



CRISPR/Cas9 Genome Engineering

All-in-One NickaseNinja™ vector

CRISPR/Cas9 技術

- ▶ 特定領域への遺伝子挿入
- ▶ 特定部位における遺伝子発現のノックアウト
- ▶ 簡便：
Electra™システムで gRNA のカセットクローニング
E.coli、酵母、および哺乳類細胞ゲノムに対応

NickaseNinja™ オールインワンベクター

- ▶ 高精度、オフターゲット効果を低減
- ▶ 簡便、単一ベクターの形質転換
- ▶ Nikase ベクターへのタンデム gRNA クローニング
- ▶ 2A- 結合型レポーターより選択：
DasherGFP, PaprikaRFP、レポーターなし
- ▶ 最小限のオフターゲット効果



CRISPR/Cas9 Genome Engineering

独自の NickaseNinja All-in-One ベクターで CRISPR/Cas9 技術を用いたゲノム編集をさらに簡単に！

ゲノム編集 (Genome Editing) とは、CRISPR/Cas システムや Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALEN) 等の技術により遺伝子特異的な破壊やレポーター遺伝子のノックイン等を行う新しい遺伝子改変技術です。DNA2.0(DNA) 社では、CRISPR/Cas9 ベクター、試薬、gRNA デザインソフトを含む、ゲノム編集操作ツールセットを開発しました。画期的な NickaseNinja™ は、単一ベクターから 2 つの gRNA をタンデム発現し、本品 1 つで全操作が完了する All-in-One ベクターです。CRISPR/Cas9 技術の利用により複雑なゲノムを的確に改変することが可能です。DNA 社は、無料でご利用頂ける gRNA デザインツールを WEB 上にご用意しており、(<https://www.dna20.com/eCommerce/cas9/input>) これを用いて gRNA をデザインし、Electra™-CRISPR ベクターにクローニングします。

使用目的

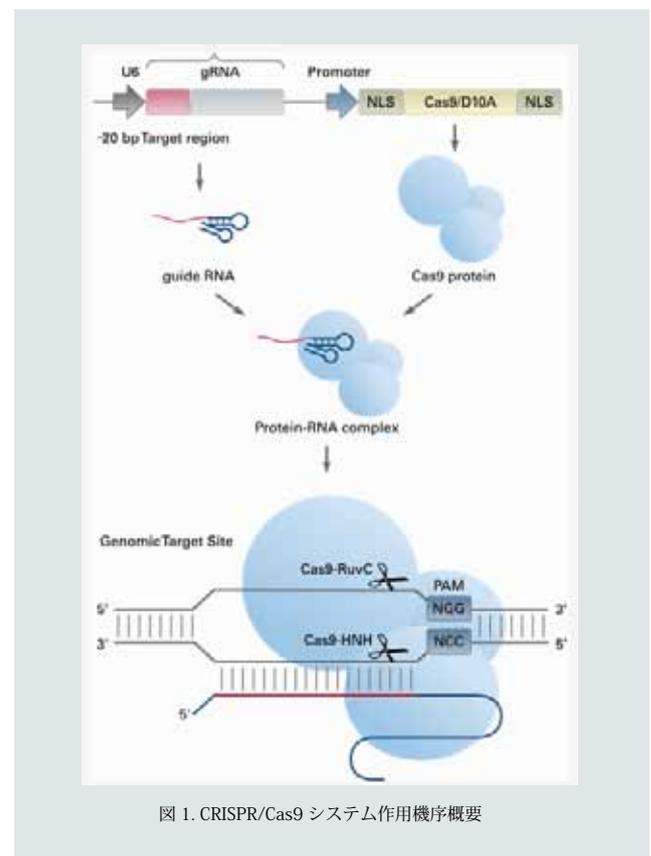
- 特定領域への遺伝子挿入
- 特定部位における遺伝子発現のノックアウト
- *E.coli*、酵母、および哺乳類細胞のゲノム編集操作

CRISPR/Cas9 ベクターの特長

- NickaseNinja™ の利用
単一ベクターに 2 つの gRNA がタンデムで組込まれ、トランスフェクション効率が増大
- プロモーターを選択可能：CMV / CBh / CAG
- 2 本鎖または 1 本鎖切断
Cas9(*S. pyogenes*) は 2 本鎖切断を行います。一方、Cas9N ニッカーゼ変異体は 1 本鎖切断を行います (特異性をより向上させるためには、2 つのタンデム gRNA をもつ NickaseNinja™ ベクターを利用*)。

*1: 2 つの gRNA をもつ NickaseNinja™ ベクターは、DNA 社のカスタムプラスミド構築サービスとしてご提供しています。本サービスでは、DNA 社ニッカーゼベクターに対するデザイン、合成、プラスミド構築を一貫して承っておりますので、カタログ商品としてはご提供していません。NickaseNinja™ All-in-One ベクターよりお客様ご希望の二重 gRNA を発現できます。

【DNA 社 カスタムサービスお問い合わせ先】
コスモ・バイオ(株) 創薬サービスグループ
TEL : 03-5632-9616 FAX : 03-5632-9614
E-mail : dds_info@cosmobio.co.jp



Cas9 ニュクレアーゼは 20 塩基のガイド配列により誘導され、ほとんど全てのゲノム座位を切断可能です。これにより生じた染色体の破損は、通常、非同源末端結合 (NHEJ) により修復されるため、標的座位にわずかな欠損や挿入が生じます。一方、相同ドナー DNA を Cas9 とトランスフェクションした場合、相同性配向型の DNA 修復システムが刺激され標的配列を期待する変異配列と置換できます。

Cas9 には、DNA の非相補鎖を切断する RuvC 様ヌクレアーゼドメインと相補鎖 HNH 様ヌクレアーゼドメインという 2 つの触媒領域があります。DNA 社の Cas9N またはニッカーゼは、Cas9 ニュクレアーゼの RuvC 様ヌクレアーゼドメインの D10A 点変異体です。ガイド RNA は、ワトソン・クリック塩基対により Cas9 をゲノム標的に導くため、いかなるゲノム座位をも簡単に標的できます。

プロモータに関して特にご希望がない場合、または DNA 社で検証済みの細胞 (HeLa, HEK293, CHO および神経細胞) 以外の細胞をご利用の場合、3 種を全てお試し頂くことをお奨めします。

CRISPR/Cas9 参考文献

- オフターゲット効果低減かつ挿入欠損効果増大に向けた Cas9 ニッカーゼ戦略に関する報告
Science 2013. 339(6121):819. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems.
- ゲノム編集用 CRISPR/Cas9 システムに関する報告
Science 2013. 339(6121):823. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.

All-in-One NickaseNinja™

タンデムで2つの gRNA を搭載した単一ベクターによりトランスフェクション効率が増大！

DNA 社では、単一 gRNA を *E.coli*、酵母、および哺乳類細胞へ Electra™ クローニング *2 できるカタログ商品のニッカーゼベクターと、タンデムで2つの gRNA を搭載した単一ベクターをデザイン、合成、プラスミド構築を一貫してカスタムプラスミド構築サービスとしてご提供する NickaseNinja™ All-in-One ベクターの2種をご用意しています。

カタログ商品のニッカーゼベクターは、クローン作製にそのままご利用頂けます。Cas9ヌクレアーゼは20塩基のガイド配列により誘導され、ほとんど全てのゲノム座位を切断可能です。これにより生じた染色体の破損は、通常、非相同末端結合 (NHEJ) により修復されるため、標的座位にわずかな欠損や挿入が生じます。一方、相同ドナー DNA を Cas9 とトランスフェクションした場合、相同性配向型の DNA 修復システムが刺激され標的配列を期待する変異配列と置換できます。

カスタムプラスミド構築サービスとしてご提供する NickaseNinja™ All-in-One ベクターは、2つの U6 プロモーターを利用して単一ニッカーゼベクターから2種類の gRNA を同時発現でき、同時導入の必要性を省いた DNA 社独自のシステムです。NickaseNinja™ ベクターには可視化用に蛍光レポータータンパク質が搭載されています。2種の gRNA 搭載型 NickaseNinja™ ベクターをご用意しており、ご希望の2つの gRNA を発現するプラスミドを DNA 社にて構築致します。NickaseNinja™ All-in-One ベクターのカタログ販売は行っておりません。

【DNA 社 カスタムサービスお問い合わせ先】

コスモ・バイオ(株) 創薬サービスグループ

TEL : 03-5632-9616 FAX : 03-5632-9614 E-mail : dds_info@cosmobio.co.jp

NickaseNinja™ ベクターの特長

- 高精度かつオフターゲット効果を低減
- 簡便：単一ベクターの形質転換
- ニッカーゼベクターへのタンデム gRNA クローニング
- 2A-結合型レポーターより選択
DasherGFP、PaprikaRFP、レポーターなし
- 特許出願中

*2 Electra Vector System™

Electra Vector System™ は、DNA 社独自の IP フリーカセットクローニングシステムです。細菌、哺乳動物、酵母用の発現ベクターへの簡便かつ傷跡の残らないクローニングをわずか5分で実現します。別途パンフレットをご用意していますので、コスモ・バイオ(株)までお問い合わせください。

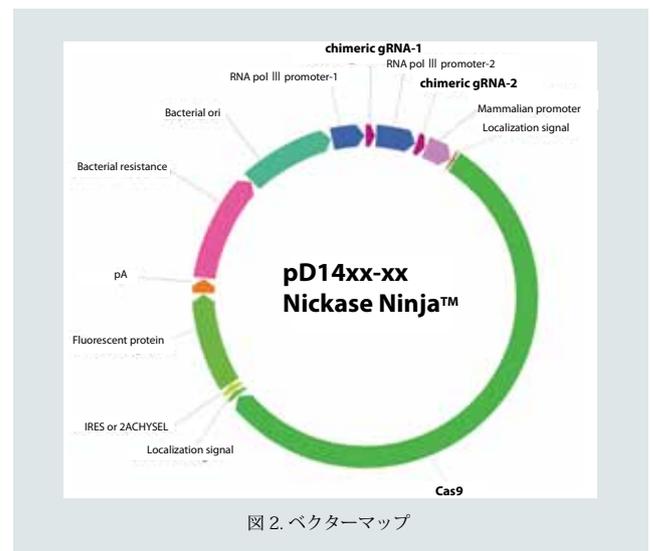
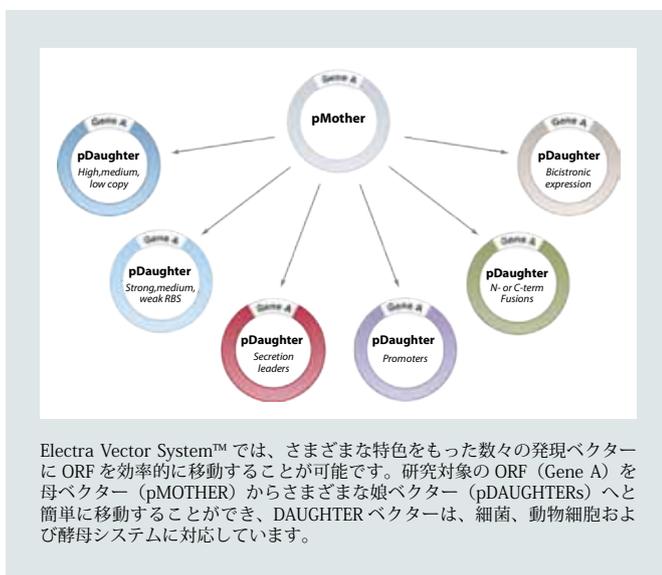


図2. ベクターマップ



Electra Vector System™ では、さまざまな特色をもった数々の発現ベクターに ORF を効率的に移動することが可能です。研究対象の ORF (Gene A) を母ベクター (pMOTHER) からさまざまな娘ベクター (pDAUGHTERS) へと簡単に移動することができ、DAUGHTER ベクターは、細菌、動物細胞および酵母システムに対応しています。

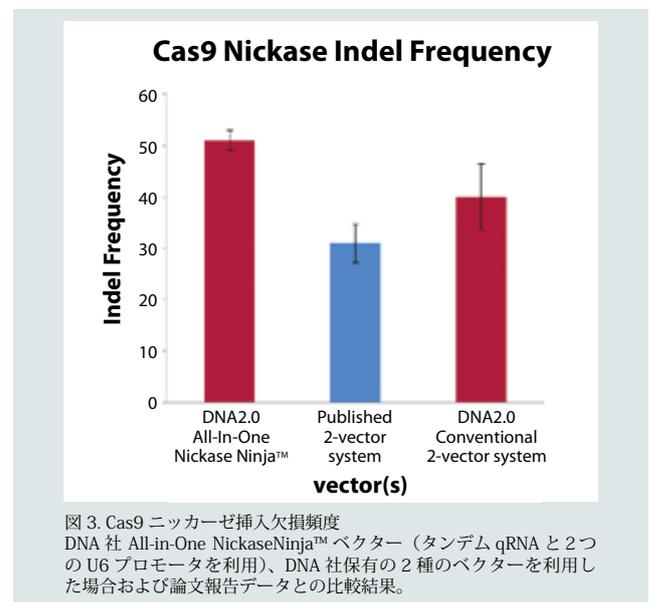


図3. Cas9 ニッカーゼ挿入欠損頻度

DNA 社 All-in-One NickaseNinja™ ベクター (タンデム gRNA と2つの U6 プロモーターを利用)、DNA 社保有の2種のベクターを利用した場合および論文報告データとの比較結果。

CRISPR gRNA Design Tool

WEB 上で使用できる無料の gRNA デザインツール！

DNA 社の CRISPR gRNA Design Tool は、ご希望の標的を効率よく変異しつつ、オフターゲット効果を低減できる gRNA 配列デザインが可能です。

下記の WEB ページより無料でご利用いただくことができ、デモンストレーションの動画もご用意しています。

<https://www.dna20.com/eCommerce/startCas9>

ご希望の遺伝子または配列をご入力頂くと、デザインツールによりご入力配列内における Cas9 標的部位を全て同定します。予想される特異性などを基準にした各標的部位に対する順位リストなどが結果として出力されます。本プログラムで使用するアルゴリズムは、NGG と NAG のスペーサー前隣接モチーフ（PAM）の前方に位置する 12 塩基シード配列の出現率を考慮します。

DNA 社 gRNA デザインツールの実績

- 野生型またはニックナーゼ Cas9 ベクター用に gRNA デザイン
- NickaseNinja™ 用 2 つのタンデム gRNA デザインが簡便化
- 遺伝子名、座位、または特定標的配列に対するデザインが迅速
- ゲノム上の類似配列を避けたオフターゲット効果抑制
- お客様が選択した gRNA 配列を Electra™ CRISPR ベクターへ組込むサービスもご提供、トランスフェクション可能な状態で納品します

【DNA 社 カスタムサービスお問い合わせ先】
コスモ・バイオ(株) 創薬サービスグループ
TEL : 03-5632-9616 FAX : 03-5632-9614
E-mail : dds_info@cosmobio.co.jp

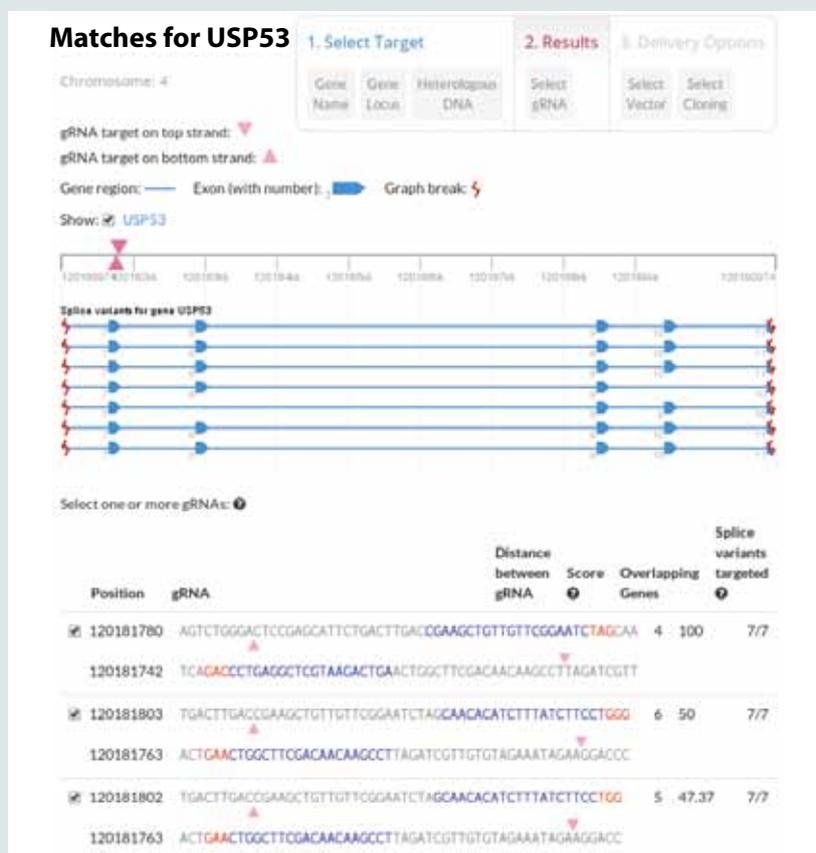


図 4. DNA 社 CRISPR gRNA デザインツールのスクリーンショット
本デザインツールでは、標的への特異性をもとに gRNA の順位に従って表示し、スプライスバリエントや重複遺伝子に対する各 gRNA の位置を表示します。
文献報告では複数の gRNA を試して効率のよいものを探すことが通例です。

DNA社 CRISPR/Cas9 Genome Engineering の検証

DNA社のCRISPRクターの検証にはHEK293細胞とEMX-1遺伝子を利用しました。Electra™システムを用いてgRNA配列をpD13xxベクターにクローンし、HEK293細胞にトランスフェクションしました。トランスフェクション後、ゲノムDNAを抽出し該当座位の配列決定を行いました。DNA社のベクターは、プロモーター配列により異なる挿入欠失 (indel) 頻度を示し、また同一座位を標的とした既報に匹敵する挿入欠失頻度を示しました。

・ 既報データ引用文献

Cell 2013. 155(2):479. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Ran *et al.*

Science 2014. 343(6166):80. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Wang *et al.*

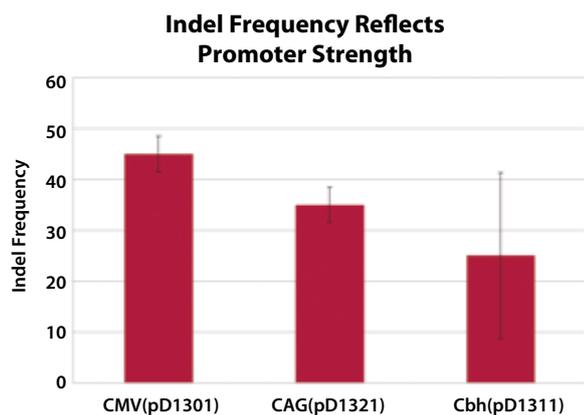


図5. インデル頻度はプロモータ強度を反映
gRNA配列をpD1301、pD1311およびpD1321にElectra™クローニングした。HEK293細胞に0.5μgのプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから72時間後、ゲノムDNAを抽出して配列決定した。DNA社ベクターは、使用したプロモーター配列によって異なるインデル頻度を示した。

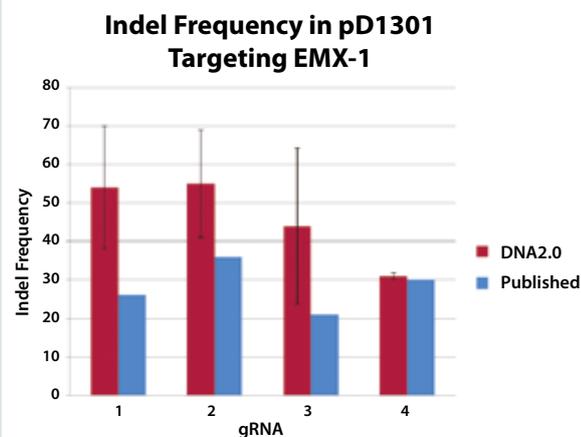
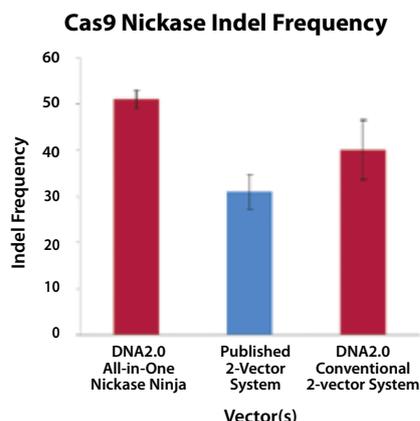


図6. pD1301を用いたEMX-1標的時の挿入欠失頻度
gRNA配列をpD1301にElectra™クローニングした。HEK293細胞に0.5μgのプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから72時間後、ゲノムDNAを抽出してEMX-1遺伝子座の配列決定を行った。DNA社ベクターは、同一座位を標的とした既報に比べ全般的に高い挿入欠失頻度を示した。



NickaseNinja™ の検証

図7. Cas9ニッカーゼ挿入欠失頻度
DNA社All-in-One NickaseNinja™ベクター(2つのU6プロモータによるタンデムgRNAを利用)、DNA社従来型2ベクターシステムおよび既報データの比較結果。

クローニング情報

gRNA の PCR

DNA 社の pDAUGHTER-CRISPR ベクターに直接クローニングできるよう、Electra™ サイトを含む下記配列をプライマー末端に付加することを推奨しています。

Forward primer:

5' -TACACGTA CT TAGTCGCTGAAGCTCTTCTCCG....(gRNA)....-3'

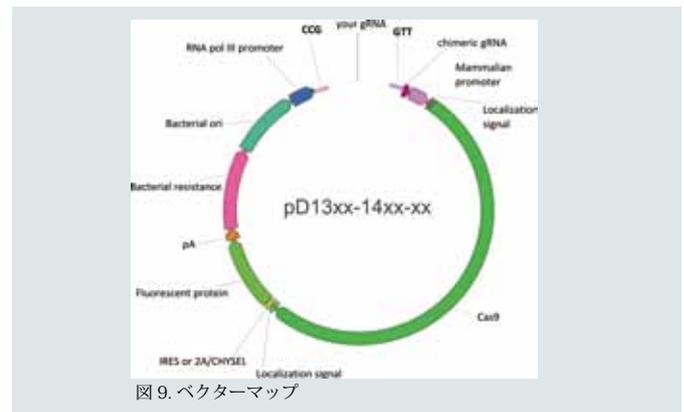
Reverse primer:

5' -AGGTACGA ACTCGATTGACGGCTCTTCTAAC....(gRNA Reverse Complement)....-3'

プライマーを直接アニーリングする方法と、推奨末端をもち、かつ 15-20bp のオーバーラップをもつプライマーをデザインして“アニーリングと伸長”を行う方法があります。PCR は 10 サイクル行うことを推奨しています。下記の Electra™ 反応には 1µl の PCR 反応溶液をお使いください。

DAUGHTER ベクターは、ボトムストランドに 5'-CGG-3'、トップストランドに 5'GTT-3' のオーバーハングをもつ開環ベクターとしてご提供します (図 7)。Electra™ 試薬ミックス存在下で、対象とする gRNA (または PCR 産物) と開環状 pDAUGHTER-CRISPR ベクターと混合し、室温 (25℃) で 5 ~ 20 分放置します。

* Electra™ クローニングでは II 型酵素 SapI を使用するため、ご利用になる gRNA に SapI 制限酵素認識部位が存在しないことをご確認ください。



クローニング操作手順

1. 右表に示した構成成分を 1 つの 1.5mL チューブに混合する。
* Daughter ベクターは、DNA 社より開環状で提供されます。
2. 5 ~ 20 分間室温放置
3. 2 µL の反応溶液をコンピテントセルに形質転換
4. 適切な抗生物質を含む LB プレートに播種
5. 37℃で一晩培養。形質転換体を選択する。

構成成分	容量 (µl)
MOTHER DNA/Positive Control* (20ng)	1
DAUGHTER Vector (20ng)	1
Electra™ Buffer Mix* (1X)	2
Electra™ Enzyme Mix* (1X)	1
Sterile ddH ₂ O	15
全容量	20

* DNA 社 Electra™ Cloning Kit 試薬 (品番: KT-02)

CRISPR/Cas9 Genome Engineering 商品リスト

Cas9 Electra™ Daughters

DNA2.0 Inc. メーカー略号: DNA 保存: -20℃			
品番	品名	包装	希望販売価格
PD1301	CMV-Cas9-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1311	CBh-Cas9-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1301-AD	CMV-Cas9-2A-GFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1311-AD	CBh-Cas9-2A-GFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1321-AD	CAG-Cas9-2A-GFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1301-AP	CMV-Cas9-2A-RFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1311-AP	CBh-Cas9-2A-RFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1321-AP	CAG-Cas9-2A-RFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000

Cas9 Nickase Electra Daughters

DNA2.0 Inc. メーカー略号: DNA 保存: -20℃			
品番	品名	包装	希望販売価格
PD1401	CMV-Cas9N-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1411	CBh-Cas9N-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1401-AD	CMV-Cas9N-2A-GFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1411-AD	CBh-Cas9N-2A-GFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1421-AD	CAG-Cas9N-2A-GFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1401-AP	CMV-Cas9N-2A-RFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1411-AP	CBh-Cas9N-2A-RFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000
PD1421-AP	CAG-Cas9N-2A-RFP-ElecD vector	10 RXN	¥48,000

All-in-One NickaseNinja™ カスタムプラスミド構築サービス

都度お見積となりますので、以下の連絡先までお問合せください。

【DNA 社 カスタムサービスお問い合わせ先】
コスモ・バイオ(株) 創薬サービスグループ
TEL : 03-5632-9616 FAX : 03-5632-9614 E-mail : dds_info@cosmobio.co.jp



DNA2.0社 IP(ライセンス)フリー製品 カタログ大好評配布中!!

お願い および 注意事項

- 希望販売価格・・・「希望販売価格」は参考であり、販売店様からの販売価格ではございません。
記載の希望販売価格は2014年5月1日現在の希望販売価格です。
予告なしに改定される場合がありますので、ご注文の際にご確認下さい。消費税は含まれておりません。
- 使用範囲・・・記載の商品は全て、「研究用試薬」です。
人や動物の医療用・臨床診断用・食品用等としては使用しないよう、十分ご注意ください。

(12021)

取扱店



人と科学のステキな未来へ

コスモバイオ株式会社

〒135-0016 東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル
URL : <http://www.cosmobio.co.jp/>

- 営業部（お問い合わせ）
TEL : (03) 5632-9610 FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620