

ゲノム編集製品ガイド

CRISPR/Cas9 の導入から目的クローン選択までゲノム編集サポートツールを網羅

CRISPR/Cas9によるゲノム編集実験フロー

ターゲットの選択

PAM配列を含む任意のDNA配列を選択

ガイドRNAの設計

オンラインツールを使用

<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>

*in vitro*でsgRNA合成と有効性を試験

sgRNAを簡便に調製し、*in vitro*で切断効率を確認

Guide-it™ Complete sgRNA Screening System P2

Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kit

Guide-it™ sgRNA Screening Kit

ガイドRNAとCas9等を細胞へ導入

sgRNAクローニング・発現システム

アデノ随伴ウイルスベクターを用いたCRISPR/Cas9システム

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2) P3

Cas9と蛍光タンパク質を同時に発現するプラスミドベクターシステム

Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green) / (Red) P4

Cas9の発現を確認

組換えCas9タンパク質を高感度に検出

Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody P4

ゲノム編集効率 (Indels) のモニター

ゲノム編集後の変異導入効率確認キット

簡便かつ高感度な変異の検出

Guide-it™ Mutation Detection Kit P5

ゲノム編集配列の確認

ゲノム編集後の挿入、欠失等ゲノム配列の確認

シーケンス用サンプル調製のためのオールインワンキット

Guide-it™ Indel Identification Kit P6

・製品一覧 P6

・ゲノム編集受託サービス 裏表紙

製品の詳細はウェブカタログでもご覧いただけます。

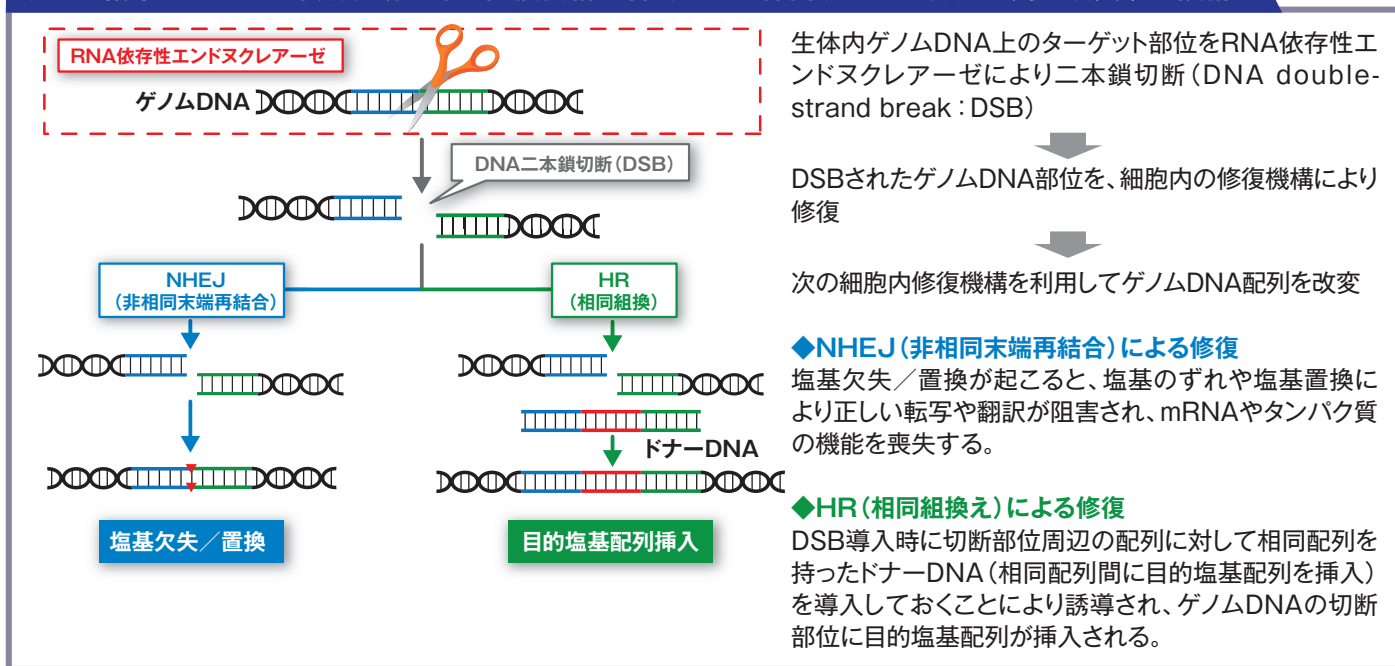
タカラバイオ ▶ バイオ産業支援事業 ▶ ウェブカタログ ▶ 幹細胞研究・遺伝子導入

▶ **Guide-it™ シリーズ選択ガイド**

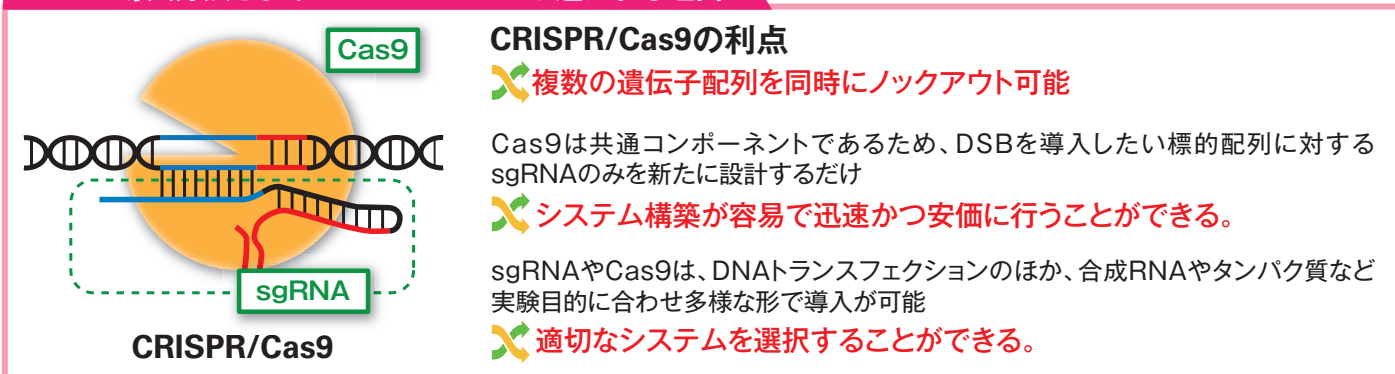
ゲノム編集を支える Guide-it



ゲノム編集…DNA二本鎖切断とその修復機構を利用して生体内ゲノムの特定配列を改変する技術

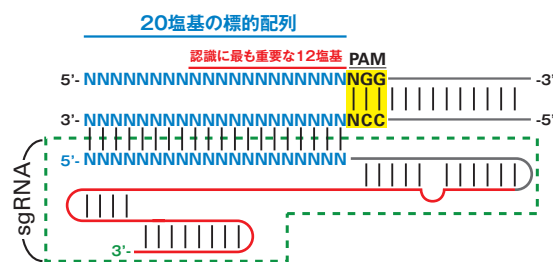


DSBの導入方法としてCRISPR/Cas9が選ばれる理由

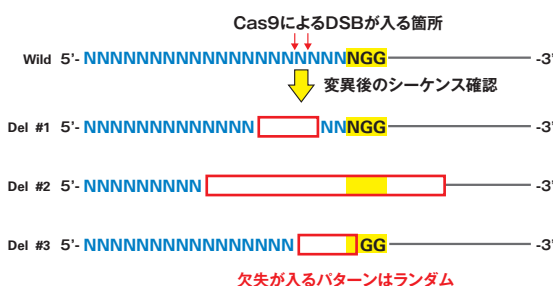


CRISPR/Cas9によるゲノム編集を成功させる2つのポイント

PAM配列の上流10～12塩基のsgRNA配列が重要！



より確実な実験系を使用して時間とコストの節約を！



Cas9タンパク質は標的ゲノム側のPAM配列NGG (Nはどの塩基でもよい)を認識し、その上流3～4塩基を切断します。そのため、ガイドRNA (single guide RNA; sgRNA) は、ゲノム上のPAM配列NGGの上流20塩基をターゲット領域としてデザインするだけで設計が可能です。

また、標的配列を認識する塩基配列において、PAM配列上流の10～12 bpがオフターゲットのリスクを低減する上で重要となる領域とされています。

sgRNAの設計は、<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/> などWebサイトから可能です。

NHEJによる遺伝子ノックアウトやHRによる遺伝子ノックインを行う場合、目的クローンの取得には、CRISPR/Cas9による遺伝子改変後の細胞のクローニングや塩基配列確認などのスクリーニング作業を行う必要があります。その時間とコストは、得られるゲノム編集効率に大きく依存します。一方、これらゲノム編集の効率は、設計したsgRNAにより得られるDSBの効率やCas9/sgRNAの細胞内導入効率により変化します。

従って、DSB切断活性が高いsgRNAやCas9/sgRNAの効果的な導入方法を選択すること、ならびに、スクリーニング作業前にゲノム編集効率を確認することで、その後に必要となるスクリーニング作業の時間とコストを節約することが可能となります。

in vitro反応によるsgRNAの合成と有効性の確認

Guide-it™ Complete sgRNA Screening System (製品コード 631439)

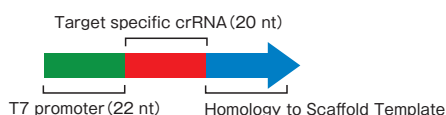
細胞や動物個体を使わずに**in vitro**でsgRNAのスクリーニングを行うことができるキットです。

- ◆ **in vitro**でのsgRNA合成、組換えCas9によるDNA切断反応に対応した**All-in-One**キット
- ◆ **in vitro** transcriptionによるsgRNA作製のための鋳型をPCRベースで簡単に合成
- ◆ sgRNA調製キット (製品コード 631438)、sgRNA評価キット (製品コード 631440) の単品購入も可能

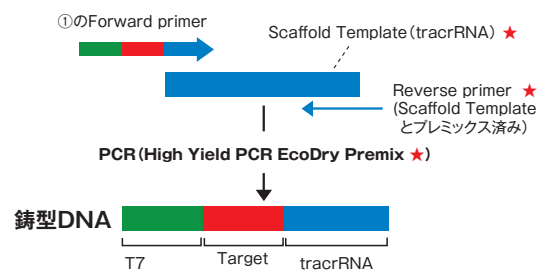
Guide-it™ Complete sgRNA Screening Systemの操作フロー

1. sgRNAの合成

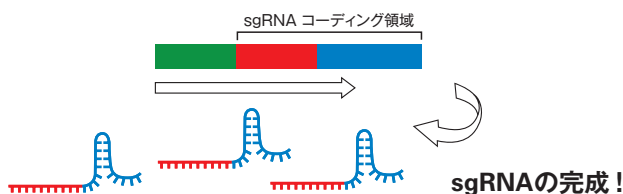
① Forward primerの設計



② PCRによる鋳型DNAの調製



③ **in vitro** transcriptionによるsgRNAの合成



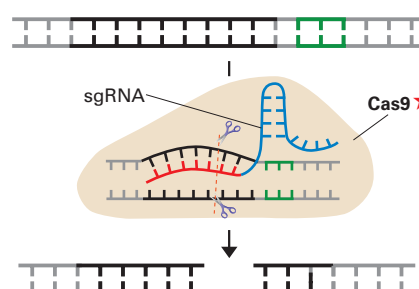
Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit
(製品コード 631438)

2. 切断効率の確認

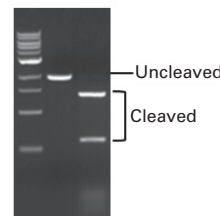
④ 切断確認用ターゲットDNAをPCRで調製



⑤ sgRNAとCas9によるターゲットDNAの切断



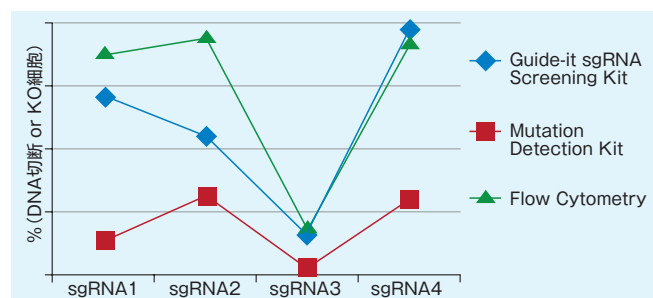
⑥ 電気泳動による切断確認



Guide-it™ sgRNA Screening Kit
(製品コード 631440)

(★は本製品に添付しています。)

■ 実施例：配列の異なるsgRNAによる**in vitro** DNA切断活性とゲノム編集効率の比較



HeLa細胞のCXCR4を標的とした配列の異なる4つのsgRNAを用いて、Guide-it sgRNA Screening Kitを用いた**in vitro** DNA切断活性(◆)、Guide-it Mutation Detection Kitで検出した**in vivo**のゲノム編集効率(■)、CXCR4を特異的に認識するFITC標識抗体を用いたFlow Cytometry解析によるCXCR4のKnock Outの割合(▲)を比較した。

in vitro DNA切断活性とゲノム編集による変異導入ならびにKO効率の間に相関性が確認されました。

このような場合にお使いください！

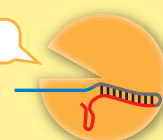
- 設計した複数のsgRNAの中からワークするものをスクリーニングする時に
- CRISPR/Cas9によるゲノム編集実験のトラブルシューティングに
- sgRNAを直接導入する際のsgRNAの大量合成に

本キットなら**in vitro**の簡便な操作のみでOKです！

👉 ゲノム編集について簡易的な実験をしながら学ぶ

ゲノム編集って意外と簡単かも！

細胞を用いず **in vitro** の簡単な操作でゲノム編集ができるので、学生実験などの学習キットとしても使っていただけます。



組換えアデノ随伴ウイルス (AAV) によるゲノム編集システム

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2) (製品コード 632608)

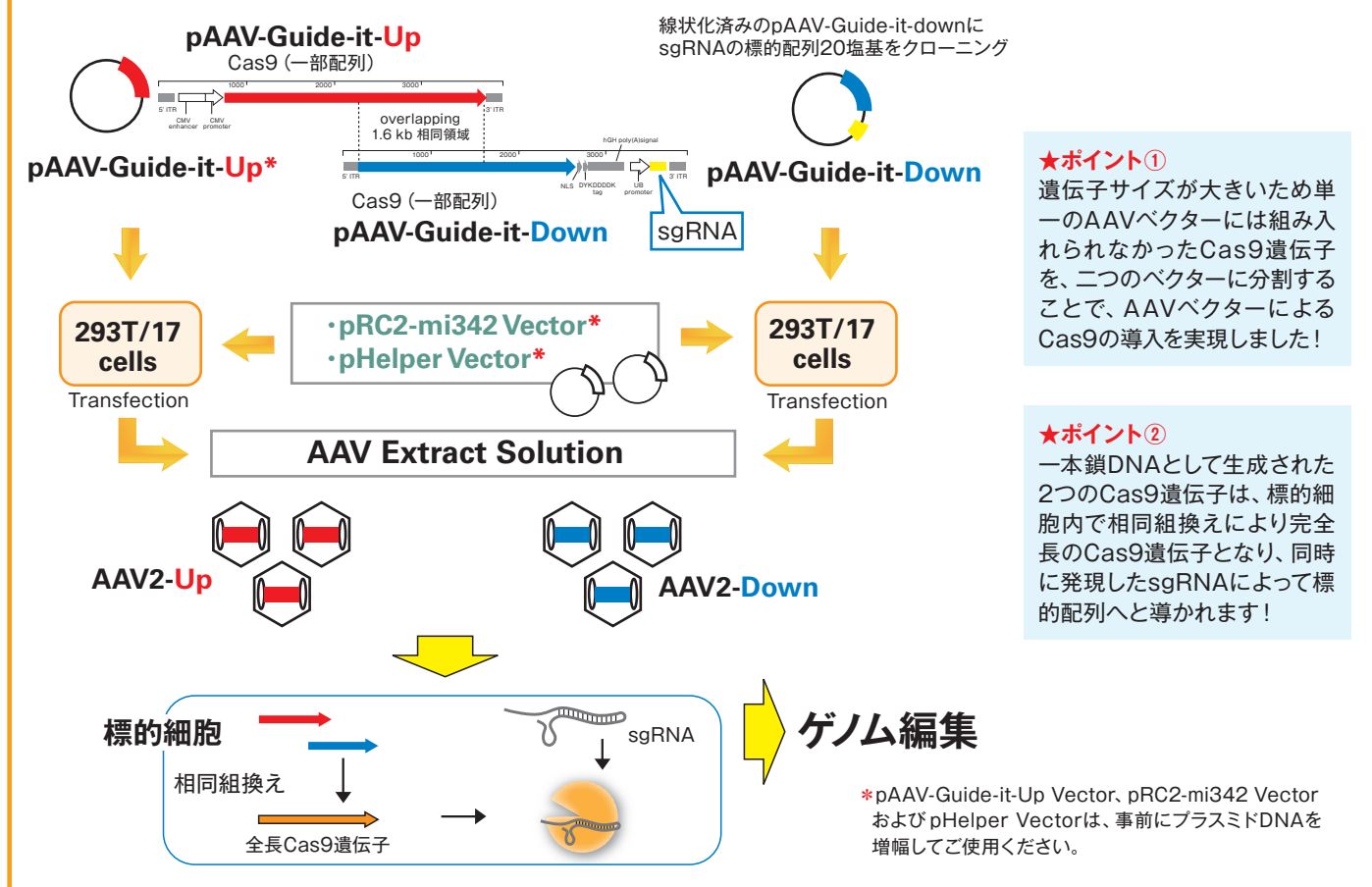
組換えアデノ随伴ウイルスは、ウイルスベクターを用いるCRISPR/Cas9システムに最適です。特にプラスミドベクターではゲノム編集効率の低い細胞にオススメです。

- ◆アデノ随伴ウイルス (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

組換えアデノ随伴ウイルスは・・・

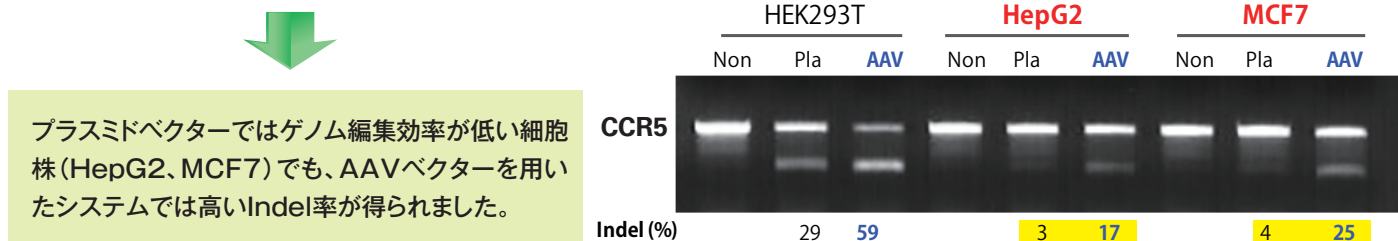
- P1レベルの施設で取扱いが可能
- 長期間の発現が可能 (非分裂細胞の場合)
- 宿主域の広いAAV2ベクターは広範囲の細胞・動物組織に導入可能
- 増殖/非増殖のいずれの細胞にも遺伝子導入が可能
- 免疫原性が低く、動物個体への遺伝子導入にも最適

AAVpro® CRISPR/Cas9 Systemの操作フロー



■ 実施例：AAVpro® CRISPR/Cas9 Systemを用いた異なる細胞種でのゲノム編集効率

12ウェルプレートに 1×10^5 個の細胞を播種し、一晚培養後、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ウイルスベクターとAAV2-Downウイルス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) を用いて比較した (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 μ g)。



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ベクターを用いたシステムでは高いIndel率が得られました。

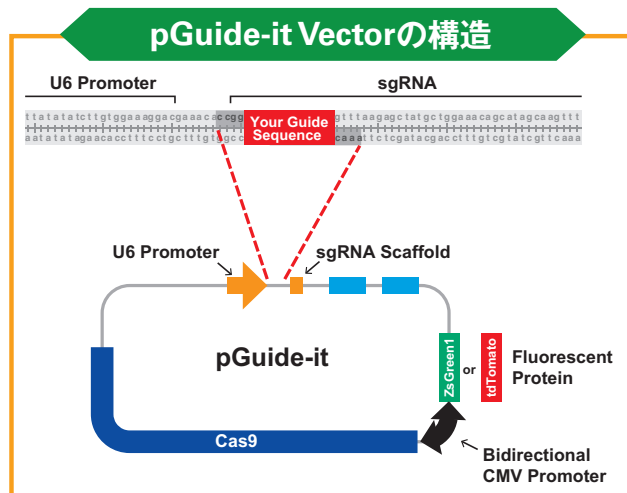
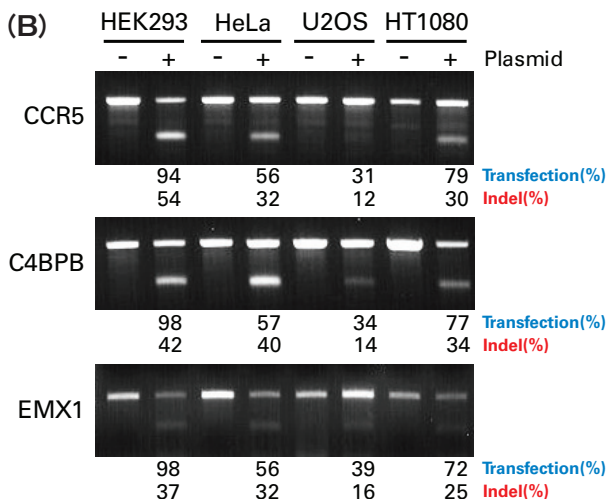
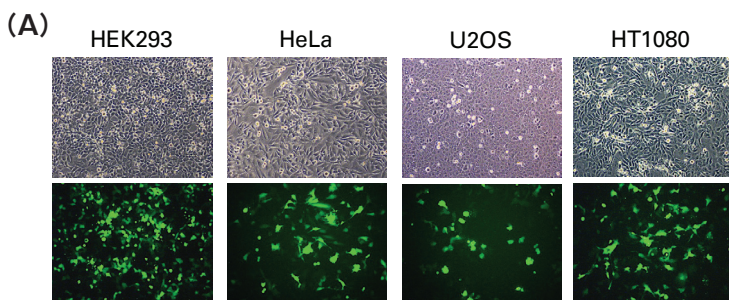
プラスミドベクターを用いるゲノム編集システム

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

sgRNA配列をプラスミドベクターにクローニングし、哺乳類細胞で発現させるためのキットです。

- ◆ Cas9と蛍光タンパク質 (ZsGreen1またはtdTomato) も同時に発現できる便利なワンベクタータイプ
- ◆ sgRNA発現用オリゴDNAを準備するだけの簡便、迅速なAll-in-Oneシステム
- ◆ 明るい蛍光マーカーでモニタリング

■ 実施例



HEK293、HeLa、U2OS、HT1080の各 1×10^5 cellsを12ウェルプレートに播種し16時間培養後、Xfect Transfection Reagentを用いて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、それぞれ2.5 μ gを使用した。

トランスフェクションから48時間後、ZsGreen1の蛍光を蛍光顕微鏡で確認(A)し、FACSでトランスフェクション効率(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。ターゲット配列を含む領域を細胞から直接PCR増幅し、増幅産物を変性、再アニーリングさせてミスマッチを含む二本鎖DNAを作製し、Guide-it Resolvaseでミスマッチ部分を切断した。その後、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(B. Indel %)を求めた。

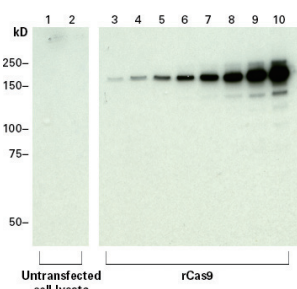
ウェスタンブロッティングでCas9の検出が可能なウサギポリクローナル抗体

Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody (製品コード 632607ほか)

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

- ◆ Wild-typeのCas9だけでなく、バリエーション(Cas9 nickase、Cas9 nuclease-deficient mutant)も認識
- ◆ 高い特異性…… 哺乳類細胞ライセートに対してバックグラウンドが出ません。
- ◆ 高感度…… ウェスタンブロッティングにより、わずか0.5 ngの組換えCas9タンパク質を検出可能。
Cas9発現細胞 3,500個からのシグナル検出も可能です。

■ 実施例：ウェスタンブロッティングにおけるGuide-it™ Cas9 Polyclonal Antibodyの検出感度



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

ゲノム編集後の変異導入効率確認に

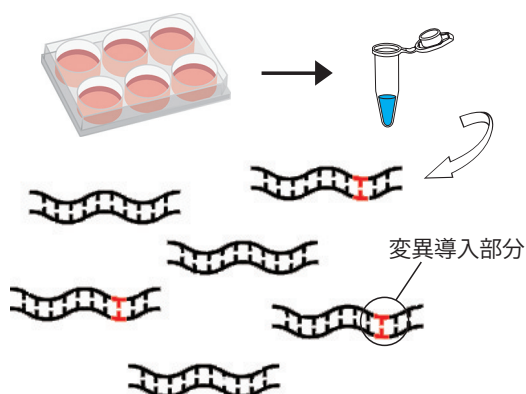
Guide-it™ Mutation Detection Kit (製品コード 631448ほか)

CRISPR/Cas9、ZFNs、TALENsなどによる変異導入効率を簡単&迅速に評価可能なキットです。

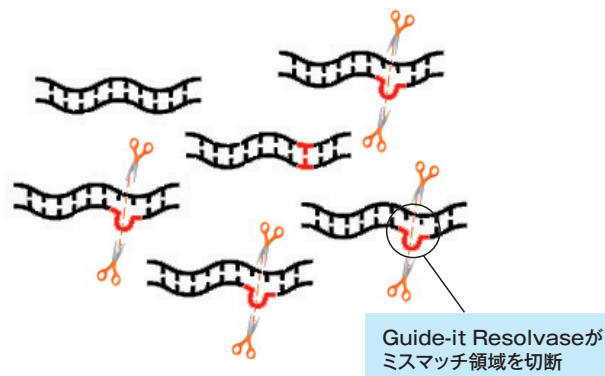
- ◆細胞のゲノムに導入された挿入、欠失をPCRベースの手法で簡単に検出
- ◆変異箇所を認識するDNA切断酵素、標的配列増幅用PCR酵素とDNA簡易抽出バッファーを含む便利なキット
- ◆PCR酵素は細胞からの直接増幅が可能で、他社アッセイキットより迅速、高効率

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

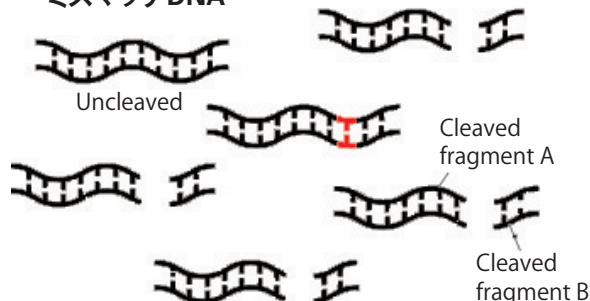
1. Terra™ PCR Direct Polymerase Mixを用いて細胞ライセートから標的配列を直接PCR増幅



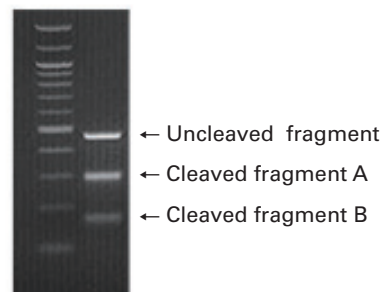
2. 変性&再アニーリングしてGuide-it™ Resolvaseで処理



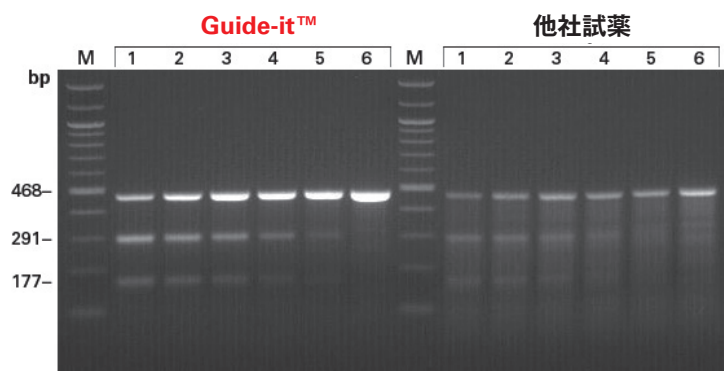
3. Guide-it™ Resolvaseによって切断されたミスマッチDNA



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)



■ 実施例：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および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 Direct 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。
(クロンテック社比較データ)

Guide-it™の電気泳動パターンはクリアでしたが、他社製品ではスメアを呈しました。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！

ゲノム編集後の挿入、欠失等ゲノム配列の確認に

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

In-Fusionクローニングにより、簡便かつ確実に変異配列を確認するキットです。

- ◆ 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をAll-in-One！
- ◆ ダイレクトPCRとIn-Fusionクローニングにより簡便、迅速、そして確実なクローニングを実現

操作フロー

細胞ライセートから直接ターゲット部位を含むゲノムDNA配列を増幅



In-Fusionクローニングにより、増幅産物をpUC19ベクターにクローニング



形質転換後、コロニーPCRによりプラスミドのインサート部分を増幅



DNAシーケンス解析を行い、ターゲットゲノム上の挿入、欠失の配列を確認

■ 実施例：CRISPR/Cas9によるゲノム編集後、CD81遺伝子の挿入、欠失配列を確認

Cas9をコードするプラスミドとCD81遺伝子をターゲットとしたsgRNAをHeLa細胞にトランスフェクションしてゲノム編集を行った後、Guide-it Indel Identification Kit を用いてシーケンス確認用サンプルを調製し、配列確認を行った。6クローンのシーケンスデータと元の配列とのアライメントを行って、CD81遺伝子上に導入された変異配列を確認した。



【製品一覧】

製 品 名	概 要	容 量	製品コード	価格(税別)	備 考
in vitroでsgRNAを合成して有効性を試験					
Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	PCRベースでsgRNAを合成し、キット添付のCas9でin vitroで有効性を試験	1 System	631439	¥120,000	-
Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit		10回	631438	¥70,000	
Guide-it™ sgRNA Screening Kit		30回	631440	¥78,000	
アデノ随伴ウイルスベクタータイプのCRISPR/Cas9システム					
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	プラスミドベクターではゲノム編集効率の低い細胞にお勧め	1 Kit	632608	¥150,000	-
AAVpro® CRISPR/Cas9 Vector System		1 Kit	632609	¥90,000	
プラスミドベクタータイプのCRISPR/Cas9システム					
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green)	Cas9と蛍光タンパク質を同時に発現	1 Kit	632601	¥73,000	ラ 営
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red)		1 Kit	632602	¥73,000	
ゲノム編集効率のモニター					
Guide-it™ Mutation Detection Kit	PCRベースでゲノム編集後の変異導入効率を簡単に確認	25回	631448	¥28,000	-
		100回	631443	¥88,000	
ゲノム編集配列の簡単確認					
Guide-it™ Indel Identification Kit	ゲノム編集後のゲノム配列確認用キット	10回	631444	¥51,000	-
CRISPR/Cas9システムのCas9抗体					
Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody	CRISPR/Cas9システムのCas9抗体	100 μl	632607	¥40,000	-
		100 μl×3	632606	¥98,000	

ラ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

営 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。

CRISPR/Cas9システム作製サービス

プラスミドベクターでのゲノム編集

DNA-directed RGEN (dRGEN) 設計・作製サービス

ヒト遺伝子に対してgRNA設計済みのプラスミドベクターセット

DNA-directed RGEN (dRGEN) ヒト遺伝子セット

設計・作製サービス

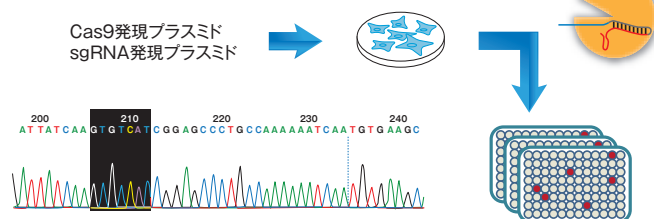
mRNA／タンパク質でのゲノム編集

Active RGEN (aRGEN) 設計・作製サービス

ノックアウト／ノックイン細胞作製サービス

CRISPR/Cas9システム (dRGEN) によって目的遺伝子をノックアウト／ノックインした細胞を作製・納品します。

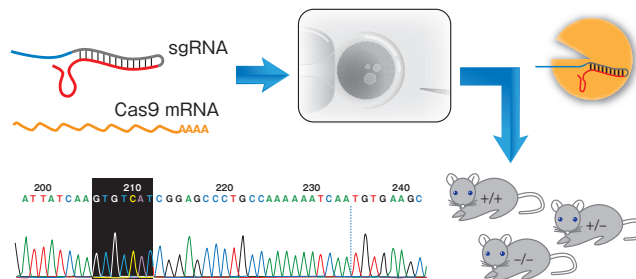
- ベクター発現によるCas9タンパク質、sgRNA導入
- iPS細胞や各種細胞株での実績



ゲノム編集動物作製サービス

CRISPR/Cas9システム (aRGEN) によって目的遺伝子をノックアウト／ノックインしたマウスまたはラットを作製・納品します。

- 胚インジェクションによるゲノム編集動物作製
- C57BL/6NcrSlcマウス、あるいはSlc:SDラットの標準系のほか、疾患モデルへの編集についてもお相談ください。
- オプションサービスも充実
 - ・ダイレクトシーケンス (尾など)
 - ・オフターゲット領域予測
 - ・TAクローニング&シーケンス解析
 - ・エクソーム解析
 - ・ウェスタンブロット解析



動物作製工程は、業務提携先の日本エスエルシー株式会社にて実施いたします。

ノックアウト／ノックイン細胞作製サービス

ノックアウト細胞作製

dRGEN (活性未確認) TFグレード大量調製 (各100 μg)
目的細胞へのトランスフェクション、編集確認
細胞クローニング ~100クローン
細胞クローニング ~200クローン

ノックイン細胞作製

(ウェスタンブロット解析)

(TAクローニングによるシーケンス解析)

ゲノム編集動物作製サービス

ノックアウト動物の作製

aRGEN (活性確認済み)
ノックアウト動物の作製
ダイレクトシーケンス解析

ホモ個体の獲得

(ウェスタンブロット解析)

(TAクローニングによるシーケンス解析)

参考価格 (税別)

標準納期

ノックアウト細胞作製	¥188,000	1件あたり	4か月～
dRGEN (活性未確認) TFグレード大量調製 (各100 μg)	¥600,000		
目的細胞へのトランスフェクション、編集確認	¥900,000		
細胞クローニング ~100クローン	¥1,400,000		
細胞クローニング ~200クローン			
ノックイン細胞作製	別途ご相談		
(ウェスタンブロット解析)	¥350,000～	10クローンあたり	2～3週間
(TAクローニングによるシーケンス解析)	¥480,000～	5クローンあたり	4週間
ゲノム編集動物作製サービス	参考価格 (税別)		
ノックアウト動物の作製	¥600,000	1件あたり	約4.5か月～
aRGEN (活性確認済み)	¥680,000～		
ノックアウト動物の作製	¥200,000		
ダイレクトシーケンス解析			
ホモ個体の獲得	別途ご相談		
(ウェスタンブロット解析)	別途ご相談		
(TAクローニングによるシーケンス解析)	¥480,000～	5クローンあたり	4週間

受託内容の詳細は弊社ウェブサイト「受託サービス」をご覧ください。

細胞工学研究支援 | 細胞関連受託 ▶ 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

ゲノム編集 タカラバイオ



- ・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2015年8月10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

TaKaRaテクニカルサポートライン、受託窓口

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