作製する方法や受託合成を利用する方法があります。タカラバイオではIVT用のキットをご用意しており、詳しくはp.3のQ10で説明しています。

Q5. Cas9タンパク質とsgRNAの複合体(RNP)の導入方法は？

A5. 培養細胞の場合は、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の導入に有効なトランスフェクション試薬 *TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System* をご用意しています。トランスフェクションでの導入が難しい場合は、エレクトロポレーションをお試ください。培養細胞だけでなく、組織や受精卵などへの実績もあります。詳しい導入条件につきましては、エレクトロポレーション装置メーカーにお問い合わせください。

無料サンプルあります！
ウェブからお申し込みください。

■ RNPの導入に最適なトランスフェクション試薬

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

Q6. プラスミドベクターを使ったCas9とsgRNAの導入にメリットはないの？

A6. 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)* 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。

■ 蛍光マーカーを搭載したCas9とsgRNAを同時発現するプラスミドベクター

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

Q7. Cas9タンパク質やプラスミドベクターでうまく導入できない場合、どうすればいいの？

A7. 原理の異なる導入システム、例えばウイルスベクターなどをお試ください。タカラバイオではアデノ随伴ウイルス(AAV)を使用した導入システム *AAVpro[®] CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)* (製品コード 632619) をご用意しており、プラスミドでは入りづらい細胞でも変異導入が行えた実績があります。

また、タカラバイオオリジナルの「Gesicle」を使った導入システム *Guide-it[™] CRISPR/Cas9 Gesicle Production System* (製品コード 632613) もあります。エキソソーム様小胞である「Gesicle」は、非ウイルスでありながら、ウイルスの感染機構を利用してCas9タンパク質とsgRNAそのものを直接目的細胞に導入でき、特にトランスフェクション効率が低い細胞(分裂細胞、非分裂細胞、iPS細胞など)に有効です。

■ P1レベルで取り扱うことができる、汎用性の高い1ベクタータイプのアデノ随伴ウイルスベクター

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro[®] CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632619	¥166,000

■ 独自の導入原理でトランスフェクション効率が低い細胞に威力を発揮

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

(2) sgRNAの設計・合成・有効性の確認

Q8. sgRNAの設計はどうすればいいの？

A8. 一般的なCas9(SpCas9)を用いる場合、標的サイト中でPAM配列(5'-NGG-3'; Nは任意)を探し、その5'側上流の20塩基をsgRNA配列として採用します。もし見つからない場合は、逆鎖側で候補となる5'-CCN-3'を探します。現在は便利なオンラインツールが多数ありますので、それらをお使いいただくのがおすすめです。以下に比較的良好に使用されているツールをご紹介します。

- ・CRISPRdirect
- ・CRISPR design tool
- ・CHOPCHOP

また、設計ツールではありませんが、短い配列の高速塩基配列検索ができるGGGenomeを使用すれば、他の遺伝子に対する詳細な相同性検索が行えます。

Q9. sgRNAの設計においてオフターゲットを抑えるポイントは？

A9. 現時点で100%オフターゲットを抑制できる配列設計方法はありませぬ。ただ、選択したsgRNA配列が、他の遺伝子サイト中に完全一致配列を持つような著しい相同性を示すものは避けた方がよいです。

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。

Q10. sgRNAの合成はどうすればいいの？

A10. 試すsgRNA数が少ない場合は、化学合成による受託サービスを利用するのも一つです。ただ、1ターゲット遺伝子に対し複数のsgRNAを試した方がいいと言われており、ターゲットが増えると合成するsgRNAの数も増えてコストもかかります。

ユーザー様ご自身が*in vitro* transcription (IVT) でsgRNAを合成いただくとコストはかなり下がります。

タカラバイオは、IVTに必要な試薬がすべて入ったオールインワンの合成キットGuide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitをご用意しています。選択したsgRNA配列20塩基を含む約60塩基のプライマーだけ別途ご準備いただく必要がありますが、後はキットに入っている試薬ですべてまかなえ、簡単な操作でコストパフォーマンスの高いsgRNA合成が可能です。しかも1回の合成で12 µg以上のsgRNAが調製できますので、標準的なプロトコールで数十回の実験が行えます。

■ 高品質のsgRNAを簡単操作で合成できるキット

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

Q11. sgRNAの有効性を事前に確認するいい方法はないの？

A11. 最終的にどれくらいの変異導入効率になるのかは、実際に試してみないと分かりません。ただ、ゲノムDNAの切断が起こらなければその後の変異導入も起こらないことを考えると、設計したsgRNAが切断活性を持つかどうかを事前に確認することに意味はあります。

タカラバイオでは、設計したsgRNAがちゃんとゲノムDNAのターゲット領域を切断するかどうかを実サンプルを使わずに *in vitro* の環境で確認できるキット Guide-it™ Complete sgRNA Screening System をご用意しています。このキットには、実際にsgRNAを合成するために必要な試薬とCas9タンパク質が入っており、正にCRISPR/Casを試験管の中で再現するイメージです。sgRNAを合成する部分は、実はQ10でご紹介したGuide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitと全く同じですので、切断活性が確認されたsgRNAはそのまま実サンプルを使った本番実験にご使用いただけます。

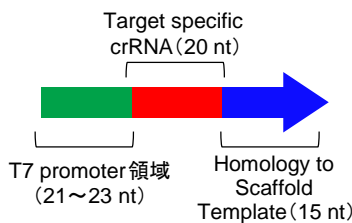
もちろん、実際の生体内での変異導入には様々なファクターがあり、「切断活性がある＝変異導入が起こる」とは限りませんが、少なくとも切断活性がない、もしくは著しく低くて本番実験でも失敗するリスクを持つsgRNAを使うことは回避できます。ゲノム編集の成功率Upのために、ぜひご利用ください。

本製品を使用したユーザー様実施例をp.8でご紹介しています。併せてご覧ください。

Guide-it™ Complete sgRNA Screening Systemの各操作ステップ

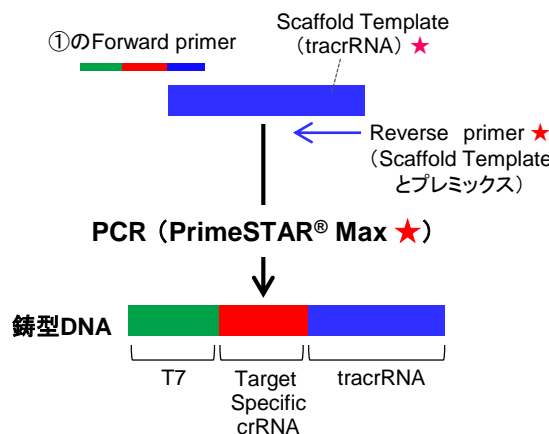
1. sgRNAを合成する

① Forward primerの設計

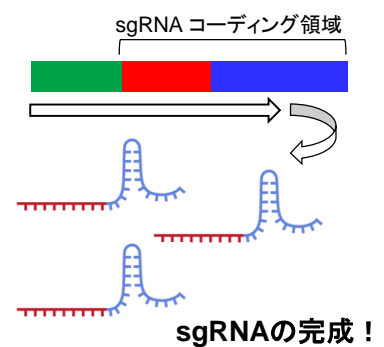


ご自身で設計したターゲット配列にT7 promoter領域とScaffold Template相同領域を付加した形で、Forward primerを合成してください。

② PCRによる鑄型DNAの調製

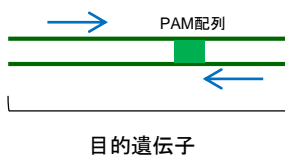


③ *In vitro* transcriptionによるsgRNAの合成

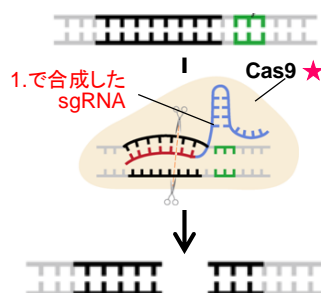


2. 切断効率を確認する

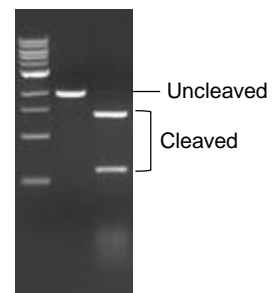
④ 切断確認用ターゲットDNAをPCR (Terra™ PCR Mix) で調製



⑤ sgRNAとCas9によるターゲットDNAの切断



⑥ 電気泳動による切断確認



(★は本システムに添付しています。)

sgRNAの切断活性を*in vitro*で確認するキット

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

(3) 効率のよいノックイン実験のために

Q12. ノックイン効率をUpするにはどうすればいいの？

A12. ノックインを行うには、ノックインしたい配列を持つドナーDNAを調製する必要があります。

ドナーDNAには、ノックインしたい箇所の上流部分・下流部分をアームとして、挿入配列の左右に持たせる必要がありますが、アームをどのくらいの長さにしたら効率的かについては様々な知見があり定まっていません。ただ、挿入配列が短かければ片アームを30~60 basesくらい、数千bpになる長い配列の場合は片アーム200~600 basesくらいが一つの目安となるようです。

また、ドナーDNAは二本鎖DNA(dsDNA)ではなく、一本鎖DNA(ssDNA)で用意した方が効率が良いと言われています。ssDNAの調製は、200 basesくらいまでなら化学合成で行うのが一般的ですので、ポイントミューテーションを入れたい場合はこちらでカバーできます。蛍光・薬剤マーカー、プロモーター、発現カセット、loxP配列など長鎖ssDNAの合成(0.5~5 kbくらい)となると技術的に難しい部分がありましたが、Guide-it™ Long ssDNA Production System v2(製品コード632666)を使用すれば、PCRと酵素処理といった簡単な手法で、長鎖ssDNAが収量よく調製できます。

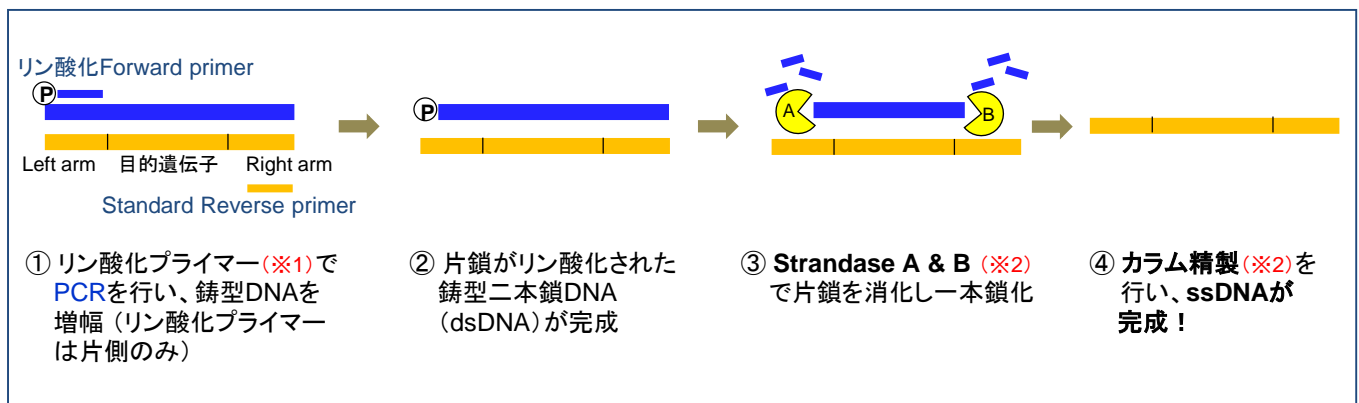
特に長鎖DNAをノックインする場合、dsDNAを使用すると、1)ランダムインテグレーションが起きやすい、2)細胞毒性が高い、など目的クローンの取得効率の低下につながる現象が起こりやすいことが分かっていますので、Guide-it™ Long ssDNA Production System v2を使用してssDNAのノックインドナーを調製することを強くおすすめします。

以下に本システムの特長とプロトコルの概要をご紹介します。

■ Guide-it™ Long ssDNA Production System v2の特長

- CRISPR/Cas9のノックインドナー用長鎖ssDNA調製キット
- 500 bases~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
- 反応系の改良により、従来製品より効率的なssDNA調製が可能に

■ プロトコール概要



※1 別途リン酸化プライマーをご準備いただく必要があります。 ※2 本キットに含まれます。

■ 長鎖ssDNAが簡単に、高収量で調製可能

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Long ssDNA Production System v2	50回 ※3	632666	¥87,000

※3 反応回数は従来製品(製品コード632644:終売)と同じです。(センス鎖25回、アンチセンス鎖25回分)

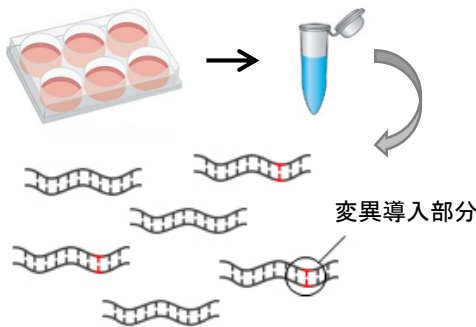
Q13. 変異導入を確認するには、シーケンスするしかないの？

A13. 最終的には、例えば培養細胞であればシングルセルクローニングを行い、目的の変異導入かどうかをシーケンスによって確認する必要があります。しかし、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にシーケンスなどの詳細な解析を行っても、目的クローンが得られる確率はゼロもしくはとても低いので、結果的に解析にかかった時間、試薬などの多くが無駄になってしまいます。そこでゲノム編集を行うユーザー様の多くは、T7E1アッセイと呼ばれるPCRと電気泳動といった簡単な手法で、そもそも変異導入が起こっているのか、起こっているならどれくらいの効率かをざっくり確認されています。つまり、コストがあまりかからないT7E1アッセイを行って当たりを付け、ある程度の変異導入が起こっていることが確認できた上で、次の大事な解析に進むという訳です。

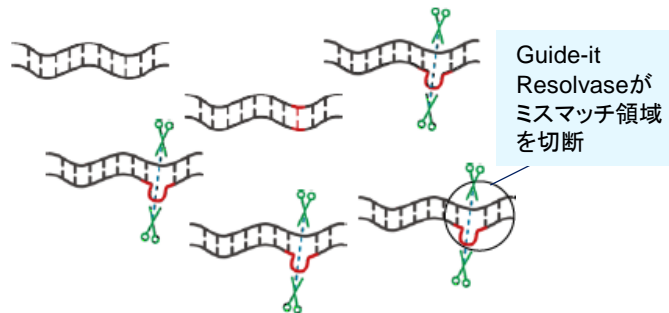
タカラバイオでは、厳密にはT7E1アッセイとは異なりますが、全く同じ目的で使用するGuide-it™ Mutation Detection Kitをご用意しています。本キットは、すべての生物・組織などで幅広く使えます。目的クローンの取得効率Upのために、ぜひ本キットをご利用ください。

■ Guide-it™ Mutation Detection Kitの各操作ステップ

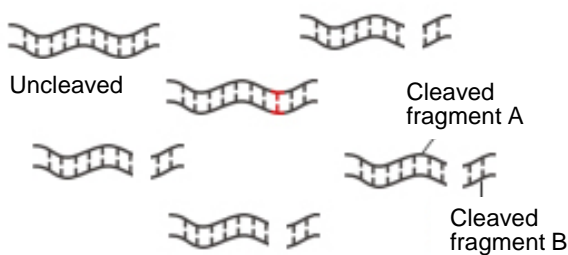
1. 細胞ライセートからTerra™ PCR Direct Polymerase Mixを用いて標的配列を直接増幅



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)



■ ざっくり簡単に変異導入効率の確認が可能

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

(5) ユーザー様実施例

マイクロインジェクション法によるCas9タンパク質とガイドRNA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)

【データご提供：T大学 I様、H様】

ユーザー様から、Guide-it™ Recombinant Cas9 (3 µg/µl)(製品コード 632641)を用いた実施例をご提供いただきました。



■ 実験の背景

当研究室は、ゲノム編集技術(CRISPR/Cas)を用いた遺伝子改変マウス作製サービスを実施しており、遺伝子組換えマウスの樹立や飼育、特定病原体の排除、受精卵の凍結保存などで、所内の共同利用実験室の1つとして各分野の研究をサポートしている。

■ 経緯と問題点

タカラバイオ社のCas9タンパク質を使用する前は、複数社のCas9タンパク質を使用していた。しかし、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。

■ 解決策

目詰まりの問題を解決するために、各社から発売のCas9タンパク質を調査したところ、タカラバイオ社のCas9タンパク質が低グリセロール濃度のため、早速購入し、ロット間差と合わせて他社製品も含めた性能比較実験を行った。

■ 結果

タカラバイオ社のCas9タンパク質使用により、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。

他社製品と比較すると、タカラバイオ社のCas9では相同組換え修復による遺伝子ノックインの効率が優れていた。下表にタカラバイオ社のCas9を用いたマウスのゲノム編集結果を示す。

遺伝子名	Type(挿入カセット長/欠失長)	ドナー	産仔数	改変あり産仔数	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ドナー	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%

■ 今後

ゲノム編集によるノックインやノックアウトを安定して作成可能なタカラバイオのCas9タンパク質に満足しており、引き続き使用していく予定である。

補足:近交系(C57BL/6J)マウス凍結受精卵をマイクロインジェクションに使用している。近交系受精卵は産子数が少くなる傾向が強いが、その条件においても安定した結果を得ている。

KIドナーとして二本鎖環状DNAを用いているため、エレクトロポレーションではなくマイクロインジェクションを実施している。

gRNAの有効性事前確認キット『Guide-it™ Complete sgRNA Screening System』の使用で、変異導入を確かなものに

【データご提供：R研究所 T様】

ユーザー様から、gRNAの有効性事前確認キット Guide-it™ Complete sgRNA Screening System (製品コード 632636)を使用した実施例をご提供いただきました。

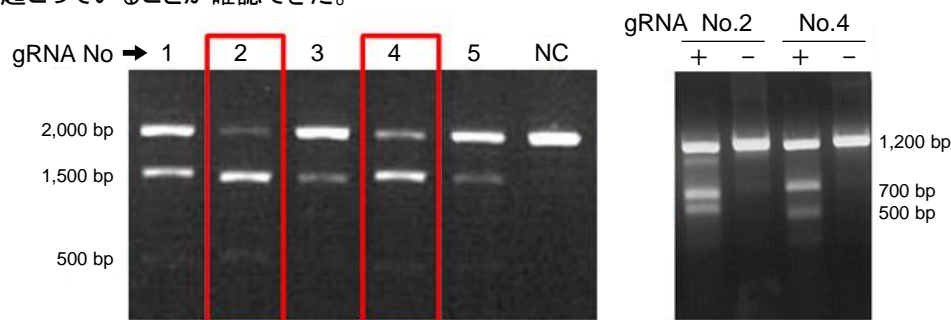
■ 実験の背景

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(図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(図B)、シーケンスでもDeletionが起きていることが確認できた。



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

図B ヒトiPS細胞での変異導入効率の確認結果

T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が、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。健常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が見えています。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。

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何ですか。

設計したgRNAの有効性の事前確認のためにGuide-it™ Complete sgRNA Screening System(製品コード 632636)を使っています。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、最近ではタカラバイオの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。

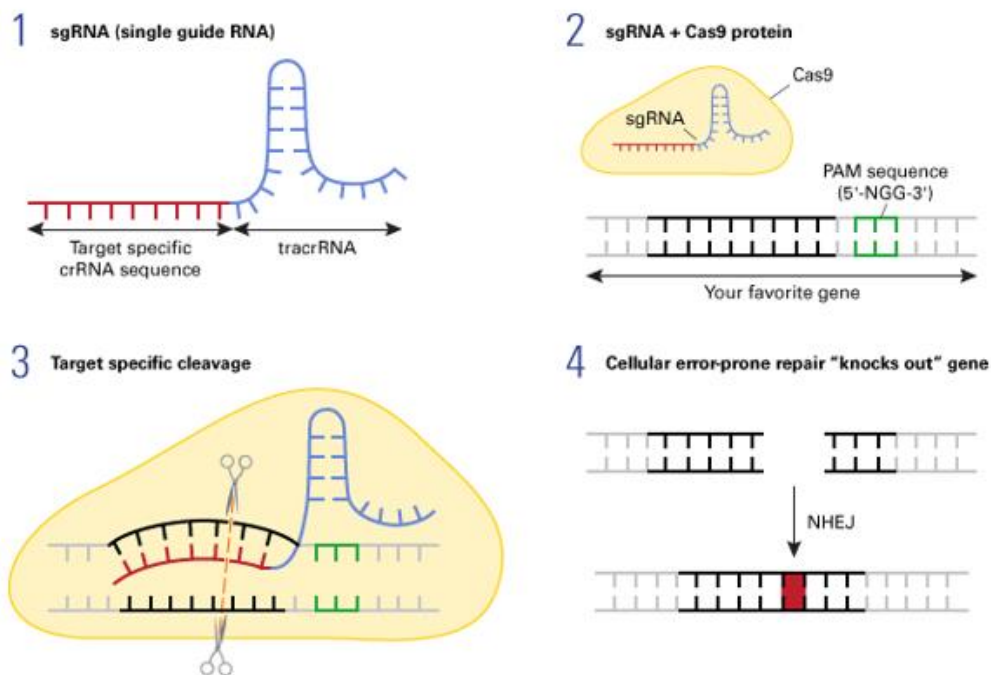
CRISPR/Cas9システムってなに？ - 正確で効率がよく、なおかつ簡単なゲノム編集ツール-

ゲノム編集を行うシステムとして初期に報告されたzinc finger nucleasesやTALEN。これらの開発で、今までは不可能だった正確で効率のよい遺伝子改変が可能になりましたが、非常に系の構築が難しく、誰もが気軽に使えるとは言い難いものでした。そのような状況をCRISPR/Cas9システムが一変させました。効率のよい正確な遺伝子改変、つまりゲノム編集が簡単に行えるようになりました。

CRISPR/Cas9とは何でしょうか。

実は、微生物が持つ獲得免疫システムを利用したもので、RNA分子がピンポイントで特定のDNA配列(侵入してきたファージなどの配列)にCas9というDNA切断酵素を誘導し、その部分を正確に切断して“侵入者”を排除する。このシステムをゲノム編集に応用したのです。

つまりCRISPR/Cas9は、切断酵素Cas9とRNA分子(single guide RNA; sgRNA)から成るシンプルなシステムです。このCas9とsgRNAを対象細胞に入れてターゲット遺伝子の正確な切断を行うと、non-homologous end joining DNA repair pathway (NHEJ) と呼ばれる修復機構が働くのですが、一定割合で塩基の欠失や挿入を伴う修復エラーが生じ、結果、塩基の読み枠がむちゃくちゃになり、その遺伝子の機能が失われるいわゆるノックアウト状態になります(ノックインの場合は、homology-directed repair (HDR)と呼ばれる修復機構を利用します)。



CRISPR/Cas9システムによるノックアウトの原理

- (1) ターゲット遺伝子の配列に基づきsgRNAを設計する。
- (2) Cas9とsgRNAの複合体を形成し、それをターゲット遺伝子に作用させる。
- (3) Cas9/sgRNA複合体がターゲット遺伝子の特定の箇所をピンポイントで認識し、正確に切断する。
- (4) 対象生物の中で修復エラーが生じ、ノックアウト状態になる。

CRISPR/Cas9のイメージを掴んでいただけましたか？

タカラバイオは、CRISPR/Cas9を用いた研究を上流から下流までサポートする幅広い製品ラインナップ“Guide-it™シリーズ”をご用意しています。

この“Guide-it™シリーズ”を使えば、簡単にCRISPR/Cas9を用いたゲノム編集をスタートできるだけでなく、効率や成功率のUpにもつながります。ぜひ一度お試しください！

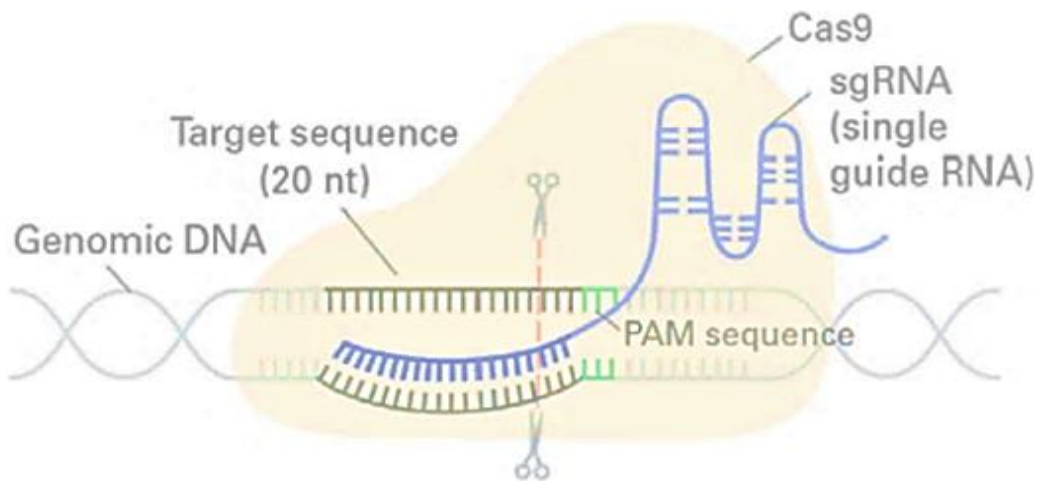
簡単だけど難しい?? CRISPR/Casによるゲノム編集成功への近道

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、様々なファクターが考えられます。

sgRNAの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、反応系構築の際は、いきなりご自身のターゲット配列用にsgRNAを設計して実験を行うのではなく、まずは文献等でノックアウトが起こった実績のあるsgRNA配列を使用して検討することをお勧めいたします。これでターゲット配列に対して変異導入が起これば、CRISPR/Casによるゲノム編集が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。

このように、あらかじめゲノム編集がワークする反応系を構築した上で、ご自身が設計したsgRNA配列を使用して実験を行います。そこで、変異導入が起これなければsgRNA配列に問題があると考えられるため、原因の特定がしやすくなります。

特に、遺伝子のノックインはノックアウトに比べて導入成功率が低い場合が多いため、上記のように段階を踏んだ反応系のチェックを行うことが、ゲノム編集成功への近道となります。



BioViewブログのご紹介

タカラバイオのウェブサイトにご用意している「BioViewブログ」では、汎用製品から他にはないユニークな製品まで、タカラバイオが販売する数多くの製品からおススメの製品をご紹介しますほか、皆様の研究に役立つ実験のコツなどもご紹介しています。

専門分野だけでなく、幅広い情報を手に入れたい方にピッタリです！

研究者の皆様にはわかりやすいブログを目指していますので、ぜひご覧ください。

(7) CRISPR/Cas関連試薬まとめ

■ CRISPR/Cas9の導入関連試薬

★ Cas9 & sgRNA導入にはCas9タンパク質とsgRNAそのものを使う方法が第一推奨です。

< Cas9タンパク質 >

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

< sgRNA合成キット >

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

★ Cas9タンパク質の導入が難しいときや、とにかく簡単にCRISPR/Casを行いたいときにはプラスミドベクターがおすすめです。

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

★ ノックインDNAの調製キットです。一本鎖DNA(ssDNA)の形で使用することで効率Upにつながります。

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

■ 確実に成功率の高いCRISPR/Casを実施するためのサポート試薬

★ 本番実験前のsgRNAの有効性確認キットです。
切断活性を持たない、もしくは著しく低いsgRNAを用いてしまうリスクを減らせます。

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

★ 変異導入効率を簡便に確認するキットです。目的クローンの取得効率Upにつながります。

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



- ・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 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282
関西支店・営業第2部 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

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

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

取扱店