ゲノム編集ハンドブック

第三版

コスモ・バイオ株式会社
COSMO BIO CO LTD

ゲノム編集 ハンドブック 第三版

目次

総説 ゲノム編集 pⅡ

広島大学大学院　理学研究科　数理分子生命理学専攻　教授　山本卓先生からご寄稿いただきました。

概論 CRISPR/Cas9システムガイドライン pⅣ

商品選択用フローチャート pX

第1章　ノックアウト	記事ID	
技術情報 GeneCopoeia社　CRISPR/Cas9 ノックアウト実験と機能検証の手順 GCP	15521	p2
技術情報 GeneCopoeia社　CRISPR/Cas9　オフターゲット作用をコントロールする GCP	15301	p5
技術情報 Santa Cruz社　CRISPR/Cas9　両対立遺伝子ノックアウト or 単一対立遺伝子ノックアウト SCB	15242	p9
技術情報 GeneCopoeia社　ドナーテンプレートを利用した効果的なゲノム編集アプリケーション GCP	15214	p10
■ ノックアウトの前に		
Applied Biological Materials社　GeneCraft-R CRISPR sgRNA Synthesis Kit APB	32929	p14
Applied Biological Materials社　GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Screening Kit APB	32996	p15
■ NHEJ		
Applied Biological Materials社　CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール APB	13443	p17
■ NHEJ/HDR		
Santa Cruz社　CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ツール SCB	14017	p23
GeneCopoeia社　CRISPR/Cas9 ノックアウトシステム GCP	15479	p27
OriGene社　CRISPR/Cas9ゲノム編集ノックアウトキット ORG	13159	p31
■ ノックアウトベクター		
OriGene社　CRISPR/Cas9ゲノム編集用ベクター ORG	12003	p32
ATUM社　CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ベクター DNA	12575	p36
■ HDR用ドナーベクター		
GeneCopoeia社　CRISPR/Cas9 HR(HDR)用ドナーベクター GCP	14734	p39
■ 機能検証		
GeneCopoeia社　CRISPR/Cas9/TALEN 挿入欠失検出システム GCP	14700	p40
Applied Biological Materials社　CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit APB	16908	p41
■ 細胞		
Applied Biological Materials社　Ready-to-use ノックアウトセルライン APB	18357	p42

第2章　ノックイン	記事ID	
■ 部位特異的ノックイン		
Applied StemCell社　TARGATT™ 部位特異的ノックインシステム ASC	32867、32869	p46
■ セーフ・ハーバー部位へのノックイン		
GeneCopoeia社　セーフ・ハーバー部位へ目的遺伝子を挿入 CRISPR/Cas9ノックインキット&HDRノックインクローン GCP	15254、14726	p48
OriGene社　CRISPR/Cas9 AAVS1領域 遺伝子挿入キット&ベクター ORG	15187	p55

第3章　CRISPR/Cas9　タンパク質と抗体	記事ID	
■ タンパク質		
Applied Biological Materials社　SpCas9タンパク質 APB	15213	p58
Applied Biological Materials社　saCas9タンパク質 APB	18254	p59
Applied Biological Materials社　dCas9タンパク質 APB	32925	p61
■ 抗体		
Santa Cruz社、Applied Biological Materials社　Cas9モノクローナル抗体 SCB APB		p62
Proteintech社、Biorbyt社、OriGene社　CRISPR/Cas9 ポリクローナル抗体 PGI BRT ORG	14578	p63

第4章　ゲノム編集効率改善

		記事ID	
技術情報	Xcess Biosciences社　小分子によるCRISPR/Cas9ゲノム編集の促進 XCB	15167	p66
	Xcess Biosciences社　SCR7(NHEJ inhibitor) XCB	15104	p67
	Xcess Biosciences社　L755,507 HDR Enhancer XCB	15075	p68
	Santa Cruz社　L755,507 HDR Enhancer SCB	15121	p68
	Xcess Biosciences社　Azidothymidine(AZT)- Reverse Transcriptase Inhibitor XCB	15086	p69
	Xcess Biosciences社　RS-1(CRISPR Editing Enhancer) XCB	16704	p69

第5章　ゲノム編集受託サービス

		記事ID	
■ カスタムsgRNA/HDR テンプレート			
	GeneCopoeia社　Genome-CRISP™ Custom CRISPR/Cas9受託サービス GCP	12069	p72
	Applied Biological Materials社　CRISPRノックイン用HDRテンプレート作製受託サービス APB	18367	p75
	Cellecta社　レンチウイルスCRISPRコンストラクト作製受託サービス CLT	14037	p76
	ATUM社　CRISPR/Cas9 All-in-One NickaseNinja™ vector DNA	12575	p77
■ 実験動物のゲノム編集			
	セツロテック社　受精卵エレクトロポレーション法によるゲノム編集マウス・ブタ作製受託サービス STE	32920	p78
	InGenious社　遺伝子改変モデルマウス作製受託サービス ITL	14775	p80
	Applied StemCell社　TARGATT™ 部位特異的ノックインマウス/ラット作製受託サービス ASC	17792	p84
	Applied StemCell社　CRISPRによるゲノム編集ラット作製受託サービス ASC	18226	p86
■ 細胞のゲノム編集			
	Applied Biological Materials社　iCRISPR ノックアウト/ノックイン細胞作製受託サービス APB	14301	p88
	Applied StemCell社　TARGATT™ 部位特異的ノックイン細胞株作製 ASC	17793	p89
	Applied StemCell社　iPS細胞のCRISPR/Cas9によるゲノム編集受託サービス ASC	18220	p90
■ ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製			
	Applied StemCell社　TARGATT™ CHO細胞株による組み換えタンパク質の高レベル作製サービス ASC	32975	p91

第6章　ライブラリー/スクリーニング

		記事ID	
技術情報	GeneCopoeia社　CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーを利用したゲノムワイド機能解析アプローチ GCP	15441	p94
	GeneCopoeia社　Genome-CRISP™ human single guide RNA(sgRNA)ライブラリー GCP	14485	p97
	GeneCopoeia社　Genome-CRISP™ CRISPR/Cas9 stable cell line GCP	14484	p99
	Cellecta社　CRISPR ヒト/マウスゲノムワイド sgRNA ライブラリー CLT	16213	p101
	Cellecta社　レンチウイルスCRISPR sgRNA ライブラリー作製受託サービス CLT	14041	p103
	Cellecta社　ハイスループットCRISPR/Cas9遺伝子スクリーニング受託サービス CLT	16795	p104
	Applied Biological Materials社　iCRISPRレンチウイルス sgRNA ライブラリー作製受託サービス APB	14300	p105
	Applied StemCell社　ゲノム編集済み MAPK アイソジェニック細胞株・リファレンス スタンダード ASC	18334	p106

第7章　CRISPR/Cas9技術応用編 "dCas"

		記事ID	
	Santa Cruz社　CRISPR/dCas Activationシステム SCB	14683	p114
	Applied Biological Materials社　CRISPR-dCas9遺伝子発現活性化システム APB	16865	p116

第8章　ゲノム編集　技術情報

		記事ID	
技術情報	Applied Biological Materials社　CRISPR/Cas9-実験計画を立てる! APB	15668	p120
技術情報	Applied Biological Materials社　CRISPR/Cas9-gRNAデザイン APB	15764	p123
技術情報	GeneCopoeia社　CRISPRとTALENの利点と欠点を解説 GCP	14598	p126
技術情報	GeneCopoeia社　ゲノム編集技術によるノックアウトとRNAi技術によるノックダウンの比較 GCP	15517	p129
技術情報	Applied Biological Materials社　CRISPR/Cas9レンチウイルスシステムを用いたヒト胚性腎臓細胞におけるGFPレポーターノックアウト APB	14909	p131
技術情報	Santa Cruz社　CRISPR/dCas Activationシステムプロトコール SCB	15330、15331	p133
技術情報	Applied Biological Materials社　CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール　プロトコール APB	14042	p136
技術情報	Applied Biological Materials社　FAQ：CRISPR/Cas9 ゲノム編集用製品について APB	14043	p144
技術情報	GeneCopoeia社　FAQ：CRISPR/Cas9商品と受託サービスについて GCP	12554	p147
技術情報	OriGene社　FAQ：CRISPR/Cas9ゲノム編集用ガイドベクターについて ORG	12367	p149
技術情報	Santa Cruz社　FAQ：CRISPR/Cas9ゲノム編集用ツールについて SCB	14019	p152

■ メーカー略号紹介

APB	Applied Biological Materials Inc.	LUC	Lucigen Corporation.
ASC	Applied StemCell, Inc.	MAG	株式会社マクロジェン・ジャパン
BRT	Biorbyt Ltd.	ORG	OriGene Technologies, Inc.
CLT	Cellecta, Inc.	PGI	Proteintech Group, Inc.
DNA	ATUM (Former DNA2.0 Inc.)	SCB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
GCP	GeneCopoeia, Inc.	STE	株式会社セツロテック
ITL	Ingenious Targeting Laboratory, Inc	XCB	Xcess Biosciences, Inc.

■ 貯蔵温度の記号紹介

室	常温保存
冷	4℃保存
凍	−20℃保存
凍	−70℃保存
液窒	液体窒素中保存

総 説

ゲノム編集

広島大学大学院
理学研究科数理分子生命理学専攻
教授 **山本 卓**

はじめに

ゲノム編集は、人工DNA切断酵素を用いて標的遺伝子を自在に改変することが可能な新しい技術です。微生物から動物や植物まで様々な生物での遺伝子改変が可能なことから、ゲノム編集はライフサイエンス研究において必要不可欠な技術となることが予想されていました。この予想は、2012年に開発された第三世代の編集ツールCRISPR/Cas9によって現実のものとなり、簡便かつ効率的なCRISPR/Cas9は、この５年間で全ての研究者の技術になったと言っても過言ではありません。ゲノム編集のように開発スピードの速い技術は近年例がなく、基礎研究のみならず応用研究での利用も積極的に進められています。本稿では、ゲノム編集ツール開発の歴史、ゲノム編集を用いた標的遺伝子改変、オフターゲット作用を抑えるゲノム編集技術について紹介します。

ゲノム編集ツール開発の背景

ゲノム編集技術の基盤となる人工DNA切断酵素は、人工制限酵素（人工ヌクレアーゼ）とRNA誘導型ヌクレアーゼに大別されます。人工ヌクレアーゼとして開発された第一世代のゲノム編集ツールは、Zinc-finger nuclease（ZFN）です。ZFNは、目的の塩基配列に特異的に結合するZinc fingerアレイに制限酵素FokIのDNA切断ドメインを連結した人工ヌクレアーゼで（図１）、一組のZFNを発現させることによって目的の塩基配列にDNA二本鎖切断（DSB）を誘導することができます。ZFNは1996年に報告されて以来、ゲノム編集での多くの先駆的な研究に実績を有していますが、特異性の高いZFNの作製が難しいことから、現在は限定な利用にとどまっています。これに対して、第二世代のゲノム編集ツールであるTALEN（Transcription activator-like effector nuclease）は作製が容易であることから、2010年以降、様々な作製方法が開発され、TALENによる遺伝子改変が急速に進みました（１）。TALENは、植物病原細菌*Xanthomonas*属のTALEタンパク質をDNA結合ドメインに利用した人工ヌクレアーゼで（図１）、ZFNと同様に１組のヌクレアーゼによってDSBを誘導します。TALEタンパク質は、TALEリピートと呼ばれる繰り返しモチーフを中心にもち、このリピート数に応じた塩基配列数を認識することができるので、特異性の高いTALENの作製が可能です（各TALENは、～20bpを認識する）。

RNA誘導型ヌクレアーゼであるCRISPR（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats）/Cas9（CRISPR-associated protein 9）は、2012年にScience誌に初めて報告されました（２）。人工ヌクレアーゼが、標的配列への結合にDNA結合ドメインを利用するのに対して、CRISPR/Cas9は、短鎖RNAと標的DNAの塩基対形成を利用します。真正細菌や古細菌は、切断したファージDNAをCRISPR領域に取り込み、細胞に記憶します。再びファージが侵入すると、取り込んだDNAを鋳型とした短鎖のcrRNAを合成します。さらに、crRNAはtracrRNAとCas9ヌクレアーゼとの複合体を形成し、PAM（Protospacer Adjacent Motif）配列があるところで塩基対形成を利用して標的配列を切断します。ゲノム編集では、crRNAとtracrRNAを１分子のsingle guide RNA（sgRNA）として作製し、sgRNAとCas9の2因子の発現（あるいはCas9タンパク質とsgRNAの複合体の導入）によって内在の遺伝子破壊が可能です（図１）。現在多くの研究者が、化膿レンサ球菌（*S. pyogenes*）のSpCas9を用いており、PAMとして利用できる3塩基（5' -NGG-3' ）があれば基本的に改変が可能です。また最近、別種の細菌から様々なPAMの塩基特異性をもつCRISPRが報告され、標的配列の選択自由度も高くなっています。CRISPR-Casの利点は、sgRNAの種類を増やすことによって、多重遺伝子改変が簡単に行えることで、培養細胞でも生物個体でも多数の成功例が既に報告されています。

ゲノム編集を用いた標的遺伝子改変

ゲノム編集ツールによって導入されたDSBは、細胞内の複数のDSB修復経路によって修復されます。主に、非相同末端連結（NHEJ）と相同組換え修復（HR）の2つの経路によって修復されますが、繰り返しDSBを導入することによって修復エラーを誘導し、標的遺伝子の改変を行います。NHEJ経路では、修復過程のエラーによって、欠失や挿入などの変異を導入することが可能です。これによって、遺伝子内の変異であれば、フレームシフトを引き起こし遺伝子が破壊されます（遺伝子ノックアウト、図２）。また、HR経路の修復では、ドナーベクターを共導入することによって、切断部分に外来の遺伝子を挿入することが可能です（遺伝子ノックイン、図２）。最近では、ドナーベクターの代わりに1本鎖DNA（ssODN）を利用した一塩基レベルのノックインも盛んに行われています。

NHEJ経路を利用した遺伝子ノックアウトは、基本的に全てのゲノム編集ツールで可能であり、多くの成功例が報告されています（３）。最近では、微生物などこれまで標的遺伝子改変が難しかった生物種での遺伝子ノックアウトの成功例も増えてきています。一方、HR経路を利用した遺伝子ノックインは、細胞種や生物種によって効率が異なるので注意が必要です。HRの活性は、細胞周期に依存しており、全くノックインできないケースも見られます。また、ゲノム編集の効率は、細胞であれば遺伝子導入効率、個体であればマイクロインジェクションが可能かどうかなど実験手法によっても影響を受けます。これらの問題を解決する方法として、NHEJを利用した新しい遺伝子ノックイン法（HITI法）が最近開発されました（４）。この方法では、NHEJによって切断された箇所にレポーター遺伝子を挿入されますが、両方向に挿入された遺伝子のうち、目的と反対の方向に入った場合は再切断を誘導するように工夫されています。これによって一方向の正確なノックインアレルが作られます。また、筆者のグループは、短いホモロジー配列（マイクロホモロジー）を介したMMEJ修復によって簡便にノックインする方法（PITCh法）を開発しており、現在では、研究目的に合った遺伝子ノックイン法の選択が可能

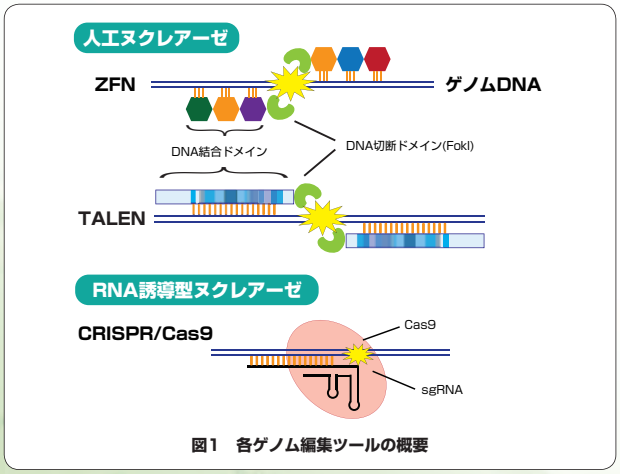


図1　各ゲノム編集ツールの概要

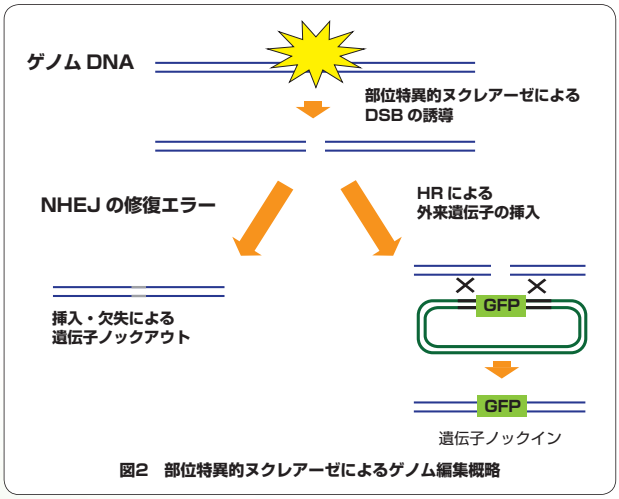


図2　部位特異的ヌクレアーゼによるゲノム編集概略

となっています(5)。

ゲノム編集技術では、同時に複数箇所を切断することによって、染色体レベルでの編集も可能であることも報告されています。同一染色体上の2箇所を切断すると大規模な欠失を作製することが培養細胞や個体のレベルで証明されています。欠失と比較すると頻度は低いですが、同一染色体上の2箇所の切断によって逆位を誘導することも可能となっています。これらの染色レベルの実験を行う場合、CRISPR/Cas9であれば複数のsgRNAを使うだけで実行可能です。筆者らは、最近1つのベクター中に7種類のsgRNAの発現カセットを組み込んだオールインワンベクターを開発しており、このベクターを用いることによって効率的に染色体レベルの改変が可能になると考えています。

オフターゲット作用を抑えるゲノム編集技術

ゲノム編集技術では、類似配列への変異導入(オフターゲット作用)について注意する必要があります。標的遺伝子の遺伝子破壊が成功する一方で、類似する配列に欠失や挿入などの変異を同時に導入する可能性です。オフターゲット作用の程度は、ゲノム編集ツールの種類や用いる細胞や個体によって異なりますが、特にガン細胞では高い傾向にあります(6)。

CRISPR/Cas9においては、オフターゲット作用を低減させる目的で、Cas9の2つのヌクレアーゼドメインのうち1か所に変異を入れたCas9ニッカーゼが開発されています(7)。近接する2箇所にsgRNAを設計し、それぞれのDNA鎖をCas9ニッカーゼによりDNAニックを入れると(Double nicking)、その領域ではDSBを導入された形になり、ゲノム編集が可能となります(図3a)。sgRNAが類似配列に結合した場合、DNAニックが入りますが、欠失や挿入変異は導入されません。これによって、オフターゲット作用を低下させることができます。また、高活性かつオフターゲット作用を抑えるCRISPRとして、Cas9の2つのヌクレアーゼドメインの両方に変異を入れたdCas (dead Cas9)を利用した方法が開発されました(8)。dCas9のC末端側にTALENで利用されているFokIのDNA切断ドメインを連結させ(FokI-dCas9)、近接する2箇所に結合するsgRNAとFokI-dCas9によって標的配列にDSBを導入できることが示されました(図3)。この方法は、1つのsgRNAが類似配列に単独で結合してもDNAニックやDSBを導入しないため、より安全な方法であると考えられます。

この他、Cas9のアミノ酸配列を改変することによってオフターゲット作用を低減した複数の変異体が開発されています。例えば、Zhangらが開発した"enhanced specificity" Cas9 (eSpCas9) Cas9では、高い切断活性を維持しつつオフターゲット作用を低減する改変に成功しています。

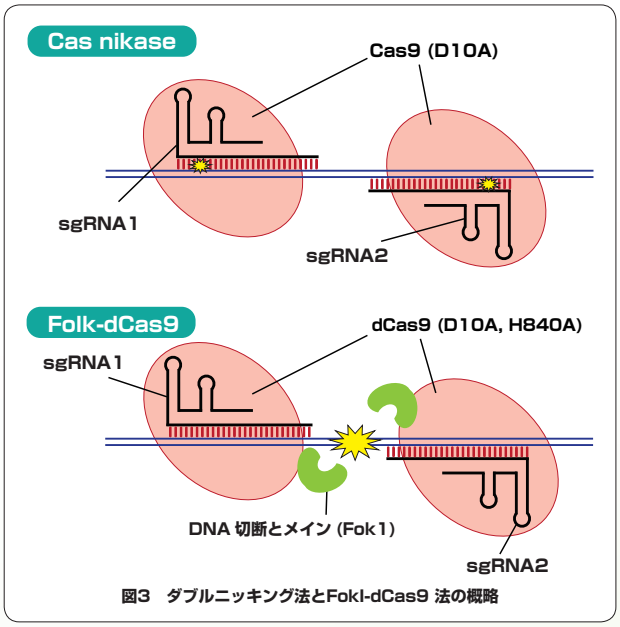


図3　ダブルニッキング法とFokI-dCas9 法の概略

今後の展望

ゲノム編集は、今後、様々な生物での遺伝子ノックアウトと遺伝子ノックインが可能な汎用技術となると予想されます。PCRと同じレベルの技術なるかもしれません。しかし一方で、この技術を使った高度な改変技術の開発や応用研究は、まだ始まったばかりです。これらの研究開発では、アイディア次第で新しい研究展開がこれから可能です。最近では、人工ヌクレアーゼのヌクレアーゼドメインの代わりに転写因子の活性化ドメインや抑制ドメイン、あるいはGFPを連結させた人工タンパク質の開発が競って進められています。Cas9についてもdCasに様々な機能ドメインを集積させる技術(SunTagシステムなど)やDNAを切断しないで塩基改変する技術(TargetAID)など次々と報告され、日々驚かされています。国内でも、既存のゲノム編集技術を利用することに加えて、若手研究者が新たな技術開発に積極的に取り組むことが重要だと考えられます。日本ゲノム編集学会では、初心者向けの講習会を行っており、この講習会を利用してゲノム編集研究を始めるきっかけにして頂ければと切に願っています。

文献

1. Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 39(12): e82, 2011
2. Jinek M1, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 337(6096):816-821, 2012
3. Peng Y, Clark KJ, Campbell JM, et al. Making designer mutants in model organisms. Development. 141(21): 4042-4054, 2014
4. Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. Nature. 540(7631):144-149, 2016
5. Sakuma T, Nakade S, Sakane Y, et al. MMEJ-assisted gene knock-in using TALENs and CRISPR/Cas9 with the PITCh systems. Nature Protocols, 11, 118–133 (2016)
6. Fu Y, Foden JA, Khayter C, et al. High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. Nat Biotechnol. 31(9): 822-826, 2013
7. Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. Cell. 154(6): 1380-1389, 2013
8. Guilinger JP, Thompson DB, Liu DR. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. Nat Biotechnol. 32(6): 577-582, 2014

著者プロフィール

山本 卓(やまもと たかし)
広島大学大学院理学研究科数理分子生命理学専攻
分子遺伝学研究室　教授

●経歴
1991年　広島大学大学院理学研究科修了
1992年　熊本大学理学部助手
1996年　広島大学博士(理学)
2002年　広島大学大学院理学研究科講師
2003年　広島大学大学院理学研究科助教授
2004年より現職
2014年　鳥取大学と熊本大学の客員教授、
　　広島大学研究拠点「ゲノム編集研究拠点」リーダー

●主な専門・研究分野
ゲノム編集、発生生物学、ゲノム生物学
●学会等活動
日本ゲノム編集学会会長、日本分子生物学会理事
●最近の代表的論文
1. ゲノム編集入門、裳華房, 2016
2. Nakade S, Tsubota T, Sakane Y, Kume S, Sakamoto N, Obara M, Daimon T, Sezutsu H, Yamamoto T, Sakuma T and Suzuki K. Microhomology-mediated end-joining-dependent integration of donor DNA in cells and animals using TALENs and CRISPR/Cas9. Nature Communications, 5, 5560 (2014)
3. Ochiai H, Sakamoto N, Fujita K, Nishikawa M, Suzuki KI, Matsuura S, Miyamoto T, Sakuma T, Shibata T and Yamamoto T. Zinc-finger nuclease-mediated targeted insertion of reporter genes for quantitative imaging of gene expression in sea urchin embryos. Proc Natl Acad Sci U S A, 109: 10915-10920, 2012

概 論

CRISPR/Cas9システム ガイドライン

～ ゲノム編集　基礎知識のまとめ～

abm
Applied Biological Materials Inc.
メーカー略号：APB

A　CRISPR技術入門

CRISPR/Cas9技術の発見により、修飾酵素やPCR技術を利用して*in vitro* でDNAを操ることが可能となって以来、40年にわたって行われてきた生命科学研究の方法が大きく変化しました。研究者にとって、「*in vivo*でのDNA構築」は長年の夢でしたが、CRISPR/Cas9技術によりこの夢が現実のものになろうとしています。CRISPR/Cas9技術による高効率なゲノム編集（*in vivo*におけるDNA操作）の出現で、がんをはじめとする数々の疾患について膨大な基礎的知見を得られるだけでなく、新規分子標的薬開発の効率化、スピードアップにも大きく貢献することが期待されています（Hsu *et al.*, 2014）。自分たちの手元で、ゲノムの欠損を修正する、特定ゲノムの機能性を促進する、といったことを行う日はそう遠くないかもしれません。

効率のよいゲノム編集技術の探索は過去20年以上に渡り研究されてきましたが、ジンクフィンガーとこれに続くTALEN技術の発見によりムーブメントが一気に過熱、さらにCRISPR/Cas9技術の発見があり、この10年間遺伝子編集が主流となっています。CRISPR/Cas9技術は、更なる発展・改良の余地はあるものの、効率、速度、簡便さから、現時点では今世紀最大の生命科学発見といえます（Doudna *et al.*, 2014）。ここでは、ほ乳類細胞を使った遺伝子特異的なノックアウトのためのsgRNAデザインおよび実験手順のガイドラインを概説します。このガイドラインは真核生物を使った部位特異的ノックアウトなど、他のCRISPR/Cas9アプリケーションにも応用いただけます。

i．CRISPRの発見と開発

CRISPRシステムは1987年に初めて報告されました。Nakataらは、アルカリフォスファターゼイソ酵素転換におけるアミノペプチダーゼを研究する中で、iap遺伝子の下流に興味深い反復と非反復配列を発見しました（Ishino *et al.*, 1987）。2002年になって、これらの反復アレイはCRISPR（**C**lustered **R**egularly **I**nterspaced **S**hort **P**alindromic **R**epeats）と名付けられました（Jansen *et al.*, 2002）が、この時点では、CRISPRの機能は完全にわかっていませんでした。2005年にMojicaらは、これらの配列、"スペーサー"は、実際にバクテリオファージ由来DNAを含んでいることを明らかにし（Mojica *et al.*, 2005）、この発見のすぐ後に、BolotinらもCRISPR構造の近隣にエンドヌクレアーゼをコードするCas遺伝子が存在することを確認し、CRISPR/Casの主要機能は外来DNAの崩壊であることが示唆されました（Bolotin *et al* ., 2005）。Kooninらは、スペーサーによりエンドヌクレアーゼと複合体を形成する短鎖ガイドRNAが産生され、ウイルスDNAを標的し、分解することを初めて提案しました（Koonin *et al.*, 2006）。さらに、"プロトスペーサー"（外来DNA上の標的ゲノム配列）のすぐ上流には、保存性の高いプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）が存在します。現在では、このPAM部位がCasエンドヌクレアーゼの優先的な標的部位であることが証明されており（Horvath *et al.*, 2008, Deveau *et al.*, 2008）、このシステムで自己DNAと非自己DNAの識別ができることが知られています（Mali *et al.*, 2013）。細菌の外来DNAの侵入に対する免疫防御策であるCRISPRの重要性が自明なものとなったのは、2010年よりも前のことです。2010年には、細菌においてⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型といった３種のCRISPRシステムが同定され、Ⅱ型CRISPR干渉は比較的シンプルなシステムであることから、ほ乳動物細胞におけるゲノム編集システムへの

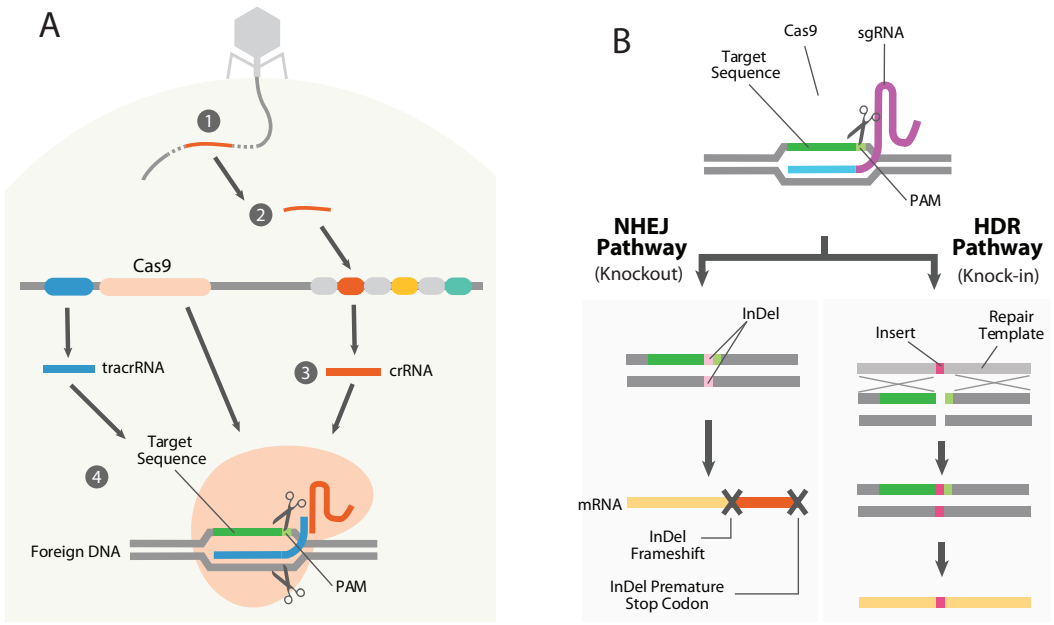


図1　細菌におけるCRISPR介在型免疫機序
(A) 細菌システムにおけるCRISPRを利用した免疫性。免疫化段階では、外来ウイルスDNAが捕捉され、内在発現したCas9エンドヌクレアーゼにより切断される（Jiang *et al.*, 2015）。その後、反復"スペーサー"として細菌性CRISPR座位に組込まれる。再度感染した際、スペーサーがpre-CRISPR RNA(pre-crRNA)と呼ばれる短鎖RNAガイドへと転写される。その後、Cas9エンドヌクレアーゼとトランス活性化crRNA（tracrRNA）がpre-crRNAに結合してウイルスDNAの標的と分解に必要な成熟複合体を形成する。
(B) 遺伝子編集用に改変されたCRISPRシステム。ゲノム編集に使用されるCRISPRシステムにはエンドヌクレアーゼが必要であり、設計した１本鎖ガイドRNA（sgRNA）が対象遺伝子を標的するようデザインされている。標的DNA配列はPAM部位に隣接する必要がある。sgRNAに先導され、Cas9が標的部位に誘導されDNA２本鎖切断を導入する。細胞は非相同性末端結合（NHEJ）修復経路または相同組換え型修復（HDR）機構により２本鎖切断を修復する。NHEJ経路はしばしばフレームシフトを生ずる挿入や欠損（InDel）変異を導入するため、効率よく遺伝子活性をノックアウトできる。HDR機構では、DNA修復鋳型を導入して相同組換えにより期待する配列を切断部位にノックインすることができる。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

適合が検討されました（Sapranaus-kas *et al*., 2011）（図. 1）。

ゲノム編集ツールとしてCRISPR/Casシステムが利用されはじめたのは、サーモフィラス菌（StCas）と化膿レンサ球菌（SpCas9）由来のⅡ型CRISPRシステムがほ乳動物のゲノム編集用に設計できることが確認された（Mali *et al*., 2013, Cong *et al*., 2013）2013年のことです。そして、ほ乳類細胞のゲノム編集用に、２種のベクターシステムが最適化されました（Mali *et al*., 2013）。２つの主要構成要素は、（1）Casエンドヌクレアーゼと、（2）crRNA-tracrRNA複合体です。これらを同時に発現させると、Cas9とcrRNA-tracRNAが複合体を形成し、標的DNA配列へとリクルートされ、DNAを切断して2本鎖DNA切断（DSB）を形成します。この2つの細菌crRNAおよびtracrRNAを組み合わせて、Cas9を標的遺伝子配列に誘導するのと同じ能力を有するキメラの１本鎖ガイドRNA（sgRNA）を形成することができます。（Jinek *et al*., 2012）。これらの構成要素をリボヌクレオタンパク質（RNP）トランスフェクション、またはレンチウイルス、アデノウイルス、およびAAVトランスダクションなどによりほ乳類細胞へと送達します。

ii. 他のゲノム編集ツールよりCRISPR/Cas9を選ぶわけ

CRISPR/Cas9システムの主要な利点として、以下の２つがあげられます。

（1）あらゆる細胞や動物種に利用可能（例えば、霊長類やプラスモジウムからコムギまで）
（2）シンプルかつ低価格

ゲノム編集用に改良されたCRISPR/Cas9システムは、ダブルニッカーゼ法に利用することもできます。本手法では、２本鎖切断ではなく１本鎖DNA切断（ニック）を産生する改変型Cas9酵素の一種であるCas9ニッカーゼを利用します。細胞は、通常このような１本鎖切断が発生した場合、無傷な相補DNA鎖を鋳型として、HDR経路を介して直ちに修復します。一組のCas9ニッカーゼを利用するこの方法では、お互いから20塩基以内を標的する必要があり、DNA２本鎖切断を導入するゲノム編集過程を完遂するために両方のニッカーゼがDNAを切断しなくてはならない（標的部位に対して各ニッカーゼが反対鎖を標的する）ため、オフターゲット切断（作用）を最小限に抑える有効な方策です。片方のニッカーゼによる１つのオフターゲット切断は、弊害なく直ちに修復されます。Applied Biological Materials社では、D10AまたはH840Aタンパク質をゲノム編集用とし、NLSあり、あるいは、NLSなしのCas9ニッカーゼをご提供しています（58ページ）。切断活性を不活化したCas9タンパク質（Cas9二重変異体またはdCas9）をDNA干渉に利用したり、相乗活性化メディエーター（SAM）といった活性化複合体に融合させ遺伝子発現の上昇に利用することもできます。dCas9は抑制因子からエピジェネティック修飾因子まで、どのようなエフェクター分子にも融合することができます。Applied Biological Materials社では、ヒト遺伝子をゲノムワイドにカバーするdCas9-SAMライブラリーをご提供しており（116ページ）、これを利用することで対象遺伝子の発現を数千倍に増大させることもできます。

HDR経路を介したCRISPR/Cas9システムを修復鋳型と共に利用することで、遺伝子やレポーターのノックイン、内在性タンパク質のタグ付けや変異導入を行うことも可能です。このように多様な技術・手法から、CRISPR/Cas9技術は、遺伝子発現の配列特異的制御において非常に有用なRNA誘導型ゲノム編集ツールであり、新薬開発においても非常に有用な技術といえます。

ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFNs）やTALENといった、先に確立されたゲノム編集ツールと異なり、sgRNAを利用する CRISPR/Cas９システムは、そのゲノム編集効率がタンパク質のデザインに依存しません。CRISPR/Cas９システムで必要な要素は、sgRNAやCas9をコードするいくつかのシンプルなDNAコンストラクトと、ノックインする場合には相同組換え用のHDRドナー鋳型のみです。さらに、複数の遺伝子を体系的に、かつ同時に編集することができます。この簡便さ、シンプルさによって、ジンクフィンガーやTALENのような人工ヌクレアーゼ型ゲノム編集ツールよりも、CRISPR/Cas９システムは、時間、労力、費用を節減でき、信頼性も改善することができます。

表1　ゲノム編集技術の比較

	ジンクフィンガーヌクレアーゼ	TALENs	CRISPR/Cas9
DNA結合ドメイン	Cys2-His2 DNA結合タンパク質	保存されたアミノ酸反復モチーフ	１本鎖sgRNA
DNA切断ドメイン	FokI制限エンドヌクレアーゼ	FokI制限エンドヌクレアーゼ	Cas9エンドヌクレアーゼ
誘導機構	タンパク質誘導型	タンパク質誘導型	RNA誘導型
デザインの難易度	★	★★★	★★★★★
オフターゲット作用	★★★★★	★★★★★	★★★
マルチプレックス	★★	★★	★★★★★

参考文献：
Zhang F *et al*. *Hum Mol Genet*. 2014 Sep 15;23（R1）:R40-6.
Jeffry D. Sander *et al*. *Nat Biotechnol*. 2014 Apr; 32（4）: 347-355.
Gaj T *et al*. *Trends Biotechnol*. 2013 Jul;31（7）:397-405.

B　CRISPR/Cas9 ノックアウトプロトコール

一般的なワークフローに準じて全ての細胞種のどのような座位に対しても二対立ホモ接合体ノックアウトを構築することができます。多くの場合、完全な機能ノックアウトを得るために標的遺伝子の両方のコピーを機能的にサイレンシングする必要があるため、編集した細胞の正確な遺伝型をシークエンシングによって確認すること推奨します。ヘテロ接合体編集（２つの対立遺伝子のうち１つのみ編集が成功）では機能をもつタンパク質が産生し続け、ノックアウトは不完全です。

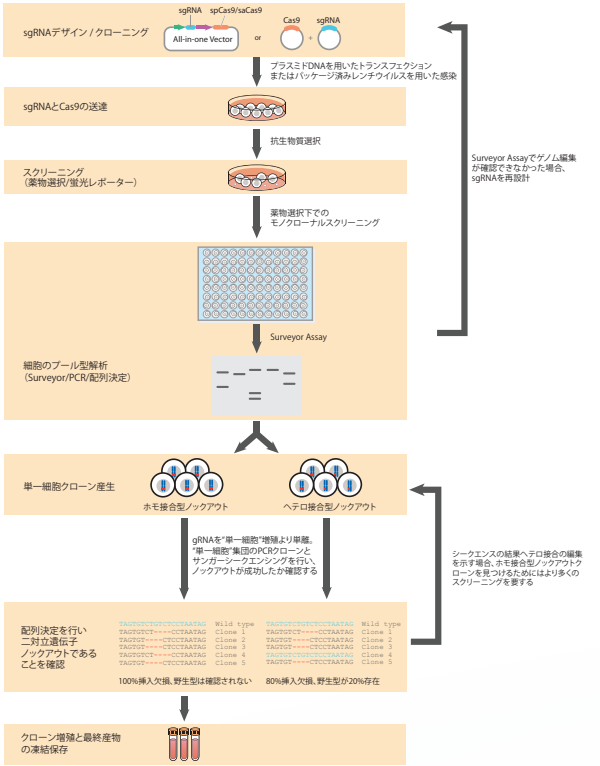


図2　CRISPR/Cas9技術を用いた標的遺伝子ノックアウト安定細胞株構築と検証のワークフロー

C　sgRNAのデザイン

CRISPR/Cas9技術を利用する実験の第一段階はsgRNAデザインです。Applied Biological Materials社では３つの主要な基準をもとにsgRNAを選択しています。

1. オフターゲットの可能性が低い（0, 1, 2塩基ミスマッチをもつ）
2. 予測される切断効率が高い
3. 可能な限り最上流のExonを標的する。複数のスプライシングバリアントが存在し、これら全てのバリアントをノックアウトしたい場合は、共通するExonを標的するよう注意する

これにより、遺伝子発現を崩壊させるフレームシフトやノンセンス変異体の効果を最大限に引き出すことができます。Cas9が標的部位でDNAを切断するために、spCas9の場合にはプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM, 5' -NGG-3' ）のすぐ上流にsgRNA標的配列をデザインします（注：黄色ブドウ球菌由来saCas9のPAM配列は、5' -NNGRR（N）-3' ）。sgRNA標的配列を合成し、pLenti-U6- sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro、GFPベクター（All-in-One Vector System）、または、pLenti-U6- sgRNA-PGK-Neoベクターにクローンします（Dual

Vector systemで使用されるsgRNAのみのベクターはCas9コンストラクトと共に使用)。Applied Biological Materials社では、ほかにも非ウイルスベクターやAAVベクター、さらに最大4種のsgRNAを単一ベクターにコードできるマルチプレックスsgRNAベクターもご提供していますが、本稿ではpLentiベクターシステムに焦点をあてます。

まずは、これらのベクターを使用してレンチウイルス粒子を産生するためのトランスフェクションやパッケージングといったステップのために、ProClone™ DH5α Competent Cells (Applied Biological Materials社、品番： E003) のような標準的なサブクローニング効率をもつ *E.coli* 株に形質転換して増幅します。詳細な増幅プロトコールは136ページを、より詳細なsgRNAデザインのガイドラインは123ページをご参照ください。

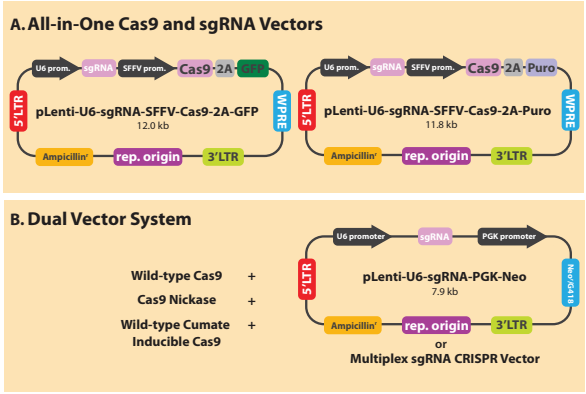


図3　Applied Biological Materials社の All-in-One (A) およびデュアルベクターシステム (B)

Applied Biological Materials社のsgRNAは、通常、上流側のExonを標的するようデザインする。これにより、遺伝子発現を崩壊させるフレームシフトやノンセンス変異の効果を最大限に引き出すことができる。複数のスプライシングバリアントをもつ遺伝子の場合、特に全スプライシングバリアントを標的したい場合には、共通Exonを標的しているかを確認する。

sgRNAは、Cas9を共発現するAll-in-Oneベクターで送達するか、Cas9プラスミドとsgRNAプラスミドの2つの形式で分けて送達する (デュアルベクター) か、またはCas9発現誘導システム (Cumate) から実験系に併せてお選びいただけます。

All-in-Oneベクターシステムは、１ステップのトランスフェクションという簡単なプロトコールであるものの、トランスフェクション効率が比較的高いうえ、sgRNAとCas9発現が1:1で得られる便利さが特長です。Applied Biological Materials社のAll-in-Oneベクターは、短鎖RNA発現に適切で強力な定常Pol IIIプロモーターであるU6プロモーターでsgRNA発現を駆動します。下流のアプリケーションに応じて、SFFVプロモーター駆動型のCas9-2A-ピューロマイシンやGFPカセットを利用すると、下流のスクリーニングやCas9発現細胞の追跡や選別も可能です (図3A)。

デュアルベクターシステムは、複数の異なるsgRNAベクターをCas9プラスミドと一緒にトランスフェクションできるため、マルチプレックス実験に適しています。Applied Biological Materials社のデュアルベクターシステムは、Cas9発現コンストラクトとsgRNA (U6プロモーター駆動型) および下流のスクリーニング用にネオマイシン (PGKプロモーターにより制御) をコードしたコンストラクトから構成されています (図4B)。マルチプレックスsgRNA発現ベクターもご提供しており、最大4種のsgRNAを１つのコンストラクトで発現することができます。さらに、Cas9発現をApplied Biological Materials社独自のシステムであるCumate誘導性システムにより時間制約的かつ可逆的にしっかりと制御することもできます。本システムでは、Cas9遺伝子発現がCumate(非毒性小分子) を添加するまで抑制され、Cumateの結合によって遺伝子発現が活性化されます。

ⅰ. sgRNAによるターゲティング効果の検証

ご自身でsgRNAをデザイン/合成する場合、あるいは市販のベクターやウイルスのsgRNA配列の切断効率を確認してより効率のよい配列を選択する場合にも、GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Synthesis Kit (*S. pyogenes*) (品番： G948、16ページ参照) が便利です。本商品は、Cas9タンパク質 (品番：K108など、58ページ参照) と併せて使用する合成sgRNAを迅速かつ簡単に作製できます。ゲノムDNA領域をPCR増幅し (gDNA PCRプライマーデザインは140ページ参照)、PCR増幅物を合成sgRNAやCas9タンパク質と共培養し、アガロースゲルで可視化します。その結果は、Genomic Cleavage Detection Assay (品番：G932、41ページ参照) と同様で、切断産物として最も濃いバンドを得られたsgRNAがCRISPR/Cas9ノックアウト実験において最も良好な切断効率を示すと考えられます。

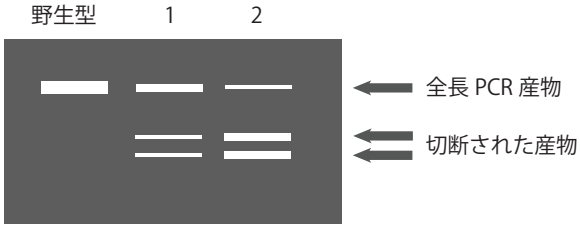


図4　アガロースゲル上でsgRNAによるターゲティング効果を可視化

ⅱ. プラスミド増幅

sgRNAコンストラクトのデザインおよび構築のつぎは、細胞への直接トランスフェクションあるいはウイルスシステムを利用するためのパッケージングといったステップのために、形質転換と増幅を行います。詳細なプロトコールは136ページをご参照ください。

D　sgRNA / Cas9の標的細胞への送達

sgRNAおよびCas9の細胞への送達手法の選択は、期待する発現レベ

表2　一般的なCRISPR/Cas9構成物送達手法の利点とアプリケーション

発現システム	システム構成	アプリケーション
レンチウイルスベクター プラスミドDNA	・プロモーター駆動型Cas9発現は定常型 (SFFVなど) または誘導型 (Cumateなど) があり、sgRNAにはU6プロモーターなどが利用される。 ・陽性細胞の同定 / 濃縮用には、セレクション用のピューロマイシンまたはGFPをコードしたものが便利。 ・レンチウイルス粒子の産生にはパッケージングプラスミドが必要。	ほ乳類細胞でのsgRNA / Cas9一過性あるいは定常発現。
レンチウイルストランスダクション	・Cas9とsgRNAをAll-in-Oneベクターに一緒に組込むか、デュアルベクターシステムで個別に組込む。 ・陽性細胞の同定 / 濃縮用にGFPをコードしたものを利用することもできる。	・広範なほ乳類細胞種におけるsgRNA / Cas9の定常発現。 ・トランスフェクションが困難な細胞に有用。 ・*in vivo* にも利用可能。 ・CRISPR/Cas9技術を用いたゲノムワイドスクリーニングにおいて一般的な手法
AAVトランスダクション	・組織特異的な送達が可能。Applied Biological Materials社では、血清型AAV1～AAV11AVDJ、 AAVDJ-8を提供。	・sgRNAやsaCas9の一過性あるいは定常発現。 ・分裂細胞と非分裂細胞に感染。 ・*in vivo* ウイルス送達法の中で最も毒性の低い手法。 ・トランスジェニックマウスでのCas9発現に、saCas9- AAVが有用。
Cas9-sgRNAリボ核タンパク質 (RNP) 複合体	・Cas9タンパク質と *in vitro* 転写させたsgRNA (Applied Biological Materials社、品番：E081 OneScribe T7 Transcription Kit) を混合しCas9 - sgRNA複合体を形成。 ・陽イオン性脂質を用いてCas9-sgRNAリボ核タンパク質を細胞に送達。	・CRISPR/ Cas9構成物を一過性発現。 ・sgRNAとCas9タンパク質が細胞内で分解するためオフターゲット作用を低減。

Applied Biological Materials社はこれらの送達手法をすべて網羅する商品ラインアップを取り揃え、CRISPR/Cas9実験を強力にサポートします。

ルに大きく依存します。sgRNAとCas9の一過性発現（したがって一過性のゲノム編集）では、シンプルにsgRNAとCas9ベクターまたはCas9タンパク質をトランスフェクションする方法が簡単です。sgRNAとCas9が細胞内に長くとどまるほどオフターゲット切断と細胞傷害の危険性が高くなるため、一過性のsgRNA / Cas9発現は特にオフターゲット効果の低減に有用であるといえます。Applied Biological Materials社では、一過性のsgRNAベクター送達によりCas9の切断活性が活性化されるCas9安定発現細胞株（21ページ参照）や、Cas9活性化にCumate（誘導因子）とsgRNAベクター送達の２つを要するCumate誘導型Cas9発現細胞をご提供しています（22ページ参照）。Cumateシステムは遺伝子編集活性の“スイッチオン/オフ”が容易であり、プロジェクトごとにsgRNA / Cas9コンストラクトをデザインする必要がないため、特に同一パスウェイ上にある複数遺伝子のノックアウトに有用である。表2では、いくつかの一般的な送達手法の利点を分類しています。120ページのCRISPR/Cas9－遺伝子送達手法に関する技術情報もご参照ください。

ⅰ. トランスフェクションとトランスダクション

実験計画に応じて、ベクタートランスフェクションまたはウイルストランスダクションを行い、標的細胞にCRISPR/Cas9構成物を送達します。トランスフェクションおよびトランスダクションの手順例は、137ページをご参照ください。

ⅱ. 薬剤選択

相同遺伝子編集をもつ細胞のモノクローナル集団を構築する場合には、薬物選択による細胞スクリーニングは非常に重要なステップで、以下の２回のスクリーニングを要します。

1）ゲノム編集がなされた細胞集団を決定する初期スクリーニング
2）期待どおりにゲノム編集された単一細胞を単離するモノクローナルスクリーニング

詳細なプロトコールは139ページをご参照ください。

E　CRISPR/Cas9によるゲノム編集効果の検証

CRISPR/Cas9によるゲノム編集効果を検証する方法として、ノックアウトの安定細胞株スクリーニングに一般的に使用されるPCRを利用した手法（品番：G932、41ページ）やサンガーシーケンス法、次世代シーケンスやウェスタンブロット法を利用する方法があります。

CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）は、ゲノム編集過程を追跡し、成功か否かを判定する、簡単で効率的な方法です。本手法では、CRISPR/Cas9によってゲノム編集を行った細胞のDNAをPCR反応の鋳型とし、対象の標的領域を増幅します。編集されたDNAは、２本鎖DNAにミスマッチを生ずるプロセスである”変性”と”再ハイブリダイズ”を受けます。検出酵素がミスマッチ部位に対して3'末端のヘテロ２本鎖DNA鎖を認識して切断し、アガロースゲルで検出できる２つのバンドを産生します。本アッセイは、最低32コピー中１コピーに生ずる変異を検出できる感度で、最大12塩基挿入により生ずるミスマッチを検出することができます（図5）。

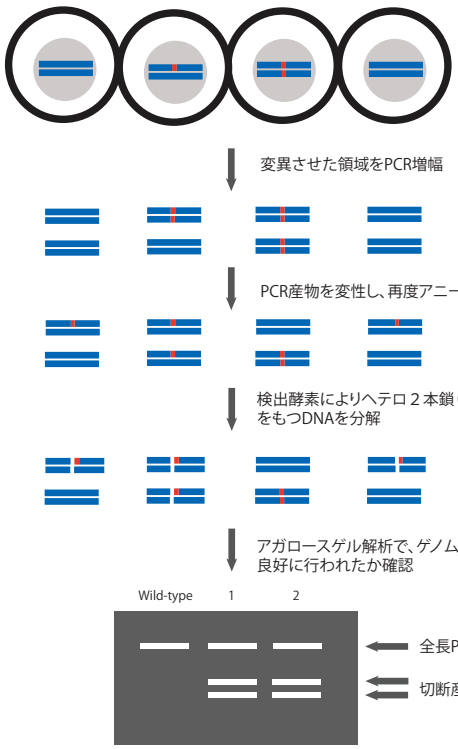


図5　CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）を用いたゲノム編集効率の検出

サンガーシーケンス法では、正確な配列情報をタイミングよく低価格で同定することが可能で、薬物選択による１回目または２回目のスクリーニングでの単一クローン単離の経過観察に利用でき、また、期待する相同性遺伝子編集をもつ陽性クローンの選択にも利用できます。

次世代シーケンシングは、より大規模（100クローン以上）なゲノム編集実験で遺伝子編集をキャラクタライズし、オフターゲット作用の可能性を解析するのに、迅速で正確な結果を比較的低価格で得られる手段です。細胞が単一クローンの二対立遺伝子ノックアウトであることや、野生型の遺伝子型断片がサンプル中に混在していないか、またどのような挿入欠損がどのような割合で存在するか、などを確認することができます。次世代シーケンシングは、セレクション過程や単一クローン単離の各段階においてノックアウトを評価するためにも利用でき、サンプルにおける挿入欠損のプロファイルを得ることができます。このようなゲノム編集効果の検証やオフターゲット作用検出を目的とする場合には、未編集のコントロール比較対象とします。

ウェスタンブロットは、機能性タンパク質が産生しないことを確認することにより安定ノックアウト細胞株が構築できたかどうかを迅速かつ簡単に検証することができる方法です。形質転換、単一細胞希釈、および単一クローン集団の増殖を行った後、ウェスタンブロットにより得られた細胞集団が二対立遺伝子ノックアウト（標的遺伝子が２コピーとも機能的にノックアウトされている）か単一対立遺伝子ノックアウト（標的遺伝子が１コピーのみ機能的にサイレンスされている）か確認します。対象タンパク質が100%ノックアウトされている場合には、二対立遺伝子ノックアウトであることがわかり、50%ノックアウトは単一対立遺伝子ノックアウトと判断できます。また、anti-Cas9 抗体（品番：Y300079、62ページ）をにより、対象細胞株にCas9が良好にトランスフェクションあるいはトランスダクションできたどうか確認することができます。より詳細な二対立遺伝子ノックアウト or単一対立遺伝子ノックアウトの確認方法は、9ページをご参照ください。

F　CRISPR/Cas9によるノックアウト実験の例

以下の実験例では、マウス結腸がん細胞におけるCRISPR/Cas9を用いた二対立遺伝子LIFノックアウト構築とGenomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）とサンガーシーケンシングおよび次世代シーケンシングによるゲノム編集効果の検証をご紹介します。

Step1：Cas9とsgRNAの送達

標的遺伝子：Mouse, Lif (Lif leukemia inhibitory factor)
sgRNAデザイン：3種、ソフトウェア解析によりオフターゲット結合部位がないことを確認
sgRNA送達：レンチウイルス粒子のトランスダクション
ベクター：pLenti-U6-sgRNA- SFFV-Cas9-2A-Puro All-in-One lentivector(図6)
パッケージングキット：Applied Biological Materials社　品番：LV003　第二世代ウイルス パッケージングミックス
感染多重度（MOI）：5

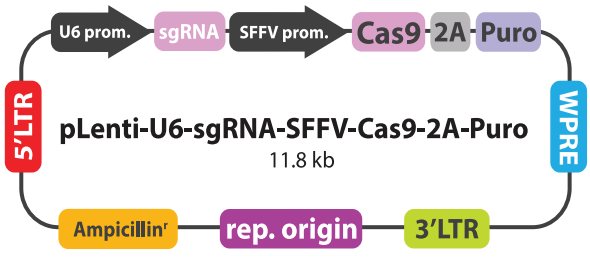


図6　pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro lentivector
pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro lentivectorは、ほ乳類細胞でsgRNAとCas9を同時に発現するall-in-one vector。sgRNA発現は強力な定常発現が得られるU6プロモーターに駆動され、SFFVプロモーターはCas9-2A-Puroカセット発現を駆動する。Cas9-2A-Puroカセットを用いることで、細胞がピューロマイシン耐性を示し、細胞のCas9発現を直接スクリーニングできる。

Step2：ゲノム編集を行ったクローンのコロニースクリーニング（1回目）

・ピューロマイシン選択後、細胞コロニーを単離した。ゲノムDNAを抽出後、サーベイヤーアッセイ（Genomic Cleavage Detection Kit, 品番：G932,41ページ）を行いLIF座位のゲノム編集を確認した。
・サーベイヤーアッセイにおいて、野生型（WT）サイズの単一バンドは編集が生じなかったことを示唆し、2本のより短鎖なバンド（2本を足すとWTのバンドサイズになる）は編集が生じたことを示唆する。

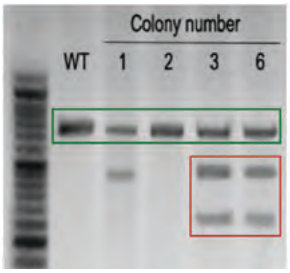


図7　サーベイヤーアッセイのアガロースゲル解析
サーベイヤーアッセイより、コロニー3と6は編集済みであり、コロニー2は未編集であることがわかる。コロニー1は不明。

Step3：ゲノム編集を行ったコロニーの配列解析

図7のコロニー3および6のPCR産物をサンガーシーケンシングで解析し、どのような遺伝子変異がはいったことでノックアウトができているかを確認しました（図8）。

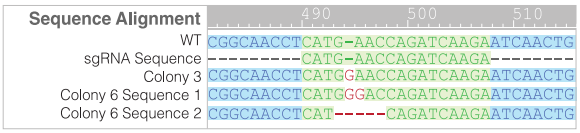


図8
コロニー3では、1つの変異配列のみが検出され、ヘテロ接合体ノックアウトであることが示唆された。コロニー6では、2種の変異配列が検出された。

Step4：単一クローンの二対立遺伝子ノックアウトクローンに対するセレクション（2回目）

コロニー6を96ウェルプレートに段階希釈して単一クローン選択をしました。これらクローン（例えば、6a, 6b, ...）からゲノムDNAを抽出し、PCR増幅後、サブクローニングしてシーケンシングにより配列決定しました。コロニー6クローンのうち、クローン6aのみが両方の対立遺伝子にフレームシフト変異を含んでおり（図9）、フレームシフト変異により翻訳領域が破壊され、ノンセンス変異依存性mRNA転写物分解を生じます。

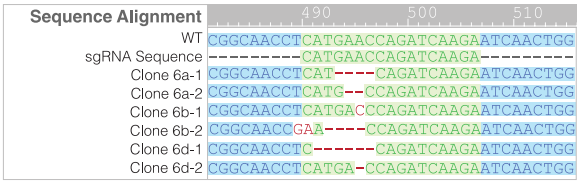


図9
クローン6a, 6bと6dは全て二対立遺伝子編集を示した。クローン6a のみ両方の対立遺伝子にフレームシフト変異が挿入されていた。全てのサブクローンにおいてWT配列は検出されなかった。

クローン6aをさらにシーケンシングし、2塩基と4塩基欠損といったわずか2つの変異対立遺伝子が存在することが確認でき、WTや他の変異は検出されませんでした（図10）。

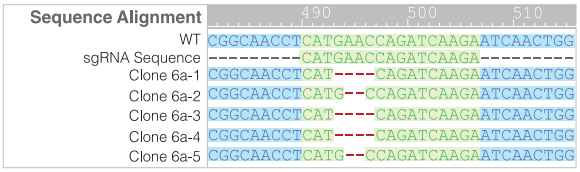


図10
6aをさらにシーケンシングし、二対立遺伝子ノックアウトであることを確認した。WT配列は検出されなかった

Step5：次世代シーケンシングによるノックアウトの検証

・次世代シーケンシングにより、何百、何千もの対立遺伝子を一度に配列決定でき、よりロバストなデータセットが得られる。対照的に、サンガーシーケンシングでは1～100クローン程度しか対応できず、集団の大部分を取り損なってしまう。
・次世代シーケンシングはノックアウトを評価するためセレクションの各段階で実施する（図11）。編集前は、WT配列のみが見られる。最初のセレクション後、コロニー6は編集済み（70%）とWT（30%）配列の混合であった。最後に、単一クローン選択後、クローン6aからは編集済み配列のみが検出され、WT配列は存在していなかった。

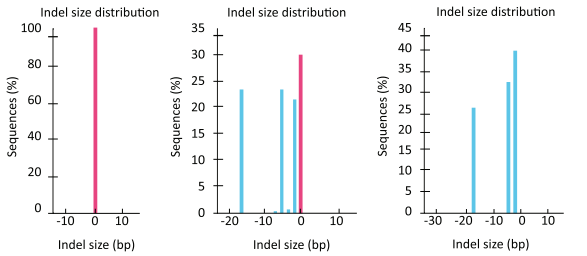


図11　CRISPR/Cas9ノックアウトスクリーニングの次世代シーケンシングの例
A）ノックアウト前はWT配列のみが検出された。
B）Cas9およびsgRNA送達後、最初のセレクションでは挿入欠損とWT配列の混合分布が見られた。
C）第2回目のセレクション後、編集済み配列のみが残った。

G　おわりに

CRISPR/Cas9技術は、その多用途性とともにテクニカル面、コスト面の両方の意味で手頃であり、多くの研究室にとって大規模なマルチプレックス実験が身近なものになりました。CRISPR/Cas9技術およびこの応用技術には、広範な分野にわたる基礎研究だけでなく、創薬研究にも大きな変化をもたらしており、近い将来、CRISPR/Cas9技術が遺伝子治療のかけがねとなり、がんやパーキンソン病といった遺伝子変異による疾患治療薬となる可能性も考えられます。

CRISPR/Cas9技術を用いたアプリケーションは、エピジェネティックな修正、遺伝子治療、遺伝子制御機構など多岐にわたるため、このガイドラインでは、CRISPR/Cas9技術を利用した安定ノックアウト細胞構築に焦点をあてています。

コスモ・バイオのWEBサイトでは、多くのゲノム編集、CRISPR/Cas9技術に関する技術情報を掲載しています。ゲノム編集技術情報のまとめページがございますので是非ご参照ください（記事ID：15215）。

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the Applied Biological Materials Inc. for providing CRISPR information presented here.

参考文献

1. Ablain J et al. A CRISPR/Cas9 vector system for tissue-specific gene disruption in zebrafish.Dev Cell. 2015 Mar 23;32(6):756.
2. Bolotin A et al. Clustered regularly spaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin.Microbiology. 2005; 151: 2551.
3. Koonin et al. A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes:computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol. Direct. 2006 Mar 16; 1(7)
4. Capecchi M. Altering the genome by homologous recombination. Science. 1989: 244; 1288.
5. Chakraborty S et al. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. Stem Cell Rep. 2014 Dec 9;3(6):940.
6. Chari R et al. Unraveling CRISPR-Cas9 genome engineering parameters via a library-on-library approach. Nat Methods. 2015 Jul 13.
7. Cheng R et al . Efficient gene editing in adult mouse livers via adenoviral delivery of CRISPR/Cas9. FEBS Lett. 2014 Nov 3;588(21):3954.
8. Choulika A et al. Introduction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Cell. Biol. 1995; 15: 1968.
9. Chu HW et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knockout in primary human airway epithelial cells reveals a proinflammatory role for MUC18. Gene ther. June 2015.
10. Chu VT et al. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. Nat Biotechnol. 2015 May;33(5):543.
11. Cong L et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013; 339: 819.
12. Deveau H et al. Phage response to CRISPR-encoded resistance in Streptococcus thermophilus. J. Bacteriol. 2008: 190; 1390.
13. DiCarlo J. et al. Genome engineering in Saccharomyces cerevisiae using CRISPR-Cas systems. Nucleic Acids Res. 2013 Apr;41(7):4336-43.
14. Doench JG et al. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. Nat Biotechnol. 2014 Dec;32(12):1262.
15. Drucker DJ et al. Glucagon-like peptide 1 stimulates insulin gene expression and increases cyclic AMP levels in a rat islet cell line. PNAS. 1987; 84 (10): 3434.
16. Friedland AE. et al. Heritable genome editing in C. elegans via a CRISPR-Cas9 system. Nat Methods. 2013 Aug;10(8):741.
17. Fu Y et al. Targeted genome editing in human cells using CRISPR/Cas nucleases and truncated guide RNAs. Methods Enzymol. 2014;546:21.
18. Gao J et al. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in Nicotiana tabacum. Plant Mol Biol. 2015 Jan; 87(1-2): 99.
19. Guilinger JP et al. Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. Nat Biotechnol. 2014;32(6):577.
20. Guo X et al. Efficient RNA/Cas9-mediated genome editing in Xenopus tropicalis. Development. 2014 Feb;141(3):707.
21. Hermann M et al. Binary recombinase systems for high-resolution conditional mutagenesis. Nucleic Acids Res. 2014 Apr;42(6):3894.
22. Hilton IB et al. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. Nat Biotechnol. 2015 May;33(5):510.
23. Horvath P and Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. Science. 2010; 327: 167.
24. Horvath P et al. Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in Streptococcus thermophilus. J. Bacteriol. 2008: 190: 1401.
25. Hsu PD et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Nat Biotechnol. 2013; 31: 827.
26. Hsu PD et al. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. Cell. 2014 Jun 157:1262.
27. Ishino Y et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli and identification of the gene product. J Bacteriol. 1987: 169; 5429.
28. Jansen R et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol. Microbiol. 2002; 43: 1565.
29. Jiang W et al. Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in Arabidopsis, tobacco, sorghum and rice. Nucleic Acids Res. 2013 Nov 1;41(20):e188.
30. Jiang Y et al. Multigene editing in the Escherichia coli genome via the CRISPR/Cas system. Appl. Environ. Microb. 2015; 81(7): 2506.
31. Jinek M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA nuclease in adaptive bacterial immunity. Science. 2012 337:816.
32. Kearns NA et al. Cas9 effector-mediated regulation of transcription and differentiation in human pluripotent stem cells. Development. 2014 Jan;141(1):219.
33. Kim S et al. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. Genome Res. 2014 Jun;24(6):1012.
34. Konermann S et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. Nature. 2015 Jan 29;517(7536):583.
35. Korge S et al. Highly Efficient Genome Editing via CRISPR/Cas9 to Create Clock Gene Knockout Cells. J Biol Rhythms. 2015 Aug 4.
36. Kuscu C et al. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. Nat Biotechnol. 2014 Jul; 32(7):677.
37. Lee YH et al. CadC has a global translational effect during acid adaptation in Salmonella enterica Serovar Typhimurium. J Bacteriol. 2007; 189(6): 2417.
38. Liao J et al. Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic stem cells. Nat Genet. 2015 May;47(5):469.
39. Liu YC et al. Reprogrammed CRISPR-Cas9 targeting the conserved regions of HPV6/11 E7 genes inhibits proliferation and induces apoptosis in E7-transformed keratinocytes. Asian J Androl. 2015 Jul 31.
40. Lupiáñez DG et al. Disruptions of topological chromatin domains cause pathogenic rewiring of gene-enhancer interactions. Cell. 2015 May 21; 161(5): 1012.
41. Maddalo D et al. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. Nature. 2014 Dec; 516(7531): 423.
42. Mali P et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 2013; 339: 823.
43. Mali P et al. Cas 9 as a versatile tool for engineering biology. Nat. Methods. 2013 Oct; 10(10): 957.
44. Malina A et al. Repurposing CRISPR/Cas9 for in situ functional assays. Genes Dev. 2013 Dec; 27(23); 2602.
45. Maruyama T et al. Increasing the efficiency of precise genome editing with CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining. Nat Biotechnol. 2015 May; 33(5): 538.
46. Mikami M et al. Comparison of crispr/cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. Plant mol bio. 2015: 88(6); 561.
47. Mojica F et al. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genomic elements. J. Mol. Evol. 2005; 60: 174.
48. Moscou M and Bogdanove A. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. Science. 2009: 326; 1501.
49. Nakamura K et al. Generation of muscular dystrophy model rats with a crispr/cas system. Sci Rep. 2014 Jul; 4: 5635.
50. Niu Y. et al. Generation of Gene-Modified Cynomolgus Monkey via Cas9/RNA-Mediated Gene Targeting in One-Cell Embryos. Cell. 2014 Feb 13;156(4):836.
51. Orban PC et al. Tissue- and site-specific DNA recombination in transgenic mice. PNAS. 1992;89(15): 6861.
52. Ott de Bruin LM et al. Novel Genome-Editing Tools to Model and Correct Primary Immunodeficiencies. Front Immunol. 2015 May; 6:250.
53. Perez-Pinera P et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. Nat Methods. 2013 Oct; 10:973.
54. Pyne M et al . Coupling the CRISPR/Cas9 system with lambda red recombineering enables simplified chromosomal gene replacement in Escherichia coli. Appl Envir Microbiol. 2015;81(15): 5103.
55. Qin W et al. Efficient CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Mice by Zygote Electroporation of Nuclease. Genetics. 2015 Jun; 200(2): 423.
56. Ranganathan V et al. Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide RNAs. Nat Commun. 2014 Aug 8; 5: 4516.
57. Rincon MY et al. Gene therapy FOR cardiovascular disease: advances in vector development, targeting and delivery for clinical translation. Cardiovasc Res. 2015 Aug 3.
58. Sanjana NE et al. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. Nat Methods. 2014 Aug; 11(8): 783.
59. Sapranauskas R et al. The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli. Nucleic Acid Res. 2011: 39; 9275.
60. Schumann R et al. Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. PNAS. 2015 Aug 18;112(33):10437-42.
61. Shalem O et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science. 2014 Jan 3; 343(6166): 84.
62. Shechner DM et al. Multiplexable, locus-specific targeting of long RNAs with CRISPR-Display. Nat Methods. 2015 Jul; 12(7): 664.
63. Song B et al. Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected betathalassemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. Stem Cells Dev. May 1, 2015, 24(9): 1053.
64. Stan J. J. Brouns, et al. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. Science. 2008; 321, 960-964.
65. Sternberg S and Doudna J. Expanding the Biologist' s Toolkit with CRISPR-Cas9. Molecular Cell. 2015; 58; 568.
66. Tsai SQ et al. GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. Nat Biotechnol. 2015 Feb; 33(2): 187.
67. Tsai SQ et al. Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. Nat Biotechnol. 2014; 32(6): 569.
68. Voit RA et al. Nuclease-mediated gene editing by homologous recombination of the human globin locus. Nucleic Acids Res. 2014 Jan; 42(2): 1365.
69. Waaijers S et al. CRISPR/Cas9-Targeted Mutagenesis in Caenorhabditis elegans. Genetics. 2013 Nov;195(3):1187.
70. Wang D et al. Adenovirus-Mediated Somatic Genome Editing of Pten by CRISPR/Cas9 in Mouse Liver in Spite of Cas9-Specific Immune Responses. Hum Gene Ther. 2015 Jul; 26(7): 432.
71. Wang H et al. One step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. Cell. 2013 May 9;153(4):910.
72. Wyvekens N et al. Dimeric CRISPR RNA-Guided FokI-dCas9 Nucleases Directed by Truncated gRNAs for Highly Specific Genome Editing. Hum Gene Ther. 2015 Jul; 26(7): 425.
73. Xu P et al. Both TALENs and CRISPR/Cas9 directly target to HBB IVS2-654 (C>T) mutation in β-Thalassemia-derived iPSCs. Sci Rep. 2015; 5: 12065.
74. Xue Z et al. CRISPR/Cas9 mediates efficient conditional mutagenesis in Drosophila. G3 (Bethesda). 2014 Sep 5;4(11):2167.
75. Yao S et al. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Epigenetic Factors for Cancer Therapy. Hum Gene Ther. 2015 Jul; 26(7): 463.
76. Yin L et al. Multiplex Conditional Mutagenesis Using Transgenic Expression of Cas9 and sgRNAs. Genetics. 2015 Jun;200(2):431.
77. Zimmerman M et al. Somatic CRISPR/Cas9-mediated tumour suppressor disruption enables versatile brain tumour modelling. Nat Commun. 2015; 6: 7391.

商品選択用フローチャート

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

ゲノム編集の目的

Cas9 タンパク質を導入する

→ p.58 ～

In vitro 転写で gRNA を調製する

→ p.14 ～

Off target 作用を抑える
ニッカーゼ / 改変型 Cas9 (Cas9 D10A)

→ p.24 ～、p.28 ～、p.33 ～、p.77 ～

gRNA ライブラリーを利用する

→ p.97 ～

標的遺伝子の転写を活性化する

→ p.114 ～

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

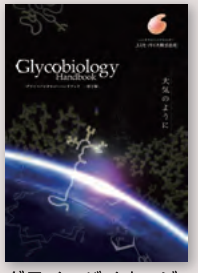
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第４版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

第 1 章

ノックアウト

技術情報 CRISPR/Cas9 ノックアウト実験と機能検証の手順 GeneCopoeia 社 …… p 2

技術情報 CRISPR/Cas9　オフターゲット作用をコントロールする GeneCopoeia 社 … p 5

技術情報 CRISPR/Cas9　両対立遺伝子ノックアウト or
単一対立遺伝子ノックアウト Santa Cruz 社 …… p 9

技術情報 ドナーテンプレートを利用した
効果的なゲノム編集アプリケーション GeneCopoeia 社 …… p 10

ノックアウトの前に

GeneCraft-R CRISPR sgRNA Synthesis Kit Applied Biological Materials 社 …… p 14

GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Screening Kit Applied Biological Materials 社 … p 15

NHEJ

CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール Applied Biological Materials 社 …… p 17

NHEJ / HDR

CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ツール Santa Cruz 社 …… p 23

CRISPR/Cas9 ノックアウトシステム GeneCopoeia 社 …… p 27

CRISPR/Cas9 ゲノム編集ノックアウトキット OriGene 社 …… p 31

ノックアウトベクター

CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ベクター OriGene 社 …… p 32

CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ベクター ATUM 社 …… p 36

HDR 用ドナーベクター

CRISPR/Cas9 HR（HDR）用ドナーベクター GeneCopoeia 社 …… p 39

機能検証

CRISPR/Cas9 / TALEN 挿入欠失検出システム GeneCopoeia 社 …… p 40

CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit Applied Biological Materials 社 …… p 41

細胞

Ready-to-use ノックアウトセルライン Applied Biological Materials 社 …… p 42

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

CRISPR/Cas9 ノックアウト実験と機能検証の手順

WEBへどうぞ
記事ID：15521

ゲノム編集ツールを入手したあとの実験作業をくわしく解説

GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

CRISPR/Cas9は、遺伝子ノックアウト、ノックイン、融合タグ付けおよび塩基置換といった様々なアプリケーションに利用できます。しかし、目的の変異が入った細胞クローンを得るためには細胞スクリーニングが必要です。

本稿では、ゲノム編集ツールを入手したあと、実際に培養細胞を用いたゲノム編集を行う際に何をする必要があるのか、いわゆる「下流の作業」について紹介します。

1 CRISPR/Cas9のプラスミドを受け取ったら

GeneCopoeia社では、同社のCRISPR/Cas9プラスミドを受け取ったら、まず、大腸菌に形質転換して凍結保存し、新しいDNAストックといつでも交換できるようにすることをお奨めしています。GeneCopoeia社のプラスミドはアンピシリン耐性をもつため、一般的なプロトコールを用いて大腸菌に形質転換できます。次に、市販のプラスミド精製キットなどを用いてプラスミドDNAを大量に調製します。

2 機能検証

GeneCopoeia社では、実験をはじめる前に機能検証を行うことをお奨めしています。任意ではあるものの、機能検証を実施することで入手したゲノム編集ツールがどれくらい良好に機能するか、予測が立てやすくなります。

機能検証にはT7エンドヌクレアーゼIを使用するミスマッチ切断アッセイ（40ページ参照）を推奨しています（Qiu, *et al.*, 2004）。本アッセイでは、非相同性末端結合（NHEJ）による挿入欠失“indel”を検出します。ゲノム編集ツールを一般的な手法を用いて細胞に導入し、細胞回収後、ゲノムDNAを抽出し、DNA二本鎖切断部位を挟む位置に設計されたプライマーを用いてPCRを行います。PCR産物を変性後、ミスマッチを含んだ二本鎖DNAを切断するT7エンドヌクレアーゼIで処理します。この処理溶液をアガロースゲル電気泳動で分離すると、もしDNAの二本鎖切断が生じた場合には3本のバンドがみられます。各バンドは、全長の分解されていない二本鎖DNAのバンド、ミスマッチ切断産物である2本のより短鎖なバンドです（図1B）。

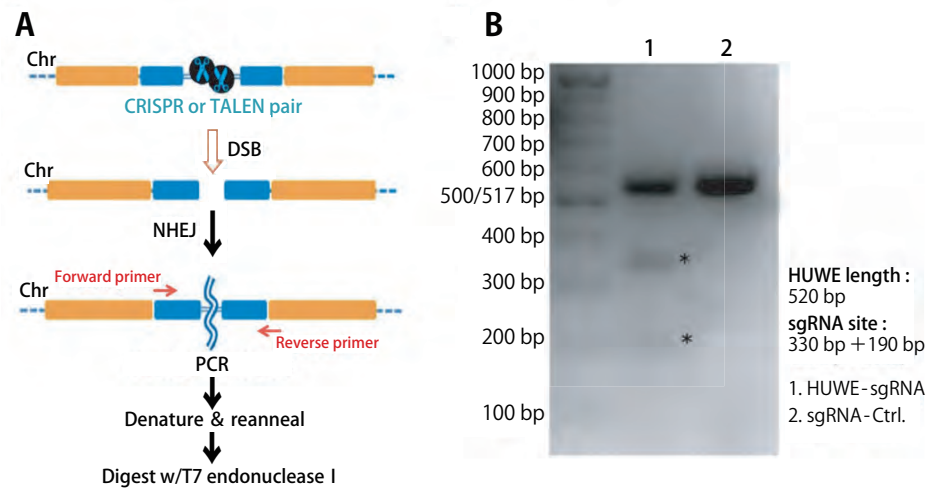


図1　ミスマッチ切断アッセイ
A：アッセイのワークフロー
B：T7エンドヌクレアーゼI処理サンプルのアガロース電気泳動像。レーン1は未分解物および分解産物（＊）がみられ、T7エンドヌクレアーゼIによる切断が生じている。レーン2はスクランブルsgRNAを導入したネガティブコントロール。

GeneCopoeia社では、CRISPR/Cas9またはTALEN実験を迅速かつ簡便に評価できるようT7エンドヌクレアーゼIを用いたミスマッチ切断アッセイキット（40ページ参照）をご提供しています。商品は、部位特異的プライマーを含まないキットと、特異的遺伝子の挿入欠失検出用にデザインされたプライマーを含むキットがあります。詳細は40ページの商品紹介記事をご参照ください。

3 トランスフェクション or ウイルス感染

GeneCopoeia社のCRISPR/Cas9プラスミドは一般的な手法で細胞にトランスフェクションできますが、特定の細胞タイプに最適化したEndoFectin™トランスフェクション試薬（WEB 記事ID：7402）もご提供しています。CRISPR/Cas9レンチウイルスプラスミドは、第3世代のレンチウイルスパッケージング試薬に対応しており、Lentifect™レンチウイルスパッケージング試薬（WEB 記事ID：7398）やレンチウイルスパッケージングサービスもご提供しています。

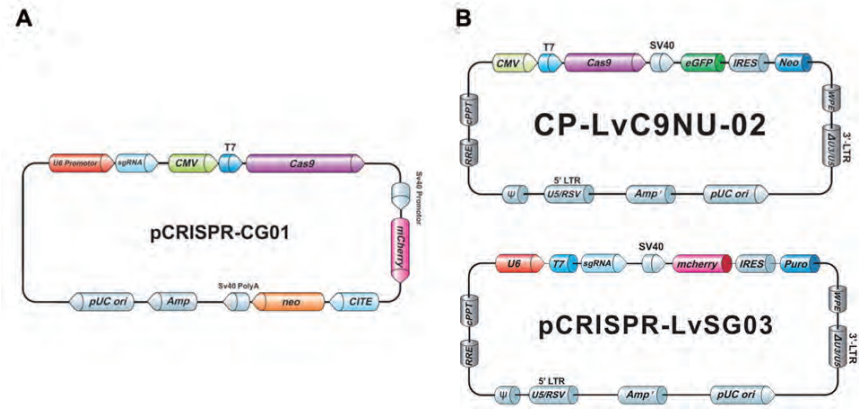


図2 GeneCopoeia（GCP）社CRISPR/Cas9プラスミドの一例
A. Cas9ヌクレアーゼ、sgRNA、Neomycin耐性遺伝子、および蛍光マーカーとしてmCherryをコードしたall-in-oneプラスミド
B. 上：Neomycin耐性遺伝子とeGFPをコードしたCas9発現レンチウイルスプラスミド
下：Puromycin耐性遺伝子とmCherryをコードしたsgRNA発現レンチウイルスプラスミド

4 クローン単離

単一な細胞集団になるよう細胞単離を行うことで、結果の解釈を混乱させるようなヘテロな細胞集団の形成やオフターゲット作用による影響を最小限に抑えることができます。スクリーニングを始める際は、まず、単一コロニーを形成するよう細胞を播種するか、96ウェルプレートで段階希釈を行います。

5 変異スクリーニング

スクリーニング方法は、どのようなゲノム編集を行うかによって異なります。ここでは、3種類の一般的な方法を紹介します。

NHEJ（非相同末端結合）によるノックアウト

NHEJ（非相同末端結合）によるノックアウトを迅速にスクリーニングする方法として、機能検証の項（40ページ）に記載のあるミスマッチ切断アッセイがあります。変異が入っていることを確認した後、PCR産物を用いてサンガーシークエンス法による配列解析を行い、変異の詳細を同定する必要があります。GeneCopoeia社では、ミスマッチ切断アッセイキット（40ページ参照、WEB 記事ID：14700）をご提供しています。

ドナーテンプレートを用いた相同組換え（HR/HDR）

一般に、CRISPR/Cas9を介する相同組換え頻度は、NHEJ（非相同末端結合）と比べてかなり低いため、ドナーテンプレートにより変異が入った細胞を回収するには、より多くのコロニーをスクリーニングする必要があるように思われるかもしれません。しかし、ドナーテンプレートにより薬剤選択マーカーや蛍光マーカーを二本鎖切断位置に組込むことができますので、比較的簡単に変異が入った細胞を回収することが可能です。トランスフェクション後、ピューロマイシン等の薬剤存在下において細胞を低密度で播種し、単一コロニー形成を促します。あるいは、96ウェルプレートを用いて段階希釈をとる方法もあります。薬剤存在下で生育する細胞が、変異導入細胞の候補です。

スクリーニングを行う場合、染色体配列とセレクションカセットの配列との境界部分にまたがるプライマーを利用してPCRを行います。相同組換えが正しく生じた場合には、アガロースゲル上で相当サイズのバンドを確認することができます。

ゲノム編集 総説
CRISPR/Cas9システム ガイドライン
商品選択用 フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウト ベクター
HDR用 ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的 ノックイン
セーフ・ハーバー部位への ノックイン
CRISPR/Cas9 タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集 効率改善
技術情報
ゲノム編集 効率改善
ゲノム編集 受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物の ゲノム編集
細胞の ゲノム編集
ゲノム編集 細胞株による タンパク質作製
ライブラリー／ スクリーニング
技術情報
ライブラリー／ スクリーニング
CRISPR/Cas9技術 応用編“dCas”
ゲノム編集
技術情報

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

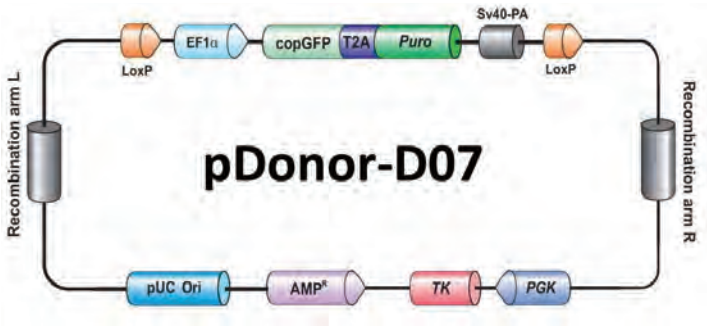


図3　GeneCopoeia社ドナープラスミドの一例

GeneCopoeia社は相同組換え領域の外側に単純ヘルペスウイルス（HSV）チミジンキナーゼ（TK）遺伝子をもつドナープラスミドもご用意しています（図3）。ガンシクロビルを添加した選択培地を使用すると、ドナープラスミドが相同組換え以外の形でランダムに組込まれた細胞は死滅するため、セレクションカセットが正常に組込まれた細胞群を回収することが可能です。

最後に、相同組換えにより変異導入した場合、導入部位の配列解析を行う必要があります。哺乳動物細胞におけるCRISPR/Cas9のデザイン、構築およびその利用に関する専門知識や経験に富むGeneCopoeia社では、sgRNAやHDRドナーデザインから作業し、配列確認済みプラスミド（27ページ参照、WEB 記事ID：15479）をご提供しています。また、CRISPR/Cas9構築や機能検証などのカスタムサービス（72ページ参照、WEB 記事ID：12069）もご提供しています。

6 CRISPR/Cas9実験の注意点

トランスフェクションやスクリーニング計画を考える前に、スクリーニングするコロニー数に影響を及ぼす可能性がある要因や、トランスフェクションの回数に関して考慮する必要があります。

トランスフェクション効率

トランスフェクション効率は、スクリーニングを行うコロニー数を決定する上で非常に重要です。もし使用する細胞株におけるトランスフェクション効率が40%の場合、トランスフェクション効率が80%の細胞に比べて2倍の数のコロニーをスクリーニングすることが予想されます。もしトランスフェクション効率が低い場合、プラスミドにコードされた蛍光マーカーを使ってソーティングしてトランスフェクションされた細胞を濃縮したり、短期的な薬剤選択を利用することもできます。GFPなどの蛍光マーカーを発現するプラスミドを利用して使用する細胞株のトランスフェクション効率を事前検討することを推奨します。

コピー数

完全なノックアウト細胞や変異導入細胞を得るためには、標的遺伝子の全ての対立遺伝子に変異を入れる必要があります。HeLa細胞を始めとする一般的な不死化細胞株の多くは、異数体または倍数体であるため、対象遺伝子を2コピー以上保有している可能性があります。したがって、もし2つ以上の対立遺伝子に変異を入れる必要がある場合には、より多くのコロニーをスクリーニングする必要があると考えられます。複数回にわたってトランスフェクションを行う必要があるかもしれません。

切断効率

CRISPR/Cas9による切断効率は、通常、約5%～70%です。トランスフェクション効率の場合と同様に、切断効率が40%の場合に比べ、それが20%の場合は2倍の数のコロニースクリーニングが必要と予想されます。

変異導入細胞を解析するコロニー数は、使用する細胞の由来や、様々な要因の組合せに依存します。単純計算すると、もし50%の切断効率をもつゲノム編集ツールを用いてトランスフェクション効率が60%の二倍体細胞株の両対立遺伝子ノックアウトを得たい場合、単一対立遺伝子に変異が入ったコロニーの割合は0.5×0.6=30%となります。両対立遺伝子修正の場合、陽性コロニーの割合は15%となります。以上を考慮すると、両対立遺伝子修正をもつクローンを1つ同定するためには少なくとも20のコロニースクリーニングが必要となります。もし、トランスフェクションと切断効率がより低い場合で、使用細胞株に標的遺伝子が2コピー以上存在する場合、わずか1つの完全なノックアウト細胞を単離するために、より多くのコロニースクリーニングが必要となります。

参考文献

・Bogdanove & Voytas (2011). TAL Effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843.
・Qiu, *et al.* (2004). Mutation detection using Surveyor™ nuclease. *Biotechniques* 36, 702.
・van der Oost, *et al.* (2013). New Tool for Genome Surgery. *Science* 339, 768.

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the GeneCopoeia, Inc. for providing experimental methodology information using CRISPR technology presented here.

CRISPR/Cas9 オフターゲット作用をコントロールする

WEBへどうぞ
記事ID：15301

ゲノム編集の標的特異性を改善するニッカーゼ

GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

近年、CRISPR/Cas9システムは、遺伝子ノックアウトや正確かつ明確な塩基置換、遺伝子組換えを始めとする様々なアプリケーションに繁用されています。CRISPR/Cas9は、そのデザインの容易さ、効率の高さ、および比較的安価であることから、遺伝子疾患の原因となる変異の修正や、従来のランダムな遺伝子組換えの代替法として期待されています。

CRISPR/Cas9では、オフターゲット作用が生じることもありますが、オフターゲット作用を低減する方法も開発されています。本稿では、ゲノム編集アプリケーションにおけるCRISPR/Cas9の機序、どのように特異性に影響を及ぼすか、CRISPR/Cas9のオフターゲット作用に関する論文報告、標的特異性の改善について紹介します。

ダブルニッキング法によるオフターゲット作用を低減したゲノム編集ツール

下記ページで紹介しております。また、コスモ・バイオのWEBでも紹介しております。

- GeneCopoeia社　構築済sgRNA、構築済HDRドナークローンとニッカーゼ/改変型Cas9（27ページ、WEB記事ID：15479）
- Santa Cruz社　ダブルニッカーゼプラスミド（24ページ、WEB記事ID：14017）
- Applied Biological Materials社　改変型Cas9ニッカーゼ & sgRNAコレクション（17ページ、WEB記事ID：13443）
- ATUM社　All-in-One NickaseNinja™ vector（77ページ、WEB記事ID：12575）
- Origene社　CRISPR/Cas9 All-in-One ベクター/セパレート型ベクター（ニッカーゼ/改変型Cas9）（32ページ、WEB記事ID：12003）

1 CRISPR/Cas9標的認識

CRISPR/Cas9システムを利用してゲノム編集を行う場合には、通常、1）化膿性連鎖球菌（*S.pyogenes*）由来Cas9ヌクレアーゼ、2）sgRNA（ガイドRNA、gRNA）の2種の構成要素を利用します。sgRNAは、CRISPR/Cas9における標的認識に利用される2つのRNA分子（CRISPR RNA（crRNA）、transactivating CRISPR RNA（tracrRNA））のキメラであり、2012年にJinekらによって報告されました（図1）。sgRNAは標的部位特異性を担う20塩基の可変領域をもちます。さらに、*S.pyogenes* Cas9（spCas9）では、“PAM”（プロトスペーサー隣接モチーフ）として知られる3塩基のN-G-G配列が特異的配列の直後に必要です。PAMはsgRNA配列と同一の側鎖に存在する必要があり、またsgRNAの一部であってはなりません。

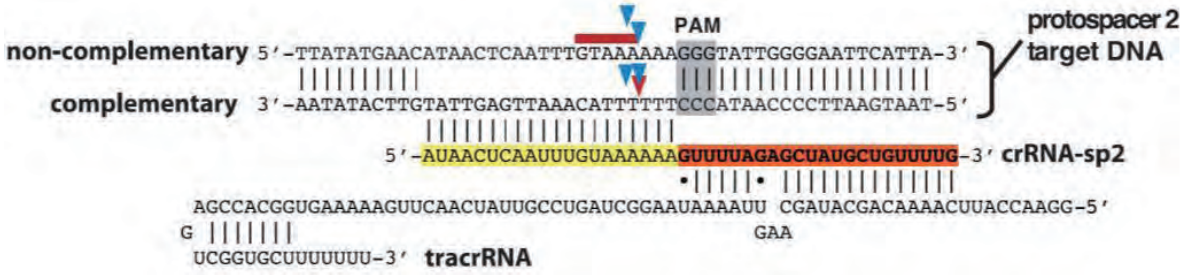


図1　化膿性連鎖球菌（*S.pyogenes*）由来Cas9ヌクレアーゼは、標的部位への結合および標的DNAの切断のために、標的特異的なcrRNA（CRISPR RNA）とtracrRNA（transactivating CRISPR RNA）を要する。PAM配列（灰色）は、Cas9/sgRNA複合体が切断部位を探索するときの目印であり、赤矢印は頻出する切断部位を示す。2つのRNA（crRNA＋tracrRNA）は融合して1つのsgRNAとして機能する。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

sgRNAがCas9と複合体を形成すると、この複合体は標的配列とPAM配列を見つけて、DNA二本鎖を巻き戻し、20塩基のsgRNAが反対鎖の相補配列にアニールします。これによりCas9ヌクレアーゼが二本鎖切断を導入します（図2）。二本鎖切断を速やかに修復することができなければ、細胞は死滅してしまいます。細胞にとって好ましい二本鎖切断修復経路は、比較的誤りの少ない相同組換え（HR）ですが、染色体が複製され姉妹染色体が対形成を行った後の分裂後期で生じる必要があるため、有糸分裂細胞で生じることはほとんどありません。相同組換えは通常、非分裂細胞でも生じません。相同性がない場合、二本鎖切断は、代わりに、非相同性末端結合（NHEJ）によって修復されます。NHEJは、その修復機構において元来エラーを起こしやすく、破壊された染色体末端を繋ぎ合わせる際に短鎖の挿入や欠失（indels）を導入します。多くの研究者は、CRISPR/Cas9によるゲノム編集アプリケーションにおいて、この挿入欠失形成傾向を簡便かつ効率的な遺伝子ノックアウト手法として活用しているのです。

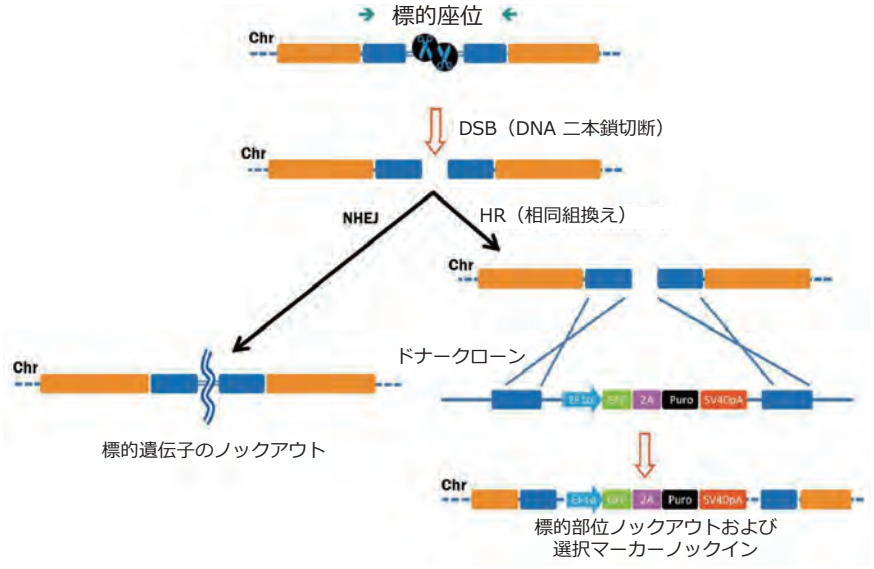


図2　ゲノム編集ツールにより誘導されるDNA二本鎖切断（DSB）修復経路
左図：非相同性末端結合
右図：ドナーテンプレート存在下での相同組換え

2 sgRNA結合の特異性

CRISPR/Cas9に利用する標的配列鎖長は20塩基であることから、もしも染色体上の標的部位へのRNA結合が、厳格に配列依存性である場合、これらの標的は真核生物ゲノムにおいて特有のものである必要があります。PAM配列との組み合わせにより、CRISPR/Cas9が他の部位を切断することは非常に考え難いケースです。しかしながら、CRISPR/Cas9の特異性には配列構成だけが関与するわけではありません。Yanfang Fuらの研究グループは、染色体に組込まれたGFPレポーター遺伝子の3種の部位が、1つまたはそれ以上のミスマッチを持つにもかかわらず、sgRNAがCas9ヌクレアーゼをこの標的部位へと導いたことを報告しています（Fu, *et al.*, 2013）。隣接しつつ分散した複数のミスマッチが、sgRNAとレポーター標的間に存在する場合にも許容性が見られています。sgRNA配列のうちPAM配列に最も隣接した10塩基以内に存在するミスマッチは、「毎回」という頻度ではないものの、通常、PAM配列より離れた10塩基に存在するミスマッチより許容性を示し、ミスマッチの分配耐性は標的によってバラツキが見られました。

さらに、Fuらは3種の内在性ヒト遺伝子に対するsgRNAを作製し、レポーターアッセイの結果をもとに各sgRNAがオフターゲット作用を示すであろう部位を予測しました。ほぼ全てのオフターゲット部位には標的RNAとの間に複数のミスマッチが存在しました。さらにFuらは、T7エンドヌクレアーゼIアッセイにより挿入欠失の存在を検出し、これらの予測されたオフターゲット部位は、しばしば挿入欠失を保持し、さらにこの数は元来の標的部位に比べて同等またはそれ以上あることを見つけました。sgRNAと染色体配列間で、最大5つのミスマッチが存在する場合であっても、検出可能な挿入欠失を形成する場合がありました。分析した染色体の標的や使用した細胞において、ミスマッチ寛容性の程度がsgRNAによって変わることが示されました。

3 CRISPR/Cas9オフターゲット変異誘発性に関する近年の解析

Fuら（Fu, *et al*., 2013）を始めとするCRISPR/Cas9システムの特異性に関する初期の研究では、本技術を遺伝子治療のような高い特異性を要するアプリケーションに利用できるのか懐疑的でした。近年の研究では、CRISPR/Cas9の特異性は高い、ということが報告されています。例えば、米ブロード研究所のEric Landerの研究室では、レンチウイルスに組込んだsgRNAライブラリーを用いてヒト細胞における大規模な変異誘発性スクリーニングを行っています。DNA損傷薬剤への耐性スクリーニングにおいて、間違った標的をしたsgRNAに比べ、正確に標的したsgRNAのほうが、遥かに高い頻度で二本鎖切断によるミスマッチ修復経路における遺伝子変異を引き起こすことが示されています（Wang, *et al*., 2014）。

マウスの白内障治療に成功したsgRNAは、12検体中10検体の組換え動物において10種の予測されたオフターゲット部位に対して何ら影響を及ぼさず、残り2検体においてわずか1ヶ所のオフターゲット部位に変異を生じたのみでした（Wu, *et al*., 2013）。これらの報告やその他の研究報告 （Li, *et al*., 2013; Yang, *et al*., 2013）、および高い特異性を示すよう、より改善されたsgRNA予測ソフトウェアツール（Ran, *et al*., 2013a; Xiao, *et al*., 2014）の利用を併せて考慮すると、CRISPR/Cas9によるオフターゲット変異誘発性は高い傾向にあると長い間心配されてきたことが過剰反応である可能性も大いにあります。

4 特異性を高める改変型Cas9（ニッカーゼ）

sgRNAデザインの改善だけではなく、Cas9変異体の使用によりCRISPR/Cas9によるオフターゲット作用をさらに低減できることが示されています。野生型Cas9は2つのヌクレアーゼドメインをもち、それぞれが片方のDNA鎖を切断します。何れかのドメインを変異させることでCas9を「ニッカーゼ」へと転換することができ、一本鎖のみを切断するようにできます。

ニッカーゼ/改変型Cas9によって、sgRNAがオフターゲット部位に送達される可能性はあるものの、一本鎖切断ではNHEJを誘導することはありません。染色体上の各DNA鎖を標的とする2種のsgRNAをデザインすることでねじれ型の二本鎖切断を誘導することができ、NHEJまたは相同組換えによる修復を受けることができます（図3）。ハーバード大学のGeorge Churchらの研究グループや米ブロード研究所のFeng Zhangらの研究グループはこの「一対のニッカーゼ」を利用する方策によりNHEJや相同組換えの何れのDNA修復も効率よく誘導できることを報告しています（Ran, *et al*., 2013b; Mali, *et al*., 2013）。さらにZhangらは、3種の異なる部位を標的するsgRNAを用いた実験で、**一対のニッカーゼを利用することでオフターゲット変異誘発の頻度を50倍から1500倍低減**できることを示しています。

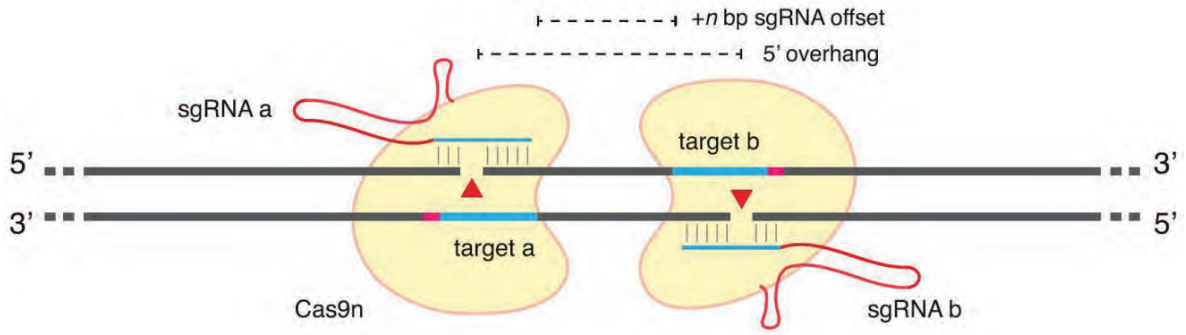


図3　Cas9ダブルニッカーゼ法の一般的な概略。Ran, *et al*.（2013b）より引用

一方で、ダブルニッカーゼのデザインは容易ではありません。お互いのPAM配列が近位に位置するsgRNA対（“head-to-head”方向）に比べ、お互いのPAM配列が最も遠位に配置されたガイドRNA対（“tail-to-tail”方向）では、より高い頻度で挿入欠損が形成されます（Ran, *et al*., 2013b; Mali, *et al*., 2013）。さらに、各sgRNAの末端同士の間隔（オフセット距離）も重要となります。最も効果の高いニッカーゼペアは、通常オフセット距離が0から20塩基です。ダブルニッカーゼ法は、オフターゲット作用による期待しない二本鎖切断がほとんど生じることなく、効率よく二本鎖切断を誘導できる一方で、デザインの制約によりアプリケーションによっては適切な部位として使用可能な範囲が限定されます。最後に、近年の報告では、最短17塩基のsgRNA配列は、標準型の20塩基のものと比較して、その挿入欠失形成効率が同程度であることが示されました（Fu, *et al*., 2014）。さらに、著者らは、これらの「短いsgRNA」を用いて4種の遺伝子を標的したところ、オフターゲット作用が最大5000倍まで低減できたと報告しています。しかし、このより短いsgRNAが一般に効果的であるかどうかは、さらなる検討が必要でしょう。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

参考文献

- Bogdanove & Voytas (2011). TAL Effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843.
- Fu, *et al*. (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* 31, 822.
- Fu, *et al*. (2014). Improving CRISPR/Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnology* 32, 279.
- Jinek, *et al*. (2012). A programmable dual-RNA–guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816.
- Li, *et al*. (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR/Cas system. *Nat. Biotechnol*. 31, 681.
- Mali, *et al*. (2013). Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnology* 31, 833.
- Ran, *et al*. (2013a). Genome engineering using the CRISPR/Cas9 system. *Nat. Protocols* 8, 2281.
- Ran, *et al*. (2013b). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR/Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154, 1380.
- Shalem, *et al*. (2014). Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84.
- Shen, *et al*. (2014). Efficient genome modification by CRISPR/Cas9 nickase with minimal off target effects. *Nature Methods* 11, 399.
- Tsai, *et al*. (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing. *Nature Biotechnology* Apr 25. doi: 10.1038/nbt.2908. [Epub ahead of print].
- Wang, *et al*. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 343, 80.
- Wu, *et al*. (2013). Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR/Cas9. Cell Stem Cell 13, 659.
- Xiao, *et al*. (2014). CasOT: a genome-wide Cas9/gRNA off-target searching tool. *Bioinformatics* 30, 1180.
- Yang, *et al*. (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas- mediated genome engineering. *Cell* 154, 1370.

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the GeneCopoeia, Inc. for providing CRISPR Off-target Mutagenesis information presented here.

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

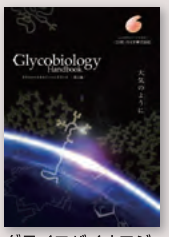
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第4版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

CRISPR/Cas9 両対立遺伝子ノックアウト or 単一対立遺伝子ノックアウト

Allelic Expression、WBで確認できます

WEBへどうぞ
記事ID:15242

Santa Cruz Biotechnology, Inc.
メーカー略号：SCB

二倍体細胞は各染色体に対して相同コピーをもち、各遺伝子2つのコピーを保有します（対立遺伝子、アレル）。集団内において1つの対立遺伝子がより頻繁に生じることから、野生型遺伝子と呼ばれます。変異により新しい対立遺伝子が生じることもあり、それぞれの新規対立遺伝子が表現型の変化を導くこともあります。二倍体細胞は多くの遺伝子に対して2つの対立遺伝子をもつため、全ての標的遺伝子をノックアウトし、ホモ接合のノックアウト細胞群を得るためには、トランスフェクションおよび細胞選択を繰り返し行う必要があるケースもあります。CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミド（23ページ、WEB 記事ID：14017）のみを使用する場合、NHEJ修復を誘導し、標的遺伝子に挿入欠失を導入します。CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドをトランスフェクション後、細胞によっては標的遺伝子の両方の対立遺伝子に対してノックアウトが生じます（両対立遺伝子ノックアウト）が、一部の細胞においては1つの対立遺伝子に対してのみノックアウトが生じます（単一対立遺伝子ノックアウト）。そのため、CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドがトランスフェクションされた細胞群には両対立遺伝子ノックアウト細胞と単一対立遺伝子ノックアウト細胞が混在することになります。

CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドをトランスフェクションした後、対象細胞に両対立遺伝子ノックアウトが生じたのか、あるいは単一対立遺伝子ノックアウトが生じたのかを確認する方法のひとつに、ウェスタンブロット法があります。単一細胞コロニーを単離することで、単一対立遺伝子または両対立遺伝子の細胞群を調製することができます。両対立遺伝子ノックアウト集団は、ウェスタンブロットにおいて対象タンパク質の100%ノックダウン（ノックアウト）を示し、単一対立遺伝子ノックアウト群では対象タンパク質発現の50%ノックダウン（ノックアウト）がみられるはずです。

標的遺伝子のノックアウトと相同組換え（HDR）には、特定のCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドとHDRプラスミド（23ページ、WEB 記事ID：14017）の同時トランスフェクションが問題なく実施されることが重要となります。これらを同時にトランスフェクションした後、RFPの検出によりプラスミド導入を確認し、その後ピューロマイシンによりゲノム上に組込まれた細胞を選択する事ができます。ウェスタンブロット法は、ここでも、何れのコロニーが対象遺伝子の両対立遺伝子ノックアウトであるかを確認するための有用な手段といえます。

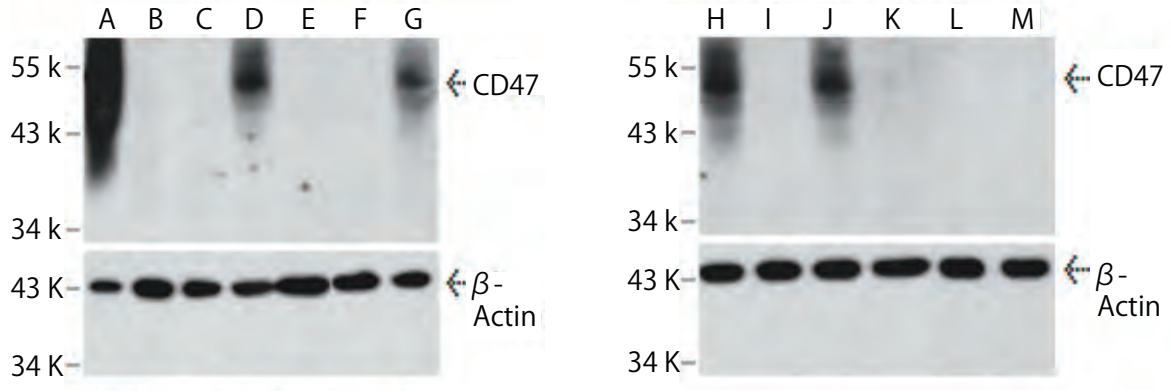


図1　ウエスタンブロッティングによるCD47の発現解析
細胞：HEK293T細胞
抗体：Anti CD47（品番：SC-12730）
　　Anti β-Actin（品番：SC-47778）
（A）コントロールHDRプラスミド導入後、ピューロマイシン処理
（B-M）CD47 CRISPR/Cas9 KOプラスミド（品番：SC-400508）およびCD47 HDRプラスミド（品番：SC-400508-HDR）を同時トランスフェクションした細胞のライセート
ピューロマイシンで薬剤選択した後、限界希釈法を用いて細胞クローニングを行った。細胞ライセートB/C/E/F/I/K/L/Mは両対立遺伝子のノックアウトを示し、細胞ライセートD/G/H/Jは、CD47の発現量が一部残っていることで単一対立遺伝子ノックアウトであることを示す。

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the Santa Cruz Biotechnology, Inc. for providing CRISPR technology information presented here.

ゲノム編集 総説
CRISPR/Cas9システム ガイドライン
商品選択用 フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウト ベクター
HDR用 ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的 ノックイン
セーフ・ハーバー部位への ノックイン
CRISPR/Cas9 タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集 効率改善
技術情報
ゲノム編集 効率改善
ゲノム編集 受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物の ゲノム編集
細胞の ゲノム編集
ゲノム編集 細胞株による タンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術 応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー/スクリーニング
技術情報
ライブラリー/スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

ドナーテンプレートを利用した効果的なゲノム編集アプリケーション

WEBへどうぞ
記事ID:15214

相同組換えを利用したCRISPR/Cas9ゲノム編集アプリケーションをご紹介

GeneCopoeia™ Expressway to Discovery

GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

背景

標的ゲノム部位に特異的変異・変化を導入するゲノム編集技術は、生物学や医学系研究者にとって非常に重要な技術です（Bogdanove & Voytas, 2011; van der Oost, *et al.*, 2013）。細菌の適応免疫を活用したCRISPR/Cas9や植物病変形成といった細菌システムを活用したTALENの2種類のゲノム編集技術が一般的によく利用されています。何れの技術も、実質的にゲノム上の如何なる標的配列に対しても二本鎖切断（DSB）を導入し、遺伝子ノックアウト、遺伝的欠損の矯正、遺伝子tagging、および遺伝子のノックインに利用されます。GeneCopoeia社では、CRISPR/Cas9を利用してゲノム編集を行うためのツールや受託サービスを広範にご提供しております。

本稿では、CRISPR/Cas9技術を利用したゲノム編集に利用されるドナーテンプレート（ドナーベクター）に関してその使用方法や、GeneCopoeia社がどのようにしてお客様のゲノム編集アプリケーションに適したドナーテンプレートをご提供するかなど詳述します。

HDRドナープラスミドを使ったゲノム編集ツール

下記ページで紹介しております。また、コスモ・バイオのWEBでも紹介しております。

- GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9 ノックインキット & HDR ノックインクローン（27ページ、WEB 記事ID：15479）
- GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9 HR（HDR）用ドナーベクター（39ページ、WEB 記事ID：14734）
- GeneCopoeia社 カスタムノックインドナー構築サービス（72ページ、WEB 記事ID：12069）

1 ドナーテンプレート（ドナーベクター）とは何か

ドナーベクターとは相同組換え（HR）において遺伝情報を染色体に移行するDNA分子であり、ノックアウト、塩基置換、融合タグ付け、プロモーター交換など広範に使用されています。相同組換えはCRISPR/Cas9システムによって生じる部位特異的二本鎖切断（DSB）により引き起こされます。細胞は2種類の機序の何れかを利用して二本鎖切断を修復します（図1）。1つは非相同性末端結合（NHEJ）であり、相同的な鋳型が存在しない場合は短鎖の挿入または欠失を生じます。この挿入欠失によりしばしばフレームシフトを伴う変異が生じるため、効率的な遺伝子ノックアウトに利用することができます。もう一方の経路は相同組換えで、NHEJに比べて比較的誤りが少ないことが知られています。姉妹染色体だけでなく外来性DNAもドナーテンプレートとして利用されます。ドナーテンプレートは二本鎖切断部位の隣接配列と同一のホモロジーアームから構成されます（図1）。組換えの際、ドナーテンプレートからの情報が「コピー」され、染色体に「ペースト」されます。選択マーカーや蛍光レポーターなど、実質的にどのようなDNA配列であっても左右のホモロジーアーム間に配置することができ、相同組換えによりこれらの追加配列がコピーされて、染色体にノックインされます。

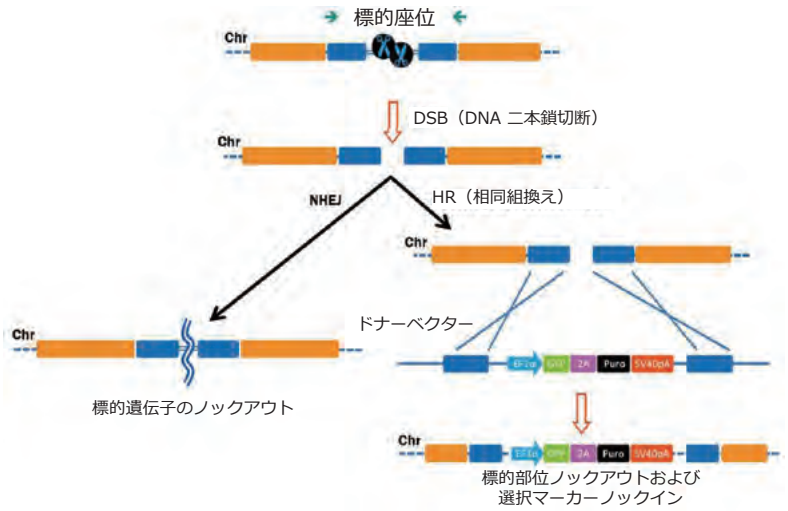


図1　ゲノム編集ツールにより誘導された二本鎖切断の修復経路
左：NHEJ経路、右：相同組換え経路

2 なぜドナーテンプレートを利用するのか

遺伝子ノックアウトを除き、ほとんどのゲノム編集アプリケーションではドナーテンプレートが必要となります。二本鎖切断の際にドナーテンプレートが存在しない場合、NHEJ誘導性フレームシフトによる遺伝子ノックアウトが生じます。一方で、ドナーテンプレートを利用した遺伝子ノックアウトでは、その恩恵を受けることができます。まず、ドナーテンプレートを利用することで確実にノックアウトできる変異をデザインすることができます。NHEJでは、挿入欠失が生じても3分の1の割合で本来の翻訳読み枠が維持される（3の倍数の塩基欠損）可能性があり、機能をもつタンパク質が発現することがあります。また、ドナーテンプレートにより薬剤選択が可能となるため、特にトランスフェクション効率の低い培養細胞株を使用する場合には、時間と労力を要する大量のクローンスクリーニングから解放されることになります。

ドナーテンプレートを使用するかどうか、どういった種類のドナーテンプレートを使用するかは、後述するアプリケーションにより異なります。

3 ドナーテンプレートを用いたアプリケーション

■ 遺伝子ノックアウト

特定遺伝子のノックアウトを行う場合、ドナーテンプレートは必須ではありません。実際、遺伝子改変動物では薬剤選択ができないことから、ノックアウトドナーはあまり有用ではありません。一方で、培養細胞における特定遺伝子のノックアウトの場合は、ドナーテンプレートが有用となるケースが多々あります。これらのドナーは非常に単純な構造で、標的部位に隣接する左右のホモロジーアームをもたせ、標的部位の一部が削除されて、薬剤選択マーカーと置換される構造となっています（図2）。ドナーテンプレートを利用したノックアウトにより、エキソン全体や遺伝子全体を削除する方法もあります。ノックアウトを目的とする際、多くの場合で2つの対立遺伝子を修正する必要があるため、同一ドナー配列をもち、かつ、異なる薬剤選択マーカーをもった2種のドナーテンプレートを構築することで、細胞クローンのスクリーニングの際に二重薬剤耐性選択を行うこともできます。

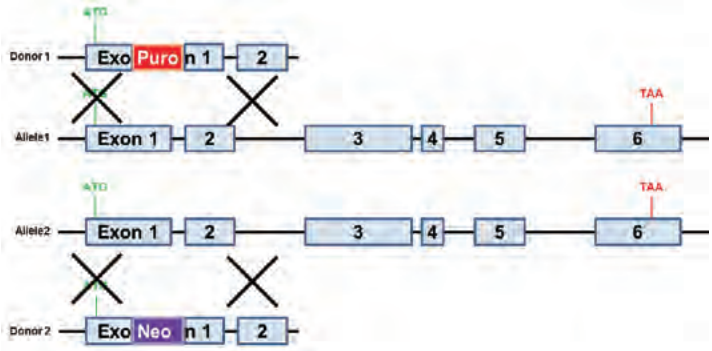


図2　遺伝子ノックアウト用ドナー
異なる選択マーカーをもつ2つのドナーテンプレートを構築した。二重薬剤選択により両対立遺伝子ノックアウトクローンの選択が可能。

■ 条件的ノックアウト

特定の組織、タイミング、生理条件下においてのみ遺伝子ノックアウトを実施したい場合、条件的ノックアウトが必要となります。一般的な条件的ノックアウトの手法として、エキソンに隣接する各イントロン内にloxPを配置する方法があります（“floxed”アレル）。loxPが挿入されたアレルはCreリコンビナーゼが発現するまで活性型です。CreによりloxP部位間の組換えが生じエキソンが欠失します（図3）。

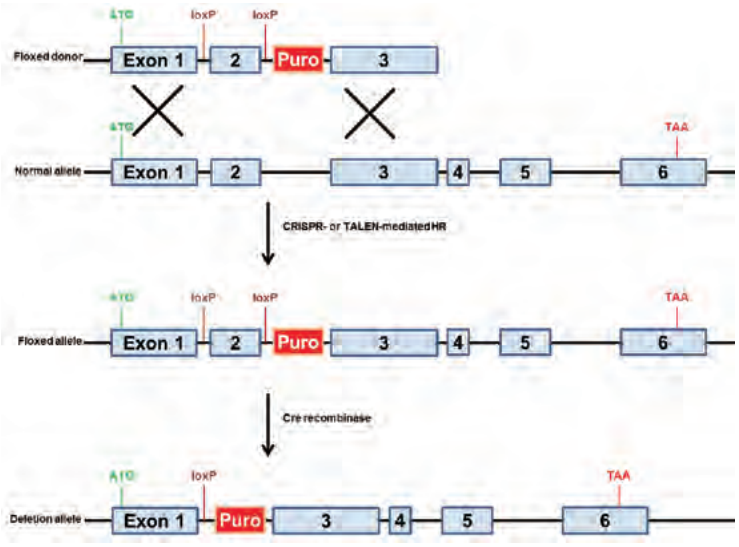


図3　条件的ノックアウト用ドナー
loxP配列にはさまれた標的遺伝子配列を含むドナーをCRISPR/Cas9システムまたはTALENシステムと同時にトランスフェクションする。薬剤選択によりloxPが挿入されたアレルをもつ細胞を単離可能。その後のCreリコンビナーゼ処理により標的遺伝子の欠失が生じる。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

塩基置換

ゲノム編集において最も有用なアプリケーションのひとつに塩基置換があります。標的遺伝子への変異導入や疾患変異の修復など、何れにおいても有用です。染色体の塩基置換には一般に2種類のタイプのドナーテンプレートが利用されています。まず、選択マーカーをもつドナーベクターの利用があげられますが、この種のドナーテンプレートは培養細胞において使用され、前述の条件的ノックアウトで使用されるものと同様、薬剤耐性遺伝子は近接のイントロンに配置されます（図4）。次に、標的部位の隣接領域とおよそ40〜80塩基の相同配列をもつ一本鎖DNA（ssODN）を利用する方法があげられます。ssODNドナーテンプレートの主な利点として、正確な相同組換えにより内在性配列の「傷跡のない」塩基対変化が生じ、他の配列の変更が生じないことがあります。本アプローチの成功例としてWu, *et. al.*（2013）があり、マウスにおいてssODNとCRISPR/Cas9を使用して白内障の原因となる変異の修復を行っています。しかし、培養細胞実験ではssODNドナーテンプレートを用いると正確に修正されたクローンを同定するためのセレクションを行うことができず、特にトランスフェクション効率の低い細胞では選択マーカーを持つドナーベクターがより有用です。

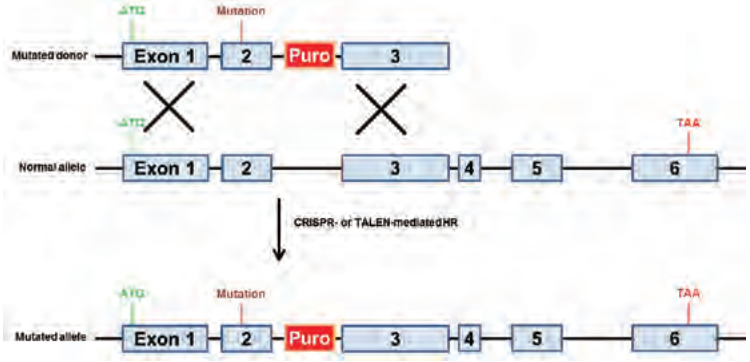


図4　塩基置換用ドナー
ー塩基置換を含むドナーテンプレートとCRISPR/Cas9システムまたは TALENシステムを同時にトランスフェクションする。薬剤選択により変異が入った細胞を単離する。

融合タグ付け

次に一般的なゲノム編集ドナーテンプレートのアプリケーションとしてタンパク質のインフレームでの融合タグ付けがあげられます。例えば、対象とする内在性タンパク質のC末端にGFPタグを付加する場合を想定すると、CRISPR/Cas9あるいはTALENとドナーテンプレートを利用して、標的遺伝子の3'末端にGFPをノックインする方法が考えられます（図5）。条件的ノックアウトや塩基置換用のドナーテンプレートと同様、培養細胞において正しく変異が導入されたクローンの選択を目的として、近接のイントロン内に選択マーカーを配置することが多々あります。

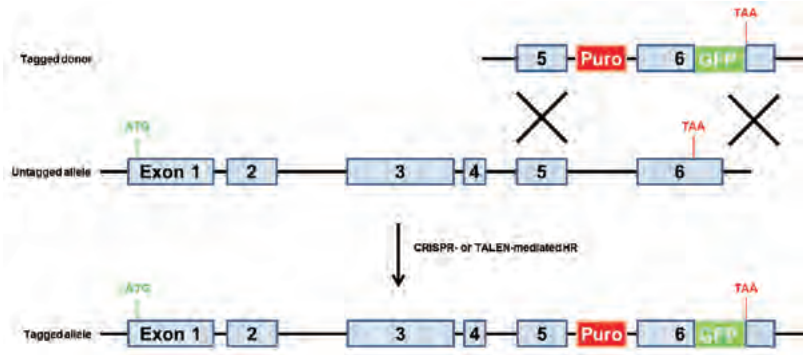


図5　融合タグ付け用ドナー
ドナーテンプレートは終止コドンの上流に3'末端タグをもつ。細胞選択用の薬剤耐性遺伝子はイントロン内に配置。

好評配布中！
コスモ・バイオニュース
ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！
www.cosmobio.co.jp
毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

セーフ・ハーバー遺伝子ノックイン

本稿で最後に紹介するドナーテンプレートは、ヒトAAVS1またはマウスRosa26といった「セーフ・ハーバー」部位に遺伝子をノックインする方法です。これらの部位は細胞や動物に対して有害な作用を示すことなく遺伝子挿入が可能であることが数々の研究により実証されています。さらに、セーフ・ハーバー部位に組込みを行うことで、ランダムな遺伝子挿入と異なり一貫性のある定常的な導入遺伝子発現が保証されます。セーフ・ハーバー部位への組込み用途として、ヒト以外の遺伝子をヒト細胞へ組込む、あるいは、遺伝子欠損をORF配列の挿入によりレスキューするなどといった、様々な可能性が考えられます。GeneCopoeia社では、お客様の目的遺伝子をセーフ・ハーバー部位に組込むための便利な試薬キットを提供しています（48ページ）。さらに、GeneCopoeia社ではヒトおよびマウスのORFクローンをゲノムワイドに保有しており、これらを利用してセーフ・ハーバーノックインORFクローンをご用意しています（図6）。

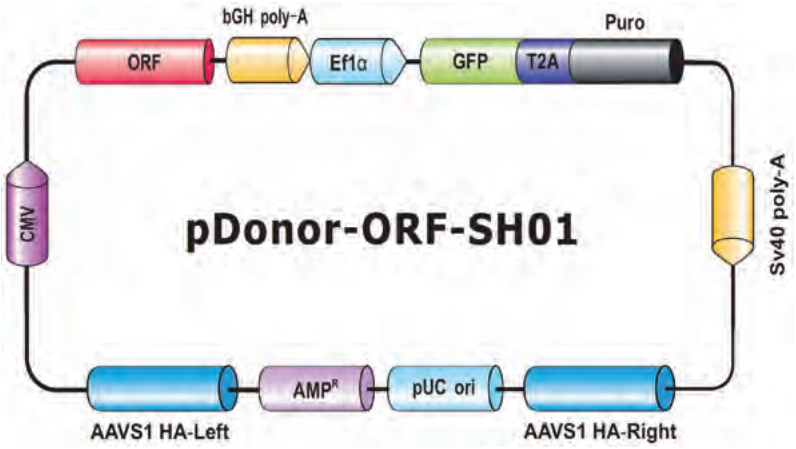


図6　Genome-CRISP™ ヒトAAVS1セーフ・ハーバーノックインクローン
ORFはAAVS1のホモロジーアーム（HA-Left、HA-Right）の間にセレクションカセットとともに配置されている。

- GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9 ノックインキット & HDR ノックインクローン（27ページ、WEB 記事ID：15749）
- GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9 HR（HDR）用ドナーベクター（WEB 記事ID：14734）
- ORIGENE社 CRISPR/Cas9 AAVS1領域 遺伝子挿入キット&ベクター（54ページ）

4 結論

本稿では、ドナーベクターを使用したゲノム編集アプリケーションをご紹介致しました。GeneCopoeia社では、ご自身で構築できる数種類のドナークローニングベクター（39ページ、WEB 記事ID：14734）などゲノム編集用ドナーアプリケーション関連商品を種々取り揃えています。ドナーベクターをデザインする際には本稿で焦点をあてた事項以外にもさまざまな複雑な点を考慮する必要があります。GeneCopoeia社では、熟練したゲノム編集チームによりデザインや構築を行うカスタムノックインドナー構築サービス（72ページ、WEB 記事ID：12069）も提供しております。

参考文献

- Bogdanove & Voytas (2011). TAL Effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843.
- van der Oost, *et al.* (2013). New Tool for Genome Surgery. *Science* 339, 768.
- Wu, *et al.* (2013). Correction of a Genetic Disease in Mouse via Use of CRISPR/Cas9. Cell Stem Cell 13, 659.

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the GeneCopoeia, Inc. for providing HDR donor for the CRISPR technology information presented here.

Applied Biological Materials社

GeneCraft-R CRISPR sgRNA Synthesis Kit

WEBへどうぞ
記事ID:32929

sgRNA合成用の簡便なキット

GeneCraft-R CRISPR sgRNA Synthesis Kitは、Streptococcus pyogenes由来Cas9（spCas9）システム用のsgRNAの合成キットです。本商品には、T7プロモーターおよび標的遺伝子配列を組み込んだオリゴDNA以外の、sgRNA合成に必要なすべての酵素や試薬が含まれています。

■sgRNAの合成手順

① 標的特異的なオリゴDNAの作成ガイド

あらかじめ標的特異的な鋳型となるオリゴDNAをデザインし作成しておく必要があります。sgRNAは、この標的配列を含むオリゴDNAと試薬中のscaffoldテンプレートとのアニールおよび伸長によりdsDNAを作成し、このdsDNAを鋳型として転写反応により合成されます。

図1　Target-specific Oligo design.

以下のガイドラインに準じて、T7プロモーター配列および標的遺伝子のsgRNA配列、scaffoldテンプレートに対応する配列を含むオリゴDNAをデザインします。

1） spCas9ヌクレアーゼはgRNA配列直後の3′末端に存在するプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列“NGG”を認識するため、標的のDNA配列の3′末端はPAM配列“NGG”で終わるように設計します。ただし、PAM配列の20塩基上流のみがsgRNA配列として利用されるため、PAM配列自身はsgRNA配列の一部ではありません。
2） 図1の通り、作成するオリゴDNAは以下の3種類の配列で構成されます。
①T7プロモーター配列:プライマー5′末端の23塩基で、sgRNAの5′末端に“GGG”を挿入します。この3つの“G”は効率よいT7プロモーターからの転写に重要です。
②実際のsgRNA標的配列：20塩基
③scaffoldテンプレートに対応する配列
3） オリゴDNAは66塩基長で、合成後に脱塩処理を行い、ヌクレアーゼフリー水に溶解して10 μM濃度に調製します。

② 標的特異的sgRNA合成

本キット商品は、標的配列を組み込んだオリゴDNAをそれぞれの酵素類と反応させることで、一つのチューブ内でdsDNAテンプレートの作成およびdsDNAテンプレートからの転写を進行させてsgRNAを合成します。

合成したsgRNAはそのままご利用いただけますが、オプションとしてキットに同梱されているDNase Ⅰにより、DNAテンプレートや残っているNTP、dNTPを取り除くことも可能です。

■GeneCraft-R CRISPR sgRNA Synthesis Kitの選択ガイド

GeneCraft-R CRISPR sgRNA Synthesis Kitには、2つのアプローチがあります。1ステップのExpressキット（品番：G948）と2ステップのClassicキット（品番：G952）です。

●1ステップExpressキット（品番：G948）

GeneCraft-R Expressは、標的配列を組み込んだオリゴDNAをそれぞれの酵素類と反応させることで、一つのチューブ内でdsDNAテンプレートの作成およびdsDNAテンプレートからの転写を進行させてsgRNAを合成します。

特長

- 反応時間30分
- ピペット操作の回数を最小化しコンタミリスクを低減
- 多検体処理に最適

構成内容

2X Express sgRNA Synthesis SuperMix	250 μℓ
DNA Polymerase	10 μℓ
sgRNA Control Oligo (10 μM)	10 μℓ
OneScribe Enzyme Mix	100 μℓ
DNase I, RNase-Free (2 U/μℓ)	100 μℓ
10X DNase I Reaction Buffer	500 μℓ
Nuclease-free H_2O	1 mℓ
	25 rxns

●2ステップClassicキット(品番：G952)

GeneCraft-R Classicは、まず標的配列を組み込んだオリゴDNAをPCR法にて増幅してdsDNAテンプレートを作成します。次にこのdsDNAを別のチューブに移し、T7プロモーターから転写反応により標的特異的なsgRNAを合成します。

特長

- PCRクリーンアップ操作は必要ありません
- 途中サンプルのdsDNAテンプレートの品質検査&保存が可能
- 均一性の高い高品質なsgRNAを合成できるため、in vivo の試験などにも最適

構成内容

2X Classic sgRNA Synthesis SuperMix	250 μℓ
GeneCraft-R Scaffold Template and Primer	25 μℓ
sgRNA Control Oligo (10 μM)	10 μℓ
OneScribe Enzyme Mix	100 μℓ
DNase I, RNase-Free (2 U/μℓ)	100 μℓ
10X DNase I Reaction Buffer	500 μℓ
2X PCR Bestaq™ MasterMix	1 mℓ
Nuclease-free H_2O	1 mℓ
	25 rxns

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Synthesis Kit（*S. pyogenes*）	G948	25 rxn	￥77,000	㊄
GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit（*S. pyogenes*）	G952	25 rxn	￥66,000	㊄

Applied Biological Materials社

GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Screening Kit

WEBへどうぞ
記事ID:32996

GeneCraft-R CRISPR sgRNA Screening Kitは、設計したspCas9（*Streptococcus pyogenes* 由来Cas9）に対するsgRNAの機能性を、*in vitro* で簡易的に比較・検証するためのキットです。本商品には、標的特異的なオリゴDNA以外の、sgRNAスクリーニングに必要なすべての酵素や試薬が含まれています。

本商品のご利用に際しては、sgRNAの合成およびスクリーニングの2工程を同時に行うことができるキットと、既に作成してあるsgRNAの機能性をスクリーニングする目的のみのキットの2種類からお選びいただけます。

特長

- 反応時間30分
- ピペット操作の回数を最小化しコンタミリスクを低減
- 多検体処理に最適

■sgRNA Synthesis and Screening Kit（品番：G954）

本商品は、1ステップかつ全行程30分のsgRNA合成試薬と、細胞の溶解および標的配列の周辺DNAを増幅するためのPCR試薬、*in vitro* でspCas9 nuclease NLSタンパク質と標的配列DNAを反応させてスクリーニングするための試薬で構成されています。
以下の、プロトコールをご参照ください。

■sgRNA Screening Kit（品番：G953）

本商品は、細胞の溶解および標的配列の周辺DNAを増幅するためのPCR試薬、*in vitro* でspCas9 nuclease NLSタンパク質と標的配列DNAを反応させてスクリーニングするための試薬で構成されています。
以下の、sgRNAのスクリーニング手順以降のプロトコールをご参照ください。

■sgRNAの合成手順

① 標的特異的なオリゴDNAの作成ガイド

あらかじめ標的特異的な鋳型となるオリゴDNAをデザインし作成しておく必要があります。sgRNAは、この標的配列を含むオリゴDNAと試薬中のscaffoldテンプレートとのアニールおよび伸長によりdsDNAを作成し、このdsDNAを鋳型として転写反応により合成されます。

図1　Target-specific Oligo design.

以下のガイドラインに準じて、T7プロモーター配列および標的遺伝子のsgRNA配列、scaffoldテンプレートに対応する配列を含むオリゴDNAをデザインします。

1） spCas9ヌクレアーゼはgRNA配列直後の3’末端に存在するプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）配列“NGG”を認識するため、標的のDNA配列の3’末端はPAM配列“NGG”で終わるように設計します。ただし、PAM配列の20塩基上流のみがsgRNA配列として利用されるため、PAM配列自身はsgRNA配列の一部ではありません。

2） 図1の通り、作成するオリゴDNAは以下の3種類の配列で構成されます。
① T7プロモーター配列:作成するオリゴDNAの5’末端の23塩基で、sgRNAの5’末端に“GGG”を挿入します。この3つの“G”は効率よいT7プロモーターからの転写に重要です。
② 実際のsgRNA標的配列:20塩基
③ scaffoldテンプレートに対応する配列

3） オリゴDNAは66塩基長で、合成後に脱塩処理を行い、ヌクレアーゼフリー水に溶解して10μM濃度に調製します。

② 標的特異的sgRNA合成

本商品は、標的配列を組み込んだオリゴDNAをそれぞれの酵素類と反応させることで、一つのチューブ内でdsDNAテンプレートの作成およびdsDNAテンプレートからの転写を進行させてsgRNAを合成します。

合成したsgRNAはそのままご利用いただけますが、オプションとしてキットに同梱されているDNase I により、DNAテンプレートや残っているNTP、dNTPを取り除くことも可能です。

■sgRNAのスクリーニング手順

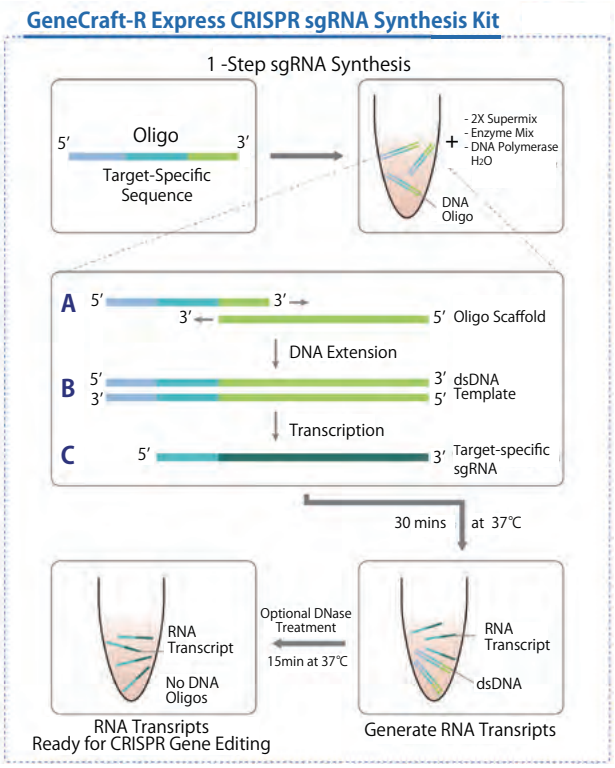
プライマーデザイン

sgRNAの機能性スクリーニングに用いるDNAテンプレートを用意するにあたり、以下のガイドラインに準じてプライマーをデザインしてください。

・標的配列の長さは2kb以上を推奨
・PCR増幅産物の中央に切断サイトが来ない
（切断効率をバンドの長さで判断するため）
・切断後の2本のバンドサイズの差が500bp以上

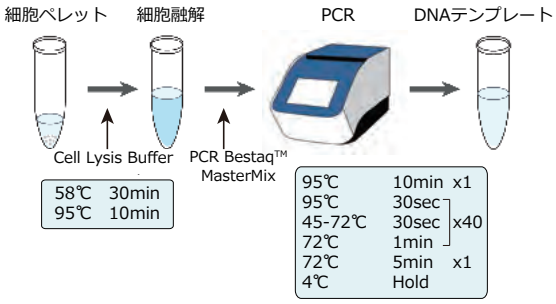
プロトコール概要

細胞を溶解して得られたゲノムDNAを鋳型に、sgRNAの標的配列を含むDNAテンプレートをPCRで増幅し作成します。このDNAテンプレートに対して、合成したsgRNAサンプルとspCas9 nucleaseを *in vitro* で反応させます。Cas9活性により切断されたDNA断片をアガロースゲル電気泳動し、バンドの数とサイズにより機能性および特異性を評価します。

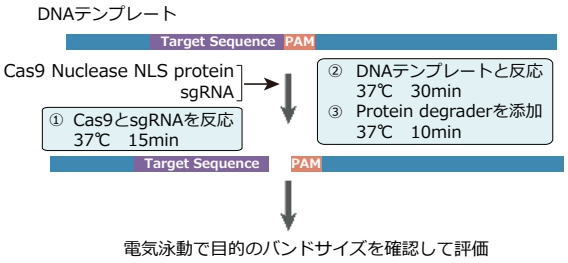


Ⅰ. PCR プライマーデザイン

Ⅱ. DNA テンプレートの調製



Ⅲ. Cas9 ヌクレアーゼ活性による切断と機能性評価



Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Synthesis and Screening Kit , *Streptococcus pyogenes*	G954	25 rxn	¥111,000	㊎
GeneCraft-R CRISPR sgRNA Screening Kit , *Streptococcus pyogenes*	G953	25 rxn	¥43,000	㊎

■関連商品

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
GeneCraft-R Express CRISPR sgRNA Synthesis Kit , *Streptococcus pyogenes*	G948	25 rxn	¥77,000	㊎
GeneCraft-R Classic CRISPR sgRNA Synthesis Kit , *Streptococcus pyogenes*	G952	25 rxn	¥66,000	㊎

CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール

Applied Biological Materials社

WEBへどうぞ
記事ID：13443

低コスト！ヒト・マウス・ラット遺伝子を網羅したゲノムワイドsgRNAコレクション

FAQあります　日本語プロトコールあります

Applied Biological Materials社では、ヒト・マウス・ラット遺伝子を網羅したsgRNA（gRNA、ガイドRNA）コンストラクトを非ウイルスベクター、AAVプラスミド、AAV粒子、レンチウイルスプラスミド、レンチウイルス粒子、アデノウイルス粒子の6種の形態でご提供しています。sgRNAコンストラクトは、SpCas9、SaCas9（AAVのみ）あるいはニッカーゼ改変型Cas9と組み合わせて使用するセパレートタイプと、SpCas9またはSaCas9とsgRNAとを1つのベクターで同時に発現するAll-in-oneタイプをご用意しています。

セパレートタイプで使用するCas9ベクターは、SpCas9、SaCas9のラインアップのほかに、SpCas9あるいはSaCas9の発現誘導ができるiCumate Cas9 ベクターもご提供しており、CRISPR/Cas9を利用したノックアウト実験をトータルサポートします。

特長

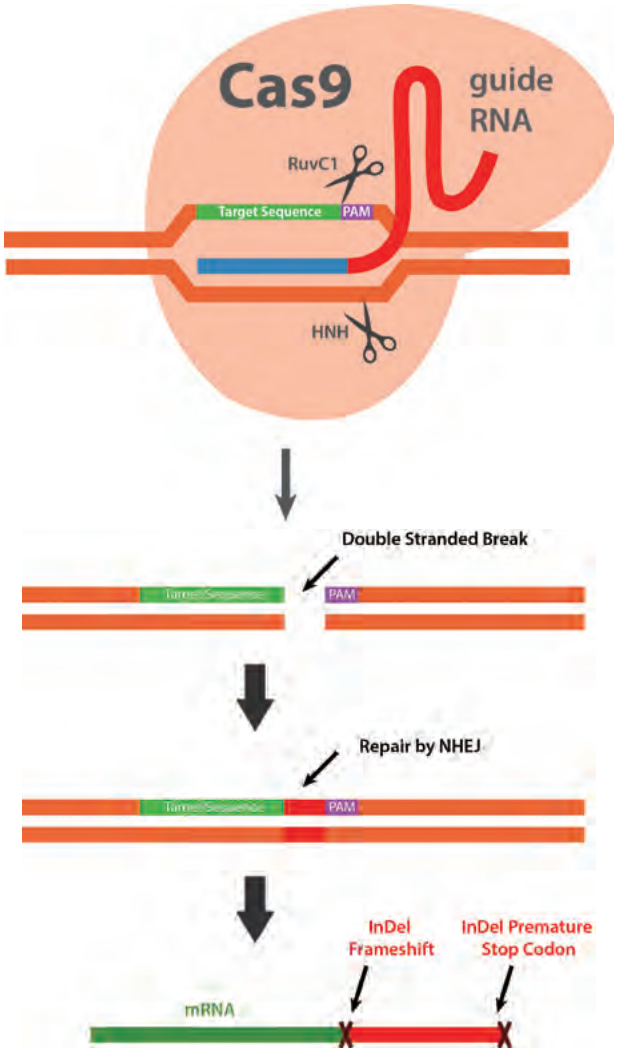
- NHEJ（非相同末端結合）機構を利用したノックアウトのアプリケーションをトータルサポート
- ヒト・マウス・ラット遺伝子をゲノムワイドに網羅した膨大なsgRNAコレクション
- 非ウイルスベクター、AAV、レンチウイルス、アデノウイルスをラインアップ
- All-in-One タイプ（Cas9 とsgRNA を同時に発現）またはセパレートタイプから選択可能
- SpCas9、SaCas9、ニッカーゼ改変型Cas9（セパレートタイプのみ）から選択可能
- sgRNA コンストラクトは単品販売と3種sgRNA コンストラクトのセット品から選択可能、セット品はさらにお買い得！
- ウイルス粒子は、初代培養細胞や非分裂細胞などトランスフェクション困難な細胞にも利用可能
- Applied Biological Materials社のLentiviral Expression Systemsで作製したレンチウイルス粒子はHIV 1型増殖力等欠損株です

■NHEJ修復機構のエラーを利用したゲノム編集ツール

本システムは、NHEJ（非相同末端結合）DNA修復機構にエラーが生じることによるゲノム崩壊（ノックアウト）を実現します。この簡便かつ頑強なゲノム編集システムには、

① エキソヌクレアーゼ：Cas9、あるいはニッカーゼ/改変型Cas9と、
② 標的特異的単鎖ガイドRNA

の2つが必要です。プラスミドのトランスフェクションやウイルスのトランスダクションにより、標的細胞や宿主において、ゲノムの標的位置を切断するCas9ヌクレアーゼが発現します。sgRNAがゲノム上の標的配列をみつけると、Cas9ヌクレアーゼがゲノムの両鎖を切断し二重鎖切断（DSB）が生じます。CRISPR/Cas9ゲノム編集ツールを過剰に発現させることにより、この二本鎖切断を修復するNHEJ機構にエラーが発生することで数塩基～数十塩基の欠損が生じ、挿入欠失フレームシフトあるいは早熟性の停止コドンが生じます。



■オフターゲット作用の問題に対処する、ニッカーゼ/改変型Cas9

2つのDNA切断ドメインをもつ野生型SpCas9を使用したゲノム編集において、sgRNAがミスマッチをもって期待しないDNA部位に結合し、オフターゲット作用を生ずる場合があります。このオフターゲット作用を低減させる手段として、野生型SpCas9ヌクレアーゼの触媒領域の1つを不活性化させた、ニッカーゼ/改変型Cas9を利用する方法があります。2つのsgRNAをゲノムDNAの近接領域（20塩基未満）の両鎖に配置して、各鎖の切断を行うことでCRISPR/Cas9システムの特異性を改善します。ゲノムDNA上に期待しない単鎖の切れ目が生じた場合には、無傷の反対鎖を鋳型として相同組換え（HDR）経路により直ちに修復されます。

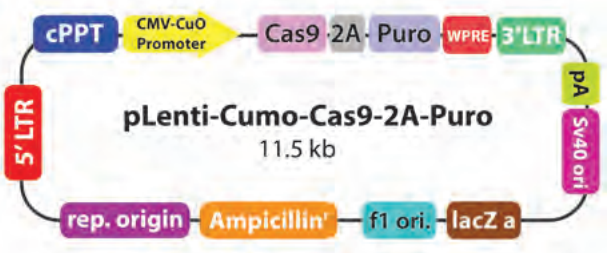
オフターゲット作用の改善に関するより詳細な情報は5ページ（WEB 記事ID：15301）をご参照ください。

■Cas9発現のオン／オフを制御できる、iCumateレンチウイルス発現誘導システム

本商品は、野生型Cas9発現のオン／オフを調節することができる、レンチウイルス骨格の発現誘導ベクターです。

シュードモナス・プチダ由来のp-cymオペロンによる抑制因子（CymR）、誘導因子（クミン酸）、および作動遺伝子（CuO）間の切換え可能な相互作用を利用し、強力なCMVプロモーターを制御します。「オフ」の状態では、CMVプロモーターの下流に意図的に配置してある作動遺伝子配列（CuO）に抑制因子（CymR）が高い親和性で結合しています。CymRがCuOに結合するとCMVプロモーターを介した転写を遮断するため、下流の如何なる遺伝子発現をも抑制します。誘導因子（クミン酸）とCymRが結合した場合、CuOとの結合ができなくなるため、転写を妨げられずに遂行することが可能となり、「オン」の状態になります。クミン酸は精密かつ正確に遺伝子発現を調節することができ、かつ毒性がなく費用対効果の高い誘導因子です。

本商品を利用することで、野生型Cas9の発現を厳密にオン／オフ制御することができ、より多彩な実験系を構築することができます。



Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

Cas9の種類	製品種	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
SpCas9ヌクレアーゼ	レンチウイルスベクター	K002	10 µg	¥ 25,000	㊒
	iCumate レンチウイルスベクター	K017	1 µg	¥ 88,000	㊒
	レンチウイルス	K003	200 µℓ	¥ 88,000	凍
	アデノウイルス	K004	250 µℓ	¥ 88,000	凍
SaCas9ヌクレアーゼ	AAVベクター	K207	10 µg	¥ 45,000	㊒
	AAV　セロタイプ1	K208	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ2	K209	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ3	K210	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ4	K211	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ5	K212	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ6	K213	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ7	K214	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ8	K215	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ9	K216	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ10	K217	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
	AAV　セロタイプ11	K218	2×250 µℓ	¥ 104,000	凍
ニッカーゼ改変型Cas9	レンチウイルスベクター	K005	10 µg	¥ 25,000	㊒
	レンチウイルス	K006	200 µℓ	¥ 88,000	凍
	アデノウイルス	K007	250 µℓ	¥ 88,000	凍

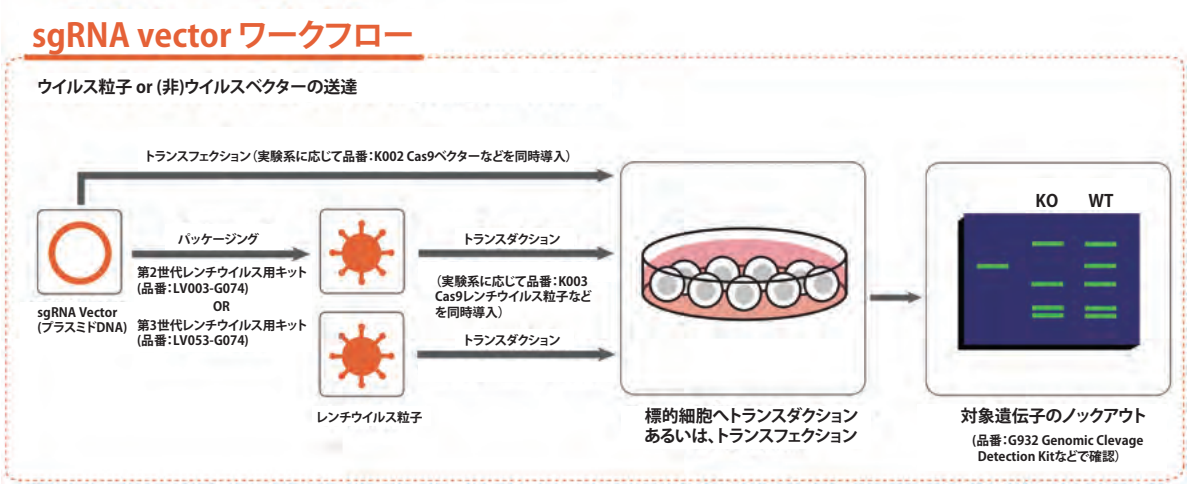
SpCas9タンパク質（58ページ）、SaCas9タンパク質（59ページ）、Cas9安定発現株（21ページ）もご提供しています。

■ゲノムワイドsgRNA（単鎖ガイドRNA）コレクション

CRISPR/Cas9システムを利用することで、非常に特異的なゲノム編集が可能になります。標的特異的なsgRNAに先導され、Cas9ヌクレアーゼがゲノムの二本鎖を巻き戻し、sgRNAによって標的配列を認識して両鎖を切断します。これにより生ずる二重鎖切断は非相同末端結合（NHEJ）経路により修復され、標的遺伝子の翻訳領域が崩壊します。Applied Biological Materials社は、すぐに実験にご利用いただけるヒト、マウス、およびラット遺伝子を標的とするゲノムワイドCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーを開発しました。

従来のレンチウイルスプラスミド、レンチウイルス粒子、アデノウイルス粒子に加え、非ウイルスベクター、AAVプラスミド、AAV粒子（セロタイプ1～11）を提供しており、SpCas9利用タイプ、SaCas9利用タイプ、ニッカーゼ利用タイプのフルラインアップを取りそろえています。1種類ずつのコンストラクト、または3種のセットでご提供していますので、実験条件にあわせてお選びください。個別使用、あるいは複数をプールして使用するなど、実験系に適した遺伝子ノックアウト実験を行っていただけます。

sgRNAアデノウイルスは、特に導入困難な細胞腫を始めとした幅広い標的細胞において、非組込み型かつ高い効率でのゲノム編集に適しています。



野生型Cas9ヌクレアーゼsgRNAコレクション

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

商品タイプ	品名	製品種	包装	希望販売価格
セパレート型 *Cas9ベクターまたはウイルス粒子、Cas9安定発現細胞株と組み合わせてご使用ください	各sgRNA	レンチウイルスベクター	1 μg	¥ 25,000
		AAVベクター（saCas9）	1 μg	¥ 40,000
		AAVベクター（spCas9）	1 μg	¥ 40,000
		レンチウイルス粒子	300 μℓ	¥ 118,000
		AAVウイルス粒子（saCas9）	5×200 μℓ	¥ 159,000
		AAVウイルス粒子（spCas9）	5×200 μℓ	¥ 159,000
		アデノウイルス粒子	250 μℓ	¥ 207,000
	3種のsgRNAセット	レンチウイルスベクター	3×1 μg	¥ 70,000
		レンチウイルス	3×300 μℓ	¥ 266,000
All-in-One型	各sgRNA	レンチウイルスベクター	1 μg	¥ 25,000
		レンチウイルス	300 μℓ	¥ 147,000
		AAVベクター（saCas9）	1 μg	¥ 55,000
		AAVウイルス粒子（saCas9）	5×200 μℓ	¥ 177,000
		非ウイルスベクター	1 μg	¥ 35,000
	3種のsgRNAセット	レンチウイルスベクター	3×1 μg	¥ 73,000
		レンチウイルス	3×300 μℓ	¥ 350,000
		非ウイルスベクター	3×1 μg	¥ 97,000

ニッカーゼ（改変型Cas9）sgRNAコレクション

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

商品タイプ	品名	製品種	包装	希望販売価格
セパレート型 *ニッカーゼ改変型Cas9ベクターまたはウイルス粒子と組み合わせてご使用ください	各sgRNA	レンチウイルスベクター	1 μg/pair	¥ 51,000
		レンチウイルス	300 μℓ /pair	¥ 235,000
		アデノウイルス	250 μℓ /pair	ご照会
	3種のsgRNAセット	レンチウイルスベクター	3×1 μg/pair	¥ 140,000
		レンチウイルス	3×300 μℓ /pair	ご照会

※ベクターマップは WEB 記事ID：13443をご参照ください。

■ガイドRNAの検索方法

1 https://www.abmgood.com/ にアクセス

2 CRISPR sgRNA Libraries のバナーをクリック

3 検索窓にご希望の遺伝子名を入力し、APPLICATION で「Knockout」を選択

4 ご希望のベクターあるいはウイルスタイプ、生物種、Cas9 種別、プロモーター、マーカーを選択

5 商品情報が表示されます。表示された品番をご利用の代理店へお伝えください。

■コントロール

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

商品タイプ	品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
セパレート型 *Cas9ベクターまたはウイルス粒子、Cas9安定発現細胞株と組み合わせてご使用ください	Scrambled sgRNA CRISPR Lentivector	K018	1 μg	¥ 25,000	㊒
	Scrambled sgRNA CRISPR Lentivirus	K019	300 μℓ	¥ 115,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV vector (for spCas9)	K050	1 μg	¥ 40,000	㊒
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 1)	K051	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 2)	K052	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 3)	K053	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 4)	K054	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 5)	K055	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 6)	K056	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 7)	K057	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 8)	K058	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 9)	K059	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 10)	K080	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for spCas9) (Serotype 11)	K083	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV vector (for saCas9)	K060	1 μg	¥ 40,000	㊒
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 1)	K061	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 2)	K062	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 3)	K063	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 4)	K064	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 5)	K065	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 6)	K066	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 7)	K067	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 8)	K068	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 9)	K069	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 10)	K081	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA AAV Virus (for saCas9) (Serotype 11)	K084	5×200 μℓ	¥ 159,000	凍
All-in-One型	Scrambled sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One Lentivector	K010	1 μg	¥ 25,000	㊒
	Scrambled sgRNA CRISPR/Cas9 All-in-One Lentivirus	K011	300 μℓ	¥ 115,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV vector (with saCas9)	K070	1 μg	¥ 40,000	㊒
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 1)	K071	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 2)	K072	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 3)	K073	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 4)	K074	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 5)	K075	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 6)	K076	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 7)	K077	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 8)	K078	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 9)	K079	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 10)	K082	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍
	CRISPR Scrambled sgRNA All-in-one AAV Virus (with saCas9) (Serotype 11)	K085	5×200 μℓ	¥ 177,000	凍

■【関連商品】第三世代レンチウイルスパッケージングシステム

商品の詳細は WEB 記事ID：6808をご参照ください。

■【関連商品】AAVパッケージングミックス

商品の詳細は WEB 記事ID：16668をご参照ください。

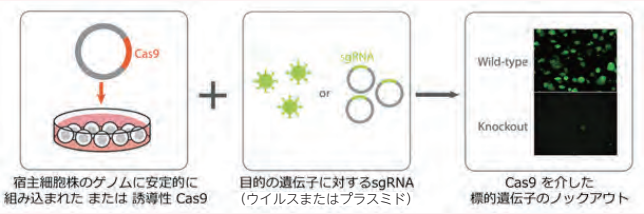
■【関連商品】SpCas9安定発現細胞株

CRISPR/Cas9 安定発現の腫瘍モデル細胞株

Ready-to-useの恒常発現および誘導性SpCas9安定発現細胞株です。PAM配列は、5´-NGG-3´です。Applied Biological Materials社では、ヒトやマウス、ラットの遺伝子に対するCRISPRを介した遺伝子ノックアウト/ノックインのための一般的な腫瘍モデル細胞株を数多く取り揃えています。

❗ご購入頂く際に、「Material Transfer Agreement（MTA）」を締結する必要がございます。WEB 記事ID：18358からダウンロードください。

特長



恒常的Cas9安定発現細胞株	Cumate誘導性Cas9安定発現細胞株
Cas9を恒常的に発現	Cumate誘導により発現量を調整する
Cas9の発現誘導の必要なし	Cas9発現を厳密かつ一時的に制御する
Cas9発現細胞株の利点	
目的遺伝子に対する sgRNA※を使用するだけ	
プリメイド安定細胞株として利用可能	
遺伝子編集効率を比較するためのコントロール細胞としての使用	

●恒常的SpCas9安定発現細胞株

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	細胞数	希望販売価格	貯蔵
SpCas9 Expressing 293T Cell Line for commercial user	T3251	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing 293T Cell Line for academic user	T3251-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing 293 Cell Line for commercial user	T3252	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing 293 Cell Line for academic user	T3252-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing A549 Cell Line for commercial user	T3253	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing A549 Cell Line for academic user	T3253-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing HeLa Cell Line for commercial user	T3254	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing HeLa Cell Line for academic user	T3254-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing HepG2 Cell Line for commercial user	T3256	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing HepG2 Cell Line for academic user	T3256-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing MCF7 Cell Line for commercial user	T3257	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing MCF7 Cell Line for academic user	T3257-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing K562 Cell Line for commercial user	T3258	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing K562 Cell Line for academic user	T3258-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing U-87 MG Cell Line for commercial user	T3259	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing U-87 MG Cell Line for academic user	T3259-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing HT1080 Cell Line for commercial user	T3260	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing HT1080 Cell Line for academic user	T3260-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing Jurkat Cell Line for commercial user	T3261	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing Jurkat Cell Line for academic user	T3261-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing A375 Cell Line for commercial user	T3262	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing A375 Cell Line for academic user	T3262-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing HCT116 Cell Line for commercial user	T3263	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing HCT116 Cell Line for academic user	T3263-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing HL-60 Cell Line for commercial user	T3264	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing HL-60 Cell Line for academic user	T3264-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing RL95-2 Cell line for commercial user	T3265	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing RL95-2 Cell line for academic user	T3265-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing SKUT-1 Cell line for commercial user	T3266	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing SKUT-1 Cell line for academic user	T3266-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing SNU-387 Cell Line for commercial user	T3267	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing SNU-387 Cell Line for academic user	T3267-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing Ovcar3 Cell Line for commercial user	T3268	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing Ovcar3 Cell Line for academic user	T3268-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing Ehanced Hepatocytes for commercial user	T3269	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing Ehanced Hepatocytes for academic user	T3269-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing T24 Cell line for commercial user	T3270	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing T24 Cell line for academic user	T3270-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing INS1E Cell line for commercial user	T3289	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing INS1E Cell line for academic user	T3289-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing RCS Cell Line for commercial user	T3290	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing RCS Cell Line for academic user	T3290-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing Immortalized Skeletal Muscle Cell Line for commercial user	T3450	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing Immortalized Skeletal Muscle Cell Line for academic user	T3450-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒
SpCas9 Expressing Immortalized Microglia -SV40 Cell Line for commercial user	T3451	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
SpCas9 Expressing Immortalized Microglia -SV40 Cell Line for academic user	T3451-A	1×10⁶ cells/mℓ	￥211,000	液窒

【ご注意】
上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規則に則し、適切にお取扱いください。

●Cumate誘導性SpCas9安定発現細胞株

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	細胞数	希望販売価格	貯蔵
Inducible SpCas9 Expressing 293T Cell Line for commercial user	T3351	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing 293T Cell Line for academic user	T3351-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing 293 Cell Line for commercial user	T3352	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing 293 Cell Line for academic user	T3352-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing A549 Cell Line for commercial user	T3353	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing A549 Cell Line for academic user	T3353-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing HeLa Cell Line for commercial user	T3354	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing HeLa Cell Line for academic user	T3354-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing HepG2 Cell Line for commercial user	T3356	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing HepG2 Cell Line for academic user	T3356-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing MCF7 Cell Line for commercial user	T3357	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing MCF7 Cell Line for academic user	T3357-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing K562 Cell Line for commercial user	T3358	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing K562 Cell Line for academic user	T3358-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing U-87 MG Cell Line for commercial user	T3359	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing U-87 MG Cell Line for academic user	T3359-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒
Inducible SpCas9 Expressing HT1080 Cell Line for commercial user	T3360	1×10⁶ cells/mℓ	ご照会	液窒
Inducible SpCas9 Expressing HT1080 Cell Line for academic user	T3360-A	1×10⁶ cells/mℓ	¥ 264,000	液窒

【ご注意】
上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。
ご使用に際しては、規則に則し、適切にお取扱いください。

Santa Cruz社

CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ツール

WEBへどうぞ
記事ID:14017

ノックアウトプラスミド、HDRプラスミド、Creベクターでゲノム編集をトータルサポート

FAQあります

Santa Cruz社では、標的遺伝子ノックアウト用プラスミド、オフターゲット作用を低減するダブルニッカーゼプラスミド、ノックアウトプラスミドとの同時トランスフェクションにご利用頂ける、RFP/ピューロマイシンノックイン用のHDRプラスミドなど、CRISPR/Cas9技術によるゲノム編集ツールをゲノムワイドにご用意しております。

背景－CRISPR/Cas9システムとは

CRISPR/Cas9システムは、古細菌や細菌の外来性遺伝物質に対する適応型免疫防御機序です。これらの微生物では、バクテリオファージ由来の外来性遺伝物質は獲得性であり、CRISPR座位に組み込まれます[1、2]。スペーサーと呼ばれるこの新規物質は、将来的なバクテリオファージ感染耐性に利用される配列特異的断片を生成します。これらの配列特異的断片は短鎖CRISPR RNA（crRNA）として翻訳され、CRISPR座位にコードされたCRISPR関連（Cas）タンパク質のヌクレアーゼ活性を介して相補配列をもつ侵入DNA断片を方向づけるガイドとして機能します[1、2]。II型CRISPRシステムのCas9ヌクレアーゼはRNA結合ドメイン、αヘリックス認識ローブ（REC）、RuvCドメインとHNHドメインを含むヌクレアーゼローブ、およびプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）相互作用部位を有します[1、2]。crRNAはRECローブ内の架橋ヘリックスに結合してCas9ヌクレアーゼと複合体を形成し、crRNA骨格をもつ複数の塩橋を形成します[1、2、3]。

crRNAがCas9に結合するとCas9ヌクレアーゼの立体構造が変化し、DNA結合用のチャネルが作られます[1、2、3]。Cas9/crRNA複合体はDNA上を走査してPAM（5'-NGG）部位を探し[4、5、6]、これを認識するとDNAの巻き戻しが誘導され、crRNAがPAM部位に隣接した相補鎖DNAを調べます。Cas9がcrRNAに相補なDNA配列に隣接したPAM部位に結合すると、RECローブ内の架橋ヘリックスにより標的DNAとともにRNA-DNAヘテロ二重鎖が形成されます[3、4、7]。PAM部位認識には核酸分解性HNHドメインやRuvCドメインの活性化が関与し、これにより標的DNAに二本鎖切断（DSB）が生じてDNA崩壊へと誘導します[1、2、5、8]。もし、crRNAが相補的でない場合、Cas9が放出され他のPAM部位を検索します[7]。DNA内の標的ゲノム鎖切断は非相同末端結合（NHEJ）修復経路により修復されますが、修復の際のエラーにより挿入や欠失が生じます。あるいは、相同組換え（HDR）経路を介して修復されますが、この場合、ゲノム内の特異的部位への特定マーカー組み換えに利用することができます[2、9、10]。このCRISPR/Cas9メカニズムは、哺乳動物細胞を含む種々のシステムにおいて、応用が期待されています。

二本鎖切断によるゲノム編集は、DNA配列を認識するメガヌクレアーゼ、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）、TALENにより遂行されますが、これらの方法には各々の制限があります。メガヌクレアーゼを使用する場合、ヌクレアーゼとDNA間の部位特異的認識を明瞭に示すことが困難であり[2]、ZFNやTALENでは3塩基未満のDNA配列を設計し、認識することが困難であることが判明しています[2]。crRNA様に作用するガイドRNA（sgRNA）は簡単にデザインすることができ、Cas9ヌクレアーゼとともに発現させることで、特定のDNA/部位を標的としたゲノム編集を遂行することができます。CRISPR/Cas9システムはshRNAやsiRNAに比べて感度が高く、スクリーニング目的ではより高い効果が得られます。

■CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミド

- 20μg包装：最大20回のトランスフェクションが可能
- 3種のgRNAをプール：CRISPR/Cas9ノックアウト（KO）プラスミドは、最大のノックアウト効率が得られるようデザインされた、Cas9ヌクレアーゼと標的特異的20塩基を含むガイドRNA（gRNA）をコードする3種のプラスミドのプール
- 優れたgRNA配列：gRNA配列はGeCKO（v2）ライブラリー由来であり、Cas9タンパク質を配向してゲノムDNAに部位特異的二本鎖切断を誘発する[11]。
- ヒトおよびマウス遺伝子を網羅
- Ready-to-use：トランスフェクションに直ちに利用できる精製済プラスミドDNAをご提供

❗本製品はHDRプラスミドと組み合わせてご使用いただけます。

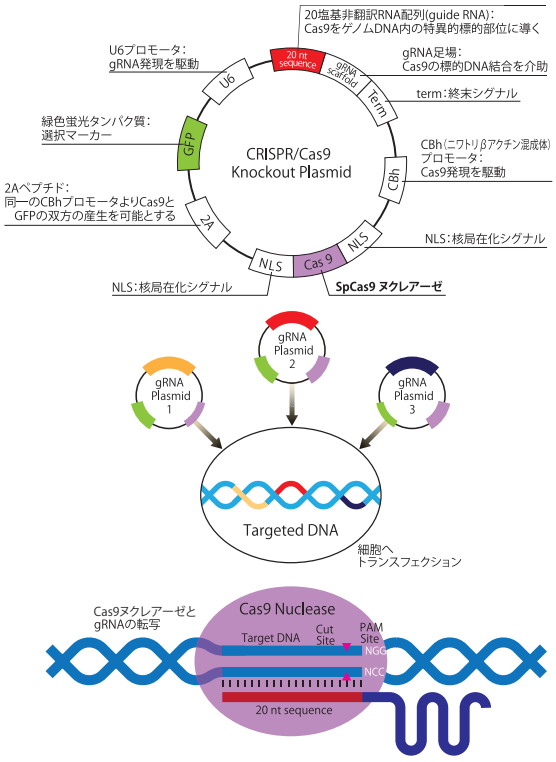


図1

- **希望販売価格（CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミド）：72,000円**
  検索方法は本記事の最後で案内しています。

■ダブルニッカーゼプラスミド

CRISPR/Cas9システムを用いたゲノムDNAの二本鎖切断は、その効率が非常に高いことが最大の利点です。しかしながら、オフターゲット作用により切断特異性が低減する可能性もあります。オフターゲット作用、および標的特異性はダブルニッキング法（ダブルニッカーゼシステム）を利用することで改善することができます。

この場合、ニッカーゼ（改変型Cas9、Cas9n）をそれぞれコードする一対のプラスミド（図2参照）を利用し、標的特異的gRNAによってそれぞれの特異的ゲノム部位を標的します[12]。各Cas9n/sgRNA複合体は、gRNAと相補するDNA鎖に1つだけニックを作ります[12]。それぞれのgRNA（sgRNAs）ペアは約20塩基程度ずれており、標的DNAの相補鎖に位置する標的配列のみを認識します。Cas9n/gRNA複合体ペアによって作られた2つのニックはDSB（DNA二本鎖切断）を模倣する状態になります[12]。したがって、一対のgRNAを利用することで高レベルの効率を維持しつつ、CRISPR/Cas9編集の特異性を改善することができます[12]。

- 20μg包装：最大20回のトランスフェクションが可能
- ニッカーゼ（Cas9 D10A変異体）と標的特異的20塩基を含むgRNAをコードした一対のプラスミド
- 同一遺伝子を標的するCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミド商品に比べてより特異性が高い標的遺伝子ノックアウトが可能なデザイン
- 一対のgRNAは約20塩基ずらして設計されており、DNA二本鎖切断を模倣したダブルニッキングを生じる
- 一方のプラスミドには選択用にピューロマイシン耐性遺伝子を搭載、他方にはトランスフェクション効率の確認用にGFPを搭載
- ヒトおよびマウス遺伝子を網羅
- Ready-to-use：トランスフェクションに直ちに利用できる精製済プラスミドDNAをご提供

❗本製品はHDRプラスミドと組み合わせて使用することができません。HDRプラスミドはKOプラスミド（野生型Cas9）用にデザインされています。

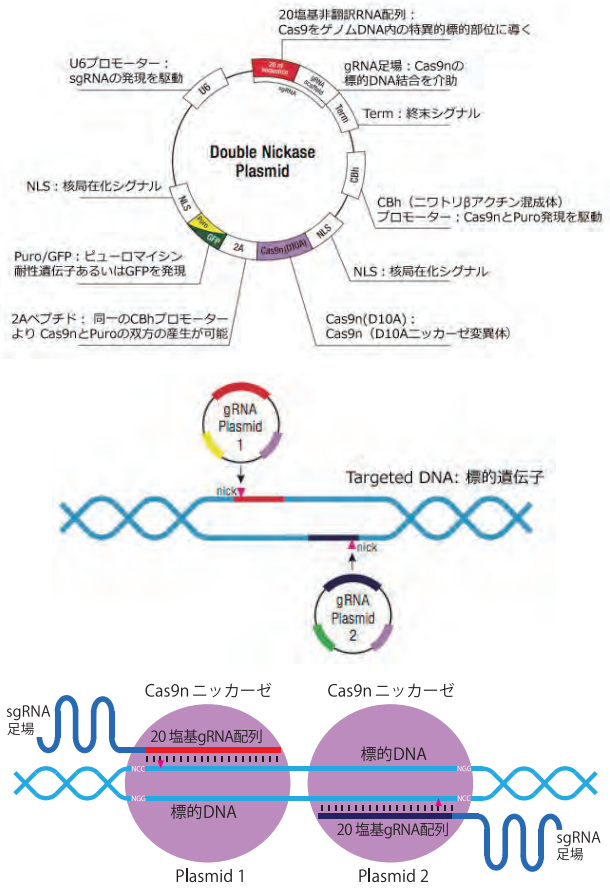


図2

● **希望販売価格（ダブルニッカーゼプラスミド）：74,000円**
検索方法は本記事の最後で案内しています。

Santa Cruz Biotechnology, Inc.【メーカー略号：SCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Control Double Nickase Plasmid	SC-437281	20 µg	￥16,000	㊒

良いコウタイがー
あっタイガ〜！

抗体百科
コスモ・バイオの抗体百科に Go！ www.cosmobio.co.jp

■探しま章 Web 検索データベース
100 万品目以上の品ぞろえ、主要な
約 12,000 ターゲットの抗体を国内に在庫。

■作りま章 抗体作製受託サービス
お客様とのコミュニケーションを大切にし、
高い技術力であらゆるニーズに対応。

■HDRプラスミド

HDRプラスミドは、CRISPR/Cas9により二本鎖切断が生じた部位に、相同組換えを利用してセレクションカセットを挿入するためのテンプレートです。

CRISPR/Cas9ノックアウト（KO）プラスミドと共に細胞に導入すると、HDRプラスミドはgRNA/Cas9によってDNA切断が生じた部位に細胞選択用ピューロマイシン耐性遺伝子とRFPを組み込みます。

❗HDRプラスミドはKOプラスミド（野生型Cas9ヌクレアーゼ）用にデザインされており、ダブルニッカーゼプラスミドと組み合わせた使用はできません。

- 20µg包装：最大20回のトランスフェクションが可能
- 各HDRテンプレートは、対応するKOプラスミドの二本鎖切断部位周辺のゲノムDNAに特異的結合するよう設計された2つの相同性アーム（800 bp）を含む
- セレクションカセットとして、ピューロマイシン耐性遺伝子およびRFDを含む
- 各ピューロマイシン耐性遺伝子には2つのLoxP部位が隣接し、Creベクターを用いた更なる処理が可能
- 各HDRプラスミドはRFPによりトランスフェクションの視認が可能
- Ready-to-use：トランスフェクションに直ちに利用できる精製済プラスミドDNAをご提供

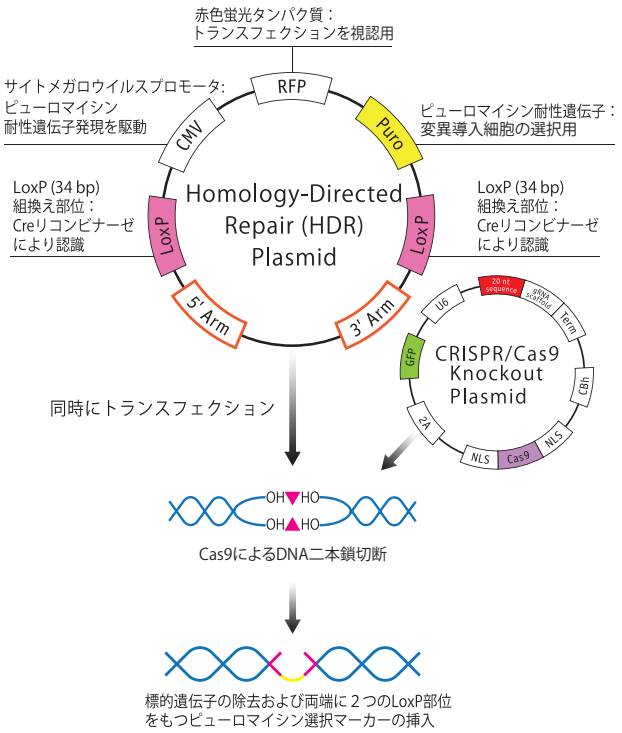


図3

- **希望販売価格（HDRプラスミド）：80,000円**
  検索方法は本記事の最後で案内しています。

■Cre vector

Creベクターは、2つのLoxP部位間の部位特異的DNA組換えを触媒するバクテリオファージp1酵素であるCreリコンビナーゼを発現します。CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドとHDRプラスミドを共トランスフェクションした場合、相同組換え（HDR）の際に挿入された選択マーカーを利用して編集されたDNAをもつ細胞を選択することができます。その後、選択細胞にCreベクターをトランスフェクションし、相同組換えの際に挿入されたピューロマイシン耐性遺伝子やRFPを含むセレクションカセットを切除することができます。

- 20µg包装：最大20回のトランスフェクションが可能
- 細胞ゲノムに組込まれたセレクションカセットを除去可能
- CMVプロモーターによりCreリコンビナーゼを発現
- Ready-to-use：トランスフェクションに直ちに利用できる精製済みプラスミドDNAをご提供

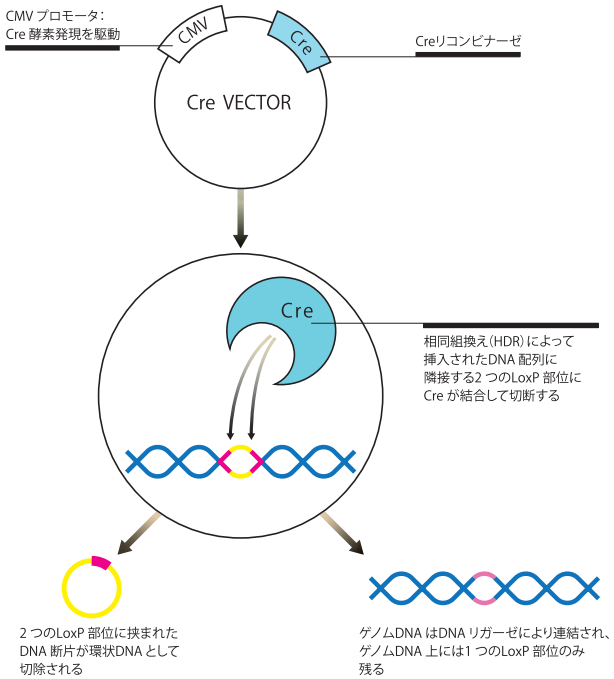
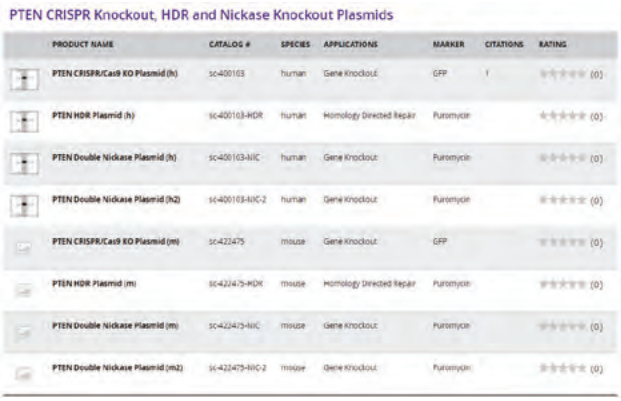


図4

Santa Cruz Biotechnology, Inc.【メーカー略号：SCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cre Vector	SC-418923	20 µg	￥ 15,000	㊐

■CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミド、ダブルニッカーゼプラスミド、HDRプラスミド商品検索方法

1	SantaCruz社WEBサイト（https://www.scbt.com/scbt/home?&_requestid=3583553）へアクセスし、検索ウィンドウに遺伝子名を入力してください。	
2	検索結果のカテゴリーから「CRISPR plasmids」をご選択ください。	
3	ご希望のプラスミド（ノックアウトプラスミド、HDRプラスミド、ニッカーゼプラスミド）をご選択ください。	

■関連製品

Santa Cruz Biotechnology, Inc.【メーカー略号:SCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Control CRISPR/Cas9 Plasmid	SC-418922	20 µg	¥ 16,000	㊎
UltraCruz® Transfection Reagent	SC-395739	0.2 ml	¥ 19,000	㊐
Plasmid Transfection Medium	SC-108062	20 ml	¥ 1,000	㊐
Puromycin dihydrochloride	SC-108071	25 mg	¥ 6,000	㊎

参考文献リスト

1. Van der Oost J., *et al*. 2014. Unraveling the Structural and Mechanistic Basis of CRISPR/Cas Systems. *Nat. Rev. Microbiol*. (7):479-92. PMID 24909109.
2. Hsu, P., *et al*. 2014. Development and Applications of CRISPR/Cas9 for Genome Editing. *Cell*. 157(6):1262-78. PMID 24906146.
3. Nishimasu, H., *et al*. 2014. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 156(5):935-49. PMID 24529477.
4. Deltcheva, E., *et al*. 2011. CRISPR RNA Maturation by Trans-Encoded Small RNA and Host Factor RNASE III. *Nature*. 471: 602-607. PMID 21455174.
5. Jinek, M., *et al*. 2012. A Programmable Dual-RNA Guided DNA Endonuclease in Adaptive Immunity. *Science*. 337(6096):816-21. PMID 22745249.
6. Deveau, H., *et al*. 2010. CRISPR/Cas System and its Role in Phage-Bacteria Interaction. *Annu. Rev. Microbiol*. 64: 475-493. PMID 20528693.
7. Sternberger, SH., *et al*. 2014. DNA Interrogation by the CRISPR RNA-guided Endonuclease Cas9. *Nature*. 507(7490):62-7. PMID 24476820.
8. Gasuinas, G., *et al*. 2012. Cas9-crRNA Ribonucleoprotein Complex Mediates Specific DNA Cleavage for Adaptive Immunity in Bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 109(39):E2579-86. PMID 22949671.
9. Mali, P., *et al*. 2013. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. *Science*. 339 (6121): 823-6. PMID 23287722.
10. Ran, FA., *et al*. 2013. Genome engineering using the CRISPR/Cas9 system. *Nat. Protoc*. (11): 2281-308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. PMID 24157548.
11. Shalem O., *et al*. 2014. Genome-scale CRISPR/Cas9 Knockout Screening in Human Cells. 343(6166):84-7. PMID 24336571.
12. Ran, F.A., *et al*. 2013. Double nicking by RNA-guided CRISPR/Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154: 1380-1389.

GeneCopoeia社

CRISPR/Cas9 ノックアウトシステム

WEBへどうぞ
記事ID:15479

構築済sgRNAコンストラクト、構築済HDRドナーコンストラクトをゲノムワイドにご提供！

FAQあります

GeneCopoeia社では、sgRNA（gRNA、ガイドRNA）コンストラクトおよび相同組換えを利用したドナークローンについて、ヒト・マウス・ラットをゲノムワイドに網羅した商品をご提供しております。

sgRNAコンストラクトは、プラスミド、レンチウイルスプラスミド、レンチウイルス粒子の3種の形態をご用意しており、野生型Cas9あるいはニッカーゼ/改変型Cas9と組み合わせて使用するセパレートタイプと、野生型Cas9とsgRNAとを1つのベクターで同時に発現するAll-in-oneタイプのプラスミドよりお選びいただけます。

相同組換え機構を利用したノックアウトアプリケーションに、sgRNAコンストラクトおよびCas9あるいはニッカーゼ/改変型Cas9と組合せてご利用いただけるドナークローンは、GFPや薬剤耐性遺伝子をDNA二本鎖切断位置にノックインします。13種類のベクター骨格よりお好みの商品をお選びいただけます。

Cas9は、野生型およびニッカーゼ/改変型Cas9をご用意しており、プラスミド、レンチウイルスプラスミド、レンチウイルス粒子（野生型Cas9のみ）よりご選択いただくことができ、CRISPR/Cas9を利用したノックアウト実験をトータルサポートします。

背景

CRISPR/Cas9システムは、ウイルスやトランスポゾンの侵入を防御するために細菌や古細菌において進化した適応免疫です。近年、CRISPR/Cas9システムによりゼブラフィッシュ、マウス、ラット、線虫、植物および細菌といった多数の生物種において、高い効率でゲノム編集ができることが実証されました。いくつかの研究グループにより、細胞やゼブラフィッシュにおいてはジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）やTALENに比べ、CRISPR/Cas9システムの方が同等またはより高い遺伝子標的効果をもつことが示されています。

II型CRISPRシステムでは、tracrRNAにアニールしたCRISPR RNA（crRNA）複合体のみで、十分にCas9エンドヌクレアーゼを特異的ゲノム配列へと先導し、標的DNAに二本鎖切断を誘導します。そのため、crRNAとtracrRNA配列を融合し合成キメラガイドRNA（sgRNA）を産生させることで、本システムを簡易化することもできます。標的配列はcrRNAやキメラsgRNAに対して相補的な20塩基のDNA配列と、これに続く3塩基（5'-NGG-3'）のPAM（プロトスペーサー隣接モチーフ）配列からなり、これはCas9自身による認識と切断に必須な配列です。CRISPR/Cas9のRNAに先導されたDNA認識機構は、選択的ゲノム工学においてシンプルでありながら強力なツールとなり得ます。CRISPR/Cas9システムにおいて、重要な利点のひとつにCas9タンパク質がそれぞれのgRNAにより先導されつつ、ゲノム上の複数の標的部位を同時に修正できることが挙げられます。

特長

- 構築済sgRNAと構築済HDRドナーコンストラクト
- ヒト、マウス、ラット遺伝子を網羅
- プラスミド、レンチウイルスプラスミド、レンチウイルス粒子をご用意
- 野生型Cas9、ニッカーゼ/改変型Cas9から選択可能
- セパレート型、All-in-One型から選択可能

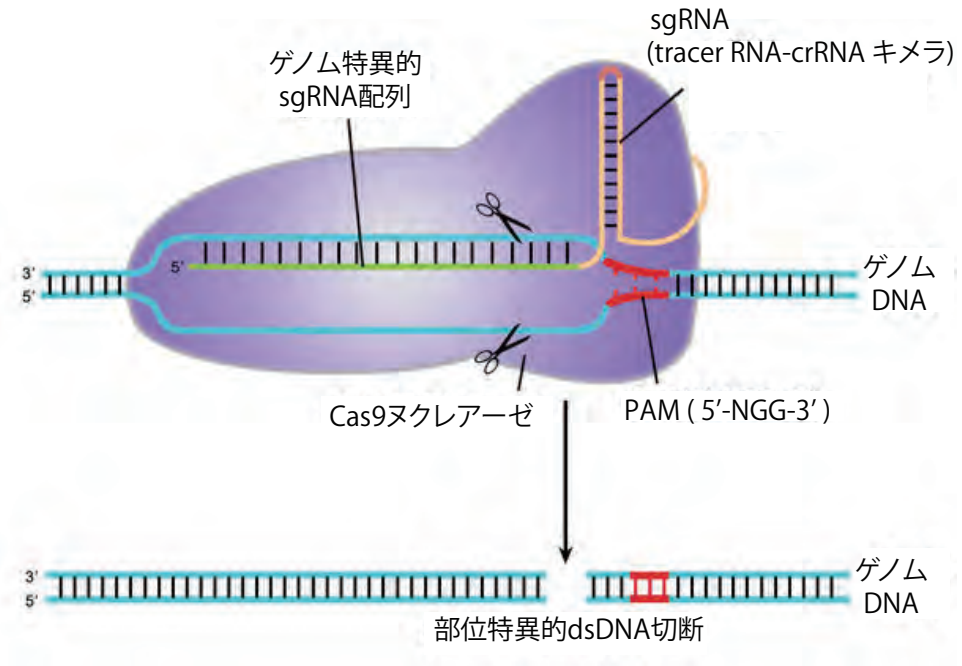


図1　CRISPR/Cas9によるゲノム編集の模式図

野生型Cas9とニッカーゼ/改変型Cas9

Cas9クローンは、野生型Cas9ヌクレアーゼ（化膿レンサ球菌）を発現します。ニッカーゼ/改変型Cas9クローンは第10位のアミノ酸をアスパラギン酸からアラニンへと置換（D10A）させたCas9変異体を発現します。Cas9ヌクレアーゼはガイドRNA（sgRNA）とともに、直後にN-G-Gプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM）をもつ20塩基標的部位において部位特異的二本鎖切断を誘導します。DSB（DNA二本鎖切断）は、フレームシフト変異につながる非相同性末端結合（NHEJ）、あるいは、修復テンプレート存在下では相同組換え（HR、HDR）により修復されます。CRISPR/Cas9技術は、DNA二本鎖切断を高頻度で誘導することから、数々の実験システムにおいて遺伝子ノックアウトや、点変異、レポーターや目的遺伝子のノックインに利用されています。Cas9 D10Aニッカーゼは野生型Cas9と同様の認識システムを利用しますが、こちらは通常NHEJや相同組換えにより修復されない一本鎖の「ニック」のみを生じる点が異なります。2種のsgRNAが正しい方向性をもって、期待する部位に隣接する両鎖をそれぞれ標的した場合、DNA二本鎖切断が生じてNHEJや相同組換えによる修復を受けることになります。

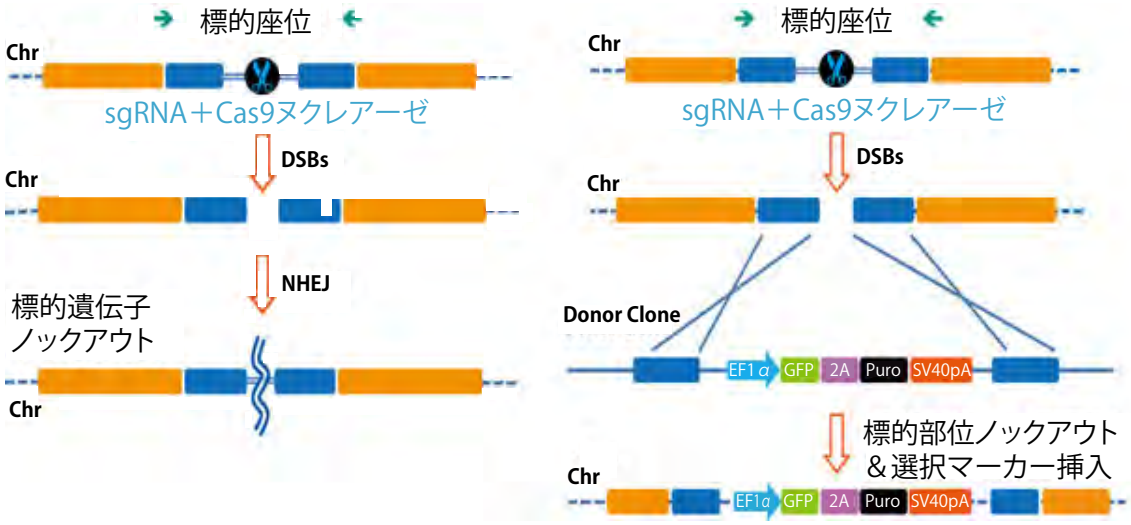


図2　CRISPR/Cas9による遺伝子工学
（左）NHEJ経路を介した標的遺伝子ノックアウト
（右）ドナーテンプレートを利用した相同組換えによる標的遺伝子ノックアウト

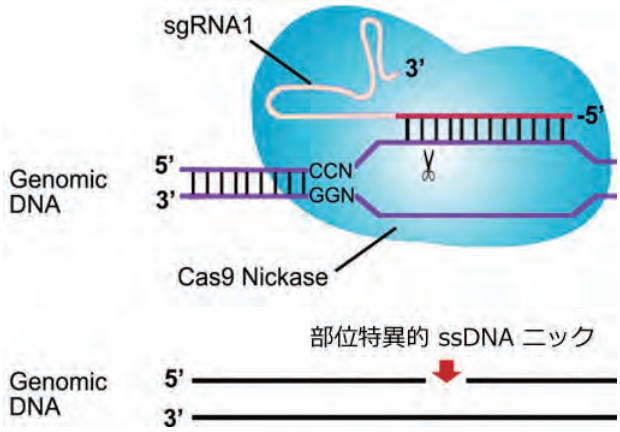


図3　結合したゲノムDNAに二本鎖切断を生ずる改変型Cas9/ニッカーゼの模式図

■野生型Cas9クローン、レンチウイルス粒子

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号:GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cas9 nuclease expression clone （CMV, mCherry / Neomycin）	CP-C9NU-01	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 nuclease lentiviral expression clone（CMV, Neomycin）	CP-LvC9NU-01	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 nuclease lentiviral expression clone（CMV, eGFP/Neomycin）	CP-LvC9NU-02	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 nuclease lentiviral expression clone（EF1a, Puromycin）	CP-LvC9NU-08	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 nuclease lentiviral expression clone（EF1a, eGFP/Neomycin）	CP-LvC9NU-09	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 nuclease lentiviral expression clone（EF1a, eGFP/Hygromycin）	CP-LvC9NU-10	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 Nuclease Purified Lentifect™ Lentiviral Particles（CMV, Neomycin）	LPP-CP-LvC9NU-01-100-C	100 µℓ	¥ 167,000	凍
Cas9 Nuclease Purified Lentifect™ Lentiviral Particles（CMV, eGFP/Neomycin）	LPP-CP-LvC9NU-02-100-C	100 µℓ	¥ 167,000	凍
Cas9 Nuclease Purified Lentifect™ Lentiviral Particles（EF1a, Puromycin）	LPP-CP-LvC9NU-08-100-C	100 µℓ	¥ 167,000	凍
Cas9 Nuclease Purified Lentifect™ Lentiviral Particles（EF1a, eGFP/Neomycin）	LPP-CP-LvC9NU-09-100-C	100 µℓ	¥ 167,000	凍
Cas9 Nuclease Purified Lentifect™ Lentiviral Particles（EF1a, eGFP/Hygromycin）	LPP-CP-LvC9NU-10-100-C	100 µℓ	¥ 167,000	凍

＊上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

■ニッカーゼ/改変型Cas9クローン

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号:GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cas9 D10A nickase expression clone（CBh）	CP-C9NI-01	1 clone	¥ 137,000	㊒
Cas9 D10A nickase expression clone（CMV, mCherry / Neomycin）	CP-C9NI-02	1 clone	¥ 137,000	㊒

構築済sgRNAと構築済HDRドナークローン

ヒト、マウス、ラット遺伝子を網羅した構築済sgRNAと構築済HDRドナークローンをご用意しています。

■構築済sgRNA

表1のベクターにsgRNAをクローニングしたコンストラクトを、ヒト、マウス、ラットの全遺伝子を網羅してご用意しています。

sgRNAクローンはcrRNAとtracrRNAからなる一本鎖キメラsgRNAを発現します。同時にトランスフェクションしたCas9ヌクレアーゼの存在下でsgRNAが標的DNA配列を認識し、Cas9ヌクレアーゼを先導してDNA二本鎖切断を誘導し、遺伝子ノックアウト、ノックイン、塩基置換などのゲノム編集を行います。複数のsgRNAクローンを構築してCas9クローンと同時にトランスフェクションし、ゲノム上の複数部位を同時に編集することも可能であり、より効果が高く自由度の高い実験デザインが可能です。

表1

	商品形態	gRNAプロモーター	選択マーカー	ベクター骨格
野生型Cas9対応	プラスミド	U6	Hygromycin	pCRISPR-SG01
	レンチウイルスプラスミド	U6	Puromycin / mCherry	pCRISPR-LvSG03
	レンチウイルス粒子	U6	Puromycin / mCherry	pCRISPR-LvSG03
ニッカーゼ/改変型Cas9対応	プラスミド	U6	Hygromycin	pCRISPR-SG01
野生型Cas9 (All-in-One)	プラスミド	U6	Neomycin / mCherry	pCRISPR-CG01
	プラスミド	U6	N/A	pCRISPR-CG02
	プラスミド	U6	Neomycin / copGFP	pCRISPR-CG04
	プラスミド	U6	copGFP	pCRISPR-CG07
	プラスミド	U6	mCherry	pCRISPR-CG08

※本製品はGCP社の野生型Cas9あるいはニッカーゼ/改変型Cas9と組み合わせてご使用いただけます。
ベクターマップは本商品も紹介するコスモ・バイオのWEBページ（WEB 記事ID：15479）からご覧になれます。

■構築済HDRドナークローン

表2のベクターに、標的遺伝子用sgRNAコンストラクトがDNA二本鎖切断を誘導した位置に合わせて設計したホモロジーアームと蛍光マーカーや薬剤耐性遺伝子などを載せたコンストラクトを、ヒト、マウス、ラットの全遺伝子を網羅してご用意しています。

商品リスト

表2

品番	プロモーター	レポーター遺伝子	選択マーカー	LoxPサイト	希望販売価格
pDonor-D01	EFa1	copGFP	Puromycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D02	CMV	copGFP	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D03	CMV	N/A	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D04	CMV	N/A	Puromycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D05	EFa1	N/A	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D07	EFa1	copGFP	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D08	CMV	copGFP	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D09	EFa1	N/A	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D10	CMV	N/A	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D11	PGK	copGFP	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D12	EFa1	copGFP	Hygromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D13	PGK	copGFP	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D14	PGK	N/A	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000

ベクターマップは本商品も紹介するコスモ・バイオのWEBページ（WEB 記事ID：15479）でご覧いただけます。

使用例

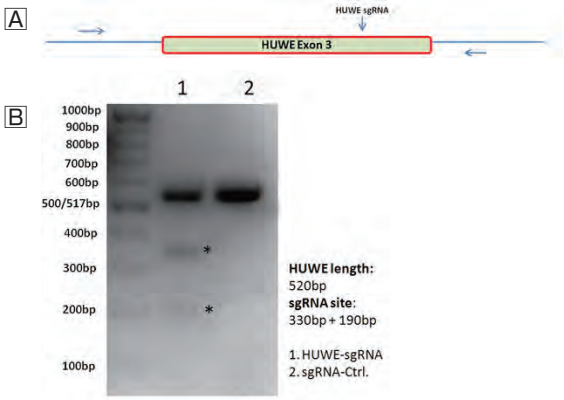


図4　HEK293T細胞を用いたHUWE I-sgRNA/Cas9によるHUWE遺伝子標的
（A）HUWE sgRNAとゲノムDNA PCRプライマーデザイン
（B）HEK293T細胞にHUWE sgRNAクローン（レーン1）とスクランブルsgRNA/Cas9コントロールクローン（レーン2）をトランスフェクションし、40時間後に細胞を回収した。ゲノムDNAを抽出後、HUWE特異的PCRプライマーでPCR増幅した。精製済みPCR産物をバッファーと混合後、変性と再アニーリングを行い、37℃で60分間T7エンドヌクレアーゼI（ENI）処理した。HUWE PCR産物サイズは520 bpであり、予想されるT7 ENI処理産物サイズは330 bpと190 bpである。

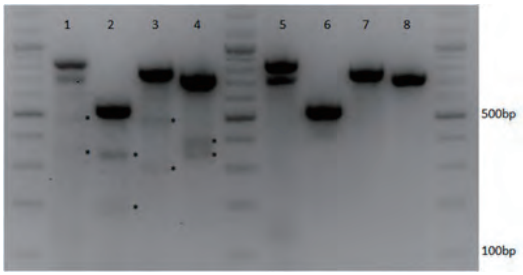
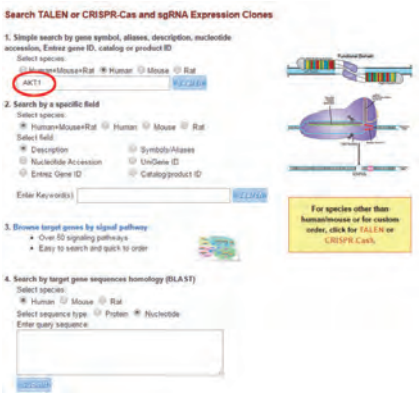


図5　複数遺伝子を標的としたCRISPR/Cas9マルチプレキシング
HEK293T GFP安定発現細胞にCas9発現プラスミドとp53、HUWE、NCL3およびGFPを標的とする複数のsgRNAs（レーン1～4）またはスクランブルsgRNA（レーン5～8）を同時にトランスフェクションした。ゲノムDNAを抽出し、複数の標的部位に挿入欠失が存在するかT7エンドヌクレアーゼI（ENI）アッセイを行って確認した。“*”はCas9と複数sgRNAsにより各標的部位に効率的に挿入欠失が導入されたことを示す（レーン1～4）。
PCR産物サイズとT7 ENI切断産物サイズ：GFP: 720 bp（未処理）、340 bp+380 bp（切断後）；NCL3: 765 bp（未処理）、295 bp+470 bp（切断後）；HUWE: 520 bp（未処理）、190 bp+330 bp（切断後）；P53: 825 bp（未処理）、475 bp+350 bp（切断後）。

■構築済sgRNAプラスミド、レンチウイルス粒子商品検索方法

1	GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9 sgRNA/HDR donor Expression Clone検索ページ（URL：www.genecopoeia.com/product/search/index.php?prt=26）にアクセス	
2	生物種を選択し、遺伝子名やアクセッション番号などを入力して検索	
3	検索結果よりご希望の遺伝子を選択	
4	クローンの詳細情報で遺伝子名やアクセッション番号をご確認いただき、ページ下方に表示される表の品番をご利用の代理店へお伝えいただき、お見積をご依頼ください。クローンごとに価格が異なります。	

■コントロール

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号:GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Scrambled sgRNA control for pCRISPR-CG01	CCPCTR01-SG01	10 μg	ご照会	㊒
	CCPCTR01-CG01	10 μg	￥ 48,000	㊒
Scrambled sgRNA control for pCRISPR-CG02	CCPCTR01-CG02	10 μg	ご照会	㊒
sgRNA Scrambled Control Lentiviral Particles*	LPPCCPCTR01L03-100	100 μℓ (25 μℓ×4 vial, 1×10⁸ TU/mℓ)	ご照会	凍

＊上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

ORIGENE Your Gene Company

OriGene社

CRISPR/Cas9ゲノム編集ノックアウトキット

WEBへどうぞ

記事ID:13159

CRISPR/Cas9 knockoutのパーフェクトキット

FAQあります

標的遺伝子に対応する2種のgRNAコンストラクト、選択マーカーノックイン用HDRプラスミド、コントロールがセットになった商品です。

背景

新しいゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9は、特異的なゲノム上の遺伝子破壊や塩基置換を可能にするフレキシブルかつシンプルなシステムで、高い標的特異性が特長です。

CRISPR/Cas9ゲノム編集システムには、Cas9タンパク質と、gRNAの共発現が必要です。導入されたgRNAとCas9タンパク質は複合体を形成します。3'末端にプロトスペーサー近接モチーフ（PAM-配列NGG）が存在すると、gRNA-Cas9複合体が標的部位に接近し、ゲノムDNAの二本鎖を切断します。

特長

- CRISPR/Cas9技術を用いた遺伝子ノックアウトのパーフェクトキット（標的部位はORFの5'末端周辺）
- gRNA及びCas9の両方を同時発現するAll-in-oneタイプの「pCasガイドシステム」（32ページ参照）により、効率的な切断が可能
- デザイン済みホモロジーアームを持つGFP/Puroノックイン用HDRドナープラスミドが付属
  選択マーカーとしてGFP/Puroをノックイン！
- ネガティブコントロールとしてpCas-Guide-scramble（品番：GE100003）が付属
- ヒト・マウス遺伝子を網羅

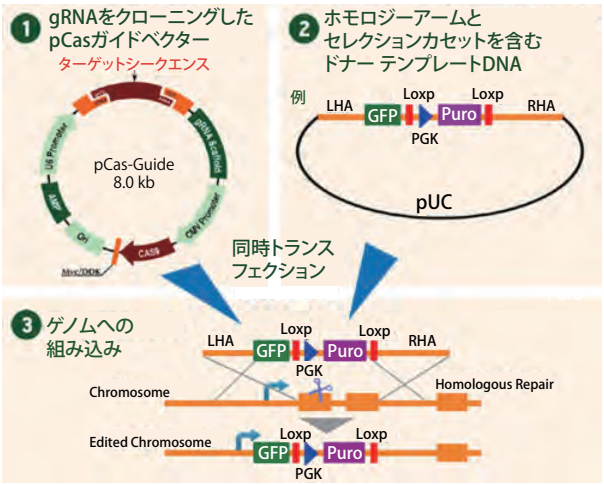
アプリケーション

- プロモーター活性研究用GFPレポーターをノックイン
- 染色体レベルでの遺伝子ノックアウト

構成内容

- 標的遺伝子特異的gRNA/Cas9発現ベクター1（pCas-Guide vector）
- 標的遺伝子特異的gRNA/Cas9発現ベクター2（pCas-Guide vector）
- HDRドナープラスミド（GFP/Puro選択マーカーノックイン用）
- スクランブルコントロールプラスミド（品番：GE100003）

CRISPRを用いたゲノム編集ノックアウトキット



商品検索方法

1	コスモ・バイオのトップページより「詳細検索」をクリックしてください。
2	メーカー略号に「ORG」、品番にKN*、キーワードにご希望の遺伝子名を入力し、検索してください。
3	検索結果が表示されますので、内容をご確認いただき品番を代理店様へご指定してご注文ください。

■関連商品

- Cas9ーゲノム編集用ガイドベクター（32ページ、WEB 記事ID：12003）

OriGene Your Gene Company
OriGene社

CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ベクター

WEBへどうぞ
記事ID:12003

All-in-Oneプラスミドベクター、セパレート型プラスミドベクター、
T7プラスミドベクター（*in vitro* トランスクリプション）、ニッカーゼ取りそろえてます！

FAQあります

背景－CRISPR/Cas9システム

ゲノム編集の最新ツールであるCRISPR/Cas9は、遺伝子ノックアウトや塩基置換を可能にするフレキシブルかつシンプルなシステムで、高い特異性と低毒性という特長を持ちます。CRISPR/Cas9ゲノム編集システムには、Cas9タンパク質と、ヒトU6ポリメラーゼIIIプロモーターで発現されたガイドRNAの共発現が必要になります。導入されたgRNAとCasタンパク質は複合体を形成します。3'末端にプロトスペーサー近接モチーフ（PAM-配列NGG）が存在すると、gRNA-Cas9複合体が標的部位に接近し、ゲノムDNAの両鎖を切断し、これを修復する機構を利用して標的遺伝子のノックアウトやノックインを可能とします。

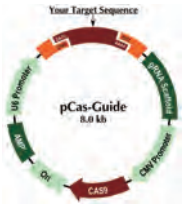
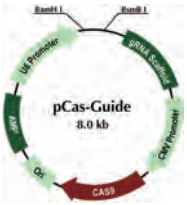
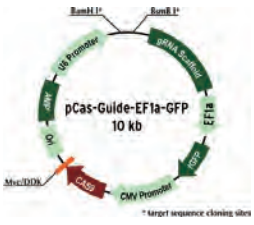
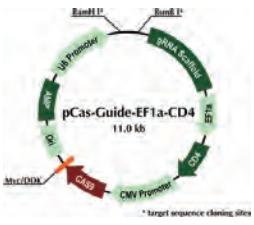
使用目的

本製品は、ゲノム編集用のgRNAをクローニングするベクターです。

gRNAとCas9を共発現するAll-in-oneタイプのベクターは、野生型のCas9を発現するスタンダードなプラスミドベクターのほか、GFP発現タイプ、CD4発現タイプ（導入細胞の濃縮用）、レンチウイルスベクターをご提供しています。また、*in vitro*トランスクリプション用プラスミドや、オフターゲット作用の低減に有用なニッカーゼ（改変型のCas9、Cas9 D10A、Nickase Cas9）を発現するプラスミドベクターも取り揃えています。標的遺伝子用のgRNAを組み込む部位は、リニア（線状化）タイプと制限酵素サイト（BamH I/BsmB I）タイプからお選びいただけます。

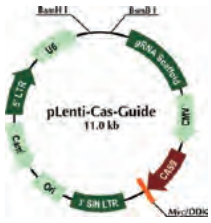
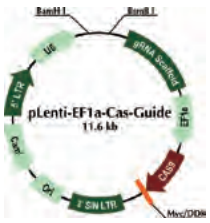
■CRISPR/Cas9 All-in-Oneプラスミドベクター（野生型Cas9）

標的遺伝子に対するsgRNAを野生型のCas9と共発現するAll-in-Oneタイプのプラスミドベクターです。
全てのベクターには、Myc-DDKタグがついています。

品番	特長	プロモーター（Cas9）	プロモーター（gRNA）	クローニングサイト	ベクターマップ
GE100001	スタートアップに最適*1	CMV	U6	CTAG突出/TTTT突出	
GE100002	スタートアップに最適*2	CMV	U6	BamH I/BsmB I	
GE100018	tGFP	CMV	U6	BamH I/BsmB I	
GE100022	CD4	CMV	U6	BamH I/BsmB I	

＊1　アニーリングバッファー（品番：GE100007）、CF3シークエンスプライマー（品番：GE100008）が含まれており、スタートアップに最適です。
＊2　CF3シークエンスプライマー（品番：GE100008）が含まれておりスタートアップに最適です。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

品番	特長	プロモーター（Cas9）	プロモーター（gRNA）	クローニングサイト	ベクターマップ
GE100009	HIV骨格	CMV	U6	線状化済	
GE100010	HIV骨格	CMV	U6	BamH I/BsmB I	
GE100045	HIV骨格	EF1α	U6	BamH I/ BsmB I	

OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Precut pCAS-Guide cloning kit, GE100007 and GE100008 included.	GE100001	1 kit（10 rxn）	¥ 120,000	㊦
pCAS-Guide vector (with Cas9 expression) for genomic target sequence cloning, GE100008 included.	GE100002	1 kit	¥ 137,000	㊦
pCas-Guide-EF1a-GFP vector (with Cas9 and GFP expression) for genomic target sequence cloning	GE100018	1 kit	¥ 137,000	㊦
pCas-Guide-EF1a-CD4 vector (with Cas9 and CD4 expression) for genomic target sequence cloning	GE100022	1 kit（10 µg）	¥ 137,000	㊦
Precut pLenti-Cas-Guide cloning kit, GE100007 and GE100008 included.	GE100009	1 kit（10 rxn）	¥ 120,000	㊦
pLenti-Cas-Guide vector (with Cas9 expression) for genomic target sequence cloning, GE100008 included.	GE100010	1 kit（10 µg）	¥ 137,000	㊦
pLenti-EF1a-Cas-Guide, (with EF1a-Cas9) for gRNA target sequence cloning	GE100045	10 µg	¥ 140,000	㊦
pCAS-Scramble, pCas-Guide vector with a scrambled sequence as a negative control	GE100003	10 µg	¥ 107,000	㊦
A scrambled sequence in pCas-Guide-EF1a-GFP vector	GE100021	10 µg	¥ 107,000	㊦
pCas-Guide-Nickase vector for gRNA cloning （with Cas9 D10A expression）	GE100019	10 µg	¥ 137,000	㊦

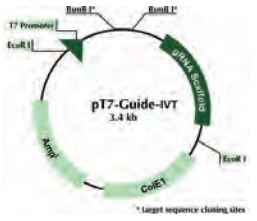
■CRISPR/Cas9 All-in-Oneベクター（ニッカーゼ/改変型Cas9）

標的遺伝子に対するgRNAとニッカーゼ/Cas9 D10Aが共発現するAll-in-Oneベクターです。
Cas9にはC末端側にmyc-DDK配列が含まれます。がん細胞する場合など、オフターゲット作用を考慮される場合にご利用ください。

品番	特長	プロモーター（Cas9）	プロモーター（gRNA）	クローニングサイト	ベクターマップ
GE100019	All-in-One	CMV	U6	BamH I/BsmB I	

■CRISPR/Cas9 mRNA発現用プラスミドならびにgRNA発現用プラスミド

Cas9のmRNAや標的遺伝子に対するgRNAをT7プロモーター下で発現させるプラスミドです。
遺伝子ノックアウトモデル（動物）を作製する際には、受精卵や胚にCas9 mRNAならびにgRNAをインジェクションする方法が頻繁に使用されており、本システムはその目的に適しています。

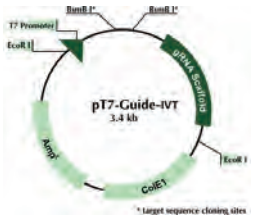
品番	特長	プロモーター（Cas9）	プロモーター（gRNA）	クローニングサイト	ベクターマップ
GE100014	*in vitro* トランスクリプション	T7	–	–	
GE100025	*in vitro* トランスクリプション	–	T7	BamH I/BsmB I	

OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
pT7-Cas9 vector in which Cas9 is under T7 for IVT to produce Cas9 mRNA	GE100014	10 µg	￥97,000	㊦
pT7-Guide-IVT vector for target sequence cloning; IVT to produce gRNA	GE100025	10 µg	￥97,000	㊦

※別途 *in vitro* 転写用の試薬が必要です。

■ニッカーゼ/改変型Cas9 mRNA発現用プラスミドならびにgRNA発現用プラスミド

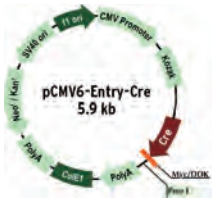
品番	特長	プロモーター（Cas9）	プロモーター（gRNA）	クローニングサイト	ベクターマップ
GE100020	*in vitro*トランスクリプション	T7	–	–	
GE100025	*in vitro*トランスクリプション	–	T7	BamH I/BsmB I	

OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
pT7-Cas9-Nickase vector （Cas9 D10A）	GE100020	10 µg	￥97,000	㊦
pT7-Guide-IVT vector for target sequence cloning; IVT to produce gRNA	GE100025	10 µg	￥97,000	㊦

※別途 *in vitro* 転写用の試薬が必要です。

■CRISPR/Cas9システム アクセサリ

品番	品名	特長	ベクターマップ
GE100017	pCMV6-Entry-Cre	Cre-Loxリコンビネーション用ベクター	
GE100007	Annealing Buffer	オリゴアニーリング用バッファー（10X）	
GE100008	CF3 Primer	標的gRNA用フォワードプライマー	

OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cre recombinase mammalian expression vector	GE100017	1 kit	¥ 110,000	凍
Oligo annealing buffer (10X)	GE100007	0.2 mℓ	¥ 22,000	冷
CF3, forward sequencing primer to sequence the targeting gRNA cloned into pCas9-Guide vector	GE100008	100 pmol	¥ 16,000	冷

■関連商品

- ゲノム編集（Genome-editing）ノックアウトキット（30ページ、WEB 記事ID：13159）

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！
いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

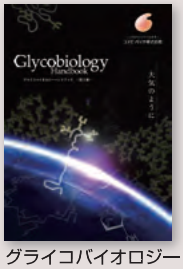
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第4版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

ATUM社

CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ベクター

WEBへどうぞ
記事ID:12575

無料のgRNAデザインツールもご提供、オフターゲット作用を低減するダブルニッキング用コンストラクトを自作

ゲノム編集とは、CRISPR/Cas9システムや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。ATUM社では、CRISPR/Cas9ベクター、試薬、gRNAデザインソフトを含む、ゲノム編集操作用ツールを開発しました。

CRISPR/Cas9ベクターの特長

- プロモーターを選択可能：CMV/CBh/CAG
- 野生型Cas9による二本鎖切断
- ニッカーゼ/改変型Cas9によるダブルニッキング

使用目的

- 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

Cas9（*S. pyogenes*）は二本鎖切断を行います。一方、ニッカーゼ/改変型Cas9は二本鎖の片側に切れ目（一本鎖切断）を入れます（特異性をより向上させるためには、2つのgRNAをタンデムで発現するNickase Ninja™ベクターをご利用ください。（77ページ））。

Cas9ヌクレアーゼは20塩基標的配列を含むgRNAにより誘導され、ゲノム上のほとんど全ての領域を切断可能です。これにより生じた染色体の損傷は、通常、非相同末端結合（NHEJ）により修復されるため、標的部位にわずかな欠失や挿入が生じます。一方、ドナーテンプレートDNAをCas9と導入した場合、相同組換えシステムが刺激され標的配列と期待する変異配列との置換が生じます。

Cas9には、DNAの非相補鎖を切断するRuvCドメインとHNHドメインという2つの触媒領域があります。ATUM社のニッカーゼは、Cas9ヌクレアーゼのRuvCドメインのD10A変異体です。gRNAは、ワトソン・クリック塩基対によりCas9をゲノム上の標的部位に導くため、いかなる領域をも簡単に標的にできます。

■CRISPR gRNA Design Tool

WEB上で使用できる無料のgRNAデザインツール！

ATUM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。ATUM社のWEBページ（https://www.atum.bio/eCommerce/cas9/input）より無料でご利用いただくことができます。

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のプロトスペーサー隣接モチーフ（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。

ATUM社 gRNAデザインツールの実績

- 野生型Cas9またはニッカーゼに対応
- 遺伝子名、遺伝子座、または特定領域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。

図1　ATUM社 CRISPR gRNAデザインツール
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、スプライスバリア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。

■ATUM社CRISPR/Cas9 Genome Engineeringの検証

ATUM社のCRISPRベクターの検証には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を抽出し該当部位の配列解析を行いました。ATUM社のベクターは、プロモーター配列により異なった挿入欠失（indel）頻度を示し、また同一部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。

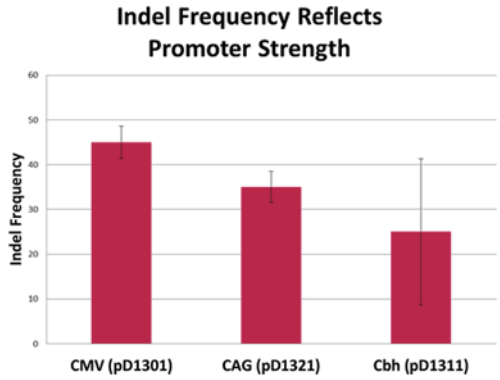


図2　インデル頻度はプロモータ強度を反映
gRNA配列をpD1301、pD1311およびpD1321にElectra™クローニングした。HEK293細胞に0.5μgのプラスミドをトランスフェクトした。トランスフェクションから72時間後、ゲノムDNAを抽出して配列決定した。ATUM社ベクターは、使用したプロモータ配列によって異なるインデル頻度を示した。

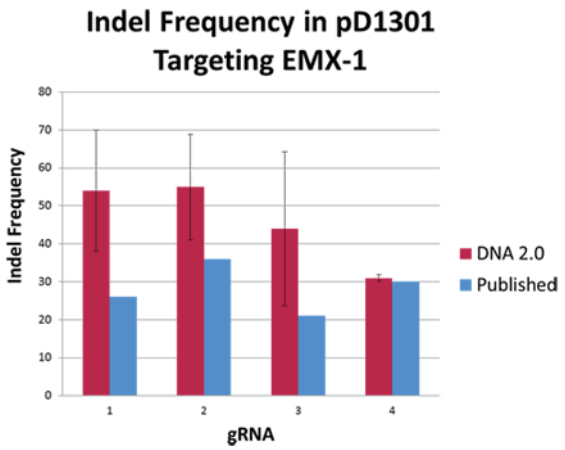


図3　pD1301を用いたEMX-1標的時の挿入欠失頻度
gRNA配列をpD1301にElectra™クローニングした。HEK293細胞に0.5μgのプラスミドをトランスフェクションした。トランスフェクションから72時間後、ゲノムDNAを抽出してEMX-1遺伝子座の配列決定を行った。ATUM社ベクターは、同一部位を標的した既報に比べ全般的に高い挿入欠失頻度を示した。

■クローニング情報

gRNAのPCR

ATUM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'-TACACGTACTTAGTCGCTGAAGCTCTTCTCCG....(gRNA).....-3'
Reverse primer:
5'-AGGTACGAACTCGATTGACGGCTCTTCTAAC....(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15-20 bp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4）。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pDAUGHTERCRISPR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。

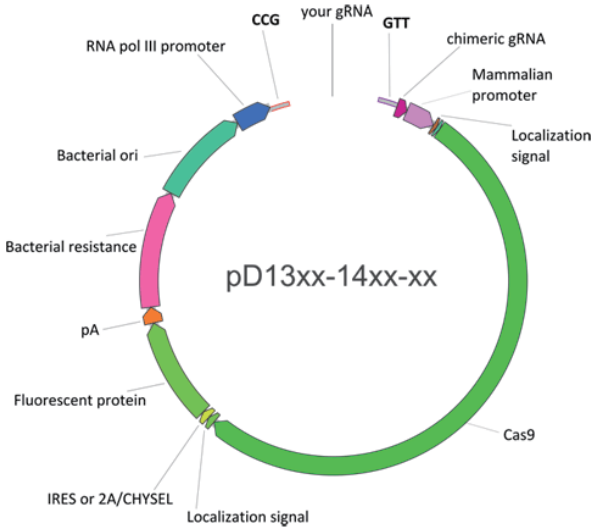


図4　ベクターマップ

図5　DAUGHTERベクタークローニングサイト

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、ATUM社より開環状で提供されます。
2. 5～20分間室温放置
3. 2μℓ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_2O	15
全容量	20

＊ATUM社 Electra™ Cloning Kit試薬（品番：EKT-03）（WEB 記事ID：11747）

■CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ベクター　商品リスト

Cas9 Electra™ Daughters

ATUM (Former DNA2.0 Inc.) 【メーカー略号:DNA】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CMV-Cas9 Cas9-ElecD	PD1301	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CBh-Cas9 Cas9-ElecD	PD1311	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CMV-Cas9-2A-GFP Cas9-ElecD	PD1301-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CBh-Cas9-2a-GFP Cas9-ElecD	PD1311-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CAG-Cas9-2A-GFP Cas9-ElecD	PD1321-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CMV-Cas9-2A-RFP Cas9-ElecD	PD1301-AP	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CBh-Cas9-2A-RFP Cas9-ElecD	PD1311-AP	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CAG-Cas9-2a-RFP Cas9-ElecD	PD1321-AP	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CAG-Cas9-2A-Puro Cas9-ElecD	PD1321-APURO	10 rxn	¥ 53,000	㊒

Cas9 Nickase Electra Daughters

ATUM (Former DNA2.0 Inc.) 【メーカー略号:DNA】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CMV-Cas9N Cas9-ElecD	PD1401	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CBh-Cas9N Cas9-ElecD	PD1411	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CMV-Cas9N-2A-GFP Cas9-ElecD	PD1401-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CBh-Cas9N-2A-GFP Cas9-ElecD	PD1411-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CAG-Cas9N-2A-GFP Cas9-ElecD	PD1421-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
EF1a-Cas9N-2A-GFP Cas9-ElecD	PD1431-AD	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CMV-Cas9N-2A-RFP Cas9-ElecD	PD1401-AP	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CBh-Cas9N-2A-RFP Cas9-ElecD	PD1411-AP	10 rxn	¥ 53,000	㊒
CAG-Cas9N-2A-RFP Cas9-ElecD	PD1421-AP	10 rxn	¥ 53,000	㊒
EF1a-Cas9N-2A-Puro Cas9-ElecD	PD1431-APURO	10 rxn	¥ 53,000	㊒

CRISPR/Cas9参考文献

・オフターゲット効果低減かつ挿入欠失効果増大に向けた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.

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.*

好評配布中！

コスモ・バイオニュース

ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！

www.cosmobio.co.jp

毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

GeneCopoeia社

CRISPR/Cas9 HR（HDR）用ドナーベクター

WEBへどうぞ
記事ID：14734

GFPまたは薬剤選択マーカーを簡単ノックイン！

FAQあります

● セーフ・ハーバー部位への目的遺伝子組込み用ゲノム編集ツール 実験検証（48ページ、WEB 記事ID：14726）

相同組換え（HR）は、DNA二本鎖切断（DSB）により誘発される天然のDNA修復機構です。部位特異的CRISPR/Cas9-sgRNA複合体は染色体上にDNA二本鎖切断を産生させDNA修復へと誘導します。ドナーテンプレート存在下では、相同組換えが生じた際に染色体上の遺伝的情報をドナー由来の新規情報へと置換します。

ドナーテンプレートを利用した相同組換えでは、遺伝子ノックアウト、インフレームの融合タグ付け、遺伝子挿入、突然変異の修正を目的とした塩基置換といった数々のアプリケーションが可能になります。

CRISPR/Cas9 HR（HDR）用ドナーベクター

GeneCopoeia社では、相同組換え用にGFPあるいは薬剤選択マーカーノックイン用のHR（HDR）用ドナークローニングベクターをご提供しています。広範なドナーベクター骨格、プロモーター、マーカー、その他有用な要素を含むベクターをご用意していますのでお客様の実験系に併せてお選びください。

- ホモロジーアーム（左と右）用に2種のマルチクローニングサイト（MCS）を含む
- 細胞選択用のGFPや薬剤耐性遺伝を含む薬剤選択マーカー
- 無作為組込みを排除するためのチミジンキナーゼ（TK）
- セレクションカセット除去用のLoxP配列

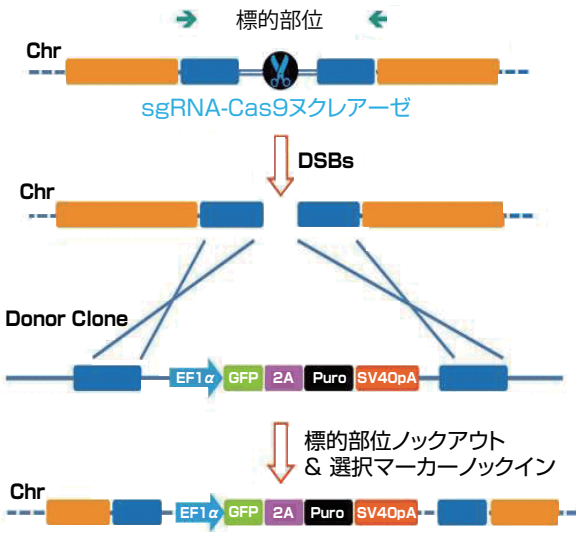


図1　CRISPR/Cas9を利用した相同組換え（HR、HDR）の作用機序。
ドナープラスミドよりレポーター遺伝子や選択マーカーが相同組換えにより標的ゲノム上の標的部位に組込まれる。

商品リスト

品番	プロモーター	レポーター遺伝子	選択マーカー	LoxPサイト	希望販売価格
pDonor-D01	EFa1	copGFP	Puromycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D02	CMV	copGFP	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D03	CMV	N/A	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D04	CMV	N/A	Puromycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D05	EFa1	N/A	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D07	EFa1	copGFP	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D08	CMV	copGFP	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D09	EFa1	N/A	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D10	CMV	N/A	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D11	PGK	copGFP	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D12	EFa1	copGFP	Hygromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D13	PGK	copGFP	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D14	PGK	N/A	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000

ベクターマップは、コスモ・バイオのWEBサイトでご確認いただけます。

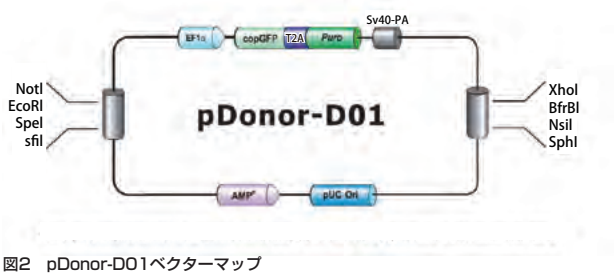


図2　pDonor-D01ベクターマップ

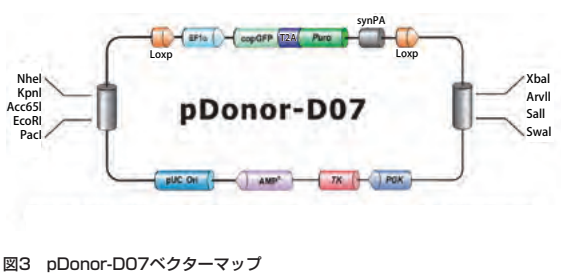


図3　pDonor-D07ベクターマップ

GeneCopoeia社

CRISPR/Cas9 / TALEN 挿入欠失検出システム

WEBへどうぞ
記事ID:14700

ゲノム編集実験の効率（変異導入効率）の確認に！

本製品は、ゲノムDNA抽出を行うことなく細胞可溶化液を直接用いて標的ゲノム領域を増幅し、標的部位周辺におけるCRISPR/Cas9 / TALEN誘導性挿入欠失変異を検出する、完全な挿入欠失検出システムです。標的部位PCRキットやT7エンドヌクレアーゼIアッセイキットをご用意しています。

背景

ミスマッチ検出は、ゲノム編集研究においてCRISPR/Cas9あるいはTALENの機能検証やノックアウトクローンスクリーニングの際に頻繁に使用される手法です。CRISPR/Cas9あるいはTALENにより期待した標的部位に導入された二本鎖切断（DSB）は非相同性末端結合（NHEJ）による修復を受けますが、この修復は誤りが起こりがちで、二本鎖切断部位周辺に短鎖の挿入や欠失が生じます。標的領域をPCR増幅し、PCR産物を変性して再度アニーリングすると、ミスマッチが生じたDNAでは野生型／挿入欠失変異ミスマッチや挿入欠失変異1／挿入欠失変異2ミスマッチを形成します。再アニーリングしたPCR断片は、ミスマッチを含むDNAのみを認識し切断するT7エンドヌクレアーゼIとインキュベートします。期待した大きさの2本の短鎖バンドが得られた場合、CRISPR/Cas9あるいはTALENにより標的部位に挿入/欠失変異が導入されたと考えられます。挿入欠失候補のPCR断片は、クローニング後、配列決定を行い、さらに検証することができます。

特長

- CRISPR/Cas9あるいはTALENの機能検証やノックアウトクローンスクリーニングを簡便化
- 標的部位をロバストにPCR増幅！ゲノムDNA抽出の必要なし！
- 簡便化されたT7エンドヌクレアーゼIアッセイで条件や陽性コントロールが最適化済み

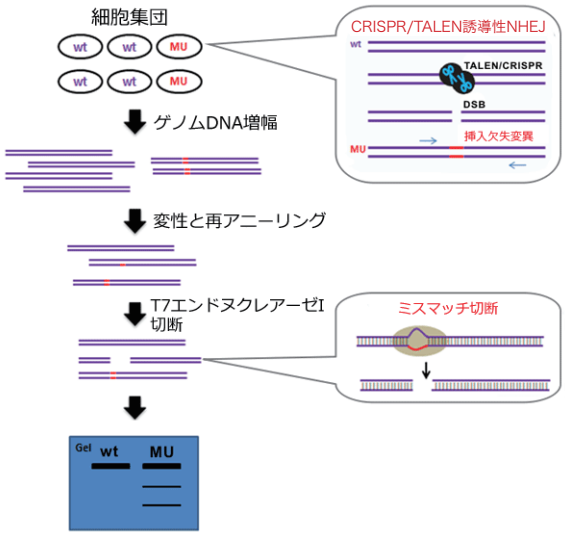


図1　T7エンドヌクレアーゼIミスマッチ切断アッセイによるCRISPR/Cas9あるいはTALEN機能検証
CRISPR/Cas9またはTALENを導入した細胞を、標的部位を挟んだ位置に設計したプライマーを用いてゲノムDNAより短鎖PCR産物を増幅した。PCR産物を変性後、再度アニーリングすることで、ミスマッチを含む二本鎖断片集団を形成させた。これらのミスマッチはT7エンドヌクレアーゼIの基質となる。CRISPR/Cas9またはTALENが細胞内で機能した場合、アガロースゲル上で切断産物を確認することができる。本ミスマッチ切断アッセイはCRISPR/Cas9（sgRNA）やTALENのゲノム編集効率の検証や、さらに下流のスクリーニングに利用できる。

使用データ

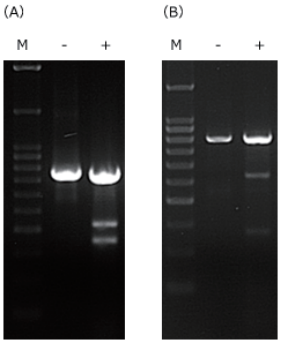


図	標的遺伝子	PCR産物[bp]	T7エンドヌクレアーゼI処理産物[bp]
(A)	NR4A1	775	428+347
(B)	ESRRA	791	267+524

図2　CRISPR/Cas9（sgRNA）により編集されたゲノム増幅物のT7エンドヌクレアーゼI処理
コントロール細胞（−）からは未切断増幅物の単一バンドのみが見られる。活性型CRISPR/Cas9（sgRNA）をもつサンプル細胞（+）の増幅物からは、期待された大きさの未修正のバンドと切断後の2本のバンドからなる3本のバンドが見られる。

※標的部位PCRプライマーはカスタム品として承っております。製品情報部 受託担当までお問い合わせください。

お問い合わせ先

TEL：03-5632-9615　FAX：03-5632-9614　E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号:GCP】

品名／構成内容		品番	包装	希望販売価格	貯蔵
IndelCheck™ CRISPR/TALEN indel detection system		IC001	50 rxn	￥47,000	凍
		IC002	200 rxn	￥143,000	凍
Target site PCR kit		IC003	50 rxn	ご照会	凍
●2x SuperHero PCR Mix	●Lysis Buffer	IC004	200 rxn	ご照会	凍
T7 endonuclease I assay kit		IC005	50 rxn	ご照会	凍
●T7エンドヌクレアーゼI	●10x T7EN Buffer	IC006	200 rxn	ご照会	凍
●コントロールテンプレート/	●プライマーミックス				

Applied Biological Materials社

CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit

WEBへどうぞ
記事ID:16908

ゲノム編集による変異の導入を確認

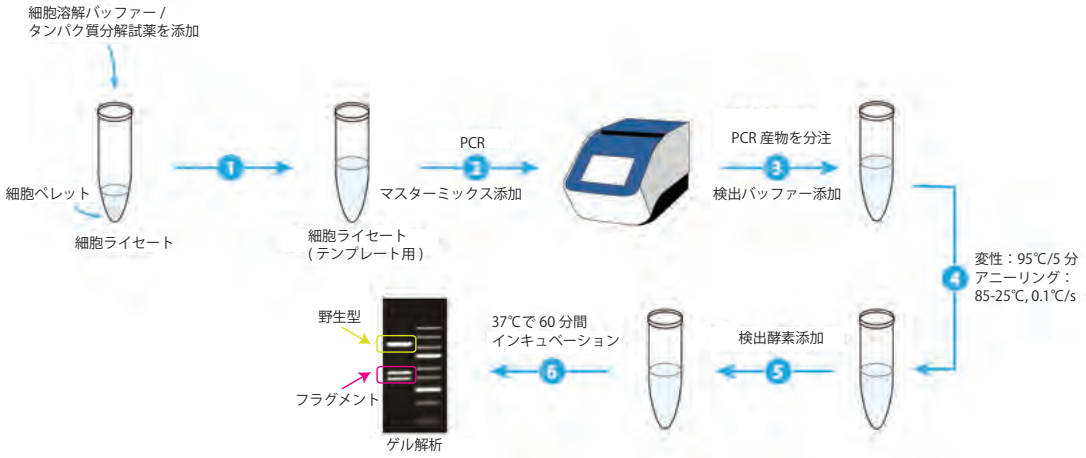
CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集による遺伝子導入を検出するキットです。
ゲノム編集などの遺伝子改変技法は広く使用されており、技術の正確性が要求されます。ゲノム編集が良好であるかどうかを確認することは重要なステップです。早い段階でアッセイがうまくいっていないことが判明すれば、その後のアッセイでサンプルを消費してしまう心配がありません。
本商品はゲノム編集のプロセスを、簡便かつ効果的に確認できるようデザインされています。

特長

- 簡便なプロトコール
- セットアップに時間がかからない
- 効率的なプロトコールのため、ハイスループットアプリケーションにも対応

■ワークフロー

CRISPR/Cas9技術によりゲノム編集した細胞サンプルは、特定の目的配列をターゲットとしたPCR反応のテンプレートとして使用します。
DNAは変性・アニーリングされ、二本鎖内でミスマッチが生じます。このミスマッチは検出酵素により識別され、ゲル解析の際に区別しやすいサイズに切断されます。



■使用例

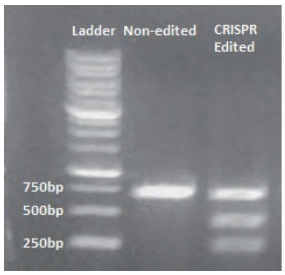


図1　酵素切断の確認
CRISPR編集済サンプルと未編集サンプルを本キットで処理した。
右：編集済サンプル：　酵素切断を行うと430bpと260bp付近に予想通りのバンドが見られた。
中央：未編集サンプル：　酵素切断は確認できなかった。

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit	G932	25 rxn	￥ 55,000	㊒

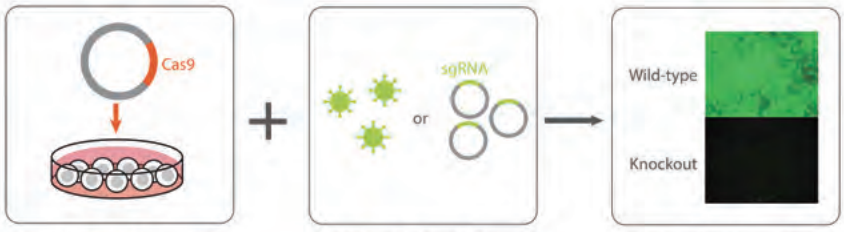
Applied Biological Materials社

Ready-to-use ノックアウトセルライン

WEBへどうぞ
記事ID:18357

ご指定の遺伝子をノックアウトする sgRNA を安定発現する細胞株

Applied Biological Materials社では、ヒト遺伝子をゲノムワイドに網羅したノックアウトセルラインをご提供しています。
293、293T、A549、HeLa、HepG2、MCF7、K562、U87-MGの8種類の細胞からお選びいただき、ご指定の遺伝子をノックアウトするsgRNAを安定発現する細胞を、Ready-to-Useの状態でお届けします。

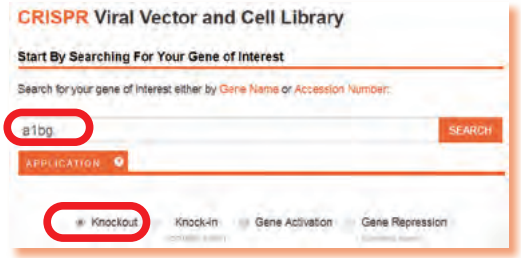


■検索方法

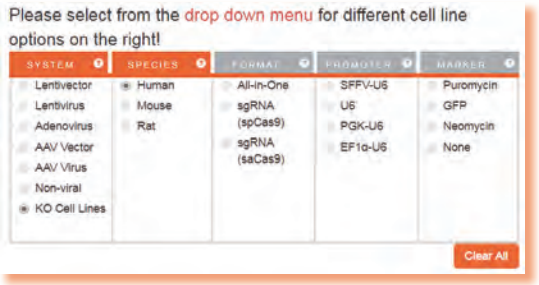
1 https://www.abmgood.com/ にアクセス

2 CRISPR sgRNA Libraries のバナーをクリック

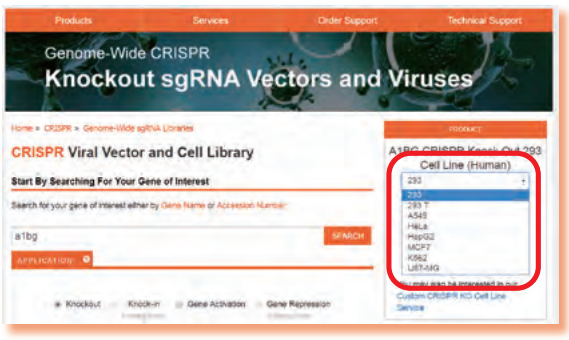
3 検索窓にご希望の遺伝子名を入力し、APPLICATION で「Knockout」を選択



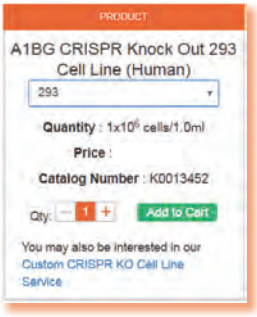
4 SYSTEM:「KO Cell Lines」を選択
SPECIES:「Human」を選択



5 検索結果が表示されますので、細胞を選択します。



6 商品情報が表示されます。表示された品番をご利用の代理店へお伝えください。



Ready-to-use ノックアウトセルライン

アカデミック／非営利団体のお客様と、企業／営利団体のお客様とで、販売価格が異なります。

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

	細胞種	包装	希望販売価格	貯蔵
アカデミック	293	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	293T	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	A549	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	HeLa	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	HepG2	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	MCF7	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	K562	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
	U87-MG	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,160,000	液窒
営利団体	293	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	293T	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	A549	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	HeLa	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	HepG2	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	MCF7	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	K562	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒
	U87-MG	1×10⁶ cells/1.0mℓ	¥ 1,780,000	液窒

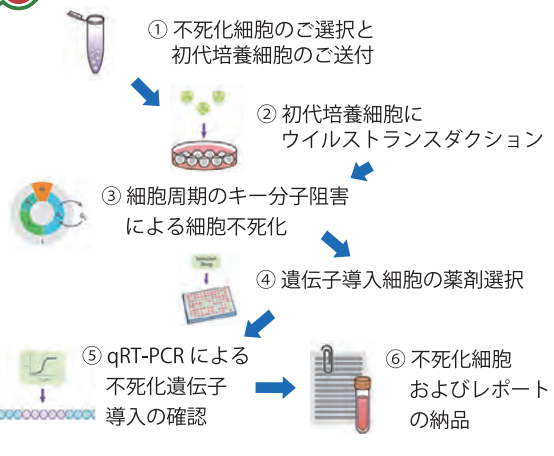
❗ご購入頂く際に、「Material Transfer Agreement（MTA）」を締結する必要がございます。WEB 記事ID：18357からダウンロードください。

【ご注意】
本商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規則に則し、適切にお取扱いください。

不死化細胞作製受託サービス

abm

Applied Biological Materials 社 は様々な細胞不死化試薬及び不死化初代培養細胞を開発し、世界中で販売を行っております。不死化のノウハウに精通した技術者が、ご送付頂いた初代培養細胞を SV40 や hTERT 等の自社開発した様々な不死化試薬により効率よく不死化して納品致します。



記事 ID 検索 12278

詳しい情報はコスモ・バイオの Web サイトへ
コスモ・バイオホームページのサイト内検索エンジン「記事 ID 検索」でご検索ください。

お問い合わせ先 TEL：03-5632-9615　FAX：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

良いコウタイがー
あっタイガ〜！

抗体百科

■ 探しま章 ― **Web 検索データベース**
100 万品目以上の品ぞろえ、主要な
約 12,000 ターゲットの抗体を国内に在庫。

■ 作りま章 ― **抗体作製受託サービス**
お客様とのコミュニケーションを大切にし、
高い技術力であらゆるニーズに対応。

**「探しま章」はトップページの
このバナーをクリック！**

国内最大級の抗体データベース 抗体百科

コスモ・バイオの抗体百科に Go！ www.cosmobio.co.jp

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

好評配布中！

コスモ・バイオニュース

ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！
www.cosmobio.co.jp

毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

第２章

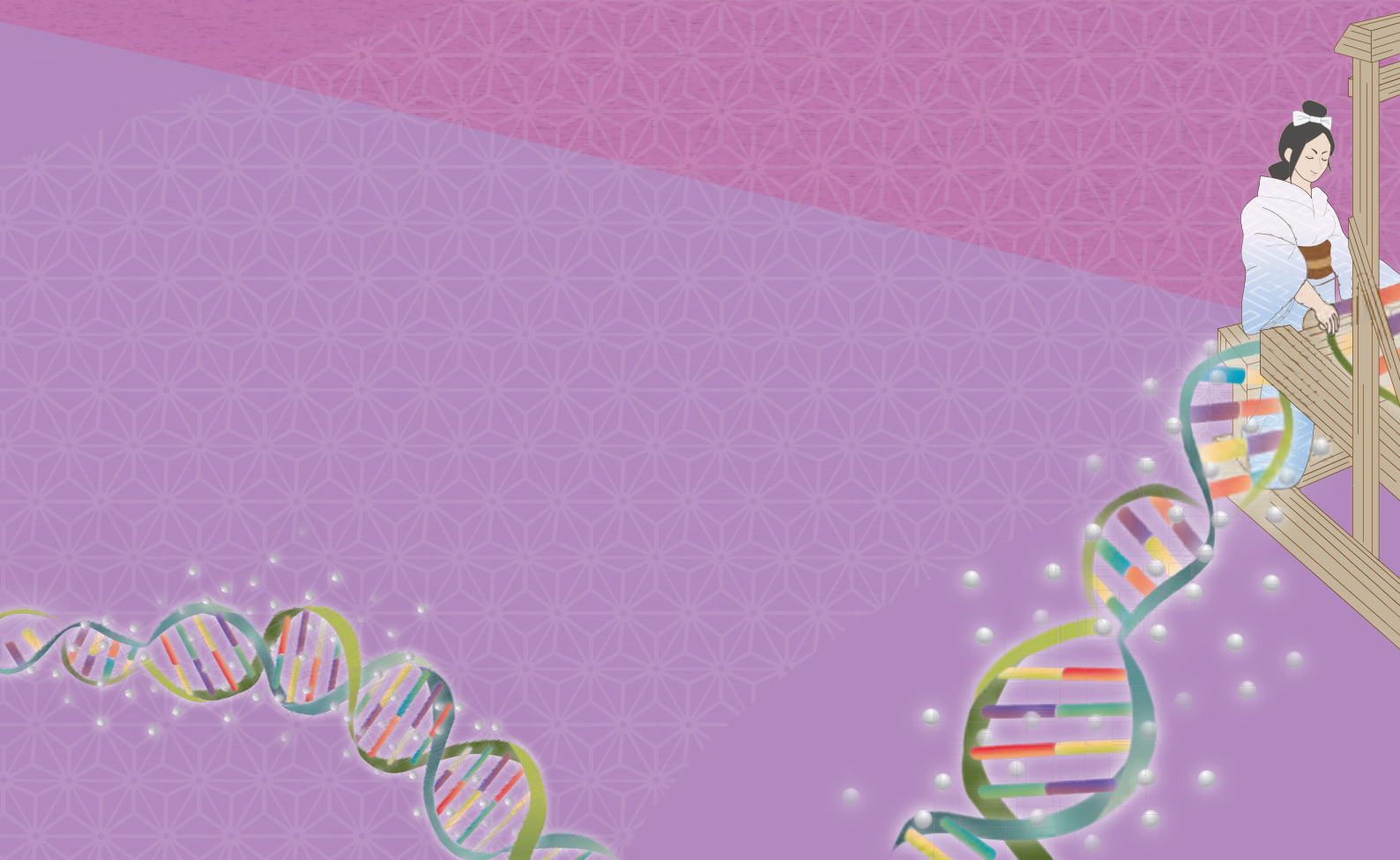
ノックイン

部位特異的ノックイン

- TARGATT™部位特異的ノックインシステム Applied StemCell 社 …… p 46

セーフ・ハーバー部位へのノックイン

- セーフ・ハーバー部位へ目的遺伝子を挿入
  CRISPR/Cas9 ノックインキット＆HDR ノックインクローン GeneCopoeia 社 ▪ p 48
- CRISPR/Cas9 AAVS1 領域遺伝子挿入キット＆ベクター OriGene 社 …… p 55



Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*
Applied StemCell社

Applied StemCell社　TARGATT™ 部位特異的ノックインシステム

WEBへどうぞ
記事ID:32867
記事ID:32869

■TARGATT™ ノックインマウス細胞株作製キット

FVB/H11、FVB/Rosa26、C57BL6/H11、C57BL6/Rosa26

Applied StemCell社のTARGATT™ ノックインマウス細胞株作製キットは、伝統的な方法に比べて迅速かつ効率的な方法で、第11染色体上のH11座位に標的遺伝子を導入し部位特異的ノックインマウスES細胞を作製するためのキットです。このキットには転写活性部位（第11染色体上のH11座位）にTARGATT™ ドッキング部位（attP）を有するC57BL / 6バックグラウンドのマウスES細胞株（品番AST-0020）、TARGATT™ インテグラーゼ発現のためのプラスミドおよびドナーDNAプラスミドを構築するためのクローニングベクターが含まれています。このキットにより大きなDNA断片をH11遺伝子座に高い効率で挿入することが可能です。

TARGATT™ の技術につきましては、本カタログの84ページの説明をご覧ください。

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号:ASC】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TARGATT™ Knock-in Mouse Cell Line Generation Kit （Master Cell Line） beta version	AST-7001	1 kit	ご照会	液窒

■TARGATT™ トランスジェニックマウス胚

FVB/H11、FVB/Rosa26、C57BL6/H11、C57BL6/Rosa26

Applied StemCell社のTARGATT™ 胚は、遺伝子操作されたTARGATT™ トランスジェニックマウス由来です。これらのマウス胚を使用して、独自のTARGATT™ マウスコロニーを作製することができます。FVB/H11、FVB/Rosa26、C57BL6/H11およびC57BL6/Rosa26の4種類の胚をご利用頂けます。これらの胚を用いて 2つの異なるゲノム遺伝子座H11およびRosa26、また2つの異なる株バックグラウンドであるFVBおよびC57BL6において部位特異的ノックインマウスモデルを作製できます。

TARGATT™ 胚には合計45～60個の凍結保存された胚（8細胞段階/桑実胚）を有する3つのストローが含まれます。

TARGATT™ の技術につきましては、本カタログの84ページの説明をご覧ください。

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号:ASC】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TARGATT™ Embryos -H11 - FVB	AST-0002	1 pack （3 straws）	ご照会	液窒
TARGATT™ Embryos -Rosa26 - FVB	AST-0004	1 pack （3 straws）	ご照会	液窒
TARGATT™ Embryos （Frozen） - H11 -C57BL/6	AST-0012	1 pack （3 straws）	ご照会	液窒
TARGATT™ Embryos （Frozen） -Rosa26 -C57BL/6	AST-0013	1 pack （3 straws）	ご照会	液窒

良いコウタイがー
あっタイガ～！

抗体百科

■ 探しま章 Web 検索データベース
100 万品目以上の品ぞろえ、主要な
約 12,000 ターゲットの抗体を国内に在庫。

■ 作りま章 抗体作製受託サービス
お客様とのコミュニケーションを大切にし、
高い技術力であらゆるニーズに対応。

「探しま章」はトップページの
このバナーをクリック！

国内最大級の抗体データベース 抗体百科

コスモ・バイオの抗体百科に Go！ www.cosmobio.co.jp

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

■TARGATT™ プラスミドシリーズ

Applied StemCellは、TARGATT™テクノロジーに使用できる多くのプラスミドを提供しています。 各プラスミドは強力なトランスジーン発現を確実にするために、多様なプロモーターとマーカー遺伝子の組み合わせをラインナップしております。TARGATT™ベクターは、マウスゲノムのよく特徴付けられた転写活性部位に目的の遺伝子を送達するように設計されています。目的遺伝子はいくつかの酵素の組み合わせを用いてTARGATT™Plasmidにクローニングできます。プラスミドのマイクロインジェクションは TARGATT™インテグラーゼと共にTARGATT™マウス胚の前核に導入すると、TARGATTインテグラーゼによって触媒される不可逆的組換えでマウス遺伝子のattP部位に目的の遺伝子が導入されます。

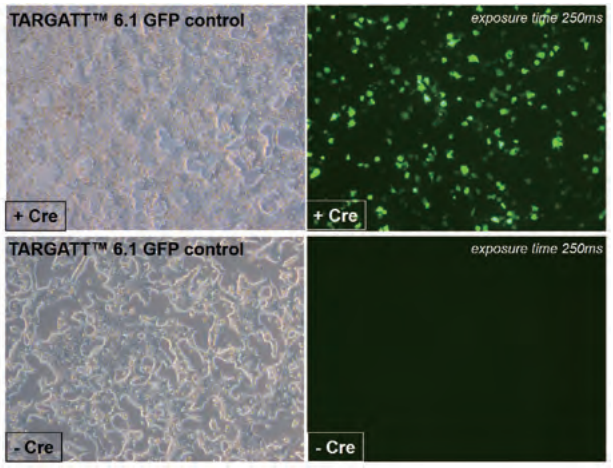


図1
TARGATT™ 6.1（CAG-L4SL-MCS-PolyA）のMCSにGFP断片をクローニングするために、100万個のHCT116細胞に5μgのTARGATT™ 6.1-GFPプラスミド（CAG-L4SL-GFP）（及び2.5μgのCre発現プラスミド）をNeon® エレクトロポレーションシステムを用いトランスフェクトした。Creリコンビナーゼ発現の存在下でLoxP-4stop-LoxPを欠失させ、GFPレポーターを発現させた。Cre発現が存在しない場合、GFP発現は、LoxP-4stop-LoxPカセット中の4stopコドンによってサイレンシングされた。

TARGATT™ の技術につきましては、本カタログの84ページの説明をご覧ください。
*ベクターご購入時は MTA の締結が必要になりますので、コスモ・バイオ 製品情報部 受託担当（jutaku_gr@cosmobio.co.jp）までお問い合わせ下さい。

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号:ASC】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TARGATT™ 2（CAG + Poly A）	AST-3042	1 vial（20 μℓ）	ご照会	㊒
TARGATT™ 3（no promoter + MCS）	AST-3043	1 vial（20 μℓ）	ご照会	㊒
TARGATT™ 7（PGK-MCS-PolyA）	AST-3047	1 vial（20 μℓ）	ご照会	㊒
TARGATT™ 8（PCA-MCS-PolyA）	AST-3048	1 vial（20 μℓ）	ご照会	㊒
TARGATT™ 6.1（CAG-L4SL-MCS-PolyA）	AST-3050	1 vial（20 μℓ）	ご照会	㊒
TARGATT™ 9.1（PCA-L4SL-MCS-PolyA）	AST-3051	1 vial（20 μℓ）	ご照会	㊒

■TARGATT™ ジェノタイピングキット

TARGATT™ Mouse ジェノタイピングキットは、TARGATT™ マウスまたはTARGATT™ 胚から生成されたトランスジェニックマウスの遺伝子型を決定するためのキットです。テールサンプルからゲノムDNAを抽出し、プライマーを用いてPCRにより遺伝子型決定します。キットを使用すると、H11 attPノックインサイトと、attLサイトとattRサイトの両方にトランスジーンが組み込まれたことを検出できます。

構成内容

TARGATT™ H11P3 Mouse Genotypingキット（品番：AST-2005）には、以下が含まれています。

- 尾部溶解緩衝液
- プライマーセットH11P3
- プライマーセットSSR
- 陽性対照DNA
- プロテイナーゼK
- プライマーセットSSL
- ヌクレアーゼフリー水

TARGATT™ Rosa26P3 Mouse Genotypingキット（品番：AST-2006）には以下が含まれています。

- 尾部溶解緩衝液
- プライマーセットRosa26P3
- プライマーセットSSR
- 陽性対照DNA
- プロテイナーゼK
- プライマーセットSSL
- ヌクレアーゼフリー水

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号:ASC】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
TARGATT™ H11 Mouse Tail Lysis PCR Kit	AST-2005	1 kit（100 reactions）	¥ 147,000	㊒
TARGATT™ Rosa26 Mouse Tail Lysis PCR Kit	AST-2006	1 kit（100 reactions）	¥ 147,000	㊒

■関連商品

- CRISPRノックイン用HDRテンプレート作製受託サービス（本誌75ページ）
- CRISPR/Cas9ノックイン細胞作製受託サービス（本誌88ページ）

GeneCopoeia社

セーフ・ハーバー部位へ目的遺伝子を挿入
CRISPR/Cas9ノックインキット&HDRノックインクローン

WEBへどうぞ
記事ID：15254
記事ID：14726

CRISPR/Cas9技術を用いて遺伝子をノックインしても安全です

培養細胞や動物を用いた実験において、遺伝子導入は以下のような目的で利用されています。

- 目的タンパク質の過剰発現
- 目的タンパク質への蛍光標識
- 変異体の表現型を野生型へ回復（レスキュー）
- 異種間の遺伝子機能解析（オーソログス遺伝子の解析）

プラスミドトランスフェクションによる目的遺伝子の一過性発現よりも、目的遺伝子をゲノムに組込み、安定的に発現させることが望ましいケースもあります。本稿では、ゲノムへ組込むことの利点と欠点、「セーフ・ハーバー部位」の利用、およびGeneCopoeia社が保有するヒトAAVS1とマウスRosa26セーフ・ハーバー用ゲノム編集ツールの性能検証について討議します。

商品情報：セーフ・ハーバー部位に目的の遺伝子をノックインするゲノム編集ツール

- GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9ノックインキット & HDRノックインクローン
  （27ページ、WEB 記事ID：15479）
- Origene社 CRISPR/Cas9 AAVS1領域遺伝子挿入キット&ベクター（55ページ、WEB 記事ID：15187）

■ランダムな遺伝子導入の危険性

細胞ゲノムに遺伝子を組込むクラシカルな手法のひとつに、直線化させたDNAをトランスフェクションまたはインジェクションしてランダムな非特異的組換えを期待するものがあります。このようなランダム組換えは、遺伝子組換えにおいて適切な場合もありますが、以下の2つの重大な危険性を含んでいます。

- 遺伝子破壊による致死や他の期待しない表現型が出現する
- 組込む部位のクロマチン高次構造が導入遺伝子の発現を抑制する場合がある

さらに、細胞が複数の組換え体を抱えることもあり、導入遺伝子自身による効果であるかどうか、解釈がより困難となる可能性もあります。そのため、適切な発現が生じるようなゲノム領域が存在することは非常に有用です。

■マウスやヒトにおける「セーフ・ハーバー部位」

哺乳動物の遺伝子導入におけるゲノム上の「安全」部位は、1990年代後半にPhillipe Sorianoおよびその共同研究グループによりはじめて報告されました（Zambrowicz, *et al.*, 1997）。ROSAβgeo26と呼ばれる特定マウス系統では、検証したほぼ全ての組織においてランダムに挿入した遺伝子から、βガラクトシダーゼを一様に高レベルで発現することが見出されています。さらに、遺伝子挿入部位が第6染色体上であることが特定されました。この領域からは1つのタンパク質コード転写物と2つの非コード転写物が発現しますが、挿入配列によって非コード転写物のみが崩壊します。挿入配列がホモ接合の子供は、ヘテロ接合の子供に比べてわずかに出生率が低いものの、ホモ接合体は正常に発生するようであり繁殖性です。そのため、これ以後「Rosa26」は適応度において明白な有害作用を生じず定常遺伝子発現が可能な遺伝子挿入部位として利用されるようになりました。2010年までには130以上の導入遺伝子をもつマウス系統が構築されています。

その後、ヒト細胞においても遺伝子を挿入できる、類似のセーフ・ハーバー部位が報告されました（DeKelver, *et al.*, 2010）。これはアデノ随伴ウイルス（AAV）が通常、第19染色体上のPPP1R12Cという特定の領域に組込まれるとの報告が基になっています。AAVS1としても知られる本座位へAAVを組み込んだ場合でも、初代培養細胞や不死化細胞、人工多能性幹細胞（iPSC）および胚性幹細胞などをはじめとする種々の細胞に目に見える表現型の変化を生じることはありません。上記の報告では、遺伝子をAAVS1部位へ特異的に挿入した場合、筆者らが使用したどのような生物種においても明らかな有害作用を生じなかったことが報告されています。さらに、天然のPPP1R12Cまたは外来性のプロモーターから発現するように挿入された遺伝子は、ある程度、細胞分裂した後も一定の発現レベルを保つことも確認されています。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

■セーフ・ハーバー部位組込み用ゲノム編集ツール

ゲノム編集はゲノムDNAの標的領域に特異的な変化／変異をもたらす強力なアプローチです（Bogdanove & Voytas, 2011; van der Oost, *et al*., 2013）。近年、植物の病変形成や適応免疫といった細菌のシステムを利用するTALENおよびCRISPR/Cas9の2種類のゲノム編集技術が登場しました。TALENとCRISPR/Cas9の何れの技術も、実質的にゲノム上の如何なる標的配列に対しても二本鎖切断を誘導できる、キメラのエンドヌクレアーゼを利用して変異誘発を行います。ゲノム編集には、遺伝子ノックアウト、融合タグ付けおよび変異修正といった数々のアプリケーションがあります。さらに、ゲノム編集手法ではRosa26やAAVS1セーフ・ハーバー部位をはじめとし、どのような領域にも遺伝子を挿入することができます。TALENあるいはCRISPR/Cas9誘導性の二本鎖切断は、ドナーテンプレート存在下において相同組換えにより修復されます（図1）。二本鎖切断の隣接領域と相同配列をもつホモロジーアーム間に希望する配列を含めることで、目的遺伝子の「ノックイン」が可能となります。

関連技術情報
- ドナーテンプレートを利用した効果的なゲノム編集アプリケーション（10ページ、WEB 記事ID：15214）

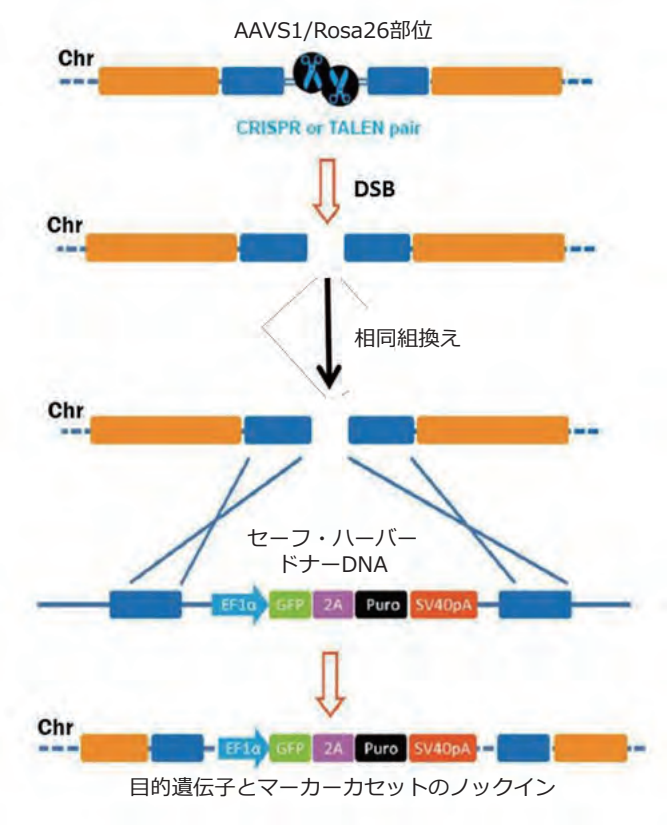


図1　相同組換えによるセーフ・ハーバーノックイン手法の一般的概要図

GeneCopoeia社では、CRISPR/Cas9によるセーフ・ハーバーノックイン用のゲノム編集用ツールおよび20,000種以上におよぶORFクローン（27ページ、WEB 記事ID：15479）を提供しています。以下に、これらのセーフ・ハーバーツールの効率を培養細胞アッセイにより実験的に検証した結果を示します。

マウスRosa26用の特定座位に二本鎖切断を誘導する3種類のTALENコンストラクトと1種類のCRISPR/Cas9コンストラクト、マウスNeuro2a細胞にそれぞれのヌクレアーゼと赤色蛍光タンパク質（RFP）とカイアシ類緑色蛍光タンパク質（copGFP）の両方をもつドナープラスミドを用意し、共トランスフェクションしました。コントロールは、ドナープラスミドのみをトランスフェクションしたものを使用しました。ドナーカセットにはピューロマイシン耐性遺伝子が含まれるため、トランスフェクションした細胞をピューロマイシン処理することでドナーカセットがゲノムに組込まれたクローンを選択することができます。組込みが生じた場合、ピューロマイシン耐性細胞は蛍光顕微鏡観察で緑色かつ赤色として確認することができます。次に、挿入部位を挟んだ位置に設計されたプライマーを用いてPCRを行い、相同組換えが起こった細胞のスクリーニングを行います。蛍光分析により、ドナープラスミドのみをもつ細胞に比べ、TALENまたはCRISPR/Cas9コンストラクトとドナープラスミドを導入した群の何れにおいても、高効率で組込みが誘導されることが示唆されました。さらに、回収した細胞からゲノムDNAを抽出し、遺伝子挿入部位にまたがる位置に設計したプライマーを用いてPCRを行った結果、ドナープラスミドのみをトランスフェクションした群では増幅がみられず、TALENまたはCRISPR/Cas9コンストラクトとドナープラスミドをトランスフェクションした群のみで増幅がみられました。本検証結果より、GeneCopoeia社のセーフ・ハーバーノックイン用ゲノム編集用ツール（48ページ、WEB 記事ID：14726）はマウスのセーフ・ハーバー部位に高効率で組換えが可能であることが明らかとなりました。

＊GeneCopoeia社では導入遺伝子のランダム組込みが生じた細胞に関しては分析を行っていません。
＊当社ではTALEN関連商品は取扱いしておりません。

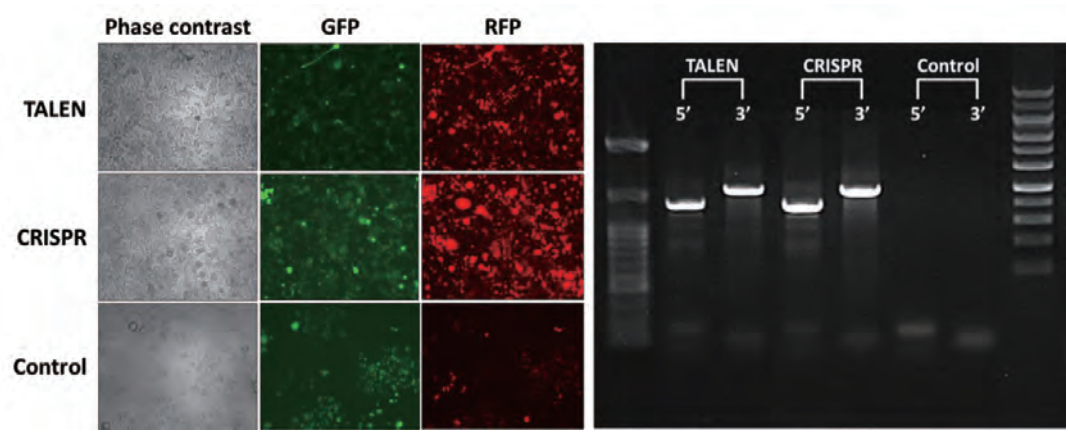


図2　マウスRosa26部位への遺伝子挿入
左図：Neuro2a細胞にTALENまたはCRISPR/Cas9とドナープラスミドを同時導入、またはドナープラスミドのみを導入（コントロール）した。ピューロマイシン処理を12日間行った後、緑色蛍光および赤色蛍光を評価した。
右図：マウスRosa26標的部位のPCR結果。

GeneCopoeia社では、第19染色体上のヒトAAVS1部位に目的遺伝子を組込むツールもご提供しています（48ページ、WEB記事ID：14726）。Rosa26実験と同様に、HEK293T細胞にAAVS1 TALENとSOX2またはOCT4ピューロマイシン耐性遺伝子、GFPを含むドナープラスミドをトランスフェクションしました。14日間のピューロマイシン選択後、GFP発現細胞を確認しました（図3）。挿入部位を挟んだプライマーを用いたPCR分析ではTALENとドナープラスミドをトランスフェクションした細胞からは、AAVS1部位への遺伝子組込みが確認できています（データ未掲載）。

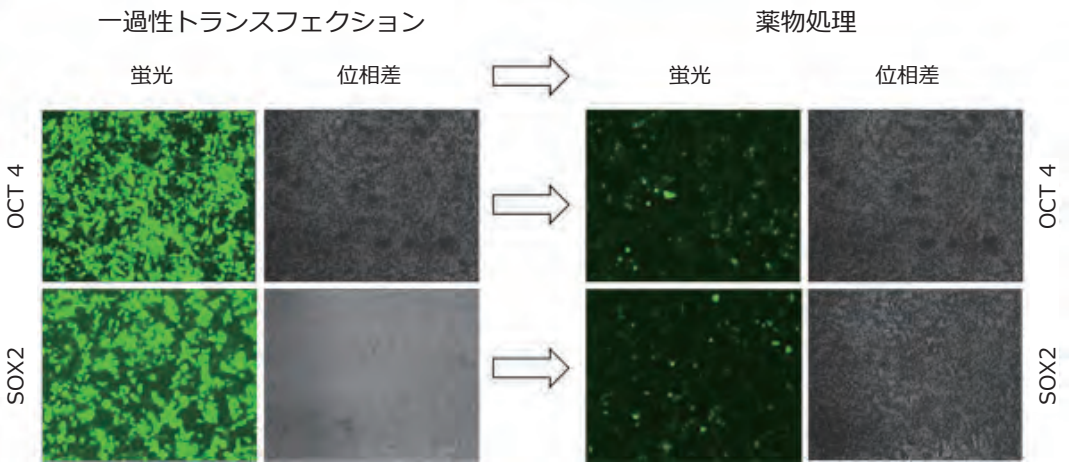


図3　ヒトAAVS1TALENを用いて2種類の遺伝子を細胞ゲノムに組込んだ
GFPと位相差画像は何れも1μg/mℓピューロマイシン処理前（左図：一過性トランスフェクション）と14日間にわたる処理後（右図：薬物処理）を示す。

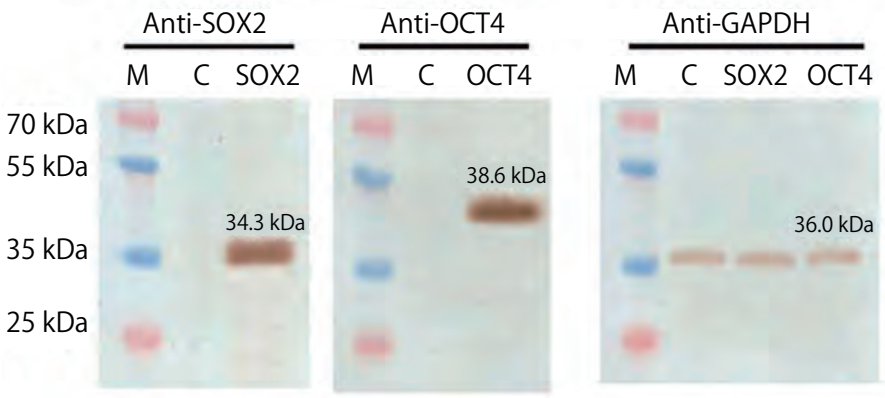


図4　ウェスタンブロット解析結果
SOX2またはOCT4をヒトAAVS1部位に組込んだ細胞を用いた。
M：マーカー
C：トランスフェクションを行っていない細胞をコントロールとして使用した。本解析における内在性SOX2とOCT4タンパク質レベルは検出限界未満であった。

■ヒトAAVS1セーフ・ハーバーノックインクローン

ヒトおよびマウス用セーフ・ハーバーノックインゲノム編集ツールの使い勝手をより良くするために、GeneCopoeia社では、ヒトAAVS1部位用セーフ・ハーバーノックインORFクローン（48ページ、WEB 記事ID：14726）をご提供しています。GeneCopoeia社は、哺乳類ORFクローンを保有しており、ヒト　セーフ・ハーバー技術用に、AAVS1部位にノックイン可能なドナークローンとして最適化した、18,000種以上ものヒトORFドナークローンを再構築しました（図5）。

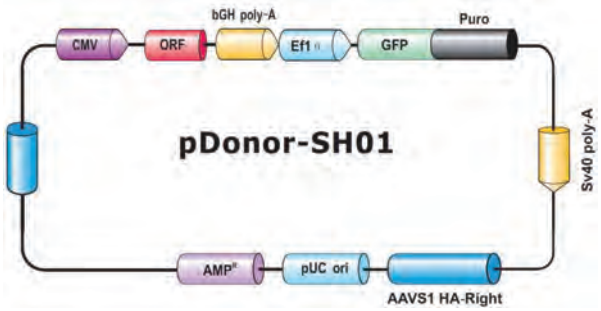


図5　ヒトAAVS1セーフ・ハーバーノックインORFクローン用GeneCopoeia社ドナーベクター
“ORF”モジュール（赤色）はセーフ・ハーバーノックイン用に18,000種以上ご用意しているヒトORF配列を示す。

参考文献

- Bogdanove & Voytas (2011). TAL Effectors: Customizable Proteins for DNA Targeting. *Science* 333, 1843.
- DeKelver, *et al*. (2010). Functional genomics, proteomics, and regulatory DNA analysis in isogenic settings using zinc finger nuclease-driven transgenesis into a safe harbor locus in the human genome. *Genome Res* 20, 1133.
- van der Oost, *et al*. (2013). New Tool for Genome Surgery. *Science* 339, 768.
- Zambrowicz, *et al*. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA beta-geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of beta-galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci*. USA 94, 3789.

セーフ・ハーバーシステムで簡単ゲノム編集！ 20,000種以上のORFクローンをラインアップ！

- セーフ・ハーバー部位への目的遺伝子組込み用ゲノム編集ツール 実験検証（49ページ、WEB 記事ID：15254）
- ドナーテンプレートを利用した効果的なゲノム編集アプリケーション（10ページ、WEB 記事ID：15214）

CRISPR/Cas9をはじめとしたゲノム編集技術は、対象遺伝子やほかの遺伝要素を染色体上の特定部位に挿入することができ、細胞工学においても非常に有益です。遺伝的に修正された細胞は系譜追跡や分析（genetic lineage tracing）と同様に創薬研究や遺伝子機能研究においても有用です。これらのアプリケーションは内在性遺伝子やほかの制御要素にかきみだされることなく、導入遺伝子の機能が想定どおりであることや、その信頼性に左右されます。一方で、導入遺伝子の無作為な組込みは予期しない挿入や変異を誘発する恐れがあります。

近年開発された新しいアプローチに、予め決定しているゲノム内の安全な部位に目的遺伝子を送達するという手法があります。マウスゲノムのRosa26と同様にヒト染色体第19位のAAVS1（PPP1R2C座位としても知られる）は、既知機能をもつDNA断片を宿す上で非常によく検証された「セーフ・ハーバー（安全地帯）」座位です。この領域はopen chromatin structureを取り、転写競合性です。また、希望するDNA断片を挿入しても細胞に悪影響を及ぼすことがこれまで報告されていない、という点は特記すべきでことです。

部位特異的CRISPR/Cas9システムは、ゲノム上のセーフ・ハーバー部位にDNA二本鎖切断を導入することができ、DNA修復機構を刺激します。関連するORFノックインドナーが存在する場合、相同性組換え（HR、HDR）が生じORFノックインドナーテンプレートよりDNA断片がセーフ・ハーバー部位へ組込まれます。

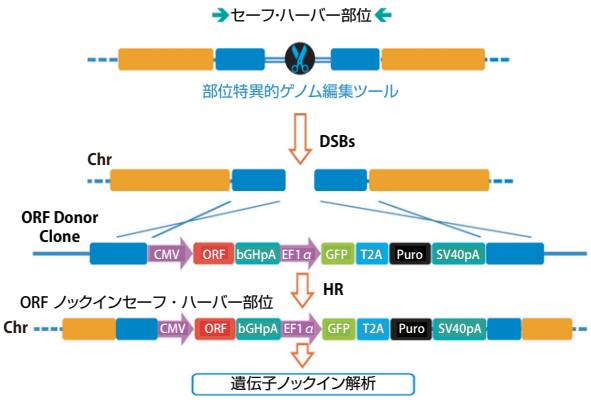


図6　CRISPR/Cas9によるセーフ・ハーバーへの導入遺伝子組込み

■CRISPR/Cas9 ヒトAAVS1セーフ・ハーバー遺伝子ノックインキット

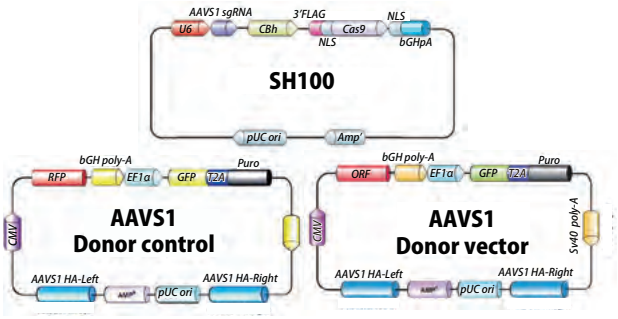
本キットは、相同組換えを利用して対象遺伝子、選択マーカー、または他の遺伝要素をヒト第19染色体上のAAVS1セーフ・ハーバー部位に特異的に導入できるようデザインされており、AAVS1 sgRNA/Cas9発現クローン、ドナークローニングベクターまたはドナークローン*1、ポジティブクローン、およびノックインPCR検証キットがそれぞれ1つずつ含まれています。

構成内容

- CRISPR/Cas9 All-in-Oneプラスミド for AAVS1（品番：SH100）
- RFPノックイン用ドナープラスミド（品番：SH308）
- ドナーコンストラクト作製用プラスミド（品番：SH200）
- AAVS1用プライマー（品番：SH400、品番：SH401）

＊1 SH200はSH004キットにのみ付属します。Genome-CRISP™ AAVS1 ORF knock-in cloneは個別にご注文頂けます。AAVS1ドナーベクターのカスタム構築も承ります。

(A)



(B)

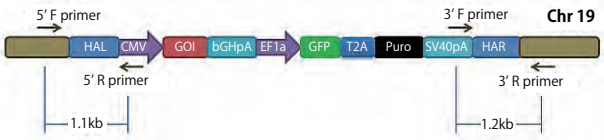


図7 Genome-CRISP™ ヒトAAVS1セーフ・ハーバー遺伝子ノックインキットの模式図
（A）AAVS1 sgRNA/Cas9発現ベクターおよびドナーDNAベクター
（B）AAVS1ノックイン検証用プライマー

■ヒトAAVS1セーフ・ハーバーノックインORFクローン

20,000以上の配列検証済みヒトAAVS1セーフ・ハーバーノックインORFクローンをご用意しており、GeneCopoeia社のWEBサイトで検索して頂くことができます。本商品は、Genome-CRISP™ ヒトAAVS1セーフ・ハーバー遺伝子ノックインキットを用いて、対象ORFをドナープラスミドからヒト第19染色体上のAAVS1セーフ・ハーバー部位へ特異的に組込むためのものです。

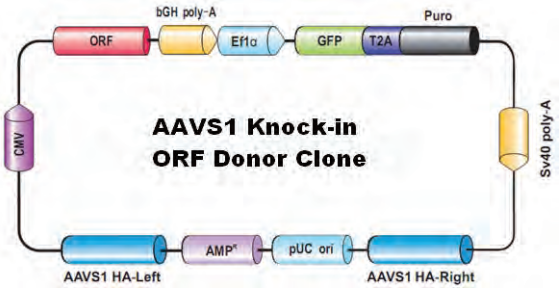


図8 ヒトAAVS1セーフ・ハーバーノックインORFクローンマップ

Human AAVS1 safe harbor gene knock-in kits and clones

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号:GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Genome-CRISP™ AAVS1 safe harbor gene knock-in kit	SH004	1 kit	¥ 321,000	㊒
Genome-CRISP™ AAVS1 safe harbor gene knock-in kit (without donor)	SH000	1 kit	¥ 275,000	㊒
AAVS1 positive control donor	SH308	1 clone	¥ 114,000	㊒
AAVS1 donor cloning vector	SH200	1 clone	¥ 98,000	㊒

好評配布中！
コスモ・バイオニュース
ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！
www.cosmobio.co.jp
毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

■CRISPR/Cas9 マウスROSA26セーフ・ハーバー遺伝子ノックインキット

本キットは、CRISPR/Cas9介在型相同組換えを利用して対象遺伝子、選択マーカー、または他の遺伝要素をマウスゲノム上のROSA26セーフ・ハーバー部位に特異的に導入できるようデザインされており、ROSA26 sgRNA/Cas9発現クローン、ドナークローニング用プラスミドまたはドナー作製用プラスミド*2、ポジティブコントロール、およびノックインPCR検証キットがそれぞれ1つずつ含まれています。

ROSA26は、ROSAβgeo26としても知られる領域で、検証したほぼ全ての組織においてランダムに挿入した導入遺伝子から、βガラクトシダーゼを一様に高レベルで発現する、ROSAβgeo26と呼ばれる特定マウス系統の第6染色体上で最初に見つかりました。この領域からは1つのタンパク質コード転写物が発現し、挿入配列によって非コード転写物のみが破壊されます。挿入配列がホモ接合の子供はヘテロ接合の子供に比べてわずかに出生率が低いものの、ホモ接合体では正常に発生するようであり繁殖性です。そのため、「Rosa26」は適応度において明白な有害作用を生じず、定常遺伝子発現が可能な導入遺伝子挿入部位としてよく利用されています。ROSA26特異的なCRISPR/Cas9システムを用いることでマウスゲノムのROSA26座位に2本鎖切断（DSB）を導入し、天然のDNA修復機能を刺激することができます。また、ROSA26 ORFノックインクローンを同時に用いることで、相同組換え（HR）が生じセーフ・ハーバー座位にORFノックインクローン由来のDNA断片をノックインすることができます。

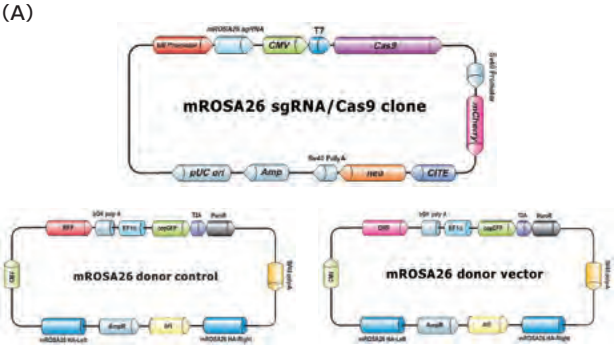
*2　Genome-CRISP™ マウスROSA26 ORFノックインクローンは個別にご注文頂けます。ROSA26ドナーベクターのカスタム構築も承ります。

構成内容

- CRISPR/Cas9 All-in-Oneプラスミド for ROSA26（品番：SH150）
- RFPノックイン用ドナープラスミド（品番：SH358）
- ドナーコンストラクト作製用プラスミド（品番：SH250）
- ROSA26用プライマー（品番：SH450、品番：SH451）

＊　SH250はSH054キットのみに付属します。Genome-CRISP™ ROSA26 ORF knock-in cloneは個別にご注文頂けます。ROSA26ドナーベクターのカスタム構築も承ります。

(A)



(B)

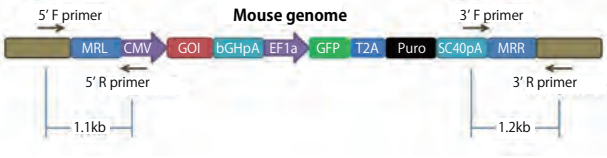
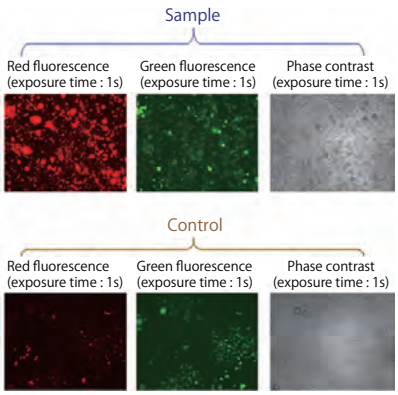


図9　Genome-CRISP™ マウスROSA26セーフ・ハーバー遺伝子ノックインキットの模式図
（A）ROSA26 CRISPR/Cas9とドナーDNAプラスミド
（B）ノックイン検証用プライマー

(A)



(B)

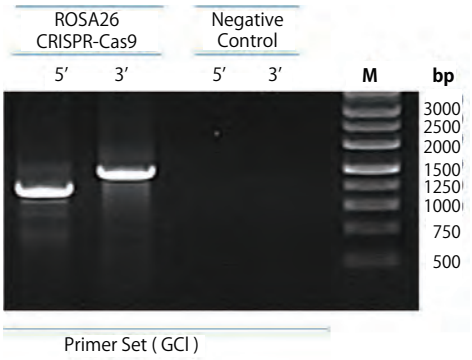


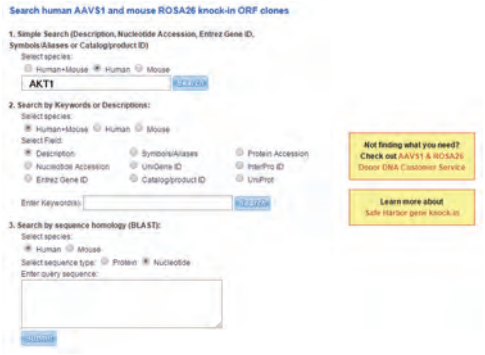
図10　マウスゲノムセーフ・ハーバーROSA26遺伝子標的
ROSA26 RFPコントロールプラスミド（品番：SH358）（800ng）をROSA26 All-in-Oneタイプ sgRNAクローン（600ng）とともに6ウェルプレートに播種したマウスNuero2a細胞にトランスフェクションした。コントロールとして、コントロールプラスミドSH358（800ng）のみを同様にトランスフェクションした。
（A）トランスフェクションの48時間後に細胞を1:10に分割して新しい6ウェルプレートに播種し、1.0μg/mℓのピューロマイシンを加えて選択を行った。画像は薬剤処理の2週間後に撮影した。ROSA26 RFPコントロールのみを導入した細胞のコロニーは、薬剤処理後ほとんど残らなかった。
（B）HR接合部分増幅用PCRプライマーを用いて特異的組換えが問題なく行われたか検証した。

Mouse ROSA26 safe harbor gene knock-in kit and clones

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号:GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Genome-CRISP™ ROSA26 safe harbor gene knock-in kit	SH054	1 kit	¥ 321,000	㊅
Genome-CRISP™ ROSA26 safe harbor gene knock-in kit (without donor)	SH050	1 kit	¥ 275,000	㊅

■ヒトAAVS1 and マウスROSA26ノックインORFクローン商品検索方法

1	GeneCopoeia社 ノックインORFクローン検索ページ（www.genecopoeia.com/product/search/index.php?prt=25）にアクセス
2	生物種を選択し、遺伝子名やアクセッション番号などを入力して検索 
3	検索結果よりご希望の遺伝子を選択
4	クローンの詳細情報で遺伝子名やアクセッション番号をご確認いただき、ページ下方に表示される表の品番をご利用の代理店へお伝えいただき、お見積をご依頼ください。クローンごとに価格が異なります。

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！
いつもお手元にハンドブック

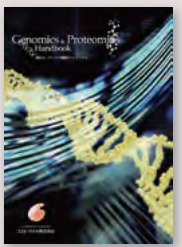
カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

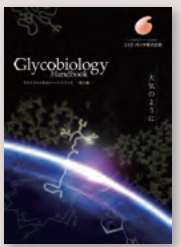
受託サービス
ハンドブック【第4版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】



遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

OriGene社

CRISPR/Cas9 AAVS1領域遺伝子挿入キット&ベクター

WEBへどうぞ
記事ID:15187

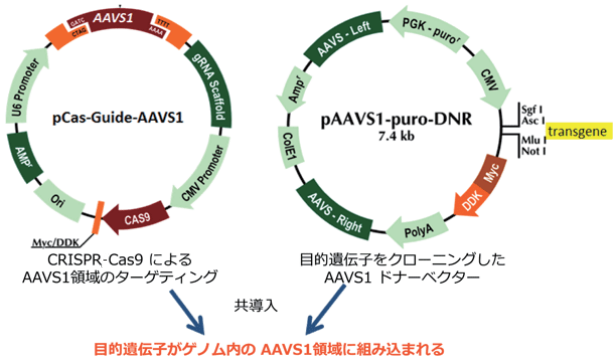
セーフ・ハーバー（安全領域）ノックインシステムで簡単ゲノム編集！

ヒトゲノム上のsafe harbor（セーフ・ハーバー／安全領域）であるAAVS1領域に目的の遺伝子を挿入するためのキットおよびベクターです。

ヒトゲノム内の AAVS1（Adeno-associated virus integration site 1）領域は、遺伝子導入による影響を受けにくい安全領域（セーフ・ハーバー／safe harbor）として知られています。AAVS1領域は様々な細胞で転写活性を有しており、確実で安定した導入遺伝子の発現が得られます。CRISPR/Cas9 システムは、AAVS1領域を標的として遺伝子を挿入するために最適な技術です。

特長

- AAVS1領域を標的として目的遺伝子を挿入
- 導入遺伝子の突然変異やランダムな挿入による影響がありません
- 導入遺伝子のソースとして、ゲノムワイドにヒト遺伝子を網羅するTrueORF® cDNAクローン（WEB 記事ID：3410）をご利用いただけます
- TrueORF®クローンからAAVS1ドナーベクターにインサートを簡単に交換可能（PrecisionShuttle™システム）



CRISPRを介したAAVS1領域（Safe Harbor）ノックインシステム

本システムには、下記の2種類のベクターが必要です。

1. **pCas-Guide-AAVS1**：AAVS1ターゲティング用All-in-one CRISPRベクター
   標的部位に二本鎖切断を導入します
2. **pAAVS1-Puro-DNR**：AAVS1ホモロジーアームを含む、目的遺伝子導入用ドナーベクター（目的遺伝子のクローニングが必要）
   二本鎖切断を導入した位置に目的遺伝子をノックインします

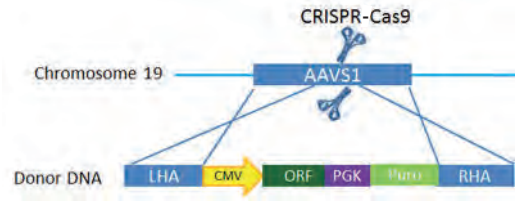


図1　CRISPRを介したAAVS1領域への遺伝子ノックイン概略図

■AAVS1遺伝子ノックインベクターキット

CRISPRを介してヒトAAVS1領域に目的遺伝子を挿入するためのベクターキットです。導入遺伝子をpAAVS1-puro-DNRベクターにクローニングする必要があります。

構成内容

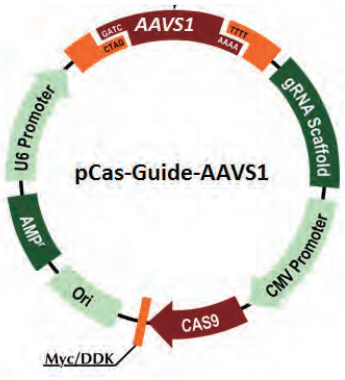
- pCas-Guide-AAVS1（品番：GE100023）
- pAAVS1-puro-DNR（品番：GE100024）
- pCas-Guide-scramble（品番：GE100003）

OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
AAVS1 Transgene knockin vector kit	GE100027	1 kit	￥258,000	㊒

■pCas-Guide-AAVS1

- ヒトAAVS1領域を標的とする検証済みCRISPRベクター
- AAVS1標的配列：GTTAATGTGGCTCTGGTTCT
- Cas9（CMVプロモーター）およびAAVS1 gRNA（U6プロモーター）を発現

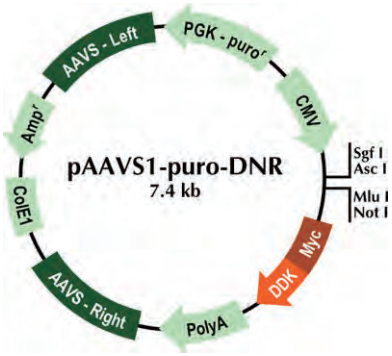


OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
pCas-Guide-AAVS1 vector	GE100023	10 µg	￥107,000	㊒

■pAAVS1-Puro-DNR

- ヒトAAVS1領域に目的遺伝子を挿入するためのドナーベクター
- AAVS1相同配列（左・右、各550 bp）を含む
- 導入遺伝子クローニング用のマルチクローニングサイト（TrueORF®クローンからのインサートの交換に対応）
- PGKプロモーター下にPuromycin耐性遺伝子を搭載
- pCas-Guide-AAVS1（品番：GE100023）との共導入により目的遺伝子をターゲット領域に挿入

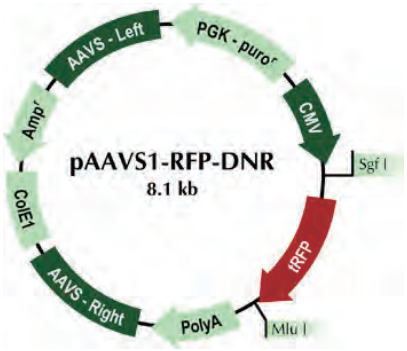


OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
pAAVS1-Puro-DNR vector	GE100024	10 µg	¥ 170,000	㊦

■pAAVS1-RFP-DNR

- PGK-puroおよびCMV-RFPを含むAAVS1ドナーベクター
- pCas-guide-AAVS1と共に使用してCRISPRノックインのポジティブコントロールに
- AAVS1相同配列（左・右、各550 bp）を含む
- pCas-guide-AAVS1（品番：GE100023）との共導入により、ヒトAAVS1領域にPGK-puroおよびCMV-RFPカセットを組み込み可能



OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
pAAVS1-RFP-DNR vector (Positive control)	GE100026	10 µg	¥ 97,000	㊦

第３章

CRISPR/Cas 9 タンパク質と抗体

タンパク質

SpCas9 タンパク質　Applied Biological Materials 社 …… p 58

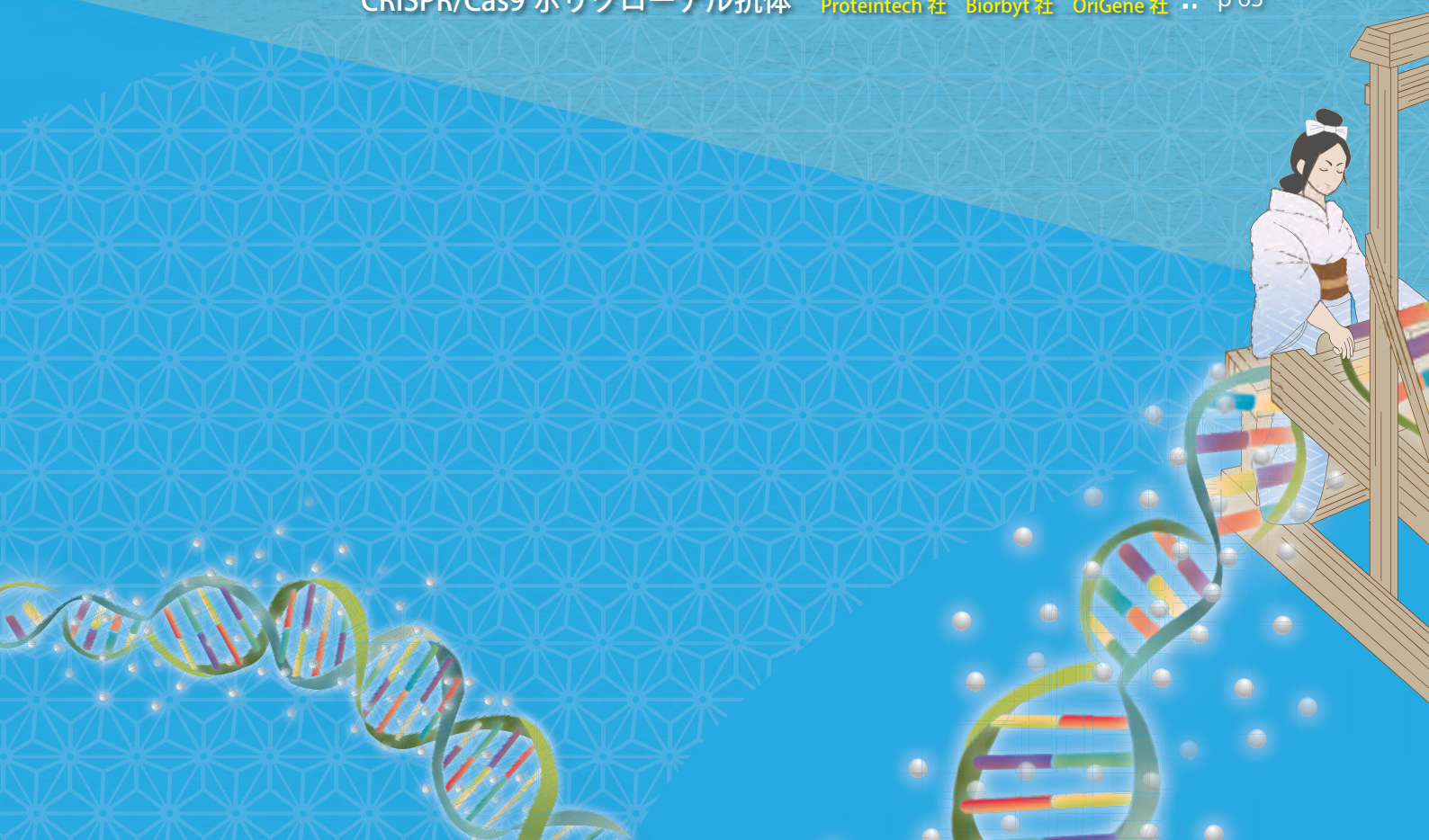
SaCas9 タンパク質　Applied Biological Materials 社 …… p 59

dCas9 タンパク質　Applied Biological Materials 社 …… p 61

抗体

Cas9 モノクローナル抗体　Santa Cruz 社　Applied Biological Materials 社 …… p 62

CRISPR/Cas9 ポリクローナル抗体　Proteintech 社　Biorbyt 社　OriGene 社 …… p 63



SpCas9タンパク質

Applied Biological Materials社

WEBへどうぞ
記事ID:15213

*in vivo*での高効率遺伝子改変にもご利用いただけます

背景

CRISPR/Cas9システムは、特異的なゲノムの破壊や置換などを可能にする最新のゲノム編集技術です。本システムでは、標的特異的なsgRNAによってCas9ヌクレアーゼタンパク質がsgRNA認識配列に誘導され、ゲノムDNA二本鎖をほどき、切断します。このDNA二本鎖切断によってNHEJのDNA修復機構が機能しますが、CRISPR/Cas9が過剰に発現していることによりエラーが生じ、フレームシフトすることで標的遺伝子のオープンリーディングフレーム破壊につながります。

仕様・構成内容

品名	Cas9 Protein	High Concentration Cas9 Protein
濃度	1000 nM	10 μM
容量	50 pmol(50 μl)	250 pmol(25 μl)
構成内容	● Cas9 Protein (1000 nM)　50 μl ● 10X Cas9 Protein Reaction Buffer　1.25 ml	● Cas9 Protein (10 μM)　25 μl ● 10X Cas9 Protein Reaction Buffer　1.25 ml
その他仕様	● **保存バッファー** ：10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, and 50% (v/v) Glycerol. ● **10X Cas9 Protein Reaction Buffer** ：200 mM HEPES, 50 mM MgCl, 1 M NaCl, 50 mM MgCl, 1 mM EDTA, pH 6.5. ● **タンパク質由来**：Recombinant *E. coli*.	

製品データ

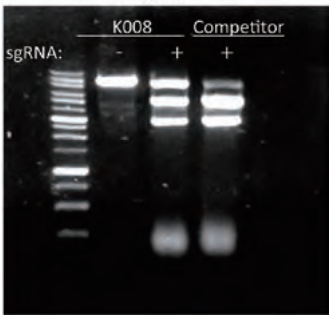


図1　Cas9のヌクレアーゼ活性の検証
（品番：K008）
8kbのDNA基質を分解した結果、～75%の効率でDNAが開裂され、～3kbと～5kbのバンドが形成された。

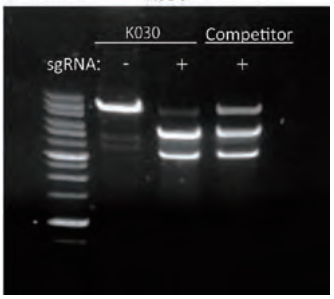
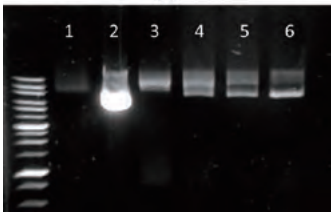


図2　Cas9のヌクレアーゼ活性の検証
（品番：K030）
8kbのDNA基質を分解した結果、～95%の効率でDNAが開裂され、～3kbと～5kbのバンドが形成された。



1 = freeze-thaw vector (not supercoiled)
2 = no sgRNA control (supercoiled)
3 = [100nM] of Cas9　5 = [25nM] of Cas9
4 = [50nM] of Cas9　6 = [10nM] of Cas9

図3　Cas9のヌクレアーゼ活性の検証
（品番：K034）
ニックが入り、Cas9濃度依存的にオープンサーキュラープラスミドが形成された。オープンサーキュラープラスミドは、スーパーコイルDNAと比較してよりゆっくりとゲル中を移動する。

結果
●Cas9もsgDNA存在下でのみ、DNAを開裂した
●品番：K008は開裂効率～75%、品番：K030は～95%を示した（図1、2参照）
●品番：K030は他社品よりも優れた開裂効率を示した（図2参照）
●品番：K034は濃度100nM、37℃、1時間インキュベートすると、100%のプラスミドにニックが入った（図3参照）

SpCas9 Protein

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
SpCas9 Nuclease Protein	K008	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 4,000	㊄
SpCas9 Nuclease NLS Protein	K030	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 4,000	㊄
SpCas9 Nickase D10A Protein	K032	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 8,000	㊄
SpCas9 Nickase D10A NLS Protein	K034	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 8,000	㊄
SpCas9 Nickase H840A Protein	K036	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 8,000	㊄
SpCas9 Nickase H840A NLS Protein	K038	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 8,000	㊄
SpCas9 Null Mutant Protein	K040	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 8,000	㊄
SpCas9 Null Mutant NLS Protein	K042	50 pmol（50 μl, 1000 nM）	¥ 8,000	㊄

High Concentration SpCas9 Protein

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
SpCas9 Nuclease Protein High Concentration	K108	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 13,000	㊄
SpCas9 Nuclease NLS Protein High Concentration	K130	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 13,000	㊄
SpCas9 Nickase D10A Protein High Concentration	K132	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 22,000	㊄
SpCas9 Nickase D10A NLS Protein High Concentration	K134	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 22,000	㊄
SpCas9 Nickase H840A Protein High Concentration	K136	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 22,000	㊄
SpCas9 Nickase H840A NLS Protein High Concentration	K138	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 22,000	㊄
SpCas9 Null Mutant Protein High Concentration	K140	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 22,000	㊄
SpCas9 Null Mutant NLS Protein High Concentration	K142	250 pmol（25 μl, 10 μM）	¥ 22,000	㊄

Applied Biological Materials社

saCas9 タンパク質

WEBへどうぞ
記事ID:18254

Staphylococcus aureus 由来、分子量の小さいCas9タンパク質

saCas9とは、*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌）に由来し、従来のspCas9（*Streptococcus pyogenes* Cas9）と比較して分子量の小さいCas9です。SpCas9はPAMとして5'-NGG-3'配列を認識しますが、SaCas9は5'-NNGRRT-3'（RはAまたはG）配列を認識します。

背景

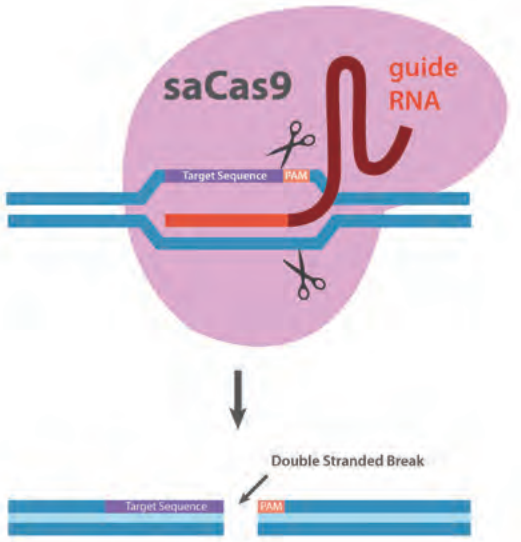
CRISPR/Cas9システムは、RNA依存性DNAエンドヌクレアーゼを利用した、特異的なゲノムの破壊や置換などを可能にする最新のゲノム編集技術です。

Cas9ヌクレアーゼは、ガイド配列を持つsgRNA依存的に任意のDNA配列を認識することにより、PAMと呼ばれる特定の配列の近傍のゲノムDNAを切断します。

二本鎖DNAの切断は非相同末端結合（NHEJ）により修復されますが、CRISPR/Cas9 が過剰に発現していることによりエラーが生じ、遺伝子の欠失や挿入が起こることでORFが破壊されて標的遺伝子はノックアウトされます。また、修復に適した相補鎖があれば相同組み換え修復（HDR）が起こりますので、これを利用して目的の配列を持つ遺伝子断片を導入してノックインを誘導することも可能です。

Streptococcus pyogenes（化膿レンサ球菌）由来のspCas9は、PAM配列の利便性から非常に使いやすいツールとして広く用いられていますが、一方でサイズの大きさからウィルスベクターへの導入効率が課題となっていました。*Staphylococcus aureus* 由来のsaCas9は、spCas9よりも短い配列でゲノム編集効率を低下させず、かつウイルスベクター技術を利用できる Cas9 として注目を集めています。

（Ran FA *et al*. *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature*. 2015.）



仕様・構成内容

品名	saCas9 Protein	High Concentration saCas9 Protein
濃度	1000 nM	10 µM
容量	50 pmol(50 µl)	250 pmol(25 µl)
構成内容	● saCas9 Nuclease Protein　50 µl ● 10X Cas9 Reaction Buffer　1.25 ml	● saCas9 Nuclease Protein　25 µl ● 10X Cas9 Reaction Buffer　1.25 ml
その他仕様	● 保存バッファー ：10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, 50% (v/v) Glycerol. ● 10X Cas9 Reaction Buffer ：200 mM HEPES, 50 mM $MgCl_2$, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, pH 6.5 ● タンパク質由来 ：Recombinant *E. coli*.	

saCas9 Protein

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名／由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
saCas9 Nuclease Protein, *Staphylococcus aureus*	K044	50 pmol (50 µl, 1000 nM)	¥ 9,000	㊦
saCas9 Nuclease NLS Protein, *Staphylococcus aureus*	K045	50 pmol (50 µl, 1000 nM)	¥ 9,000	㊦
saCas9 Null Mutant Protein, *Staphylococcus aureus*	K046	50 pmol (50 µl, 1000 nM)	¥ 9,000	㊦
saCas9 Null Mutant NLS Protein, *Staphylococcus aureus*	K047	50 pmol (50 µl, 1000 nM)	¥ 9,000	㊦

High Concentration saCas9 Protein

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名／由来	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
saCas9 Nuclease Protein, High Concentration, *Staphylococcus aureus*	K144	250 pmol (25 µl, 10 µM)	¥ 25,000	㊦
saCas9 Nuclease NLS Protein, High Concentration, *Staphylococcus aureus*	K145	250 pmol (25 µl, 10 µM)	¥ 25,000	㊦
saCas9 Null Mutant Protein, High Concentration, *Staphylococcus aureus*	K146	250 pmol (25 µl, 10 µM)	¥ 25,000	㊦
saCas9 Null Mutant NLS Protein, High Concentration, *Staphylococcus aureus*	K147	250 pmol (25 µl, 10 µM)	¥ 25,000	㊦

Lucigen®
Simplifying Genomics

Lucigen Corporation.　メーカー略号：LUC

ヌクレアーゼ、ポリメラーゼ等
各種酵素のバルク製造を承ります！

高品質 AsCpf1 Nuclease をご提供

Lucigen 社 AsCpf1 Nuclease

- *Acidaminococcus sp.* BV3L6 由来ヌクレアーゼ
- 大腸菌で作製したリコンビナントタンパク質
- C 末端に 2x 核移行シグナル (NLS) と 6x His タグを含む
- ISO 13485 に準拠した製造システム

CRISPR/Cas9 sgRNA プラスミドや
不安定なウイルス配列のクローニングに最適！

Endura™ Competent Cell

サンプルあります

- レンチウイルスプラスミドベクターのクローニングおよび増殖に最適
- CRISPR/Cas9 sgRNA レンチウイルスプラスミドライブラリー作製（GeCKO v2.0 plasmid libraries : 下記の文献参照）に推奨されています。

記事 ID 検索 9462

参考文献：
Science. 2014 Jan 3;343(6166):84-7. doi: 10.1126/science.1247005. Epub 2013 Dec 12. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells.
[PMID:24336571]

図 . GeCKO ライブラリーの構築に使用されている Endura™ コンピテントセルの安定性。
レーン 1/ レーン 2：別々のライブラリーを Endura™ コンピテントセル中で 37℃の条件で調製した。
レーン 3：ライブラリー 1 を Endura™ コンピテントセル中で 32℃の条件で調製した。
組換えは 37℃で顕著に表れている。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

Applied Biological Materials社

dCas9タンパク質

WEBへどうぞ
記事ID:32925

GFPとNLSを有するCas9ヌル変異体タンパク質

dCas9タンパク質は切断ドメインが非活化されているCas9ヌル変異体で、CRISPR/Cas9系のコントロールとして利用できます。本製品は、dCas9タンパク質に核移行配列（NLS：Nuclear Localization Sequence）およびGFPが結合しているため、トランスフェクションの視認や細胞からのCas9除去の確認が可能です。

背景

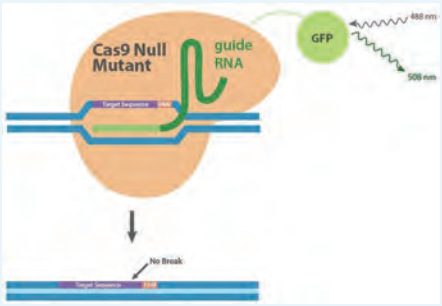
CRISPR/Cas9システムは、RNA依存性DNAエンドヌクレアーゼを利用した、特異的なゲノムの破壊や置換などを可能にする最新のゲノム編集技術です。

dCas9タンパク質（D10AおよびH840A）は、野生型Cas9がもつ2つの切断ドメインの両方に変異を導入して作成されています。ガイドRNAを介したゲノムDNAへの結合能は残っていますが、Cas9のヌクレアーゼ活性およびニッカーゼ活性は欠失しているためゲノム編集を行うことはなく、CRISPR実験におけるネガティブコントロールとして有用です。また、dCas9タンパク質の結合は転写の障害となるため、遺伝子発現の可逆的なノックダウンのためのツールとしても活用できます。

本製品のCas9には、*Streptococcus pyogenes*（化膿レンサ球菌）に由来するspCas9を使用しています。

特長

- フローサイトメトリーによる検出やスクリーニングにもご利用いただけます
- SV40 T抗原のNLSをC末端側に有しています



仕様・構成内容

品番	K086	K186
濃度	1000 nM	10 µM
容量	50 pmol（50 µℓ）	250 pmol（25 µℓ）
構成内容	● Cas9 Null Mutant GFP NLS Protein 50 µℓ ● 10X Cas9 Reaction Buffer 1.25 mℓ	● Cas9 Null Mutant GFP NLS Protein 25 µℓ ● 10X Cas9 Reaction Buffer 1.25 mℓ
その他仕様	● 保存バッファー ：10 mM Tris-HCl （pH 7.4）, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 300 mM NaCl, and 50% （v/v） Glycerol. ● 10X Cas9 Reaction Buffer ：200 mM HEPES, 50 mM MgCl2, 1 M NaCl,1 mM EDTA, pH 6.5. ● タンパク質由来 ：Recombinant *E. coli.*	

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cas9 Null Mutant GFP NLS Protein	K086	50 pmol（50 µℓ）	¥ 9,000	㊒
Cas9 Null Mutant GFP NLS Protein High Concentraion	K186	250 pmol（25 µℓ）	¥ 25,000	㊒

■関連商品

SpCas9ヌル変異体タンパク質

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cas9 Null Mutant NLS Protein	K042	50 pmol（50 µℓ, 1000 nM）	¥ 8,000	㊒
Cas9 Null Mutant NLS Protein High Concentraion	K142	250 pmol（25 µℓ, 10 µM）	¥ 22,000	㊒
Cas9 Null Mutant Protein	K040	50 pmol（50 µℓ, 1000 nM）	¥ 8,000	㊒
Cas9 Null Mutant Protein High Concentraion	K140	250 pmol（25 µℓ, 10 µM）	¥ 22,000	㊒

SaCas9ヌル変異体タンパク質

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
saCas9 Null Mutant NLS Protein , *Staphylococcus aureus*	K047	50 pmol（50 µℓ, 1,000 nM）	¥ 9,000	㊒
saCas9 Null Mutant NLS Protein, High Concentration , *Staphylococcus aureus*	K147	250 pmol（25 µℓ, 10 µM）	¥ 25,000	㊒
saCas9 Null Mutant Protein , *Staphylococcus aureus*	K046	50 pmol（50 µℓ, 1,000 nM）	¥ 9,000	㊒
saCas9 Null Mutant Protein, High Concentration , *Staphylococcus aureus*	K146	250 pmol（25 µℓ, 10 µM）	¥ 25,000	㊒

Cas9モノクローナル抗体

Cas9タンパク質発現確認に

■マウスモノクローナルCas9抗体（Santa Cruz社 / メーカー略号：SCB）

Cas9抗体（7A9-3A3）は*Streptococcus pyogenes* のリコンビナントCas9タンパク質を抗原として作製されています。
Cas9抗体（7A9-3A3）はトランスフェクションレベルのトータルCas9タンパク質の検出に有用です。

免疫動物	マウス（モノクローナル）
抗原	N-terminal region of Cas9 of *Streptococcus pyogene*
適用	ウエスタンブロット（WB）、免疫染色（IHC）、フローサイトメトリー（FC）、免疫沈降（IP）
推奨希釈倍率	WB：1:100～1,000 IHC：1:50～500

フォローサイトメトリーの場合、1μg／1×10^6 cellsからご検討ください。
免疫沈降の場合、1～2μg／1～500μgトータルタンパク質からご検討ください。

サンプル包装有ります
営業部 03-5632-9610 までお問い合わせください。

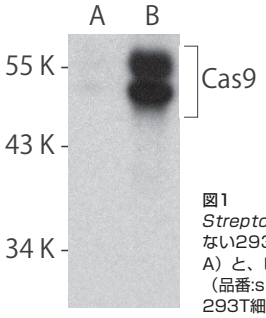


図1
Streptococcus pyogenes にCas9を発現させていない293T細胞ライセート（品番:sc-117752、図中A）と、ヒトSQSTM1 CRISPR/Casp KOプラスミド（品番:sc-400099、図中B）をトランスフェクトした293T細胞ライセートのウェスタンブロット結果。

Santa Cruz Biotechnology, Inc.【メーカー略号:SCB】

品名	品番	交差性	免疫動物（クローン）	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Cas9（7A9-3A3）	SC-517386	*Streptococcus pyogenes*	mouse（7A9-3A3）	200 μg（200 μg/mℓ）	¥ 58,000	㊄

■マウスモノクローナルCas9抗体（Applied Biological Materials 社／メーカー略号：APB）

免疫動物	マウス（モノクローナル）
抗原	Recombinant fragment corresponding to Cas9 endonuclease from *Streptococcus pyogenes*.
適用	ELISA, ウエスタンブロット
濃度	100μg / 100μℓ
バッファー	PBS, pH 7.4 with 0.02% sodium azide.
Isotype	IgA
精製方法	アフィニティ精製

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号:APB】

品名	品番	交差性	免疫動物（クローン）	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Cas9	Y300079	*Streptococcus pyogenes*	mouse	100 μℓ	¥ 39,000	㊆

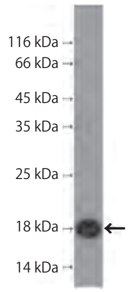
CRISPR/Cas9ポリクローナル抗体

WEBへどうぞ
記事ID：14578

ゲノム編集ツールとして注目されているCRISPR/Cas9に対するポリクローナル抗体です。ウェスタンブロット（WB）、免疫沈降（IP）などにご使用いただけます。

■ウサギポリクローナルCas9抗体（Proteintech社／メーカー略号：PGI）

免疫動物	ウサギ（ポリクローナル）
抗原	Cas9 Fusion Protein（品番：AG25281）
種反応性	細菌
適用	ウエスタンブロット, ELISA
推奨希釈倍率	WB：1:1000-1:10000
バッファー	PBS with 0.1% sodium azide and 50% glycerol pH 7.3.
精製方法	抗原アフィニティ精製



ウェスタンブロット（WB）
リコンビナントタンパク質を SDS-PAGE により分離し、本抗体を用いてウェスタンブロットを行った（希釈倍率 1:3000）。

Proteintech Group, Inc.【メーカー略号:PGI】

品名	品番	免疫動物	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti Cas9	26758-1-AP	rabbit	150 μℓ	￥ 64,000	㊉凍

■ウサギポリクローナルCRISPR/Cas9抗体（Biorbyt社／メーカー略号：BRT）

免疫動物	ウサギ（ポリクローナル）
純度	Protein A アフィニティ精製
バッファー	1 X TBS (pH7.4), 0.5% BSA, 40% グリセロール
特異性	CRISPR/Cas9 特異的
ターゲット	CRISPR/Cas9

Biorbyt Ltd.【メーカー略号:BRT】

品名	品番	免疫動物	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CRISPR/Cas9	ORB195937	rabbit	100 μℓ	￥ 115,000	㊉凍

■ウサギポリクローナルCAS9抗体（OriGene社／メーカー略号：ORG）

免疫動物	ウサギ（ポリクローナル）
抗原	KLH とコンジュゲートしたCAS9 合成ペプチド（S. Pyogenes 由来cas9 1150-1200残基）
種反応性	S. Pyogenes
濃度	1.00mg/mℓ
適用	WB（ウェスタンブロット），IP（免疫沈降）
推奨希釈倍率	WB 1:500
バッファー	PBS (PH 7.3), 1% BSA, 50% グリセロール, 0.02% アジ化ナトリウム
純度	アフィニティ精製

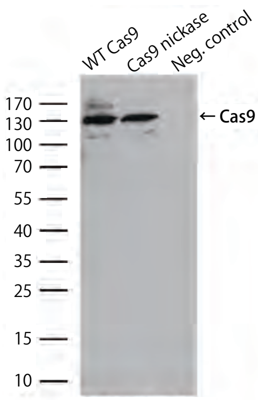


図1　ウェスタンブロット（WB）
ＷＴ　ＣＡＳ９プラスミド（左、品番：GE100002）、CAS9ニッカーゼ プラスミド（中央、品番：GE100019）、コントロールプラスミド（右、品番：PS100001）のいずれかを、HEK293T細胞にトランスフェクションした。各細胞ライセートを等量ずつアプライし、（10μg／レーン）本抗体でイムノブロットを行った（希釈倍率 1:2000）。

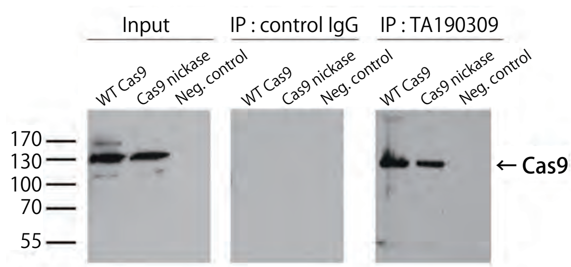


図2　免疫沈降（IP）
本抗体を用いて、WT Cas9およびCas9ニッカーゼの免疫沈降を行った。WT CAS9プラスミド（品番：GE100002）、CAS9ニッカーゼ プラスミド（品番：GE100019）、コントロールプラスミド（品番：PS100001）のいずれかを、HEK293T細胞にトランスフェクションした。
Input：細胞ライセート10μgを用いて、本抗体でウェスタンブロットを行った（希釈倍率 1:2000）。
IP　：細胞ライセート100μgを用いて、本抗体／コントロール抗体20μg、Protein Gビーズ 5μgで免疫沈降した。マウス抗DDKモノクローナル抗体（品番：TA50011）でウェスタンブロットを行い、免疫沈降したCas9を検出した（Myc-DDKタグCas9）。

OriGene Technologies, Inc.【メーカー略号:ORG】

品名	品番	免疫動物	包装	希望販売価格	貯蔵
Anti CAS9	TA190309	rabbit	100 μℓ（1.00 mg/mℓ）	￥ 99,000	㊉凍

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

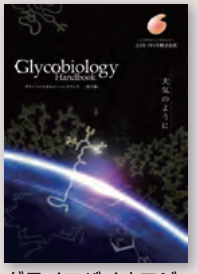
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第４版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

第４章

ゲノム編集効率改善

技術情報

- 小分子による CRISPR/Cas9 ゲノム編集の促進 Xcess Biosciences 社 ..... p 66
- SCR7（NHEJ inhibitor） Xcess Biosciences 社 ..... p 67
- L755,507 HDR Enhancer Xcess Biosciences 社 ..... p 68
- L755,507 HDR Enhancer Santa Cruz 社 ..... p 68
- Azidothymidine（AZT）-Reverse Transcriptase Inhibitor Xcess Biosciences 社 ..... p 69
- RS-1 (CRISPR Editing Enhancer) Xcess Biosciences 社 ..... p 69

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

小分子による CRISPR/Cas9ゲノム編集の促進

WEBへどうぞ
記事ID：15167

SCR7でNHEJを抑制、L755,507でHDRの効率アップ、AZTでindel変異を促進！

Xcess Biosciences, Inc.
メーカー略号：XCB

SCR7（67ページ参照）は、ヒトおよびマウス細胞株でCRISPR/Cas9ゲノム編集ツールと同時に利用すると非相同性末端結合（NHEJ）経路を抑制し、相同組換え（HDR）効率を**4〜5倍**促進できることが報告されました[1]。

SCR7は非相同性末端結合（NHEJ）の強力かつ選択的な阻害剤です。無細胞のDNA修復システムにおいてDNA二本鎖切断（DSB）の連結を阻害し、T4リガーゼやリガーゼIには関与しないもののリガーゼIVが介する連結はそのDNA結合を干渉して遮断することから、細胞内におけるDSBの蓄積を導きます。このSCR7は、哺乳動物細胞においてCRISPR/Cas9システムを利用した遺伝子編集が正確になされる頻度を改善することができる、非常に有用なツールです。Xcess Biosciences社は、2013年より機能的なSCR7を他社に先駆けて販売しています。

SCR7以外にも、小分子L755,507により、CRISPR/Cas9が介在する相同組換え（HDR）効率を長鎖断片挿入において**3倍**、点変異では**9倍**も促進できることが報告されています[2]。Yu Cらの研究では、L755,507（68ページ参照）を5 μM使用した場合に最大効果が得られ、最初の24時間以内に至適活性が見られています。

他の逆転写酵素阻害剤であるAzidothymidine（AZT）（69ページ参照）は、5 μMにおいて相同組換え（HDR）効率を3倍低下することができます。また、非相同性末端結合（NHEJ）を介するフレームシフト挿入欠失（indel）変異を促進することができます。これらの小分子の毒性は非常に低く、多様な細胞種において機能を示すことから、多量の鋳型を介する遺伝子挿入や一本鎖オリゴヌクレオチド（ssODN）を介するSNPs編集においてもゲノム編集効率の促進に利用できると考えられます。

参考文献

1. Chu VT, *et al*. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR/Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. (2015) *Nat Biotechnol*. In press.
2. Yu C, *et al*. Small Molecules Enhance CRISPR Genome Editing in Pluripotent Stem Cells. (2015) *Cell Stem Cell* 16(2), 142.

良いコウタイがー
あっタイガ〜！

抗体百科
■ 探しま章 Web 検索データベース
100 万品目以上の品ぞろえ、主要な約 12,000 ターゲットの抗体を国内に在庫。
■ 作りま章 抗体作製受託サービス
お客様とのコミュニケーションを大切にし、高い技術力であらゆるニーズに対応。
コスモ・バイオの抗体百科に Go！ www.cosmobio.co.jp

コスモ・バイオ株式会社 お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610 FAX: 03-5632-9619 E-mail: mail@cosmobio.co.jp

Xcess Biosciences社

SCR7（NHEJ inhibitor）

WEBへどうぞ
記事ID:15104

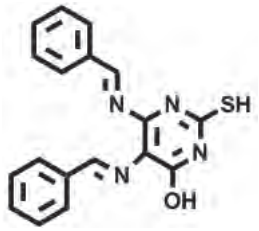
NHEJを阻害してCRISPR/Cas9システムでの相同組換え効率を促進

SCR7は、非相同末端結合（NHEJ）の強力かつ選択的な阻害剤で、CRISPR/Cas9システムと組み合わせて使用することで相同組換え効率を促進します。

SCR7は、Ligase IVのDNA結合をブロックすることで、無細胞DNA修復機構における二本鎖切断（DSB）結合を阻害します。細胞内でLigase IV依存的なNHEJを阻害し、結果として細胞内に二本鎖切断（DSB）が蓄積し、内因性のアポトーシス経路を活性化されて細胞毒性を生じます。さらに重要な役割として、SCR7はマウスモデルにおける腫瘍進行を妨害し、二本鎖切断（DSB）誘導治療法において並行投与するとその感度を大幅に向上させます。

また、SCR7をCRISPR/Cas9ゲノム編集システムで使用すると、ヒトとマウスの細胞株両方でHDR（相同組換え）効率が4～5倍に促進されます。

SCR7の詳細情報



分子量	334.39
組成	$C_{18}H_{14}N_4OS$
CAS番号	1533426-72-0
溶解性	DMSO up to 50 mM
化合物名	5,6-bis((E)-benzylideneamino)-2-mercaptopyrimidin-4-ol

使用方法

用途	用法
In vitro	SCR7を終濃度20-150 μMで使用 （*in vitro*および細胞内アッセイ）
In vivo	SCR7をマウス腹腔内投与（IP） （at 20 ㎎/㎏ once per day）

参考文献

1. Srivastava M, *et al*. (2012) *Cell*. 151(7):1474-87.[PMID : 23260137]
2. Chu VT, *et al*. (2015) *Nat Biotechnol*. [PMID : 25803306].

製品使用文献

1. Genomic Tagging in mammalian cells
   K Förstemann, G Center - foerstemann.genzentrum.lmu.de
2. Genomic Tagging in Drosophila cells
   K Förstemann, G Center - foerstemann.genzentrum.lmu.de
3. A Mouse Geneticist's Practical Guide to CRISPR Applications
   P Singh, JC Schimenti, E Bolcun-Filas - Genetics, 2015 - Genetics Soc America 4.
4. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR/Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. (2015) *Nat Biotechnol*. In press.Chu VT, *et al*.
5. Small Molecules Enhance CRISPR Genome Editing in Pluripotent Stem Cells. (2015) *Cell Stem Cell* 16(2), 142.Yu C, *et al*.

よくある質問Q&A

【01】マウスにSCR7を投与する時の溶媒は？

【Xcess Biosciences社の回答】

SCR7の文献（Cell, 2012）には溶媒まで記載がありません。文献著者に問い合わせいただくか、いくつか一般的な処方をお試しください。

→【お客様の懸念事項】

文献ではおそらくDMSOを使用していると思いますが、DMSOではマウスが耐えられない可能性があると考えられます。我々は、tamoxifenをマウス腹腔内注射する時に溶媒として植物油（疎水性）を使用していますが、SCR7でもワークするでしょうか？

→【コンサルティング後のお客様の解決方法】

化合物を水/メチルセルロースで溶解します。数日間であれば冷蔵保管可能です。

【02】大容量のSCR7（例：100㎎）を小分け包装（例：5㎎）にして販売できますか？

SCR7を固体として保管し、正確に秤量してから正しい投与量に溶解した方が良いでしょう。SCR7は、緩い粉末なので、～1㎎までなら容易に量り取ることが出来ます。Xcess Biosciences社では、5㎎や5㎎以上の量を～1㎎までの量で正確に秤量できます（accuracy beyond 0.1㎎ scale）。ただし、大きな容量でご注文になる前に、小包装サイズをお客様の系でお試しいただくことを推奨致します。Xcess Biosciences社がお客様からフィードバックを頂いた中には、求める結果を得られた方とそうでない方がおり、アッセイ系に依存すると考えられます。

【03】SCR7はエタノールに溶解しますか？
DMSOは卵母細胞に対する毒性が非常に高いので、エタノールで溶解することを考えています。

溶解性は、DMSO 38㎎/㎖、水・エタノール＜1㎎/㎖です。

Xcess Biosciences, Inc.【メーカー略号:XCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
SCR7	M60082-2S	2 ㎎	￥36,000	㊄

Xcess Biosciences社

L755,507 HDR Enhancer

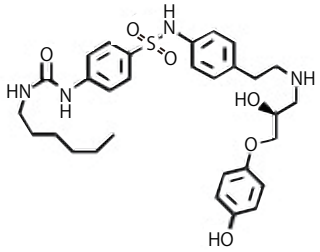
WEBへどうぞ
記事ID:15075

ヒトiPS細胞で相同組換え効率を促進

L755,507は、強力かつ選択的なβ3アドレナリン受容体のパーシャルアゴニストです（EC_{50}～0.43 nM）。β1、β2アドレナリン受容体よりも1000倍の選択性をもっています（EC_{50}～580 nM and ＞10000 nM for β1- and β2-adrenoceptors respectively）。また、*in vitro*でアカゲザル脂肪細胞の脂肪分解を刺激します（EC_{50}=3.9 nM）。

近年の研究では、L755,507がCRISPR介在性の相同組換え（HDR）効率をヒトiPS細胞やその他細胞種で促進することが報告されています。

L755,507の詳細情報



分子量	584.73
組成	$C_{30}H_{40}N_4O_6S$
CAS番号	159182-43-1
溶解性	DMSO up to 100 mM
化合物名	(S)-4-(3-hexylureido)-N-(4-(2-((2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl)amino)ethyl)phenyl) benzenesulfonamide

使用方法

用途	用法
In vitro	L755,507を終濃度1-5 μM で使用（様々な*in vitro*アッセイ）
In vivo	L755,507をアカゲザル（*rhesus monkeys*）に0.1㎎/㎏で急速投与後、30%の代謝率を刺激

参考文献

1. Fisher MH, *et al.* (1998) *J Clin Invest.*101(11):2387-93. [PMID : 9616210]
2. Parmee ER, *et al.* (1998) *Bioorg Med Chem Lett.* 8(9):1107-12. [PMID : 9871717]
3. Yu C, *et al.* (2015) *Cell Stem Cell.*16(2):142-7. [PMID : 25658371]

Xcess Biosciences, Inc.【メーカー略号:XCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
L755,507, CRISPR Editing Enhancer	M60237-2S	2 ㎎	￥ 28,000	㊐

Santa Cruz社

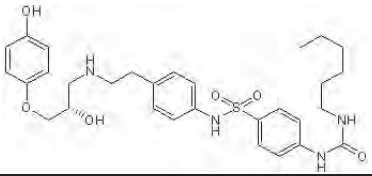
L755,507 HDR Enhancer

WEBへどうぞ
記事ID:15121

iPS細胞でのゲノム編集－相同組み換え効率を向上

L755,507は、ヒトiPS細胞でCRISPR/Cas9による相同組換え（HDR：homology-directed repair）効率を促進します。また、L755,507は、β3アドレナリン受容体（β3-AR）の強力かつ選択的なパーシャルアゴニストで、β1アドレナリン受容体（β1-AR）やβ2アドレナリン受容体（β2-AR）よりも選択的に結合します。

詳細情報

別名	4-[[(Hexylamino)carbonyl]amino]-N-[4-[2-[[(2S)-2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenoxy)propyl]amino]ethyl]phenyl]-benzenesulfonamide
アプリケーション	An enhancer of CRISPR-mediated HDR efficiency
CAS番号	159182-43-1
分子量	584.73
分子組成	$C_{30}H_{40}N_4O_6S$
構造	

参考文献

1. Parmee, E.R, *et al. Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8(9): 1107-1112. PMID: 9871717
2. Fisher, M.H, *et al. J. Clin. Invest.* 101(11): 2387-2393. PMID: 9616210

Santa Cruz Biotechnology, Inc.【メーカー略号:SCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
L-755,507	SC-204045	10 ㎎	￥ 34,000	㊐
	SC-204045A	50 ㎎	￥ 147,000	㊐

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

Xcess Biosciences社

Azidothymidine（AZT）- Reverse Transcriptase Inhibitor

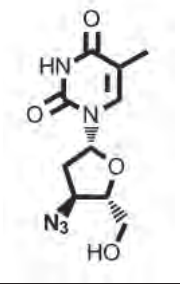
WEBへどうぞ
記事ID：15086

CRISPRでの遺伝子ノックアウトを促進

Azidothymidine（AZT）は、脳浸透性かつ経口投与可能な逆転写酵素阻害剤で、DNA polymerase αへの作用に対してHIV逆転写酵素に100倍の選択性を有します。HIV-1複製を抑制し、HIV-1感染T細胞株における細胞生存率を高めます。また、多発性骨髄腫（MM：multiple myeloma）細胞株の増殖を抑制し、マウスでのMM腫瘍の異種移植片の成長を低下させます。

最近の研究では、Azidothymidine（AZT）はヒト人工多能性幹細胞（iPS細胞）、および他の細胞種においてCRISPR/Cas9によるNHEJを介した遺伝子ノックアウトを促進することが報告されています。

Azidothymidine（AZT）の詳細情報



分子量	267.24
組成	$C_{10}H_{13}N_5O_4$
CAS番号	30516-87-1
溶解性	DMSO up to 100 mM, Water up to 50 mM
化合物名	1-((2R,4S,5S)-4-azido-5-(hydroxymethyl) tetrahydrofuran-2-yl)-5-methylpyrimidine-2,4 (1H,3H)-dione

使用方法

用途	用法
In vitro	Azidothymidine（AZT）を終濃度5-30 μM で使用（様々な*in vitro*アッセイ）
In vivo	Azidothymidine（AZT）をマウスに経口投与（at 10-50 mg/kg orally once per day）

参考文献

1. Mitsuya H, *et al.* (1985) *Proc Natl Acad Sci USA.* 82(20):7096-100. [PMID : 2413459]
2. Furman PA, *et al.* (1986) *Proc Natl Acad Sci USA.* 83(21):8333-7. [PMID :2430286]
3. Broder S, *et al.* (2010) *Antiviral Res.* 85(1):1-18. [PMID : 20018391]
4. Pereira J, *et al.* (2013) *Anticancer Agents Med Chem.* 13(1):186-92. [PMID : 22931421]
5. Yu C, *et al.* (2015) *Cell Stem Cell.*16(2):14 2-7. [PMID : 25658371]

Xcess Biosciences, Inc.【メーカー略号:XCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Azidothymidine (AZT), Reverse Transcriptase Inhibitor	M60238-2S	2 mg	￥ 14,000	㊒

Xcess Biosciences社

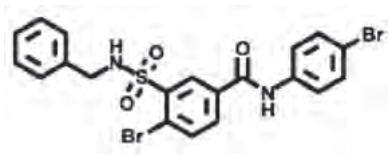
RS-1 (CRISPR Editing Enhancer)

WEBへどうぞ
記事ID：16704

相同組換え（HDR）を促進させ、CRISPR/Cas9システムでノックイン効率を向上

これまでRS-1はRAD51を刺激する化合物であると特徴づけられていましたが、HDRを促進し、CRISPR/Cas9やTALEN介在性のノックイン効率を向上させることが分かってきました。ノックイン効率は異なる遺伝子座において2～5倍に促進されますが、その一方で非相同末端結合（NHEJ:Non-homologous end joining）阻害剤のSCR7はほとんど影響しません。RS-1は動物生産にも適用することが出来、ノックイン比率が数倍に改善されました。

RS-1の詳細情報



分子量	524.23
組成	$C_{20}H_{16}Br_2N_2O_3S$
CAS番号	312756-74-4
溶解性	DMSO up to 100 mM
化合物名	3-（N-benzylsulfamoyl）-4-bromo-N-（4-bromophenyl）benzamide

使用方法

用途	用法
In vitro	RS-1を終濃度15 μMで使用（TALEN もしくは Cas9によるKnock-in 実験）
In vivo	RS-1を動物に腹腔内投与（IP）（at 110 mg/kg once per day）

参考文献

1. Jayathilaka K, *et al.* (2008) *Proc Natl Acad Sci USA.* 105(41):15848-53.
2. Mason JM, *et al.* (2014) *Cancer Res.* 74(13):3546-55.
3. Song J, *et al.* (2016) *Nat Commun.* 7:10548.

Xcess Biosciences, Inc.【メーカー略号:XCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
RS-1, CRISPR Editing Enhancer	M60300-2S	2 mg	￥ 25,000	㊒

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

好評配布中！

コスモ・バイオニュース

ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！
www.cosmobio.co.jp

毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

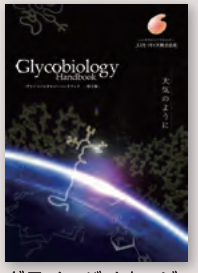
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第４版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

第５章

ゲノム編集受託サービス

カスタム sgRNA/HDR テンプレート ..... p 72

- Genome-CRISP™ Custom CRISPR/Cas9 受託サービス　GeneCopoeia 社
- CRISPR ノックイン用 HDR テンプレート作製受託サービス　Applied Biological Materials 社
- レンチウイルス CRISPR コンストラクト作製受託サービス　Cellecta 社
- CRISPR/Cas9 All-in-One NickaseNinja™ Vector　ATUM 社

実験動物のゲノム編集 ..... p 78

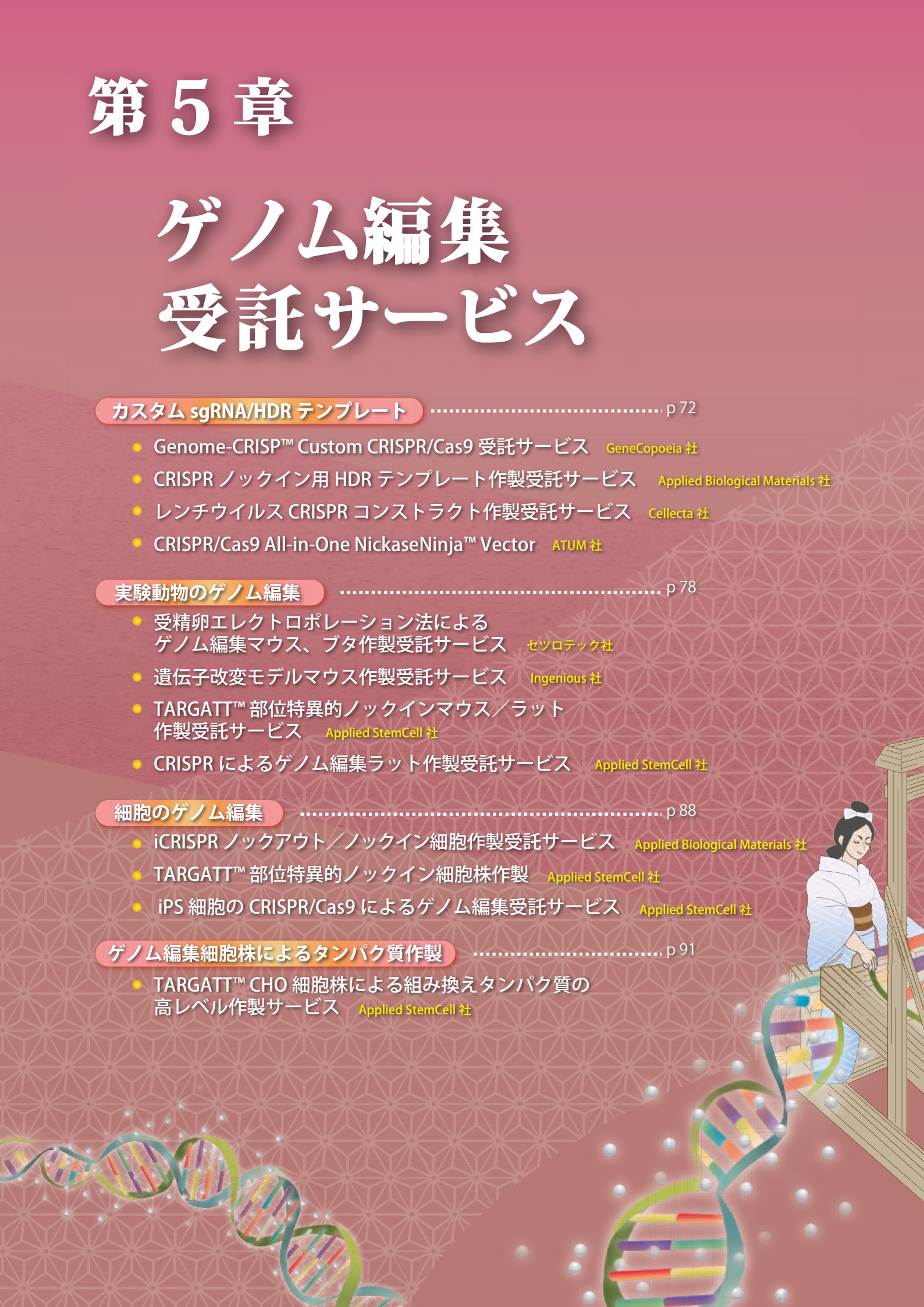
- 受精卵エレクトロポレーション法による ゲノム編集マウス、ブタ作製受託サービス　セツロテック社
- 遺伝子改変モデルマウス作製受託サービス　Ingenious 社
- TARGATT™ 部位特異的ノックインマウス／ラット 作製受託サービス　Applied StemCell 社
- CRISPR によるゲノム編集ラット作製受託サービス　Applied StemCell 社

細胞のゲノム編集 ..... p 88

- iCRISPR ノックアウト／ノックイン細胞作製受託サービス　Applied Biological Materials 社
- TARGATT™ 部位特異的ノックイン細胞株作製　Applied StemCell 社
- iPS 細胞の CRISPR/Cas9 によるゲノム編集受託サービス　Applied StemCell 社

ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製 ..... p 91

- TARGATT™ CHO 細胞株による組み換えタンパク質の 高レベル作製サービス　Applied StemCell 社



GeneCopoeia社

Genome-CRISP™ Custom CRISPR/Cas9受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID:12069

部位特異的にゲノム編集できる次世代遺伝子改変ツール！

FAQあります

CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats）は真性細菌および古細菌が持つファージやプラスミドに対する獲得免疫システムで機能するDNA配列であり、Casタンパク質ファミリーと組み合わせて一般にCRISPR/Cas9システムと称されます。近年このシステムを用いたゲノム編集がゼブラフィッシュ、マウス、ラット、植物、細菌等で行われ、TALENやZFNに代わる可能性を秘めた技術として注目されています。

CRISPR/Cas9システムは3種類存在していますが、ゲノム編集にはCas9タンパク質を利用したII型が用いられ、crRNAとtracrRNAが相互作用することでCas9エンドヌクレアーゼを標的DNA配列に誘導し、二本鎖切断を引き起こします。このシステムはcrRNAとtracrRNA配列を融合してsingle-guided RNA（sgRNA）を合成することで単純化することができます。

sgRNAは相補的な20 bpの標的DNA配列に結合しCas9を標的配列に呼び込みます。Cas9は標的配列に隣接するPAM（5'-NGG-3'）配列を認識し、その上流を切断します。CRISPR/Cas9システムはシンプルでありながら非常に強力なゲノム編集ツールであり、同時に複数の標的配列を切断することも可能です。

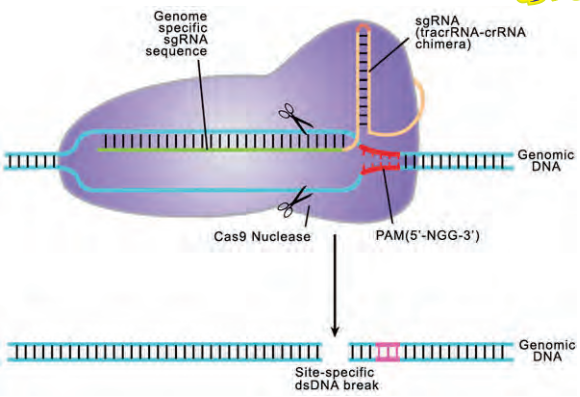


図1　CRISPR/Cas9によるゲノム編集の模式図

特長

- RNA誘導によるゲノムDNA認識はメチル化状態に影響を受けない
- ZFNやTALENと同等かそれ以上に優れた遺伝子編集効率
- 複数の遺伝子を同時に編集可能
- シンプルで早いデザインプロセス

TALENとCRISPR/Cas9システムの比較

性質	TALEN	CRISPR/Cas9
認識タイプ	Protein-DNA	RNA-DNA
メチル化感受性	大	無し
染色体構造感受性	大	大
オフターゲット切断	ほぼ生じない	TALENやZFNよりも生じる可能性あり
多重切断	ほぼできない	可能

アプリケーション例

CRISPR/Cas9のゲノム編集アプリケーション例を下表に記します。

ゲノム改変	説明	ドナーDNA
標識	GFP点ルシフェラーゼ導入による内在プロモーター活性の評価 タンパク質発現及び局在の検出	必要
変異	標的遺伝子に点突然変異の導入	必要
ノックアウト	セレクションマーカー導入による欠失挿入で標的遺伝子をノックアウト	ノックアウト細胞の選択に便利
セーフ・ハーバーへのノックイン	ヒトやマウスのセーフ・ハーバー領域にORF等をノックイン	必要
活性化	標的遺伝子発現の活性化	無
抑制	標的遺伝子発現の抑制	無

■Genome-CRISP™ Cas9 Nuclease Expression Clone

Cas9ヌクレアーゼ発現クローンはあらかじめCas9遺伝子配列を含んでおります。Cas9ヌクレアーゼはcrRNAとtracrRNA（あるいはキメラsgRNA）により宿主ゲノムのターゲット領域に誘導され、部位特異的な二本鎖切断を引き起こします。切断部位はDNA修復メカニズムの一つである非相同末端結合（NHEJ）により繋ぎ合わされることで、欠失や挿入が切断部位に生じます。また、二本鎖切断部位に外来性の二本鎖ドナーDNAを相同的組換え（HR）により導入することも可能です。CRISPR/Cas9システムはヒトES細胞やiPS細胞の改変や、ラット、ゼブラフィッシュ等のノックアウト動物の作出にも利用されております。

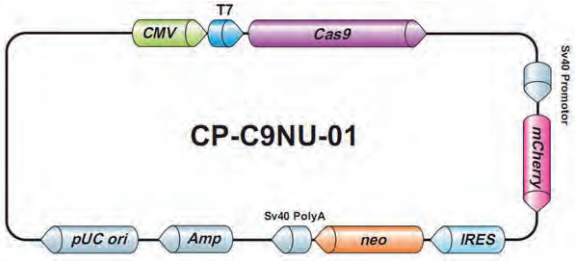


図2　野生型Cas9発現クローンのベクターマップ一例

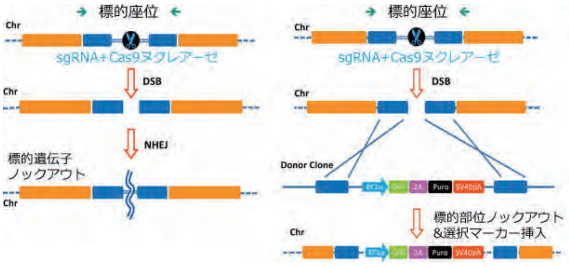


図3　CRISPR/Cas9による遺伝子工学
（左）sgRNAに先導されたCas9ヌクレアーゼにより生じたDSBのNHEJによる修復
（右）sgRNAに先導されたCas9ヌクレアーゼにより生じたDSBのHRによる修復とこれに伴うドナープラスミドからの期待する遺伝子または選択マーカー（他の遺伝要素など）の挿入

■Cas9 Nickase Expression Clone

野生型のCas9は2つの触媒ドメインを有しており、1つは結合鎖を切断し、もう1つは相補鎖を切断します。Cas9のD10A変異体であるニッカーゼは相補鎖切断活性が不活化されているため、標的結合部位に一本鎖切断を引き起こします。

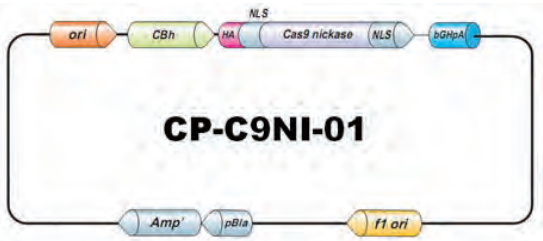


図4　ニッカーゼ/改変型Cas9発現クローンのベクターマップ一例

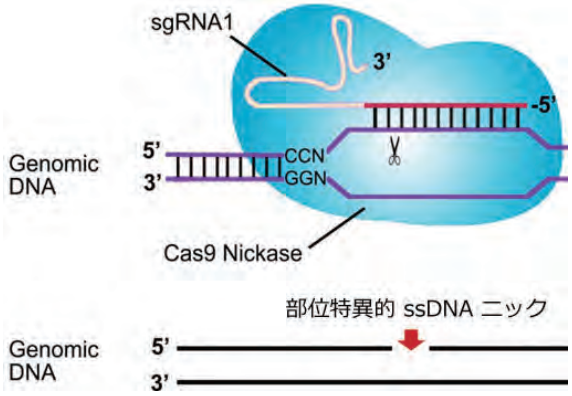


図5　結合した側鎖に一本鎖切断を生ずるニッカーゼの模式図

■Genome-CRISP™ sgRNA Design and Cloning Service

GeneCopoeia社はsingle-guide RNA（sgRNA）の標的配列に対するデザインとクローニングサービスをご提供致します。sgRNAクローンはcrRNAとtracrRNA配列からなる一本鎖sgRNAを発現します。sgRNAは標的DNA配列を認識し、同じくトランスフェクションしたCas9を標的配列に呼び込んでノックアウト、ノックイン、突然変異誘発等のゲノム編集を行うための二本鎖切断を行います。複数のsgRNAクローンを構築してCas9クローンと共にトランスフェクションすることにより、ゲノム中の複数部位を同時にゲノム編集することも可能です。

Vector Type

Vector	Promoter	sgRNA	Cas9 Nuclease	Selection Marker/ Reporter Gene
pCRISPR-SG01	U6	1 or multiple	Sold separately	Hygromycin
pCRISPR-CG01	U6	1 or multiple	CMV-driven Cas9 in the same vector	Neomycin/mCherry
pCRISPR-CG02	U6	1	CBh-driven Cas9 in the same vector	N/A

ベクターマップは、本商品を紹介するコスモ・バイオのWEBページよりご覧になれます。（WEB 記事ID：12069）

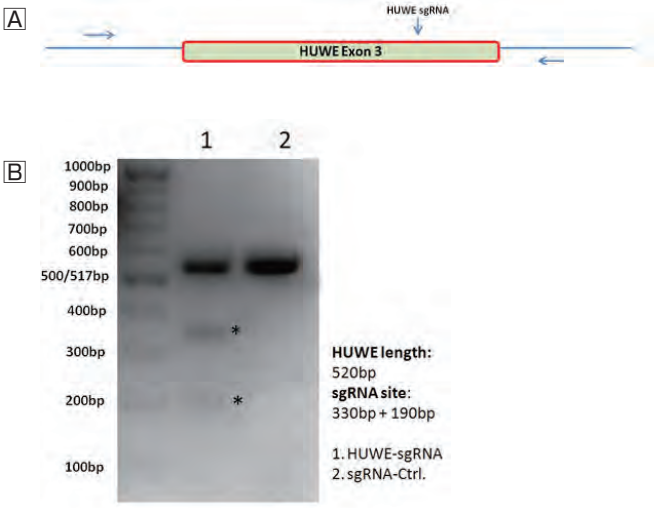


図6　HEK293T細胞を用いたHUWE I-sgRNA/Cas9によるHUWE I 遺伝子標的
（A）HUWE I-sgRNAとゲノムDNA PCRプライマーデザイン
（B）6ウェルプレートを用いてHEK293T細胞にHUWE I-sgRNAクローン（レーン1）またはスクランブルsgRNA/Cas9コントロールクローン（レーン2）をトランスフェクションした。トランスフェクションから40時間後に細胞を回収した。ゲノムDNAを抽出後、HUWE特異的PCRプライマーを用いてPCR増幅した。PCR産物はゲル精製した。8μℓ の精製済みPCR産物をバッファーと混合後、変性と再アニーリングを行い、37℃で60分間T7エンドヌクレアーゼI（ENI）処理した。HUWE PCR産物サイズは520 bpであり、予想されるT7 ENI処理産物サイズは330 bpと190 bpである。

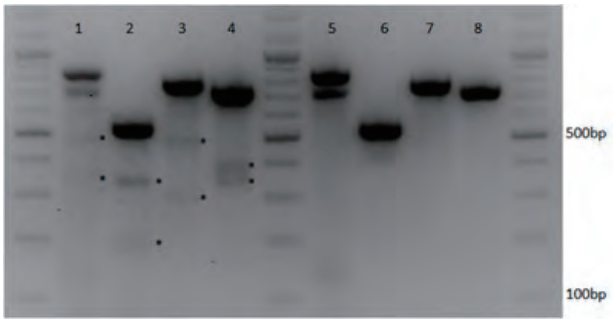


図7　複数遺伝子を標的としたCRISPR/Cas9マルチプレキシング
HEK293T GFP安定発現細胞にCas9発現プラスミドとp53、HUWE1、NCL3およびGFPを標的とする複数のsgRNAs（レーン1～4）またはスクランブルsgRNA（レーン5～8）を同時にトランスフェクションした。ゲノムDNAを抽出し、複数の標的部位に挿入欠損が存在するかT7エンドヌクレアーゼI（ENI）アッセイを行って確認した。“*”はCas9と複数sgRNAsにより各標的部位に効率的に挿入欠失が導入されたことを示す（レーン1～4）。
PCR産物サイズとT7 ENI切断産物サイズ：GFP: 720 bp（未処理）、340 bp+380 bp（切断後）；NCL3: 765 bp（未処理）、295 bp+470 bp（切断後）；HUWE: 520 bp（未処理）、190 bp+330 bp（切断後）；P53: 825 bp（未処理）、475 bp+350 bp（切断後）。

■参考価格と標準納期

分類	サービス名称	サービス概要	参考価格	標準納期
CRISPR/Cas9	Cas9 nuclease expression clone	納品物：10μg plasmid DNA	¥ 139,000	3-4週間
	Cas9 nuclease expression clone (& sgRNA design and cloning service)	納品物：10μg plasmid DNA sgRNA only expression clone design and cloning serviceを同時にご注文頂いた場合の価格になります。	¥ 78,000	3-4週間
	Cas9 D10A nickase expression clone	納品物：10μg plasmid DNA	¥ 139,000	3-4週間
	Cas9 D10A nickase expression clone (& sgRNA design and cloning service)	納品物：10μg plasmid DNA sgRNA only expression clone design and cloning serviceを同時にご注文頂いた場合の価格になります。	¥ 78,000	3-4週間
	sgRNA only expression clone design and cloning service	sgRNA sequenceの検証と10μgのplasmid DNAが含まれます。	¥ 88,000	4-5週間
	All-in-one sgRNA + Cas9 expression clone (single plasmid containing Cas9 and one sgRNA), design and cloning	sgRNA sequenceの検証と10μgのplasmid DNAが含まれます。	¥ 108,000	4-5週間
機能検証	Plasmid-level validation	Surrogate reporter assayによる CRISPR/Cas9の機能検証を行います。	¥ 220,000	6-9週間
	Chromosomal-level validation	T7 Endonuclease assayによる機能検証（図6、7をご参照ください）を行います。検証にはヒトHEK293又はH1299細胞を使用します。ご希望の細胞を使用することも可能ですので、ご相談ください。	¥ 220,000	6-9週間

商品リスト

品番	プロモーター	レポーター遺伝子	選択マーカー	LoxPサイト	希望販売価格
pDonor-D01	EFa1	copGFP	Puromycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D02	CMV	copGFP	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D03	CMV	N/A	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D04	CMV	N/A	Puromycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D05	EFa1	N/A	Neomycin	N/A	¥ 114,000
pDonor-D07	EFa1	copGFP	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D08	CMV	copGFP	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D09	EFa1	N/A	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D10	CMV	N/A	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D11	PGK	copGFP	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D12	EFa1	copGFP	Hygromycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D13	PGK	copGFP	Neomycin/TK	LoxP	¥ 183,000
pDonor-D14	PGK	N/A	Puromycin/TK	LoxP	¥ 183,000

ベクターマップは、本商品を紹介するコスモ・バイオのWEBページよりご覧になれます。（WEB 記事ID：12069）

ドナーを利用したゲノム編集アプリケーションについて、10ページ（WEB 記事ID：15214）にて紹介しております。

■お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：12069）から見積のご依頼をお願い致します。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願い致します。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

■関連製品・サービス

- CRISPR/Cas9 human sgRNAライブラリー（WEB 記事ID：14485）

参考文献

- Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science* 327 (5962): 167-70.
- Marraffini LA, Sontheimer EJ (February 2010). "CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea". *Nat Rev Genet* 11 (3): 181-190.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, *et al.* (November 2009). "RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex". *Cell* 139 (5): 945-56.
- van der Oost J, Brouns SJ (November 2009). "RNAi: prokaryotes get in on the act". *Cell* 139 (5): 863-5. doi:10.1016/j.cell.2009.11.018.
- Hale CR, Zhao P, Olson S, *et al.* (November 2009). "RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex". *Cell* 139 (5): 945-56.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentie E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptiv bacterial immunity. *Science* 337, 816-821.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraf?ni, L.A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR/Cas systems. *Nat.Biotechnol.* 31, 233-239.
- Hsu, P.D., Scott, D.A.,Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V.,Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., *et al.* (2013). DNA targeting speci?city of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* Published online July 21, 2013.

Applied Biological Materials社

CRISPRノックイン用HDR テンプレート作製受託サービス

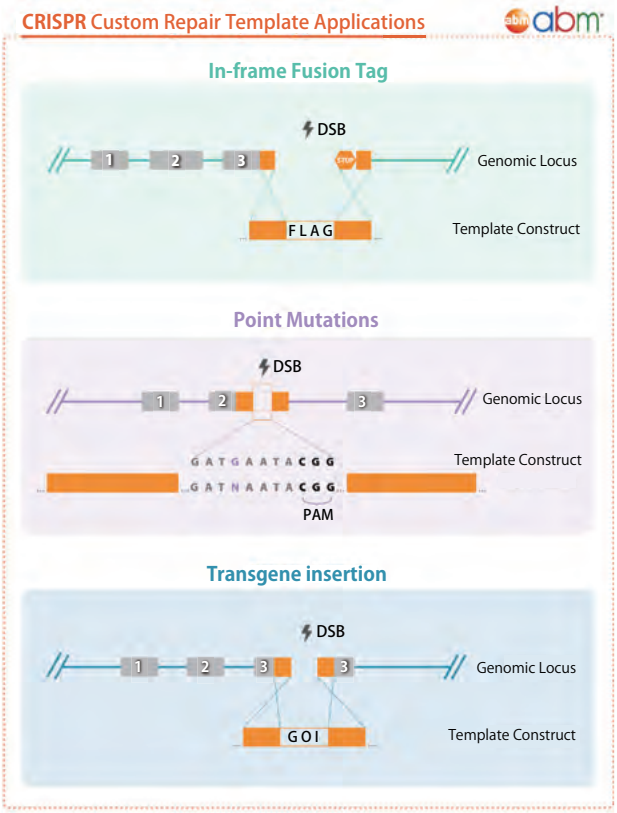
WEBへどうぞ
記事ID：18367

ssDNA オリゴと dsDNA ドナープラスミドをカスタム作製！

CRISPRによるノックインでは、Cas9が二本鎖DNA切断後に相同組換え修復（HDR）を可能にするHDRテンプレートが必要です。HDRテンプレートは挿入配列と左右の相同性アームから構成されます。50bp 未満の小さな変異については、ssDNAオリゴヌクレオチドテンプレートを使用することを推奨しますが、より大きな挿入にはdsDNAドナープラスミドを使用する必要があります。
HDRを使用して正確なゲノムノックインを達成するために、ご希望の ssDNAオリゴヌクレオチドおよびdsDNAドナープラスミドを作製します。

アプリケーション

1. インフレーム融合タグ
   → 短いペプチド配列またはレポーター遺伝子を標的遺伝子にタグ付ける
2. 点突然変異
   → 目的遺伝子内の短い配列または残基を突然変異させる
3. 遺伝子の挿入
   → 選択した遺伝子座に大きな導入遺伝子を挿入する



お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBのサービス紹介ページ（WEB記事ID：18367）からお見積のご依頼をお願い致します。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願いいたします。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

ssDNA oligonucleotide

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

サービス名	ホモロジーアーム	品番	包装	参考価格
Custom CRISPR Repair Template (<200bp ssDNA oligonucleotide)	ホモロジーアーム+インサートは合計200bp以下である必要がありますので、ホモロジーアームの推奨サイズは50bp-90bp／アームです。	C427	4nmole	¥ 95,000

dsDNA Vectors with Repair Template

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

サービス名	ホモロジーアーム	インサート	品番	包装	参考価格
Custom CRISPR Repair Template (<1.2 kb arms, <1kb insert)	< 1.2kb	Custom insert <1kb	C428	1.0μg	¥ 165,000
Custom CRISPR Repair Template (<1.2 kb arms, 1-2kb insert)	< 1.2kb	Custom insert 1-2kb	C429	1.0μg	¥ 203,000
Custom CRISPR Repair Template (<1.2 kb arms, predesigned SV40-GFP-2A-Puro insert)	< 1.2kb	Predesigned insert with GFP and Puromycin resistance	C430	1.0μg	¥ 219,000
Custom CRISPR Repair Template (<1.2 kb arms, predesigned SV40-RFP-2A-Puro insert)	< 1.2kb	Predesigned insert with RFP and Puromycin resistance	C431	1.0μg	¥ 219,000
Custom CRISPR Repair Template (1.2-2kb arms, <1kb insert)	1.2-2kb	Custom insert <1kb	C432	1.0μg	¥ 215,000
Custom CRISPR Repair Template (1.2-2kb arms, 1-2kb insert)	1.2-2kb	Custom insert 1-2kb	C433	1.0μg	¥ 250,000
Custom CRISPR Repair Template (1.2-2kb arms, predesigned SV40-GFP-2A-Puro insert)	1.2-2kb	Predesigned insert with GFP and Puromycin resistance	C434	1.0μg	¥ 265,000
Custom CRISPR Repair Template (1.2-2kb arms, predesigned SV40-RFP-2A-Puro insert)	1.2-2kb	Predesigned insert with RFP and Puromycin resistance	C435	1.0μg	¥ 265,000
Custom CRISPR Repair Template (>2kb arms, any insert size)	> 2kb	Custom or predesigned insert<1kb	C436	1.0μg	ご照会

CELLECTA
Cellecta社

レンチウイルスCRISPRコンストラクト作製受託サービス（Cellecta社）

WEBへどうぞ
記事ID：14037

レンチウイルスベースの All-in-One ベクターで効率的なノックアウトを実現！

■サービス概要

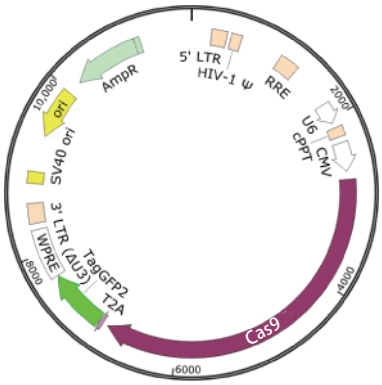
CRISPR/Cas9はsgRNAとCas9を組み合わせることで遺伝子発現をノックアウトできるシステムです。Cellecta社のレンチウイルスベースCRISPRシングルベクターコンストラクトはsgRNAとCas9を共発現することが可能であり、ご希望の分裂・非分裂細胞で完全な遺伝子ノックアウトを実現できます。ホスト細胞に導入されたレンチウイルスベクターはゲノムDNAに組み込まれ、娘細胞に受け継がれます。

ご希望の標的遺伝子についてCellecta社でsgRNA設計を行い、ご指定頂いたベクターにsgRNAを組み込んだsgRNAコンストラクトをご提供致します。ご希望によりパッケージング済みウイルス粒子をご提供することも可能です。また、ご希望の標的遺伝子に対する本システムを用いたノックアウト細胞作製受託も承ります。

サービスの特徴

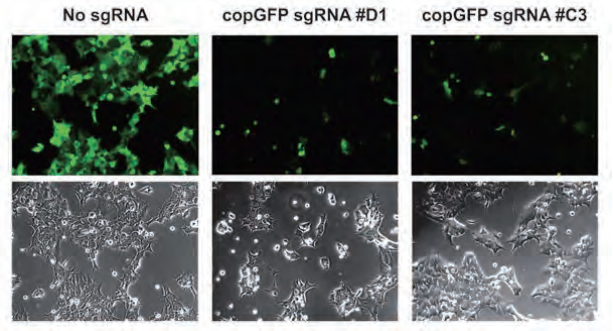
- 1ベクターでsgRNAとCas9を共発現できるAll-in-Oneベクター採用
- Cas9プロモーターはCMVとUbiCから選択可能
- 宿主ゲノムに組み込まれることで長期安定発現を実現
- パッケージ済みレンチウイルス粒子での納品も可能

pRSGCCP-U6-(sg)-CMV-Cas9-2A-Puro
11,505 bp

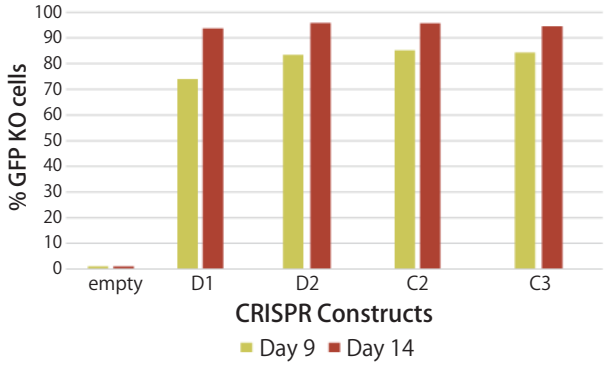


pRSGCCG-U6-(sg)-CMV-Cas9-2A-TagGFP2
11,616 bp

■データ例



copGFPを標的とする数種のsgRNAをデザインし、copGFP安定発現HEK293細胞に形質導入した。9日後にGFP蛍光発現を観察したところ、少なくとも70%の細胞でGFP発現が消失していた。



形質導入の9日及び14日後にFACSで細胞を解析したところ、9日後には少なくとも70%、14日後には少なくとも90%の細胞でGFP発現の消失が確認できた。

■CRISPRによるノックアウト細胞株の作製

標的となる遺伝子情報及び細胞株名称をご連絡頂ければ、レンチウイルスCRISPRコンストラクトをデザインして標的遺伝子をノックアウトした細胞株を納品致します。標的遺伝子の両アレルをPCRで解析し、ノックアウトを確認します。

ご注意

- ノックインはサービス対象外です。
- ほ乳類以外の細胞及び初代培養細胞はサービス対象外です。

細胞株サンプルのご送付方法

1×10^6の凍結細胞を含むバイアル2本をご用意いただきます。詳細はコスモ・バイオのWEBをご覧ください。（WEB 記事ID：12575）

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9615　FAX: 03-5632-9614　E-mail: jutaku_gr@cosmobio.co.jp

ATUM社

CRISPR/Cas9 All-in-One NickaseNinja™ Vector

WEBへどうぞ
記事ID：12575

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！

ATUM社では、gRNAを*E.coli*、酵母、および哺乳類細胞へElectra™システムでクローニングできるニッカーゼプラスミドベクター（38ページ）と、タンデムで2つのgRNAを搭載したAll-in-Oneプラスミド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。

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失や挿入が生じます。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ATUM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ATUM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。

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
- 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

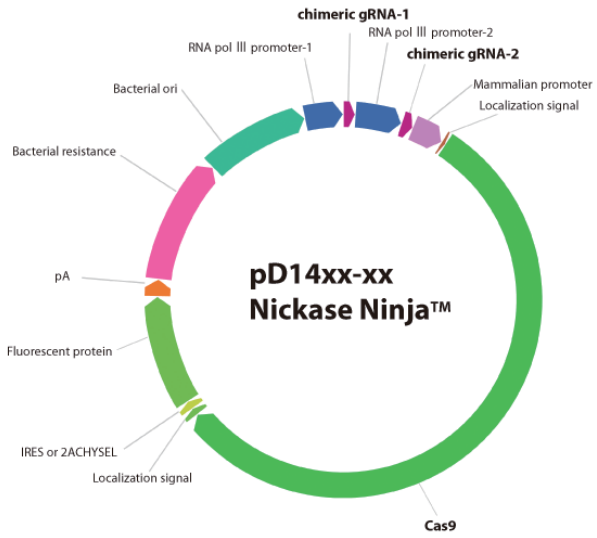
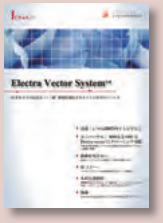


図1　ベクターマップ

Electra Vector System™

Electra Vector System™は、ATUM社（旧DNA2.0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、哺乳類、酵母用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。

コスモ・バイオのWEBで詳細をご覧になれます。（WEB 記事ID：11747）



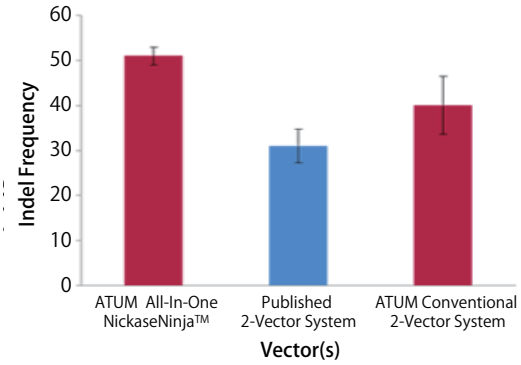


図2　Cas9ニッカーゼ挿入欠損頻度
ATUM社 All-in-One NickaseNinja™ベクター（タンデムgRNAと2つのU6プロモータを利用）、ATUM社保有の2種のベクターを利用した場合および論文報告データとの比較結果。

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

2つのgRNAをもつNickaseNinja™ベクターは、ATUM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、ATUM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1つで、お客様ご希望のgRNAペアを発現できます。

ATUM社　カスタムサービスお問い合わせ先
TEL：03-5632-9615　FAX：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

株式会社セツロテック

受精卵エレクトロポレーション法による ゲノム編集マウス・ブタ作製受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID:32920

GEEP法により迅速、低コストなゲノム編集を実現！

■サービス概要

セツロテック社は独自の受精卵エレクトロポレーション法により低コスト、短納期でゲノム編集マウス・ブタを作製いたします。また、自社でマウスを管理しており、ゲノム編集マウス・ブタ作製に対する様々なニーズにお応えいたします。

価格：お問い合わせください。　納期：2か月～
コスモ・バイオのWebでFAQを掲載しています。

受精卵エレクトロポレーション法とは

受精卵エレクトロポレーション法（GEEP法）とは、Cas9タンパク質及びgRNAといったゲノム編集ツールをエレクトロポレーションによって受精卵に導入する方法です。このGEEP法ではCRISPR/Cas9ゲノム編集ツールをハイスループット・低コストかつ、ダメージの少ないかたちで受精卵に導入することができるため、例えば、遺伝子改変マウスの作製が非常に簡便になり、安価に提供することができます。従来、遺伝子改変マウスを作製する目的には、マイクロインジェクション法が主に用いられます。マイクロインジェクション法は、ガラスキャピラリーという非常に細いガラス管を用いて、顕微鏡下でCRISPR/Cas9ゲノム編集ツールを受精卵一つ一つに注入する方法で、操作技術が求められるほか、専用の設備が必要です。これに比べてGEEP法では、必要な技術は受精卵を電極に並べることのみです。加えて、受精卵を一つ一つ操作する煩雑な作業を介することなく、複数個（20個～200個）の受精卵へ同時にゲノム編集ツールを導入することができます。このような新たな技術を活用することで、人工受精後の卵が新鮮なうちに、短時間で均一な条件下で、低侵襲にゲノム編集を行えるというメリットを産み出し、高効率でゲノム編集生物を得ることが期待できます。また、マウスのみならずブタへのGEEP法の応用も可能となりました。

■GEEP法の4つの優位性

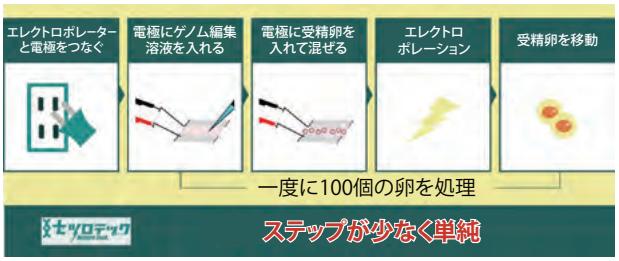
1. 実験時間が短いので、受精卵へのダメージが最小限となり、高いゲノム編集効率が期待できます。
2. 単純なノックアウトマウスであれば、凍結胚や冷蔵胚での納品により安くて早いサービスをご提供できます。
3. 単純なノックアウトマウスの作製だけでなく、ノックインや複数同時ゲノム編集など難しい課題にもお応えします。
4. マウスだけでなく、ゲノム編集ブタの開発にも成功しており、様々なモデル生物のゲノム編集ニーズに応えられます。

■GEEP法と競合技術の比較性

	セツロテック	他社
ゲノム編集マウス作製法	受精卵エレクトロポレーション法（GEEP法）	マイクロインジェクション法
100コの受精卵の取扱時間	15分以内	120分以上
ゲノム編集生物の発生率	高い	中程度
ノックアウトマウス	○	○
ノックインマウス	テスト	テスト
多因子疾患モデル生物	○	△
ゲノム編集受精卵での納品	○	△
F0解析	○	△
ブタなど他の哺乳類のゲノム編集	○	△
コスト	安い	高い

100個の受精卵を操作した時の比較

セツロテックの技術／受精卵エレクトロポレーション法



■ゲノム編集マウス・ブタ作製のフローチャート

1. 人工授精による受精卵調整
↓
2. エレクトロポレーション法によりCas9/crRNA/tracrRNAを受精卵に導入
↓
3. 培養（18hr程度）
↓
4. 仮親（偽妊娠マウス・ブタ）の卵管へ移植
↓
5. 19日後出産。必要に応じ帝王切開
↓
6. 3週齢になった時点で、耳片からゲノムDNA調整。配列解析によりゲノム編集の成否を確認
↓
7. ゲノム編集マウス・ブタを顧客へ郵送

お見積り・ご注文方法

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問合せ下さい。
TEL　：03-5632-9615　　FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

セツロテック Setsuro Tech.

GENOME EDITING

ゲノム編集革命で
暮らしを豊かに

こんなニーズはありませんか？

・自分が研究しているテーマに関連するすべての候補遺伝子のノックアウトマウスを作りたい
・一度に複数遺伝子を欠損させたノックアウトマウスを作ってみたい
・いろいろな flox マウスを作りたい

難しいテーマもご相談ください。
最適なソリューションをご提供させていただきます。

GENOME EDITING

ingenious targeting laboratory
inGenious社

遺伝子改変モデルマウス作製受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID:14775

豊富な経験と実績に裏打ちされた遺伝子改変マウス作製のリーディングカンパニー

inGenious社は16年以上の遺伝子改変マウス作製実績を有するリーディングカンパニーであり、その成果は*Science*や*Nature*、*Cell*等のトップジャーナルを含む多くの学術誌に掲載されています。

熟練の技術者によりお客様のニーズに合わせてES細胞を用いたスタンダードな遺伝子ターゲティング、CRISPRインジェクション、ES細胞のCRISPRによる相同的組換えサービスをご提供します。CRISPRとES細胞を組み合わせることは、スクリーニングプロセスをマウスではなく細胞で行えるというメリットがあり、非常に難易度の高いマウスモデルの作製を従来の手法に比べ迅速に低コストで実現可能です。

研究目的と必要なモデルマウスをお伺いし、最適なストラテジーを立案してご案内致します。

inGenious社の強み

- 実績豊富：1,550以上のマウスモデル作成実績：
  −豊富な経験と実績に裏打ちされた遺伝子改変マウス作製のリーディングカンパニーです。
- 生殖細胞系列保証マウス：
  −独自開発のES細胞株は90%以上の正倍数体比率を誇り、生殖細胞系列伝達を保証
- 時間・コスト削減：
  −独自開発のFLP ES細胞株の利用によりモデル作製の時間とコストを削減
- 高い満足度：
  −95%以上のお客様がサービスの品質に満足しているという事実
- 驚きの成功報酬形式：
  −F1マウスが発生しなかった場合は請求が発生しません。

サービス内容

	ES細胞を用いたゴールドスタンダード相同的組換え	ES細胞を用いたCRISPR相同的組換え	CRISPRの受精卵マイクロインジェクション
ファウンダー樹立期間（1回のインジェクション）	7カ月	5カ月	3カ月
F1マウスの生殖系列確認までの期間	10カ月	8カ月	6カ月
オフターゲット効果	生じない	ほぼ生じない	可能性あり
モザイク遺伝	なし	なし	あり
コスト	中	低	低
生殖系列保証マウス	可能	可能	可能

＊上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

動物実験の基本方針

当社は、実験動物の取り扱いにあたり、「動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号）」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示88号）」及び「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年文部科学省告示71号）」等の法令に則り、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（平成18年6月1日日本学術会議）」を踏まえて、社内に動物実験委員会を設置し、「動物実験等に関する規程」を定め、これに従って各種実験を適正に実施しています。また、試験を第三者に委託する場合、同等の取り扱い基準を満たす第三者に試験委託しています。

■遺伝子改変モデルマウス作製受託サービスのお見積り方法

サービスを紹介するコスモ・バイオの各Webページからお見積もりをご依頼いただけます。

1．CRISPR/Cas9を用いたモデルマウス作製　WEB 記事ID：14776
2．ES細胞を用いたモデルマウス作製　WEB 記事ID：14777
3．KOMP/EUCOMMモデルマウス作製サービス　WEB 記事ID：14779
4．オプションサービス　WEB 記事ID：14783

また、ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願いいたします。

TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

1 CRISPR/Cas9を用いたモデルマウス作製

WEBへどうぞ
記事ID：14776

CRISPR/Cas9による安価で短期間のモデルマウス作製受託サービスです。inGenious社はCRISPRの受精卵へのマイクロインジェクションにより、コンベンショナルノックアウトモデルとコンベンショナル点突然変異ノックインモデルの作製が可能です。また、ES細胞におけるCRISPRの相同的組換えを利用し、コンディショナルノックアウトとスモールカセットのノックインが可能です。

ご利用可能なCRISPRによるターゲッティング手法

A. コンベンショナルノックアウト
B. コンディショナルノックアウト
C. 点突然変異
D. スモールカセットの挿入（約1 kb）

■サービス内容

1．受精卵の細胞質または前核インジェクションによるCRISPRマウスモデル作製

段階	サービス内容	参考価格	標準納期
I	1）最低2×sgRNAのデザインと合成 2）PCRとシーケンスによる*in vitro*バリデーション **納品物-可能性のあるオフターゲット領域のレポート**	120万円	2ヶ月
II	1）マイクロインジェクションに備えCRISPR試薬の調製 2）sgRNA、Cas9タンパク質（及びドナーオリゴ）を150個の受精卵・前核にインジェクション 3）受精卵を仮親に移植	390万円	1ヶ月
III	1）ジェノタイピングによるF0ファウンダーマウスの同定 2）F0ファウンダーマウスを交配し生殖系列確認済みF1マウスの取得 **納品物：最低2匹の生殖系列確認済みF1マウス***	170万円	3ヶ月
合計		680万円	**約6ヶ月**

オフターゲット領域の確認は追加料金が発生します。

＊150個の受精卵にインジェクションした結果、F0ファウンダーマウスが得られなかった場合は、ingenious社は生殖系列確認済みF1マウスを納品するためにES細胞を用いたCRISPRモデルマウス作製を行います。
残念ながらF1マウスが得られなかった場合、ご請求は発生致しません。

2．ES細胞における相同的組み換えによるCRISPRマウスモデル作製

段階	サービス内容	参考価格	標準納期
I	1）最低2×sgRNAのデザイン 2）ドナーターゲッティングベクターのデザインと調製 3）PCRとシーケンスによる*in vitro*バリデーション **納品物-可能性のあるオフターゲット領域のレポート**	140万円	2ヶ月
II	sgRNAとCas9のmRNA（およびドナーターゲッティングベクター）を FLP ES細胞（WEB 記事ID：14782）へエレクトロポレーションし培養する。	120万円	1ヶ月
III	PCRによるポジティブES細胞クローンの選別	120万円	0.5ヶ月
IV	ポジティブES細胞を胚盤胞にマイクロインジェクション	120万円	1ヶ月
V	生殖系列確認済みF1マウスの取得 **納品物：キメラマウスおよびF1マウス（ネオマイシン耐性除去）**	180万円	3ヶ月
合計		680万円	**約7.5ヶ月**

＊生殖系列確認済みF1マウスの納品を保証致します。

2 ES細胞を用いたモデルマウス作製

WEBへどうぞ
記事ID:14777

■サービス内容

ノックアウトモデルマウス作製

InGenious社は16年以上の遺伝子改変マウス作製実績を有し、コンベンショナル欠失、コンディショナルノックアウト、そしてBACs技術を用いた広範囲の欠失まで非常に難易度の高い遺伝子改変技術を開発してきました。

1. コンベンショナルノックアウト

標的領域をネオマイシン選択カセットやレポーター遺伝子と置き換えます。遺伝子は全ての組織で常に不活化されます。コンベンショナルな遺伝子欠失は胚性致死の原因となるため多くのお客様はコンディショナルノックアウトをご選択されます。

2. コンディショナルノックアウト

標的となる遺伝子領域をCreリコンビナーゼ標的配列であるloxPで挟みこんだFloxedマウスと、特定の組織でCreやCRE-ERT2を発現するCreドライバーマウスを交配することで、組織特異的又は時期特異的な遺伝子不活化が可能です。このようなCreドライバーマウスは膨大な数が様々な研究機関でデータベース化されて管理されており、入手することが可能です。Cre-LoxPシステムにより胚性致死のリスクを回避することができ、更に多様なモデル作製を可能にします。

3. 広範囲欠失（BAC技術）

BAC技術は複数の遺伝子や全遺伝子クラスター等の非常に大きなゲノム上の配列に対し、広範囲な特異的欠失を可能にします。inGenious社はこのような大きな欠失によるモデルマウス作製を成功させることのできる唯一の会社です。

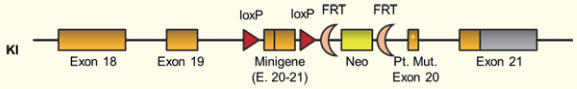
ノックインモデルマウス作製

1. コンベンショナルノックイン

- **点変異**
  一つの点突然変異または数百bpから数キロbp離れた複数の点突然変異を生じたマウスモデルの作製が可能です。BAC技術によりこれらのモデルを効率的に作製致します。
- **カセット挿入**
  カセットにはヒトやマウスのcDNAやレポーター遺伝子、またヒト遺伝子全体（TruHumanization™）を含めることが可能です。カセットはマウス内因性遺伝子と入れ替えるか、共発現するために内因性遺伝子に融合させます。共発現の促進のためには2Aペプチド技術を用いることが可能です。また、内因性遺伝子を破壊しない場合はRosa26領域へのカセット挿入を利用することにより、過剰発現を誘導することが可能です。

2. コンディショナルノックイン

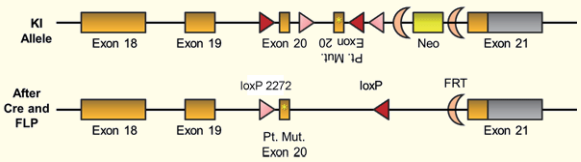
2.1 ミニジーン手法



Cre/loxPやFLP/FRTの部位特異的組み換えシステム

ミニジーンの挿入によりワイルドタイプの発現を維持しており、CreによるミニジーンとFLPによるネオマイシンの切り出しにより、Exon20の点突然変異をコンディショナルに活性化することが可能です。またミニジーンに点突然変異を入れ、Creによりミニジーンが切りだされるとワイルドタイプの発現になるため、コンディショナルレスキューモデルも構築可能です。

2.2 逆位法

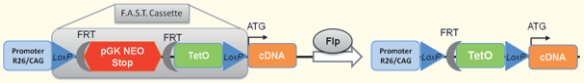


2つのloxP配列が異なる方向に位置しているときはCreによりloxP間の遺伝子が反転することを利用し、コンディショナルな変異の導入が可能です。

2.3 Rosa26過剰遺伝子発現

Rosa26遺伝子座は、遺伝子を安全に挿入可能なセーフ・ハーバー遺伝子座と考えられており、Rosa26遺伝子座を利用したマウスモデルについては、これまでに多くの文献報告、検証がなされています。導入遺伝子はRosa26遺伝子の内在性プロモーターにより恒常的に発現され、組織特異的なプロモーターも利用可能です。Lox-P flanked stopカセットを使用することで任意の組織における遺伝子発現や、CreERT2モデルを利用することで発現の誘導も可能です。下記の図はRosa26コンストラクトを示しています。なお、レポーター遺伝子またはタグの付加もご希望により可能です。またLox-P flanked stopカセットなしで組織特異的プロモーターをご選択いただくことも可能です。

誘導性/可逆性F.A.S.T.™遺伝子発現システム（WEB 記事ID：14778）により、過剰発現およびサイレンシングが同様に達成することができ、モデル動物の汎用性をより高めます。



F.A.S.T.™カセットはお客様の研究目的に合わせて、レポーターの付加やストップコンポーネントの排除、またその他の修飾に対応可能です。

新規ノックイン手法

- TruHumanization™（WEB 記事ID：14781）
  ヒト遺伝子全体の挿入によるマウス遺伝子の置き換え。
- 誘導性/可逆的遺伝子発現技術F.A.S.T.™（WEB 記事ID：14778）
  適切なカセット挿入と交配により、ノックアウト、ノックアウトレスキュー、誘導性/逆的過剰発現モデル、異所発現モデル、可逆的な遺伝子ノックダウン/アウトの5種類のモデルを作製可能。

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9615　FAX: 03-5632-9614　E-mail: jutaku_gr@cosmobio.co.jp

■サービスの作業工程

ベクター構築

1. 遺伝子構造と配列の完璧なバイオインフォマティクス解析
2. 標的遺伝子の過去のターゲッティングヒストリーの検証
3. お客様の研究目的に沿った全てのターゲッティングストラテジーのご紹介
4. PCRとサザンブロット解析のためのスクリーニングストラテジーのデザイン
5. BACクローンが標的遺伝子に含まれていることの確認
6. クローニングとホモロジーアームの確認
7. FRTまたはloxPに隣接するネオマイシン選択カセットの挿入と確認
8. 特異的な変異、欠失、挿入の確認
9. ターゲッティングベクターのシーケンシング
10. エレクトロポレーションのためのDNA直線化

エレクトロポレーションと組織培養

1. ES細胞の培養・増殖
2. ターゲッティングベクターのES細胞へのエレクトロポレーション
3. ES細胞のポジティブ/ネガティブセレクション
4. 200-300 ES細胞/エレクトロポレーションの単離
5. ES細胞の複製と凍結保存
6. ES細胞スクリーニングのためのDNA抽出

スクリーニング

1. PCRとサザンブロッティングによるポジティブクローンの同定
2. ES細胞クローンのゲノム安定性を正倍数体の細胞の割合を調査して評価し、インジェクションおよびマウス作製に使用するゲノム安定性の高いES細胞を選定する。
3. マイクロインジェクションに備えポジティブES細胞クローンを増殖する。

インジェクション

1. 受精卵と仮親マウスの準備
2. ターゲッティングしたESクローンを受精卵にマイクロインジェクションするか、8細胞期胚にレーザーインジェクションする。
3. 受精卵または8細胞期胚を仮親マウスに移植。

飼育と生殖細胞系列伝達の確認

1. 仮親マウスの飼育とキメラマウスの離乳
2. 雄キメラマウスと雌のC57Bl/6Nワイルドタイプマウスの交配
3. F1マウスの離乳
4. PCR解析と目的の改変の確認およびネオマイシン耐性とFLP導入遺伝子の消失を確認。

3 オプションサービス

WEBへどうぞ
記事ID:14783

inGenious社の通常納品物はネオマイシン耐性が消失し、生殖系列伝達確認済みのノックアウト/ノックインF1ヘテロ接合体マウスですが、更に繁殖や精子・卵子の凍結保存、ホモ接合体マウスの取得等、ご希望に応じたオプションサービスをご選択いただけます。

追加繁殖

マウスの繁殖は最大で3ヶ月間、または25匹のジェノタイピング完了のどちらかを満たすまで継続致します。
サービスには交配、飼育、F2産子のPCRによるジェノタイピングが含まれ、ホモ接合体マウスを最低1繁殖ペア納品します。

コロニースケールアップ

ヘテロ接合体またはホモ接合体の雌、雄、または繁殖ペアをご希望の数までスケールアップします。
費用は数により変動しますのでお気軽にお問合せください。

精子凍結保存

Step 1.
本サービスには2匹の雄マウスからの精子採取、凍結保存、解凍精子の運動性テストが含まれます。
また、凍結保存した精子の機能を確認するために解凍精子の*in vitro*受精、受精卵の胚盤胞期までの培養も行います。ただし、体外受精による生存マウスの取得は保証対象外です。また凍結精子は1年間保管可能ですが、1年以上の場合は追加費用が必要となります。
参考価格：432,000円（税抜）

Step 2.
解凍精子を体外受精し、胚を仮親に移植します。
ヘテロ接合体雄マウスはワイルドタイプと変異型精子を持っているので、ワイルドタイプ卵子に体外受精すると産子はワイルドかヘテロになります。ホモ接合体の雄マウスを使用した場合、産子は全てヘテロになります。ジェノタイピング費用は含まれておりません。
参考価格：216,000円（税抜）

胚凍結保存

Step 1.
本サービスには5匹のヘテロ接合体雄マウスを10-15匹の過排卵ワイルドタイプ雌マウスと交配し、採取した胚を凍結保存する工程が含まれます。また解凍胚を胚盤胞まで培養して生存率確認によるQCも実施します。25個の胚を含むストローを最低5本、1年間凍結保存します。
参考価格：755,000円（税抜）

Step 2.
胚を仮親に移植し、産子を得ます。
参考価格：216,000円（税抜）

ご注意：本サービスはC57BL/6NかHybrid（C57BL/N/129SvEv）ストレインのみご利用になれます。ヘテロ接合体雄マウスが用いられた場合、胚はワイルドタイプとヘテロ接合遺伝子型の混合となります。ホモ接合体雄マウスが使用された場合、胚はヘテロ接合遺伝子型の混合となります（ジェノタイピングはお客様に実施して頂きます）。

組織採取

お客様のモデルマウスから臓器を摘出し、包埋又は凍結して納品致します。

上記の他にお客様が作製したベクターコンストラクトやCRISPR試薬を使用したマウス作製等、ご要望に応じて承りますのでお気軽にお問合せください。

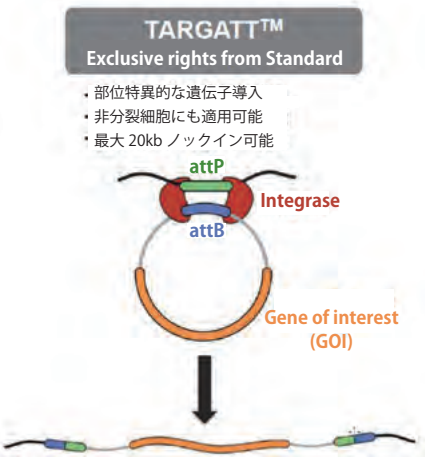
Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*
Applied StemCell社

TARGATT™ 部位特異的ノックイン マウス／ラット作製受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID：17792

最大20kb の標的遺伝子をご希望部位にノックイン!!

特許取得済みのTARGATT™ 技術を用いて部位特異的ノックインマウスおよびラットを作製致します。TARGATT™ 技術とはPhiC31インテグラーゼがベクターに挿入された34bpのアタッチメントサイトattB配列と宿主（細胞、マウス、ラット）ゲノム中に挿入されたattP配列間の組み換えを触媒することで目的領域に遺伝子を導入する手法であり、Applied StemCell社はStanford University（CA USA）から本手法の独占的なライセンスを得ています。



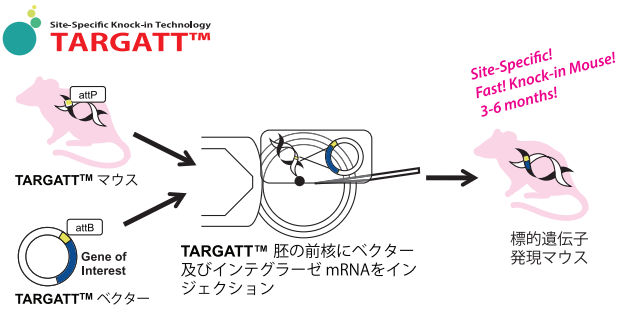


図1　TARGATT™ マウス（FVBまたはC57BL/6J バックグラウンド）のセーフハーバー領域であるH11またはRosa26には、あらかじめattP配列が導入されていますので、目的遺伝子を導入して過剰発現、レポーター遺伝子発現、shRNAによる遺伝子ノックダウン、ヒト化マウスモデル作製等が実現可能です。目的遺伝子のID番号をお知らせ頂ければ、カスタムデザインのノックインマウスを納期約3ヶ月でお届け致します。

TARGATT™ テクノロジーの利点

- PhiC31インテグラーゼによる効率的な遺伝子導入で、時間とコストを削減
- 部位特異的な遺伝子導入で位置効果をなくし、導入遺伝子の高発現を実現
- 遺伝子間領域に組み込まれるため、内部遺伝子発現が阻害されないことを保証
- シングルコピーのノックインで、repeat-induced遺伝子サイレンシングやゲノム不安定性を排除
- 部位特異的な遺伝子導入により、異なる系統間における導入遺伝子の効果を正確に比較可能
- レポーター遺伝子発現、遺伝子ノックダウン、疾患モデル作製、高度な条件付きノックアウトモデルのための部位特異的Cre発現等、さまざまなアプリケーションに利用可能

TARGATT™ システムのFAQ

コスモ・バイオのWebに、本システムに関するFAQを掲載しています（WEB 記事ID：17792）。

サービス内容（ノックインマウス）

ノックインマウス作製サービスには、以下のマイルストーンが含まれています。

① 目的遺伝子を含むTARGATT™ ベクターの調製
・TARGATT™ Vectorへの目的遺伝子のクローニング、ミニプレップ
・TARGATT™ Vectorおよびコントロールベクターからミニサークルの RNaseフリー調製および精製
② 前核注射
・TARGATT™ ミニサークル DNA を TARGATT™ 胚（FVB または C57BL/6J）の前核に注入
・偽妊娠マウスへの胚移植
③ F0ファウンダーマウスのスクリーニング
④ ヘテロ接合性ファウンダーの納品
⑤ オプション：ホモ接合マウスを作製するためのファウンダーの育成

コロニー産生、凍結保存、動物表現型決定などもご提供可能です。

サービス項目	納期	納品物
① TARGATT DNA構築（標的遺伝子をクローニングしたベクターもマウスとともに納品されます。）	4-6週間	TARGATT™ ベクター クローニングのレポート
② TARGATT™ integraseの調製 *in vitro* 転写と調製	1週間	integrase mRNAの合成とバリデーションのレポート
③ TARGATT™ DNAを前核にマイクロインジェクション（最大150個の胚にインジェクションします。）	1-2ヶ月	—
④ マウス飼育及びジェノタイピング	3-4週間	Rosa26領域にシングルコピーの標的遺伝子が挿入されたF0ファウンダーマウスを最低1匹納品

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9615　FAX: 03-5632-9614　E-mail: jutaku_gr@cosmobio.co.jp

サービス内容（ノックインラット）

Applied StemCell社は、条件付きノックアウトCre-LoxPラット育種ペアを2段階プロセスでエンジニアリングする2つの補完的な技術を採用しています。TARGATT™ およびライセンスされたCRISPR / Cas9遺伝子編集プラットフォームです。

CRISPR / Cas9を用いて、目的の遺伝子をLoxP配列をノッキングして遺伝子に隣接させ、条件付きノックアウトラットモデルを作製することにより、遺伝子を浮遊させることができます。

TARGATT™ テクノロジーは、ラットゲノムの安全なハーバー座（H11座位）にある、あらかじめ選定され、設計されたドッキングサイトに目的の遺伝子（22kbまで）を挿入することができます。この場合、Creリコンビナーゼ遺伝子は、選択されたプロモーター（組織／細胞特異的）と対になり、選択されたプロモーターによって駆動されるCre遺伝子の発現を保証するためにセーフハーバー座に挿入することができます。

Cre-ラットをこのように条件付きノックアウトラットで飼育すると、指定された組織内のfloxed遺伝子が欠失したラット子孫が得られます。

CRISPR / Cas9を用いた条件付きノックアウトラットモデル

コンディショナルノックアウト（CKO）動物モデルは、胚性致死性、補償機構および望ましくない表現型などの構成的ノックアウトモデルの障害を回避し、ヒト疾患をよりよくモデル化するため、人気が高まっています。最も一般的に使用されるCKOシステムは、目的の遺伝子（標的エクソン）が2つのLoxP配列（floxedアレルとも呼ばれる）に隣接するCre-LoxPシステムです。隣接するLoxP配列は、CRISPR / Cas9技術を用いて目的の遺伝子の両側の特定の部位に挿入されます。LoxP部位は、余剰エクソンの欠失を触媒するCreリコンビナーゼの標的です。

ノックインラット作製サービスのポートフォリオの一部のモデルには、以下が含まれます。

① 構成的ノックイン、ノックアウトモデル；点突然変異ラットモデル
② 条件付きノックアウトラットモデル（例：LoxP-Cre）
③ 誘導性発現ラット（例：Tet-調節系）

また、Applied StemCell社独自のTARGATT™ テクノロジーを使用して、より高度なラットモデルを生成することもできます。

・ヒト化ラットモデル（大遺伝子挿入）
・トランスジーン過剰発現モデル
・レポーター遺伝子の挿入
・Creドライバラット：任意のプロモーター選択（使用可能な場合）を用いてCre-ラットを生成することができます。

CRISPR Knock-Out or Knock-In Rat Generation Timeline

サービス項目	納期	納品物
1. TARGATT DNA構築 （標的遺伝子をクローニングしたベクターも納品されます。）	4-8週間	TARGATT™ ベクタークローニングのレポート
2. TARGATT™ integrase の調製 *in vitro* 転写と調製	2週間	integrase mRNA の合成とバリデーションのレポート
3. TARGATT™ DNAを前核にマイクロインジェクション （最大150個の胚にインジェクションします。）	1-2ヶ月	—
4. ラット飼育及びジェノタイピング	1-2ヶ月	H11領域にシングルコピーの標的遺伝子が挿入されたF0ファウンダーラットを最低1匹納品

お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：17792）からお見積もりのご依頼をお願い致します。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問合せ下さい。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

参考文献

技術説明

・Zhu, F., *et al.* (2014). *Nucleic acids research*, 42(5), e34-e34.
・Tasic, B., *et al.* (2011). *PNAS USA*, 108(19), 7902-7907.
他のトランスジェニック手法との比較
・Rossant, J., *et al.* (2011). *PNAS USA* 108(19), 7659-7660.
TARGATT™によるTet 誘導マウスの作製
・Fan, X., *et al.* (2012). *Endocrinology*, 153(11), 5637-5644.
Hipp11（H11）遺伝子座の利点
・Hippenmeyer, S., *et al.* (2010). *Neuron*, 68(4), 695-709.
TARGATT™により作製されたマウスのアプリケーション
・Park, K. E., *et al.* (2016). *International journal of molecular sciences*, *17*(6), 810.
・Guenther, CA., *et al.* (2014). *Nature genetics*, 46(7), 748-752
・Devine, WP., *et al.* (2014). *eLife*, 3, e03848.
・Villamizar, C. A. (2014) UT GSBS Dissertations and These (Open Access). Paper 508 (2014)
・Fogg, PC., *et al.* (2014). *Journal of molecular biology*, 426(15), 2703-2716
・Chen-Tsai, RY. (2014) *Chinese Science*. 59:1-6.

TARGATT™マウスモデルの引用文献

・Jiang, T., *et al.* (2017). *eLife*, 6
・Booze, M. L., *et al.* (2016). *Free Radical Biology and Medicine*, 99: 533-543.
・Feng, D., *et al.* (2016). *The Journal of Clinical Investigation*, 126(6).
・Sun, N., *et al.* (2015). Measuring in vivo mitophagy. *Molecular cell*, 60(4), 685-696

Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*
Applied StemCell社

CRISPRによるゲノム編集ラット作製受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID:18226

ライセンス取得済みなので安心してご利用頂けます

■サービス概要

Cas9/CRISPR法は、点突然変異（1つまたは複数）、小さなレポーター挿入および条件付きノックアウトを含むラットモデルを生成するために使用されます。CRISPR/Cas9システムは、Cas9ヌクレアーゼを用いてRNA誘導部位特異的DNA切断を促進します。この系は2つの成分から成ります：（1）哺乳動物細胞における核区画化を確実にするために核局在化シグナルを運ぶCas9タンパク質の哺乳動物コドン最適化バージョン；（2）標的DNAを配列特異的に切断するためにCas9タンパク質に指向するRNA（gRNA）を誘導する。ZFNsまたはTALENsを超えるCRISPR/Cas9の利点は、哺乳動物ゲノム内の複数の部位を同時に修飾することができるという点で、哺乳類細胞における遺伝子編集のための堅牢でハイスループットなアプローチを提供するというスケーラビリティと多重性です。

Applied StemCell社は、成功率の高いいくつかの遺伝子発現様式を有するラットモデルを生成することができます。 ポートフォリオの一部のモデルには、以下が含まれます。

- ●構成的ノックイン、ノックアウトモデル；点突然変異ラットモデル
- ●条件付きノックアウトラットモデル（例：LoxP-Cre）
- ●誘導性発現ラット（例：Tet-調節系）

また、Applied StemCell社独自のTARGATT™ テクノロジーを使用して、より高度なラットモデルを生成することもできます。

- ●ヒト化ラットモデル（大遺伝子挿入）
- ●トランスジーン過剰発現モデル
- ●レポーター遺伝子の挿入
- ●Creドライバラット：任意のプロモーター選択（使用可能な場合）を用いてCre-ラットを生成することができます。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問合せ下さい。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

参考文献

CRISPR technology:
・Smalley, E. （2016） CRISPR mouse model boom, rat model renaissance. *Nature Biotechnology*. 34: 893-894
・Baker, M. （2014） Gene editing at CRISPR speed. *Nature* Biotechnology 32, 309-312

CRISPR Knockin H11 Locus in Pigs:
・Ruan, J., *et al.* （2015）. *Scientific reports*, 5:14253. doi: 10.1038/srep14253

Others:
・Hu, J. K., *et al.* （2016）. *PloS one, 11* （5）, e0156074
・Besschetnova, TY., *et al.* （2015）. *Matrix Biology*, 42, 56-73.
・McKenzie, CW., *et al.* （2015）. *Molecular biology of the cell*, 26 （18）, 3140-3149
・Bishop, KA., *et al.* （2016）. G3: Genes| Genomes| Genetics, g3-116.

好評配布中！
コスモ・バイオニュース
ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！
www.cosmobio.co.jp
毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

コスモ・バイオは、

Science Signaling の

細胞シグナル伝達のトップジャーナル　— 米国科学振興協会（AAAS）発行 —

日本語サイトを 運営しています。

Science Signaling
AAAS

Science Signaling Japan brought to you by COSMO BIO
Signal Transduction Knowledge Environment

Science Signaling とは？

Cell Signaling（シグナル伝達）の先進的研究成果を発信する週刊の web ジャーナルです。本誌は 1999 年に米国科学振興協会（AAAS）から *Signal Transduction Knowledge Environment*（STKE）として創刊され、2008 年からは「*Science Signaling*」に名称を変えて、シグナル伝達分野の最新情報を毎週お届けしています。

投稿受付中！
本誌 4 ページ「*Science Signaling* 投稿について」もぜひご覧ください。

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

毎週水曜日更新
http://www.cosmobio.co.jp/ にて公開中

Applied Biological Materials社

iCRISPR ノックアウト／ノックイン細胞作製受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID：14301

ヒト、マウス、ラット由来細胞のKO/KI承ります！

ウイルスベクターや遺伝子工学の分野で長年実績のあるApplied Biological Materials社は、全ヒト、マウス、およびラット遺伝子を標的とした独自のゲノムワイドsgRNAライブラリー発現用のレンチウイルスシステムを開発しました。レンチウイルスシステムは、Cas9ヌクレアーゼ発現ベクターと補完することで、遺伝子ノックアウト／ノックイン実験において理想的な手法となります。

本サービスでは上記手法を用いてヒト、マウス、ラット由来細胞の標的遺伝子をノックアウト、またはセーフハーバーであるAAVS1領域にノックインしてご提供いたします。厳格な品質管理とサンガーシーケンシング、PCRまたはウエスタンブロットによる遺伝子ノックアウトの検証後、遺伝子改変細胞をお客様にお届けいたします。

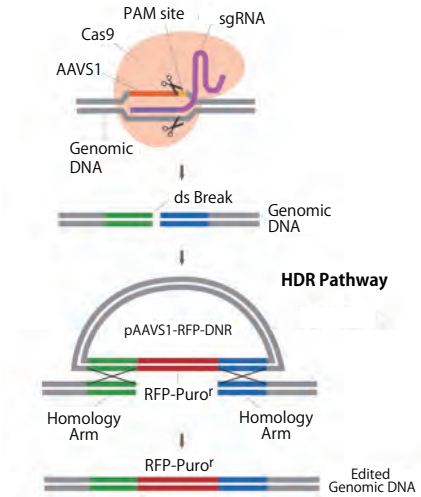


図1　CRISPR/Cas9によるノックイン模式図

作業内容

① ご希望の Cas9 発現細胞を下記からご選択いただきます
- ● HEK293　● HEK293T　● A549
- ● HeLa　● MDCK　● A375
- ● HepG2　● HT1080　● U87MG

またはApplied Biological Materials社の豊富な不死化細胞からご選択いただくことも可能です

② sgRNAおよびドナーベクターのデザイン、構築、細胞へのデリバリー
③ 薬剤耐性または蛍光レポーターによるクローンのスクリーニングと選択
④ サンガーシーケンシングによるスクリーニングとバリデーション
⑤ 選択されたクローンの増殖と凍結保管
⑥ PCR ベースのマイコプラズマ試験

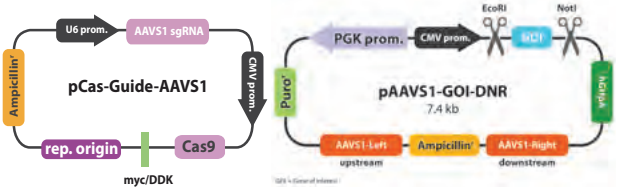


図2　ゲノム編集用ベクターマップ
pCas-Guide-AAVS1はsgRNAとCas9を哺乳類細胞で共発現するためのall-in-oneベクターです。
pAAVS1-GOI-DNRはAAVS1領域にGOIをノックインするためのドナーベクターであり、ピューロマイシン耐性マーカーを発現します。

納品物

・報告書（Cas9-sgRNAベクター情報およびsgRNA配列情報、サンガーシーケンシングデータ含む）
・最低1クローンのノックアウト／ノックイン細胞各1～2バイアル

■参考価格と標準納期

参考価格

サービス項目	参考価格（税抜）
CRISPRノックアウト細胞作製受託サービス＊1	¥1,100,000
CRISPR ノックイン細胞作製受託サービス＊2	¥2,300,000
ゲノム編集用にご希望の細胞をご送付いただく場合	¥158,000
納品クローン追加	¥50,000
納品クローンのバイアル追加	¥16,000
ウエスタンブロッティングによるバリデーション（最大10クローン）＊3	¥193,000
Whole Genome SequencingによるOff-Target解析	¥792,000
サンガーシーケンシングによるセレクション、スクリーニングの再実施	¥165,000
ノックアウト細胞のSTRプロファイリング	¥30,000

＊1. Applied Biological Materials社所有の細胞を用いた場合の基本価格です。対立遺伝子のうち一方のみノックアウトされた場合でも作業成功と判断し全額のご請求となります。ノックアウト細胞が得られなかった場合は、作業費として22万円（税抜）を申し受けます。
＊2. Applied Biological Materials社所有の細胞を用いた場合の基本価格です。ノックインできるのはAAVS1領域に限定されます。対立遺伝子のうち一方のみノックインされた場合でも作業成功と判断し全額のご請求となります。ノックアウト細胞が得られなかった場合は、作業費として46万円（税抜）を申し受けます。
＊3. バリデート済みの抗体をポジティブコントロールと共にご送付いただきます。

納期

約7ヶ月。細胞の増殖速度により更に納期が延長することもあります。

■サンプルのご送付方法

1×10⁶の凍結細胞を含むバイアル2本をご用意いただきます。詳細はコスモ・バイオのWebの商品紹介ページ（WEB 記事ID：14301）をご覧ください。

お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：14301）から見積のご依頼をお願い致します。

お問い合わせ先：製品情報部
ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願い致します。
TEL　：03-5632-9615　FAX：03-5632-9614
E-mail ：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*

Applied StemCell社

TARGATT™ 部位特異的ノックイン細胞株作製

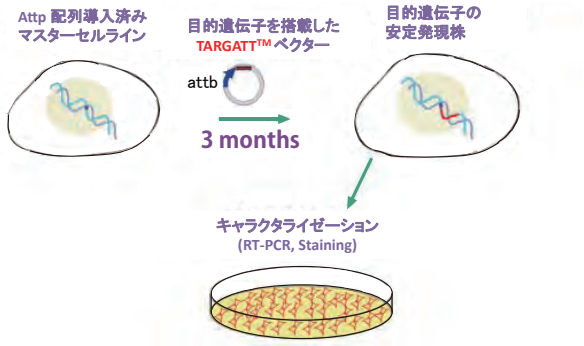
WEBへどうぞ
記事ID:17793

最大 20 kb の標的遺伝子をご希望部位にノックイン!!

サービス内容

特許取得済みのTARGATT™ 技術を用いて部位特異的ノックイン細胞を作製致します。TARGATT™ 技術とは、PhiC31インテグラーゼがベクターに挿入された34 bpのアタッチメントサイトattB配列と宿主（細胞、マウス、ラット）ゲノム中に挿入されたattP配列間の組み換えを触媒することで目的領域に遺伝子を導入する手法であり、Applied StemCell社（ASC社）はStanford University（CA USA）から本手法の独占的なライセンスを得ております。

TARGATT™ テクノロジーの利点やFAQ、参考文献等は、84ページにて紹介しています。



ASC社はattPドッキング部位をセーフハーバー領域に含むCHO細胞（導入部位：H11）及びヒト皮膚細胞由来のiPS細胞（導入部位：Rosa26）を作製しました。本細胞株は高効率で、目的遺伝子を迅速、簡単、部位特異的に挿入するために使用可能です。あるいはご希望の細胞株をご送付頂き、CRISPR/Cas9によりattPドッキング部位を特定の遺伝子座に挿入したトランスジェニック細胞株を作製することも可能です。

サービス手順

1）ご希望の細胞をご送付頂くか、ATCC等からの購入をご依頼下さい。
*またマイコプラズマ試験の結果をご連絡下さい。弊社にて試験実施することも可能です。
*いくつかの癌細胞は核型検査結果が必要になります
2）CRISPR技術を用いてattP部位を細胞に挿入する
*attP の挿入部位のご指定が可能です。
3）インテグラーゼおよびドナープラスミドをトランスフェクションすることにより、attP部位にご希望の遺伝子を導入します。
4）細胞スクリーニング、細胞増幅/バリデーション、凍結保存

お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：17793）からお見積もりのご依頼をお願い致します。サンプルの送付方法等もご案内しています。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問合せ下さい。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

WEBへどうぞ
記事ID:18369

■関連商品

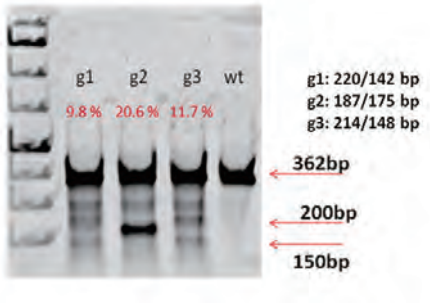
Cas9発現細胞株(Jurkat, mESC, K562)

gRNA の活性検証を血液細胞で

gRNAバリデーションは通常K562又はHEK293細胞株を用いて行いますが、これらの細胞株で検証されたgRNA活性が、血液細胞においても適用されるとは限りません。Applied StemCell社はS.pyogenes Cas9ヌクレアーゼを安定に発現するJurkat, mESC, K562細胞株を開発いたしました。gRNAをトランスフェクトした後にSurveyorまたはT7エンドヌクレアーゼアッセイを行うことにより、gRNAの活性検証にご使用いただけます。

以下のデータは、Jurkat-C9mを用いたガイドRNAの検証結果を示しています。まずJurkat-C9mに3つのgRNAをトランスフェクトし、その72時間後にゲノムDNAを抽出しました。3種全てのgRNAは、ミスマッチアッセイにおいて活性があることが示されました。

＊mESC-C9mのご購入に際しましてはMTAへのサインが必要になります。



Applied StemCell, Inc.【メーカー略号：ASC】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Cas9 Expressing Jurkat Cells	ASE-9300	1 vial（5×10^5 cells）	¥ 363,000	液窒
Cas9 Expressing K562-LC9	ASE-9312	1 vial（5×10^5 cells）	¥ 363,000	液窒
Cas9 Expressing mESC C57BL/6	ASE-9311	1 vial（5×10^5 cells）	¥ 363,000	液窒

Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*
Applied StemCell社

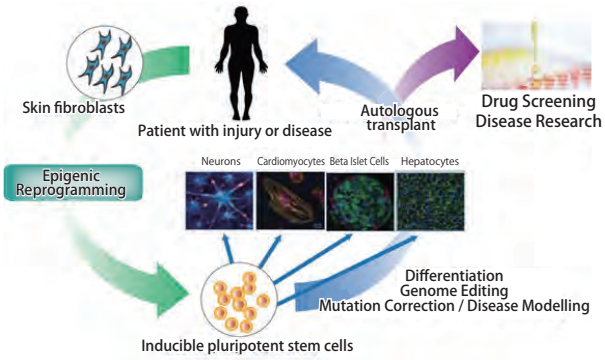
iPS細胞のCRISPR/Cas9によるゲノム編集受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID：18220

病理モデルに最適なゲノム編集iPS細胞を作成します

■受託サービス概要

Applied StemCell社ではCRISPR/Cas9 によるiPS細胞株の作製受託サービスを行っており、*in vitro* におけるドラッグディスカバリーや毒性研究のための疾患モデルとしてご利用頂けます。疾患モデルの選択肢にはフェニルケトン尿症（PKU）、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、筋ジストロフィー（MD）、Ⅰ型またはⅡ型糖尿病などが含まれます。ソースとなるiPS細胞はお客様がお持ちのものをお送りいただくか、Applied StemCell社のiPS細胞カタログからお選びいただけます。



特長

以下の多様なゲノム編集iPS細胞を提供可能です。

- 遺伝子のノックアウト、挿入、置換
- レポーター遺伝子の挿入
- 遺伝子の修正
- 部位特異的な長い断片のノックアウト（10kb以上）
- ヘテロ接合・ホモ接合のクローンが選択可能
- 重要な研究分野用の非特異的な変異のないCRISPRによるゲノム編集

※ゲノム編集の有無はジェノタイピングとRFLPにより確認しています。また、作製時には進捗段階に応じてご報告差し上げ、作製完了時にはより詳細な報告を差し上げます。

ゲノム編集iPS細胞作製のワークフロー

手順	所要時間
1. 細胞系列のバリデーション	
1.1 細胞の回復と培養、伸長	2-3週間
1.2 マイコプラズマ試験	1週間
1.3 Drug kill curve evaluation	1週間
1.4 標的配列のシーケンシング	1週間
1.5 トランスフェクションの最適化	2週間
2. DNAベクターの構築とバリデーション	
2.1 gRNAのデザインと構築、オフターゲットの解析とSNPのチェック、gRNAのクローニング（最大4種のgRNA）	1週間
2.2 gRNAのvitroバリデーション（最大4種のgRNA）	2-3週間
2.3 ドナーオリゴのデザインと構築	2-3週間
3. CRISPR/Cas9コンストラクトのトランスフェクション	
3.1 トランスフェクション/エレクトロポレーション	1週間
3.2 薬剤によるセレクション	1週間
3.3 トランスフェクションされた細胞が日相同末端連結（NHEj）	1週間
3.4 細胞のクローニングと増殖	2-4週間
4. 細胞の確認と増殖	
4.1 PCRとシーケンシングによるスクリーニング（最大200クローン）	2-3週間
4.2 PCRとシーケンシングによる陽性クローンのスクリーニング（1、2クローン）	2-4週間
4.3 細胞の凍結保存	1週間
total	16-26週間

お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：18220）からお見積もりのご依頼をお願い致します。サンプルの送付方法等もご案内しています。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問合せ下さい。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

参考文献

・Seigel, G. M., *et al.*（2014）. Comparative Analysis of ABCG2+ Stem-Like Retinoblastoma Cells and Induced Pluripotent Stem Cells as Three-Dimensional Aggregates. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, *55*（13）, 3068-3068.
・Comley, J.（2016）. CRISPR/Cas9 - transforming gene editing in drug discovery labs. *Drug Discovery Weekly*. Fall 2016; 33-48.

Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*

Applied StemCell社

TARGATT™ CHO細胞株による組み換えタンパク質の高レベル作製サービス

WEBへどうぞ
記事ID:32975

大規模なバイオプロダクションを実現

伝統的なCHO抗体の製造方法は、導入遺伝子の無作為な遺伝子挿入および強制増幅を含むので非効率的であり、挿入部位効果（位置効果）、DNA反復誘発遺伝子サイレンシングおよびゲノム不安定性、内因性遺伝子の調節または中断の変化が生産レベルに悪影響を及ぼします。

Applied StemCellは、CHO細胞株における独自のTARGATT™ 技術（WEB 記事ID：17793）により、高レベルのタンパク質および抗体発現のためのTARGATT™ CHO細胞株を作製しました。本細胞株は標的遺伝子をセーフハーバー領域であるH11に導入して発現することが可能であり、2週間のフェドバッチ振とうフラスコ発現系で2.5g/ℓを超える組換えタンパク質を産生します。本技術により容易に大規模なバイオプロダクションを実現します。

・標準納期：4-6 ヶ月
・発現ベクター：通常TARGATT™ 2（CAG+Poly A）を使用します。

お見積り・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：32975）からお見積もりのご依頼をお願い致します。

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問合せ下さい。
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

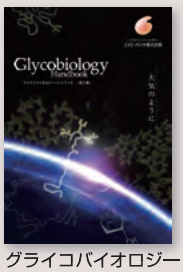
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第4版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

良いコウタイがー
あっタイガ〜！

抗体百科

■ 探しま章 ┐ **Web 検索データベース**
└ 100 万品目以上の品ぞろえ、主要な
約 12,000 ターゲットの抗体を国内に在庫。

■ 作りま章 ┐ **抗体作製受託サービス**
└ お客様とのコミュニケーションを大切にし、
高い技術力であらゆるニーズに対応。

**「探しま章」はトップページの
このバナーをクリック！**

国内最大級の抗体データベース 抗体百科

コスモ・バイオの抗体百科に Go！ www.cosmobio.co.jp

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

好評配布中！

コスモ・バイオニュース

ウェブサイトから定期購読の登録【無料】ができます！
www.cosmobio.co.jp

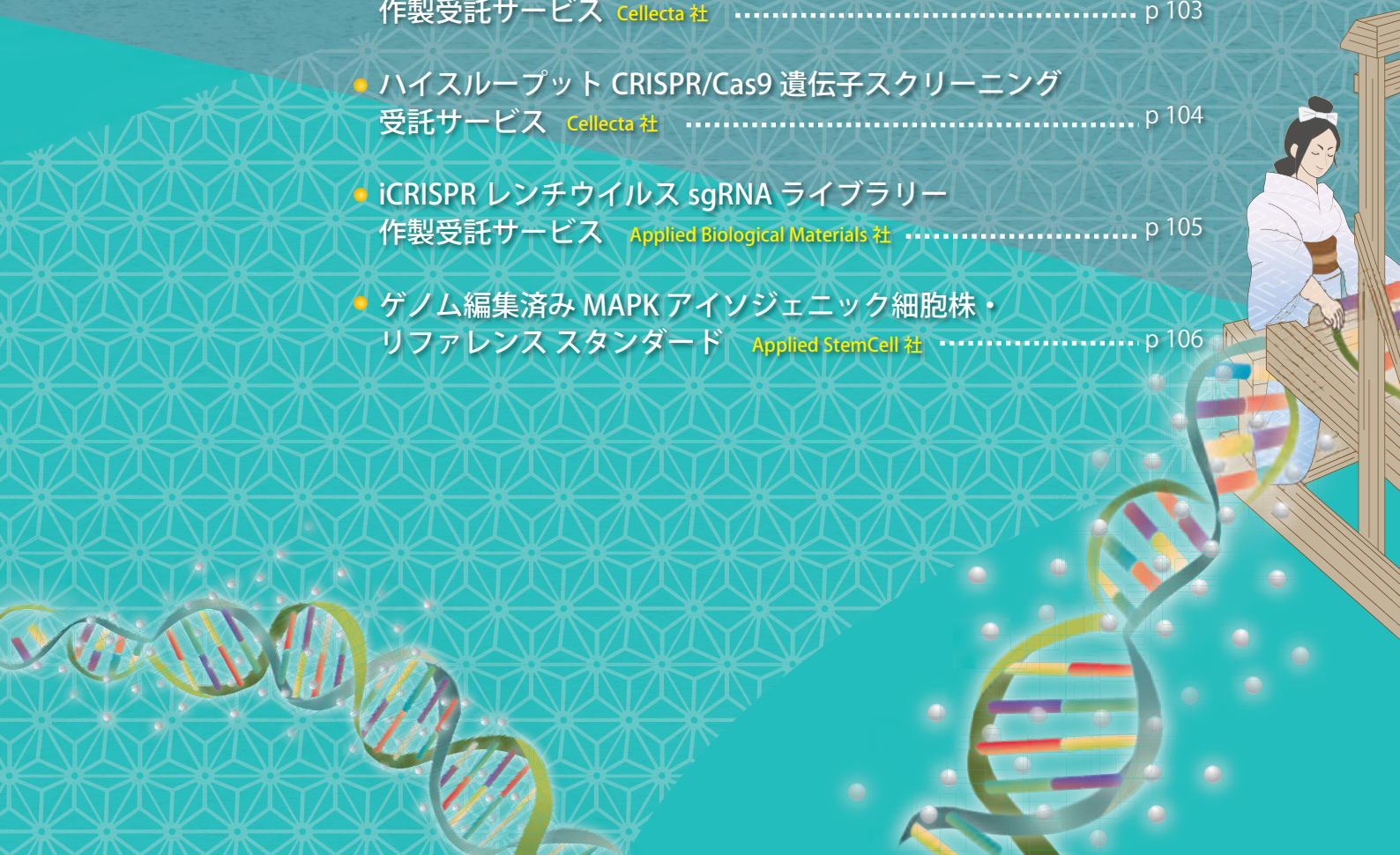
毎号、特集として様々な研究の中から旬な話題をピックアップ。
新商品の紹介や、キャンペーン・学会などの情報も掲載しています。

第6章

ライブラリー／スクリーニング

技術情報

- CRISPR/Cas9 sgRNA ライブラリーを利用したゲノムワイド機能解析アプローチ GeneCopoeia 社 …… p 94
- Genome-CRISP™ human single guide RNA（sgRNA）ライブラリー GeneCopoeia 社 …… p 97
- Genome-CRISP™ CRISPR/Cas9 stable cell line GeneCopoeia 社 … p 99
- CRISPR ヒト / マウスゲノムワイド sgRNA ライブラリー Cellecta 社 …… p 101
- レンチウイルス CRISPR sgRNA ライブラリー作製受託サービス Cellecta 社 …… p 103
- ハイスループット CRISPR/Cas9 遺伝子スクリーニング受託サービス Cellecta 社 …… p 104
- iCRISPR レンチウイルス sgRNA ライブラリー作製受託サービス Applied Biological Materials 社 …… p 105
- ゲノム編集済み MAPK アイソジェニック細胞株・リファレンス スタンダード Applied StemCell 社 …… p 106



CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーを利用したゲノムワイド機能解析アプローチ

WEBへどうぞ
記事ID：15441

ゲノム編集技術をハイスループット ノックアウトアプリケーションへ利用

GeneCopoeia™ Expressway to Discovery

GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

近年の研究により、多くの生物のゲノム配列が明らかになりつつあり、最近では特にヒトゲノムの全長配列といった豊富なDNA配列情報を利用し、ゲノムにコードされた遺伝子について、本来の役割を明らかにする研究が進められています。さらに、生化学的ネットワークやシグナル伝達経路についての理解が深まり、疾患治療の改善へと繋がることが期待されています。

機能ゲノム学の主なアプローチとして、遺伝子を「ノックダウン（低減）」または「ノックアウト（完全除去）」して遺伝子機能を調べる方法がありますが、2012年以降は、機能ゲノム研究にCRISPR/Cas9技術を利用する研究者が増えています。CRISPR/Cas9は、シンプルなRNA誘導型のメカニズムであるため、遺伝子ノックアウト、融合タグ付け、塩基置換、ノックインといった多くのアプリケーションに対して迅速、簡便かつ比較的低価格で利用することが可能です。近年は、CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーを用いたハイスループットスクリーニングも利用されるようになりました。

GeneCopoeia社（97ページ参照、WEB 記事ID：14485）やApplied Biological Materials社（105ページ参照、WEB 記事ID：14300）では、特定の伝達経路や遺伝子群に焦点をあてたCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーやご自身で遺伝子をご選択いただけるカスタムメイドのsgRNAライブラリーを多数販売しています。本稿では、CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーの特長、アプリケーション、特定のシグナル伝達経路や遺伝子群に焦点をあてたCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーの利点に関して紹介します。

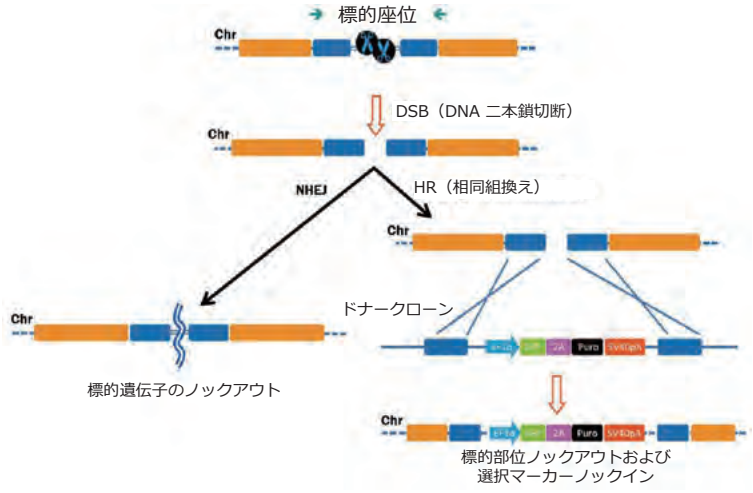


図1　CRISPR/Cas9により誘導されたDNA二本鎖切断の修復経路
左：NHEJ（非相同性末端結合）　右：ドナーコンストラクト存在下における相同組換え

1 CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーとは

CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーは、数百から数千のsgRNA発現プラスミド（あるいはウイルス粒子）のコレクションです。各プラスミドから特定の標的部位に特異的な一本鎖ガイドRNA（sgRNA、gRNA）が発現し、これが*Streptococcus pyogenes*由来のCas9ヌクレアーゼ存在下で、染色体上にDNA二本鎖切断を誘導します（図1）。DNA二本鎖切断は非相同末端結合（NHEJ）による修復を受けますが、ここにエラーが生じることによりノックアウトが誘導されます。ドナーテンプレート存在下では相同組換え（HR）により、ノックアウトが誘導されます。ドナーテンプレート存在下での相同組換え、あるいは非相同性末端結合（NHEJ）のいずれかによる修復を受け、ここにエラーが生じることによって、変異体をノックアウトへと導きます。

CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーの利用により、哺乳動物細胞を利用して様々な遺伝子を同時にノックアウトすることができるため、薬物標的の同定や検証などのアプリケーションにおいて注目されています。従来、これらのアプリケーションにはRNAiが利用されていました。例えば、Sethi（2012）らは、6,000種の「新薬候補」遺伝子を標的とするshRNAライブラリーを用いて卵巣がん細胞における標的候補の同定を報告しており、CooperとBrockdorff（2013）は、shRNAライブラリーを利用してGata6-neoプロモータレポーターを活性化させる因子を同定しています。Cellecta社からは、次世代シーケンス技術を利用したゲノムワイドshRNAライブラリー（WEB 記事ID：8048）が販売されています。Zhang（2014）らは、蛍光標識細胞分取法（FACS）を利用して、細胞表面マーカーであるPSA-NCAMを発現する細胞を単離し、ヒト胚性幹細胞（hESCs）においてPSA-NCAMが発現していることを示しました。

shRNAライブラリーはハイスループットでの機能欠失型スクリーニングに有用であるものの、CRISPR/Cas9技術と比べるとRNAi技術には「不足している」といえるポイントがいくつかあります。

- RNAiは、遺伝子発現レベルの低下（ノックダウン）を誘導する。したがって、残った遺伝子発現による偽陰性を見落とす可能性がある。
- RNAiは、mRNAに対してのみ機能する。長鎖のノンコーディングRNAなど、核内RNAはサイレンシングできない。

一方、CRISPR/Cas9技術は、遺伝子コードを永久的に変更します。したがって、CRISPR/Cas9では、転写産物が核内や細胞質内に局在化したとしても全ての対立遺伝子をノックアウトすることが可能といえます。

2 CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーの使い方

sgRNAライブラリーの使い方は非常にシンプルです。ただし、sgRNAライブラリーを有効利用するためには「読み取り情報（観察できる表現型やアッセイ）」の存在が重要となります（図2）。sgRNAライブラリーの各プラスミドをDNAのままで細胞にトランスフェクションすることも可能ではありますが、一般的にはレンチウイルス粒子にパッケージングしたものをプールして使用します。GCP社のsgRNAライブラリーについては、各プラスミドはsgRNAが含まれるものの、必須であるCas9は含まれていません。そのため、使用する細胞にsgRNAとCas9とを同時にトランスフェクションまたは同時感染させる必要があります。レンチウイルス粒子を用いて感染させる場合、Cas9は分子サイズが大きくパッケージングが難しいため、はじめにCas9安定発現細胞株を樹立することが推奨されます。また、sgRNA発現レンチウイルス粒子のみを使用することで感染効率がより高くなります。細胞にプラスミドをトランスフェクションする場合、あるいはプールしたレンチウイルス粒子を感染させる場合のいずれにおいても、細胞の応答をもとにスクリーニングを行うことになります。スクリーニング結果の解釈の一例として以下のようなケースがあげられます。

- 細胞死：致死性のノックアウトとなった細胞は生存細胞集団内で少数派となる。
- 薬剤耐性：研究対象の薬剤に対して耐性を示す細胞は薬剤処理後に生存細胞集団内で大きな比率を示す。
- レポーターアッセイ：GFPなどの蛍光レポーター発現能を欠損した細胞はFACS処理後に少数派となる。

結果の読み出しを行った後、DNAシーケンシングを行い、どのsgRNAがプール内で過小または過大に存在するかを同定します。大規模な全ゲノムスケールのライブラリーを利用する場合には、候補遺伝子を標的するsgRNAの同定に次世代シーケンシングを利用する必要があります。

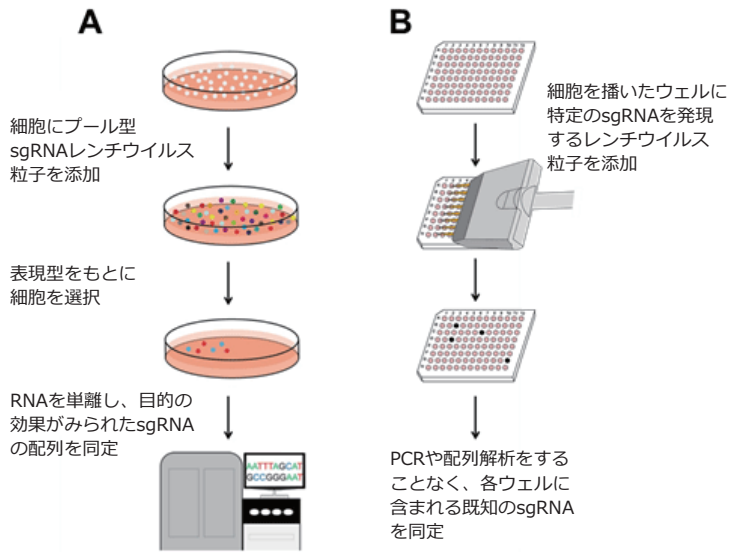


図2　CRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーを用いた基本的な実験の流れ
A プール型スクリーニング
B 個別のsgRNAを用いたスクリーニング

3 CRISPR sgRNAライブラリー開発

遺伝子機能除去（loss of function）においては、RNAiと比較してCRISPR/Cas9技術が優位であるとの観点から、いくつかの研究グループにより大規模CRISPR sgRNAライブラリーが構築されました。例えば、Wang（2014）らは、7,300種の遺伝子を標的とするsgRNA発現レンチウイルス粒子のプールを構築し、Cas9ヌクレアーゼを安定発現する一倍体細胞株に感染させました。6-チオグアノシン耐性をもつ導入細胞のスクリーニングを行った結果、ミスマッチ修復経路に関与する遺伝子を標的とするsgRNA群が多数みられ、他のDNA修復経路ではこれがみられないことを見いだしています。同様に、MITのFeng Zhangのグループは、約18,000種の遺伝子を標的するsgRNAレンチウイルスライブラリーを使用してベムラフェニブに感受性または耐性なメラノーマや幹細胞を同定しました（Shalemら、2014）。Zhangのラボでは、いくつかの改良を加えた、より多くのヒトおよびマウス遺伝子を標的する第2世代ライブラリーを構築し、この初期研究をさらに追求しています（Sanjanaら、2014）。

4 GeneCopoeia社 Genome-CRISP™ CRISPR sgRNAライブラリー

GeneCopoeia社では、特定のシグナル伝達経路や遺伝子群を標的とした構築済みCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーシリーズをご提供しています。

- GeneCopoeia社 Genome-CRISP™ human single guide RNA（sgRNA）ライブラリー（97ページ、WEB記事ID：14485）
- GeneCopoeia社 Genome-CRISP™ CRISPR/Cas9 stable cell line（99ページ、WEB記事ID：14484）

参考文献

- Cooper & Brockdorff (2013). Genome-wide shRNA screening to identify factors mediating Gata6 repression in mouse embryonic stem cells. *Development* 140, 4110.
- Sethi, *et al*., (2012). An RNA interference lethality screen of the human druggable genome to identify molecular vulnerabilities in epithelial ovarian cancer. PLoSONE 7.
- Shalem, *et al*. (2014). Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84.
- Sanjana, *et al*. (2014). Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nature Methods* 11, 783.
- Wang, *et al*. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 343, 80.
- Zhang, *et al*. (2014). Functional genomic screen of human stem cell differentiation reveals pathways involved in neurodevelopment and neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 12361

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the GeneCopoeia, Inc. for providing the information of CRISPR/Cas9 technology for the genome-wide screening presented here.

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

GeneCopoeia社

Genome-CRISP™ human single guide RNA（sgRNA）ライブラリー

WEBへどうぞ
記事ID: 14485

CRISPR/Cas9を使った遺伝子ノックアウトによる機能欠失型スクリーニング！

本製品は、特定遺伝子群、あるいはお客様ご指定の遺伝子群や情報伝達経路に関与するヒト遺伝子のハイスループットノックアウトに適したCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリーです。遺伝子ノックアウトによる機能欠失型スクリーニングは、遺伝子探索、ゲノムスケールでの機能照合（例：シグナル情報伝達経路）、および薬物探索（例：標的同定や薬物機能研究）など、哺乳動物細胞を用いた体系的な遺伝学的解析を進める上で非常に有力なツールです。

アプリケーション

- 多数のsgRNAを用いたハイスループットスクリーニング
- 薬物標的探索（図1）
- 合成致死性の解析

CRISPR/Cas9を利用した大規模スクリーニング

本製品は、大規模機能スクリーニングを目的として、2種類の送達手法（トランスフェクションとトランスダクション）が可能なレンチウイルスベクターにクローンしてあります。高い遺伝子ノックアウト効果が得られるよう、各標的遺伝子に対して異なる遺伝子部位を標的するバーコード付きsgRNAを構築し、最適化および配列検証済みです。本ライブラリーは、予め選択してある遺伝子ファミリー用のプール型sgRNAライブラリーの他に、ご指定の遺伝子群に合わせてカスタマイズすることもできます。レンチウイルス粒子、すぐにトランスフェクションできるプラスミドDNA、または大腸菌ストックよりお選びください。Cas9ヌクレアーゼ安定発現株をはじめとするご利用の細胞株にトランスフェクションまたはトランスダクションできます。

表1　GeneCopoeia Genome-CRISP™構築済みヒトCRISPR/Cas9 sgRNAライブラリー

品番	ライブラリー名	sgRNA数	標的遺伝子数
L01-LS03	天然キナーゼ&ユビキチンリガーゼ	475	239
L02-LS03	核内ホルモン受容体	236	118
L03-LS03	腫瘍転移遺伝子	114	57
L04-LS03	癌遺伝子	576	288
L05-LS03	腫瘍抑制遺伝子	462	231
L06-LS03	タンパク質キナーゼ	1316	658
L07-LS03	50種の経路における主要遺伝子	278	139

＊各ライブラリーは、大腸菌ストック、トランスフェクションにそのまま使用できる精製済プラスミドDNA、またはレンチウイルス粒子のいずれかの形態をプールした状態でご提供しています。

GeneCopoeia社sgRNAライブラリーは、非常に多用途なベクター（図3）を用いて調製されており、直接細胞にトランスフェクション、あるいはレンチウイルス粒子へとパッケージング、また*in vitro*転写にもご使用いただけます。sgRNAライブラリーは各sgRNAクローンを個別に構築し、プールしています。そのため、以下のような利点があります。

特長

- 個別に構築したsgRNAコンストラクトをプール
- プラスミドまたはウイルス粒子にてご提供
- ライブラリーの規模が比較的小さいため、解析に要する時間や労力を抑えることが可能

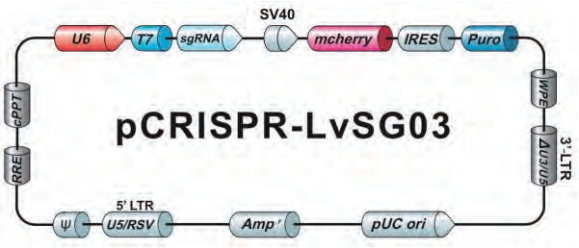


図1　Genome-CRISP™ CRISPR sgRNAライブラリーに使用しているプラスミド

■Genome-CRISP™ human single guide RNA（sgRNA）ライブラリー

プール型精製済プラスミドDNAフォーマット

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号：GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Innate kinases & ubiquitin ligases, plasmid DNA format, Human	LO1-LS03-F1	4 vial (118-119 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Nuclear hormone receptors, plasmid DNA format, Human	LO2-LS03-F1	2 vial (118 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Tumor metastasis genes, plasmid DNA format, Human	LO3-LS03-F1	2 vial (57 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Oncogenes, plasmid DNA format, Human	LO4-LS03-F1	4 vial (144 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Tumor suppressor genes, plasmid DNA format, Human	LO5-LS03-F1	4 vial (115-116 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Protein kinases, plasmid DNA format, Human	LO6-LS03-F1	10 vial (131-132 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Key genes in 50 pathways, plasmid DNA format, Human	LO7-LS03-F1	2 vial (139 sgRNAs each, 10-15 μg)	ご照会	㊒

プール型大腸菌ストックフォーマット*

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号：GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Innate kinases & ubiquitin ligases, bacterial stock format, Human	LO1-LS03-B1	4 vial (118-119 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Nuclear hormone receptors, bacterial stock format, Human	LO2-LS03-B1	2 vial (118 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Tumor metastasis genes, bacterial stock format, Human	LO3-LS03-B1	2 vial (57 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Oncogenes, bacterial stock format, Human	LO4-LS03-B1	4 vial (144 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Tumor suppressor genes, bacterial stock format, Human	LO5-LS03-B1	4 vial (115-116 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Protein kinases, bacterial stock format, Human	LO6-LS03-B1	10 vial (131-132 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Key genes in 50 pathways, bacterial stock format, Human	LO7-LS03-B1	2 vial (139 sgRNAs, 1mℓ each vial)	ご照会	凍

＊上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

プール型レンチウイルス粒子フォーマット*

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号：GCP】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Innate kinases & ubiquitin ligases, lenti virus particle format, Human	LO1-LS03-P1	4 vial (118-119 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Nuclear hormone receptors, lenti virus particle format, Human	LO2-LS03-P1	2 vial (118 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Tumor metastasis genes, lenti virus particle format, Human	LO3-LS03-P1	2 vial (57 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Oncogenes, lenti virus particle format, Human	LO4-LS03-P1	4 vial (144 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Tumor suppressor genes, lenti virus particle format, Human	LO5-LS03-P1	4 vial (115-116 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Protein kinases, lenti virus particle format, Human	LO6-LS03-P1	10 vial (131-132 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍
CRISPR/Cas pooled sgRNA library, Key genes in 50 pathways, lenti virus particle format, Human	LO7-LS03-P1	2 vial (139 sgRNAs, 2.5×10^6 TU in 25 μℓ)	ご照会	凍

＊上記商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

■関連製品

- Premade Cas9 stable cell line（CRISPR/Cas9安定発現細胞株）（99ページ、WEB 記事ID：14484）

GeneCopoeia社

Genome-CRISP™ CRISPR/Cas9 stable cell line

WEBへどうぞ
記事ID: 14484

CRISPR/Cas9ヌクレアーゼ安定発現細胞株、gRNAの機能検証やgRNAライブラリーのスクリーニングに

CRISPR/Cas9ヌクレアーゼを定常的に発現する安定発現細胞株です。この細胞株を利用してCRISPRゲノム編集アプリケーションを高効率で行うことが可能です。

Genome-CRISP™ Cas9安定発現細胞株は、Cas9ヌクレアーゼ遺伝子をセーフ・ハーバー（ヒト：AAVS1、マウス：ROSA26）、またはランダムで導入したヒトやマウス、ラットの細胞株をご用意しています。CRISPR/Cas9ヌクレアーゼは、sgRNAと共に、遺伝子ノックアウト、遺伝子変異導入、タグ融合など、ゲノム上遺伝子の編集に広く使用されています。本細胞株は安定的なCRISPR/Cas9ヌクレアーゼの発現を実現しています。

特長

- sgRNAライブラリーを用いたスクリーニングに有用
- Cas9は、セーフ・ハーバー部位への組込みもしくはレンチウイルスを利用したランダムな組込み
- 単一クローンから樹立しているため、Cas9発現が高レベルで安定
- GeneCopoeia社のsgRNAクローン、sgRNAライブラリー、ドナークローンと組み合わせて使用可能

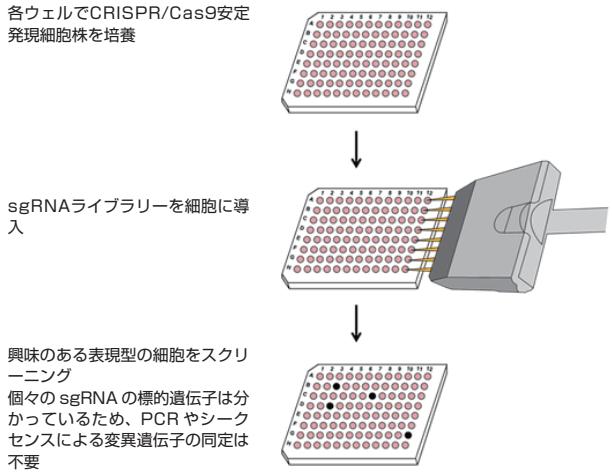


図1　アプリケーション例：Cas9安定発現細胞株とsgRNAライブラリー（individuals）を用いたスクリーニング
薬物標的探索へのGenome-CRISP™ Cas9安定細胞株の利用。
上：96ウェルプレートの各ウェル内でCRISPR/Cas9ヌクレアーゼ安定発現細胞を培養
中：マルチチャネルピペットを用いて、個別またはプール型Genome-CRISP™ sgRNAライブラリーを細胞にトランスフェクション/トランスダクション
下：細胞死（黒色ウェル）をもとにスクリーニング
各sgRNAにはバーコードが付与されており、個別またはプールしたsgRNAを薬物標的候補として同定可能。

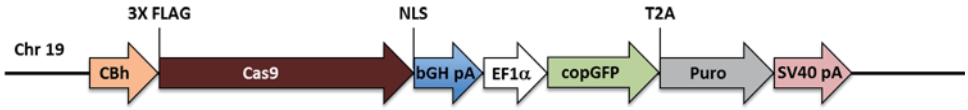


図2　細胞に組込まれるCRISPR/Cas9ヌクレアーゼコンストラクト模式図
このコンストラクトをヒト第19染色体上のAAVS1セーフ・ハーバー部位にノックインした。

CBh　：ハイブリッドCBAプロモーター
3X FLAG：N末端 3x FLAGタグ
NLS　：核局在化シグナル
bGH pA：ウシ成長ホルモンポリアデニル化シグナル
EF1a　：伸長因子1aプロモータ
copGFP：カイアシ類緑色蛍光タンパク質
T2A　：copGFPやPuroの翻訳を同一転写物とは非依存的に行う要素
SV40 pA：サルウイルス40ポリアデニル化シグナル

➡商品リストは次ページ

ヒト細胞株

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号：GCP】

細胞株	由来	挿入箇所	選択マーカー	品番	希望販売価格	貯蔵
T24	Bladder cancer	random	Hygro	SL560	ご照会	液窒
U-2-OS	Bone cancer	random	Hygro	SL546	ご照会	液窒
K562	Bone marrow cancer	random	Hygro	SL552	ご照会	液窒
DU4475	Breast cancer	random	Hygro	SL547	ご照会	液窒
HCC1428	Breast cancer	random	Hygro	SL558	ご照会	液窒
HCC70	Breast cancer	random	Hygro	SL544	ご照会	液窒
MCF-7	Breast cancer	AAVS1	Hygro	SL514	ご照会	液窒
MCF-7	Breast cancer	random	Hygro	SL524	ご照会	液窒
MDA-MB-231	Breast cancer	random	Hygro	SL515	ご照会	液窒
MDA-MB-468	Breast cancer	random	Hygro	SL516	ご照会	液窒
SK-BR-3	Breast cancer	random	Hygro	SL535	ご照会	液窒
T47D	Breast cancer	random	Hygro	SL517	ご照会	液窒
LS411N	Caecum cancer	random	Hygro	SL532	ご照会	液窒
HeLa	Cervical cancer	AAVS1	Hygro	SL503	ご照会	液窒
HT-29	Colon cancer	random	Hygro	SL523	ご照会	液窒
LoVo	Colon cancer	random	Hygro	SL525	ご照会	液窒
RKO	Colon cancer	random	Hygro	SL539	ご照会	液窒
T84	Colon cancer	random	Hygro	SL541	ご照会	液窒
COLO 205	Colon cancer (derived frm metastatic site)	random	Hygro	SL542	ご照会	液窒
HEK293T	Embryonic kidney	AAVS1	Puro	SL502	ご照会	液窒
HEK293T	Embryonic kidney	AAVS1, with loxP	Hygro	SL554	ご照会	液窒
HK2	Kidney cancer	random	Hygro	SL566	ご照会	液窒
C3A	Liver cancer	random	Hygro	SL543	ご照会	液窒
HepG2	Liver cancer	AAVS1	Hygro	SL518	ご照会	液窒
PLC/PRF/5	Liver cancer	random	Hygro	SL531	ご照会	液窒
SNU-387	Liver cancer	random	Hygro	SL537	ご照会	液窒
SNU-423	Liver cancer	random	Hygro	SL538	ご照会	液窒
SNU-449	Liver cancer	random	Hygro	SL530	ご照会	液窒
SNU-475	Liver cancer	random	Hygro	SL522	ご照会	液窒
A549	Lung cancer	AAVS1	Hygro	SL504	ご照会	液窒
H1975	Lung cancer	random	Hygro	SL529	ご照会	液窒
NCI-H1299	Lung cancer	AAVS1	Puro	SL501	ご照会	液窒
NCI-H1299	Lung cancer	random	Hygro	SL533	ご照会	液窒
NCI-H1437	Lung cancer	random	Hygro	SL536	ご照会	液窒
SH-SY5Y	Neuroblastoma	random	Hygro	SL550	ご照会	液窒
BXPC-3	Pancreatic cancer	random	Hygro	SL521	ご照会	液窒
CFPAC-1	Pancreatic cancer (derived from metastatic liver)	random	Hygro	SL540	ご照会	液窒
Jurkat	Peripheral blood cancer	random	Hygro	SL555	ご照会	液窒
DU145	Prostate cancer. Derived from metastatic site: Brain	random	Hygro	SL548	ご照会	液窒
AGS	Stomach/gastric cancer	random	Hygro	SL520	ご照会	液窒
KATO111	Stomach/gastric cancer	random	Hygro	SL527	ご照会	液窒
SNU-1	Stomach/gastric cancer	random	Hygro	SL526	ご照会	液窒
SNU-16	Stomach/gastric cancer	random	Hygro	SL545	ご照会	液窒

各細胞株2×10^6 cellsでのご提供です。「営利研究機関」と「非営利研究機関」で販売価格が異なります。

マウス細胞株

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号：GCP】

細胞株	由来	挿入箇所	選択マーカー	品番	希望販売価格	貯蔵
C2C12	Muscle (myoblast)	ROSA26	Hygro	SL564	ご照会	液窒
Neuro2a	Neuroblastoma	ROSA26	Hygro	SL509	ご照会	液窒
Neuro2a	Neuroblastoma	ROSA26, with loxP	Hygro	SL559	ご照会	液窒
Neuro2a	Neuroblastoma	ROSA26	Puro	SL510	ご照会	液窒
Neuro2a	Neuroblastoma	ROSA26	Neo	SL511	ご照会	液窒

各細胞株2×10^6 cellsでのご提供です。「営利研究機関」と「非営利研究機関」で販売価格が異なります。

ラット細胞株

GeneCopoeia, Inc.【メーカー略号：GCP】

細胞株	由来	挿入箇所	選択マーカー	品番	希望販売価格	貯蔵
C6	Glioma	random	Hygro	SL534	ご照会	液窒

各細胞株2×10^6 cellsでのご提供です。「営利研究機関」と「非営利研究機関」で販売価格が異なります。
販売価格につきましてはコスモ・バイオ（株）までお問い合わせください。

CELLECTA
Cellecta社

CRISPR ヒト/マウスゲノムワイド sgRNA ライブラリー

WEBへどうぞ
記事ID：16213

低コストでゲノムワイドな遺伝子探索を実現！！

Cellecta社のヒト/マウスゲノムワイドなプール型レンチウイルスsgRNAライブラリーは標的遺伝子分野が異なる3つのModuleから構成されており、機能欠損スクリーニングにご利用頂けます。各Moduleには約 6,500種類の遺伝子を標的とする約55,000種類のsgRNAが含まれています。またゲノムワイドなSingle Moduleもご用意しており、約19,000種類の遺伝子を標的とする約80,000種類のsgRNAが含まれています。各標的遺伝子に対して最大8種類のsgRNAが設計されております。本ライブラリーはsgRNA毎に異なるバーコード配列が発現カセットに挿入されているため、スクリーニング後に次世代シーケンス解析することでノックアウトされた標的遺伝子を特定可能です。

スクリーニング実験後の細胞をご送付いただき、次世代シーケンスを行う受託サービスもご用意しております。

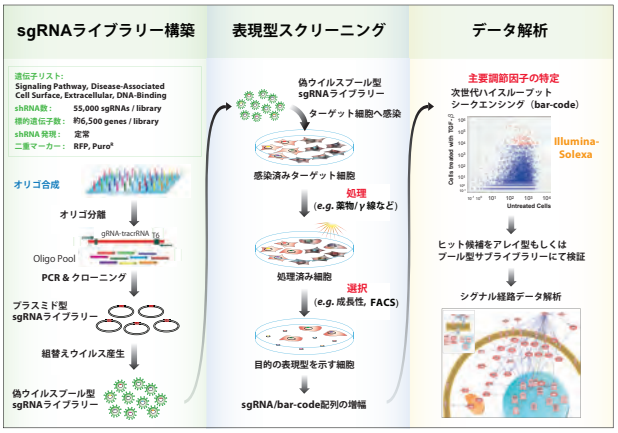


図1　プール型レンチウイルス sgRNA ライブラリー実験概要

sgRNAライブラリーの特徴

- 各標的遺伝子に対して4-8種類のsgRNA
- 全てのライブラリーを合わせるとほぼ全ての遺伝子をカバー（19,000種類以上）
- Illumina HiSeqおよびGAIIx、NextSeqにより標的遺伝子を特定可能

CRISPR Human Genome Knockout Library	標的分野	標的遺伝子数	sgRNA数
Module 1	シグナル伝達	6,555	約55,000
Module 2	疾患関連 既知薬剤ターゲット	6,262	約55,000
Module 3	細胞表面マーカー 細胞外マトリックス DNA 結合	6,184	約55,000
Single-module（80K）	ゲノムワイド	約19,000	約80,000

表1　特徴

詳細

各sgRNAライブラリーの標的遺伝子リストやマニュアル等はコスモ・バイオのWebからダウンロードいただけます。

本ライブラリーはU6プロモーターでsgRNAを発現し、ヒトユビキチンCプロモーター下にTagRFP(Evrogen)とピューロマイシン耐性遺伝子を配置した下記ベクターを使用しております。NGS Cassetteの詳細、およびシークエンスにつきましても、コスモ・バイオの WEB （記事ID：16213）からダウンロードいただけます。

本ライブラリーは広く使用されている第二、または第三世代のVSV-G偽型ウイルス粒子や、Cellecta社の第二世代のpsPAX2/pMD2.G packaging plasmid mix（Ready-to-use Packaging Plasmid Mix, 品番：CPCP-K2A，250µgによりパッケージすることができます。Cellecta社のパッケージ済みライブラリーのタイターは293T細胞にトランスダクションし、RFP陽性細胞のFACSにより決定可能です。

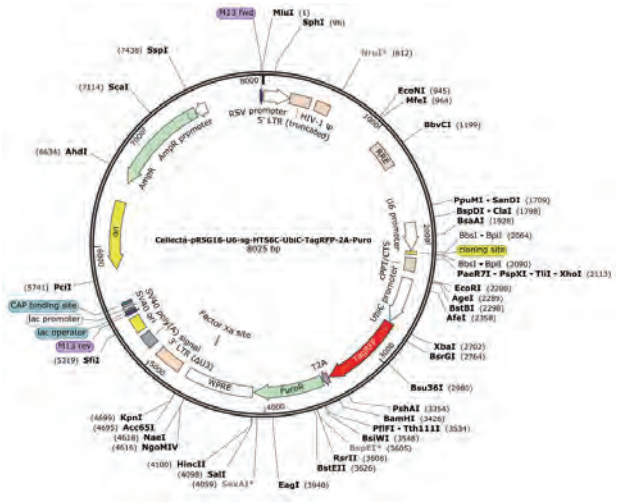


図2　CRISPR Library Vector(pRSG16-U6-sg-HTS6C-UbiC-TagRFP-2A-Puro)

参考価格及び標準納期

プラスミドライブラリー

Cellecta, Inc.【メーカー略号：CLT】

品名	品番	標的分野	包装	価格	納期	貯蔵
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 1	KOHGW-M1-P	シグナル伝達	200 µg	ご照会	約3週間	㊒
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 2	KOHGW-M2-P	疾患関連 既知薬剤ターゲット	200 µg	ご照会	約3週間	㊒
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 3	KOHGW-M3-P	細胞表面マーカー 細胞外マトリックス DNA 結合遺伝子	200 µg	ご照会	約3週間	㊒
CRISPR Human Genome 80K Knockout Library, Single Module	KOHGW-80K-P	ゲノムワイド	200 µg	ご照会	約3週間	㊒
CRISPR Mouse Genome 80K Knockout Library（plasmid）	KOMGW-80K-P	ゲノムワイド	200 µg	ご照会	約3週間	㊒

パッケージ済みウイルスライブラリー

Cellecta, Inc.【メーカー略号：CLT】

品名	品番	標的分野	包装	価格	納期	貯蔵
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 1	KOHGW-M1-V8	シグナル伝達	2×10^{8}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 2	KOHGW-M2-V8	疾患関連 既知薬剤ターゲット	2×10^{8}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 3	KOHGW-M3-V8	細胞表面マーカー 細胞外マトリックス DNA 結合遺伝子	2×10^{8}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome 80K Knockout Library , Single Module	KOHGW-80K-V8	ゲノムワイド	2×10^{8}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Mouse Genome 80K Knockout Library（virus）	KOMGW-80K-V8	ゲノムワイド	2×10^{8}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 1	KOHGW-M1-V9	シグナル伝達	1×10^{9}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 2	KOHGW-M2-V9	疾患関連 既知薬剤ターゲット	1×10^{9}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome Knockout Library, Module 3	KOHGW-M3-V9	細胞表面マーカー 細胞外マトリックス DNA 結合遺伝子	1×10^{9}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Human Genome 80K Knockout Library , Single Module	KOHGW-80K-V8	ゲノムワイド	1×10^{9}tu	ご照会	約5週間	凍
CRISPR Mouse Genome 80K Knockout Library（virus）	KOMGW-80K-V9	ゲノムワイド	1×10^{9}tu	ご照会	約5週間	凍

パッケージング用製品

Cell Biolabs, Inc.【メーカー略号：CBL】、Cellecta, Inc.【メーカー略号：CLT】

品名	メーカー	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
293LTV Cell Line	CBL	LTV-100	1 vial	¥95,000	液窒
Ready-to-Use Packaging Plasmid Mix (250µg)	CLT	CPCP-K2A	1 each	¥68,000	凍

sgRNA ライブラリースクリーニングの次世代シーケンス解析受託サービス

本サービスは、Cellecta社ライブラリーを使用して調製した各サンプルの凍結ペレット（細胞・組織）をご提供いただき、Cellecta社にてDNA抽出・増幅、次世代シークエンシングデータ取得・解析を行い、sgRNA 配列のリストをご提供するものです。サンプルは、フェノール-クロロホルム耐性の15-㎖サイズのポリプロピレン遠心用チューブに保管し、黒色または青色のアルコール耐性マーカーで各チューブにサンプル名をご記入いただき、チューブラベルとサンプル詳細とを記載したリストと共にドライアイス便でご発送ください。

受託サービスの流れ	
1	お申込書類の提出（お申込み用の書類は、コスモ・バイオのWebからダウンロードいただけます（記事ID：16213）
2	Cellecta社へ細胞・組織ペレット（品番：CANA-SQ）、またはゲノムDNA（品番：CANA-SQD）の送付
3	Cellecta社にて実験・解析作業 1. 各サンプルからゲノムDNAを抽出する（細胞、組織ペレットの場合） 2. 抽出したゲノムDNA のバーコードを増幅後、ハイスループットシークエンシング調製する 3. 各サンプルの増幅されたバーコードをシークエンス（>20×10^{6}リード） 4. 各バーコードを sgRNA 配列と照合させ、解析する （ア） 各 sgRNA 配列の相対存在量の算出（バーコード/sgRNA 数） （イ） サンプル間の差異計算（お客様より何れのサンプル間を比較するという情報をいただいた場合に限ります） 5. 報告書を作成
4	コスモ・バイオより報告書（電子データ）を納品

■関連商品・受託サービス

◦ レンチウイルス CRISPR コンストラクト作製受託サービス（WEB記事ID：14037）

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願いいたします。

TEL：03-5632-9615
FAX：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

CELLECTA
Cellecta社

レンチウイルスCRISPR sgRNA ライブラリー作製受託サービス

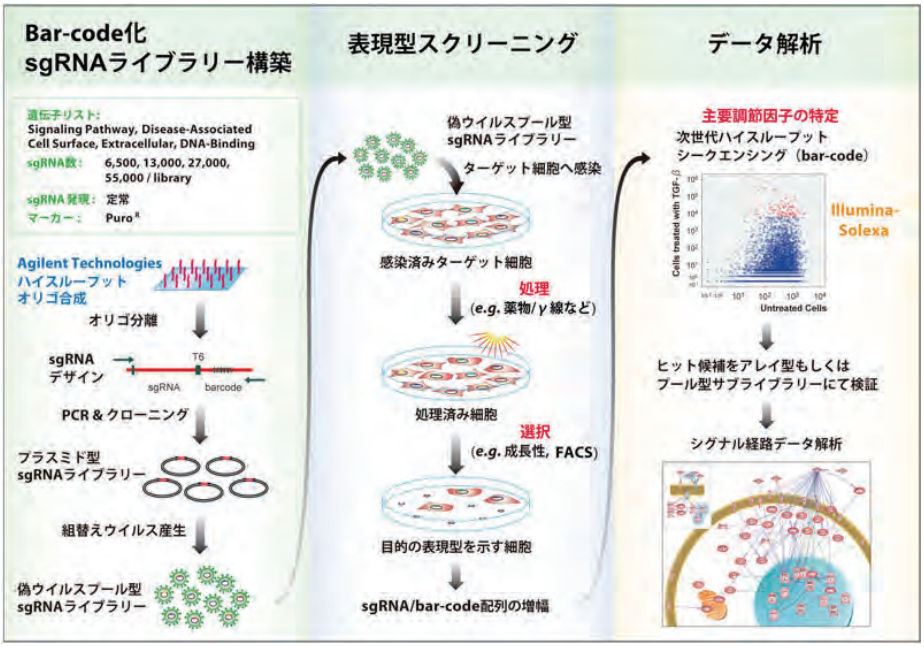
WEBへどうぞ
記事ID: 14041

レンチウイルスベースのヒト sgRNA カスタムライブラリー

■サービス概要

ご希望の標的ヒト遺伝子についてCellecta社でsgRNA設計し、ご指定頂いたベクターに組み込んだゲノムワイドなレンチウイルスsgRNAライブラリーをご提供致します。ご希望によりパッケージング済みウイルス粒子をご提供することも可能です。ウイルスの自己複製能を欠損させた安全なシステムですので、P2レベルの実験施設でご利用いただけます。

各sgRNAコンストラクトには特異的なバーコード配列が導入されており、次世代シーケンサーで検出することで表現型選抜後の候補遺伝子の効率的な同定が可能です。



サービスの特徴

- Two-Vector CRISPR/Cas9 Systemを採用。
- Cas9プロモーターはCMVとUbiCから選択可能
- 宿主ゲノムに組み込まれることで長期安定発現を実現
- パッケージ済みレンチウイルス粒子での納品も可能
- ライブラリーサイズは1,000 - 45,000 sgRNAsから選択可能

■関連商品

Cas9発現用ベクターおよびパッケージング済ウイルス粒子

Cellecta, Inc.【メーカー略号：CLT】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
CRISPR Cas9 Expression Vector pR-CMV-Cas9-2A-Hygro (plasmid)	SVC9-PS	1 each (25 µg)	¥ 68,000	凍
CRISPR Cas9 Expression Vector pR-CMV-Cas9-2A-Blast (plasmid)	SVC9B-PS	1 each (25 µg)	¥ 68,000	凍
CRISPR Cas9 Expression Vector pR-CMV-Cas9-2A-Hygro (packaged virus)	SVC9-VS	1 each (1×10⁶TU)	¥ 120,000	凍
CRISPR Cas9 Expression Vector pR-CMV-Cas9-2A-Blast (packaged virus only)	SVC9B-VS	1 each (1×10⁶TU)	¥ 120,000	凍

パッケージング用製品

Cell Biolabs, Inc.【メーカー略号：CBL】、Cellecta, Inc.【メーカー略号：CLT】

品名	メーカー	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
293LTV Cell Line	CBL	LTV-100	1 vial	¥ 95,000	液窒
Ready-to-Use Packaging Plasmid Mix (250 µg)	CLT	CPCP-K2A	1 each (250 µg)	¥ 68,000	凍

CELLECTA
Cellecta社

ハイスループットCRISPR/Cas9 遺伝子スクリーニング受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID：16795

スクリーニング後の次世代シーケンシング作業と解析、承ります！

Cellecta社では、同社が提供するsgRNAライブラリー（WEB記事ID：16213、101ページ参照）や、非営利研究機関へ提供されているGeCKOライブラリーといった、プール型レンチウイルスCRISPRライブラリーを利用したスクリーニング実験の「次世代シーケンス」と「データ解析」をご提供しています。

Cellecta社のsgRNAライブラリーやGeckoライブラリーを使用して、各培養時間または処理条件（1サンプル）で回収した細胞をそのままご提供頂き、Cellecta社にてDNA抽出、増幅、配列決定、およびデータアセンブリと基本的なデータ解析を行います。

受託サービスの流れ

本サービスは、Cellecta社あるいは、GeCKOライブラリーを使用して調製した各サンプルの凍結ペレット（細胞・組織）をご提供いただき、Cellecta社にてDNA 抽出・増幅、次世代シークエンシングデータ取得・解析を行い、sgRNAおよびその標的遺伝子のリストをご提供するものです。サンプルは、フェノール- クロロホルム耐性の15-mL サイズのポリプロピレン遠心用チューブに保管し、黒色または青色のアルコール耐性マーカーで各チューブにサンプル名をご記入いただき、チューブラベルとサンプル詳細とを記載したリストと共にドライアイス便でご発送ください。

受託サービスの流れ	
1	お申込書類の提出　（お申込み用の書類は、コスモ・バイオのWebからダウンロードいただけます（記事ID: 16795））
2	Cellecta社へ細胞・組織ペレット（またはゲノムDNA）の送付
3	Cellecta社にて実験・解析作業 1. 各サンプルからゲノムDNA 抽出する（細胞、組織ペレットの場合） 2. 抽出したゲノムDNA のgRNA配列あるいはバーコード配列を増幅後、ハイスループットシークエンシング用に調製する 3. Illumina社NextSeqまたはHiSeqによる次世代シークエンシング（NGS）作業の実施 4. シークエンシング生データからsgRNA数をカウント （ア）各sgRNA 配列の相対存在量の算出 （イ）サンプル間の差異計算（お客様より何れのサンプル間を比較するという情報をいただいた場合に限ります） 5. 報告書を作成
4	コスモ・バイオより報告書（電子データ）を納品

Cellecta, Inc.【メーカー略号：CLT】

品名	品番	包装	希望販売価格
Barcode NGS of DNA from Genetic Screen, >100M Reads (screening done with Cellecta Library)	CANA-100SQD	1 each	ご照会
DNA isolation from Cell peletts for Sequencing	CANA-DNA	1 serv.	¥ 68,000
DNA isolation from Tumors for Sequencing	CANA-DNAT	1 serv.	¥ 130,000
HT Barcode Sequencing of DNA from Genetic Screen(screening done with Cellecta Library)	CANA-SQD	1 serv.	ご照会
NGS of DNA from Genetic Screen (screening done with Cellecta Library only), Academic	CANA-SQD-A	1 serv.	¥ 198,000
NGS of DNA from Genetic Screen (screening done with GeCKO Library)	CANA-SQD-GECKO	1 serv.	ご照会
NGS of DNA from Genetic Screen (screening done with GeCKO Library), Academic	CANA-SQD-GECKO-A	1 serv.	¥ 299,000

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願いいたします。
TEL : 03-5632-9615
FAX : 03-5632-9614
E-mail : jutaku_gr@cosmobio.co.jp

Applied Biological Materials社

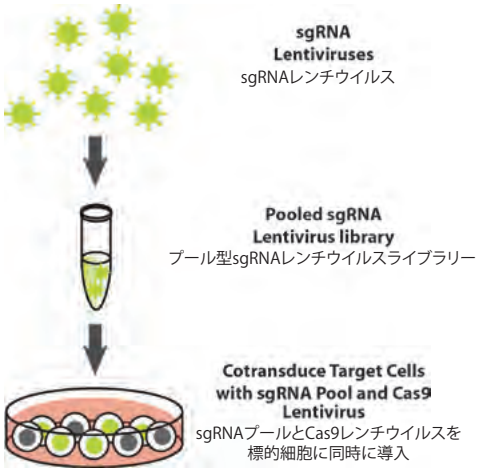
iCRISPRレンチウイルスsgRNAライブラリー作製受託サービス

WEBへどうぞ
記事ID：14300

パスウェイノックアウトツールをお届けします！

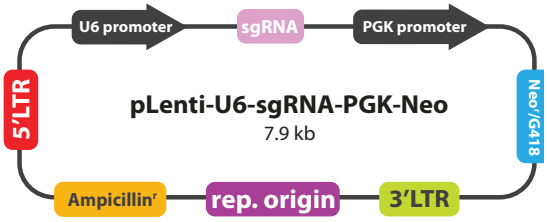
最大100種の標的遺伝子に対してプール型sgRNAレンチウイルスライブラリーを利用することで一度にノックアウトすることができます。本商品はお客様の目的に合わせて作製しますので、特に遺伝子ファミリーやパスウェイのノックアウトに有用です。プール型レンチウイルスベクター構築とレンチウイルスをご提供致します。ご希望の遺伝子の生物種、遺伝子名およびアクセッション番号を表記した標的遺伝子リストをご連絡ください。

ゲノム編集の検出にはSurveyorアッセイやサンガーシーケンシングをお薦めします。RT-PCRは配列上の僅かな違いを検出するには不向きです。



sgRNAベクター情報

- 名称：pLenti-U6-sgRNA-PGK-Neo
- タイプ：レンチウイルスベクター
- 抗生物質：アンピシリン



納品物

例：100種の遺伝子を標的にする場合
100種の標的遺伝子に対する300種類のプラスミドプール品約100µg及び1-2mℓのパッケージ済みレンチウイルス(>1×10^7 IU/mℓ)

＊納品物にCas9ヌクレアーゼは含まれておりませんので別途Cas9レンチウイルスベクター(品番：K002)かCas9レンチウイルス(品番：K003)（18ページ）、あるいはCas9安定発現細胞株（21ページ）をご購入下さい。

【ご注意】本商品は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

参考価格および標準納期

参考価格：280万円(100種類の遺伝子に対するgRNAを設計する場合)
標準納期：5-7週間

見積・ご注文方法

コスモ・バイオのWEBの商品紹介ページ（WEB 記事ID：14300）からお見積もりのご依頼をお願い致します。

お問い合わせ先

ご質問・ご不明の点は製品情報部 受託担当までお問い合せください。また、秘密保持契約のご希望につきましても、下記までご連絡をお願い致します。

TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

良いコウタイがー
あっタイガ〜！

抗体百科
コスモ・バイオの抗体百科に Go！　www.cosmobio.co.jp
■ 探しま章 Web 検索データベース
100 万品目以上の品ぞろえ、主要な約 12,000 ターゲットの抗体を国内に在庫。
■ 作りま章 抗体作製受託サービス
お客様とのコミュニケーションを大切にし、高い技術力であらゆるニーズに対応。

Applied StemCell
Genome editing *in vitro* and *in vivo*
Applied StemCell社

ゲノム編集済み MAPK アイソジェニック細胞株・リファレンス スタンダード

WEBへどうぞ
記事ID:18334

癌治療のリード化合物スクリーニングに最適

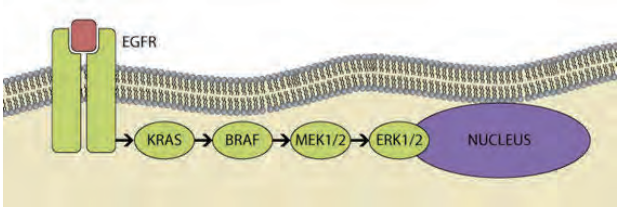
CRISPR/Cas9によりMAPK経路に突然変異を導入したアイソジェニック細胞株と、その細胞株由来のgDNA、凍結細胞ペレット、FFPEブロックリファレンス商品を販売しています。

Applied StemCell社はヒト大腸癌細胞株であるHCT-116細胞及び RKO細胞を親株とし、CRISPR/Cas9により51種類の突然変異をMAPK経路にホモ及びフットプリントフリーで導入したアイソジェニック細胞株を作製しました。これらの細胞株は、癌生物学の理解を深めるための、または癌治療のリード化合物を同定するためのハイスループットスクリーニングに理想的なツールセットです。

背景

アイソジェニック細胞株とは

CRISPR/Cas9により標的遺伝子に突然変異導入を行った遺伝的背景が親株と同じ細胞株です。親株はゲノム編集された細胞株のコントロール系統となります。そのためアイソジェニック細胞対は、細胞表現型に対する遺伝子型の影響や遺伝子型特異的毒性を示す化合物の発見を可能にする並行ハイスループットスクリーニング等に利用可能であり、細胞生物学を研究するために非常に有用なツールです。



MAPKシグナル伝達経路とは

外部細胞膜でのEGFRから始まり、KRAS、BRAF、MEKおよびERKを介して進行する一連のシグナル伝達経路です。 このシグナル伝達カスケードは、最終的に、細胞増殖、生存、分化、運動性および血管新生を促進する重要な遺伝子の転写活性化をもたらします。MAPK経路は癌において最も頻繁に活性化される経路の1つであり、いくつかの薬物はMAPK変異状態に依存する薬理ゲノミクスプロファイルを有しています。

■商品ラインアップ

●ONCOREF™ MAPK アイソジェニック細胞株

●ONCOREF™ MAPKゲノムDNA(gDNA)リファレンス スタンダード

MAPKゲノムDNA(gDNA)リファレンス スタンダードは、MAPK 突然変異細胞株パネルから抽出され、アッセイの開発およびアッセイ性能の日常的なモニタリングの両方に理想的な材料です。

●ONCOREF™ FFPEブロックリファレンス スタンダード

ホルマリン固定は、生物標本の長期間保存のために一般的に使用されますが、抽出DNAの収率を低下させ、核酸構造の化学変化を引き起こす可能性があります。

FFPE参照標準により、貴重な臨床サンプルを使用する必要なく、ホルマリン固定検体のサンプル処理プロトコールを最適化することができます。

・Core Diameter Approx. 6.5 mm
・Block Thickness Approx. 4 mm

●ONCOREF™ FFPEスクロールリファレンス スタンダード

ONCOREF™ FFPE Scrollは、プロトコルを最適化や、アッセイの感度と特異性評価、ワークフローの変化がダウンストリーム分析に及ぼす影響を分析するために、サンプル処理ワークフローに直接組み込むことができるリファレンス スタンダードです。上記凍結細胞ペレットと対でご使用いただけます。

・Quantity 1 scroll, 6.5mm diameter
・Scroll Thickness 20 µm

●ONCOREF™ 凍結細胞ペレット

凍結細胞ペレットは、DNA完全性およびアッセイ結果に対するホルマリン固定の影響を評価するために、FFPE細胞ブロックと対でご使用頂けます。

■Applied StemCell社MAPK変異一覧

EGFR Mutations Covered by ASC				
Exon	CDS Mutation	AA Mutation	Mutation ID	Mutation State
Exon 18	c.2155G>A	p.G719A	COSM6252	
	c.2155G>T	p.G719C	COSM6253	Homozygous
	c.2156G>C	p.G719A	COSM6239	Homozygous
Exon 19	c.2239_2256del18	p.L747_S752delLREATS		Homozygous
	c.2240_2257del18	p.L747_P753>S		Homozygous
	c.2238_2255del18	p.E746_S752>D		Homozygous
	c.2239_2258>CA	p.L747_P753>Q		Homozygous
	c.2237_2254del18	p.E746_S752>A		Homozygous
	c.2237_2255>T	p.E746_S752>V		Homozygous
	c.2236_2253del18	p.E746_T751delELREAT		Homozygous
	c.2237_2251del15	p.E746_T751>A		Homozygous
	c.2239_2253del15	p.L747_T751delLREAT		Homozygous
	c.2240_2254del15	p.L747_T751delLREAT		Homozygous
	c.2237_2252>T	p.E746_T751>V		Homozygous
	c.2235_2252>AAT	p.E746_T751>I		Homozygous
	c.2233_2247del15	p.K745_E749delKELRE		Homozygous
	c.2235_2249del15	p.E746_A750delELREA		Homozygous
	c.2235_2250del15	p.E746_A750delELREA		Homozygous
	c.2239_2251>C	p.L747_T751>P		Homozygous
	c.2239_2251>C	p.L747_T751>S		Homozygous
	c.2238_2252>GCA	p.L747_T751>Q		Homozygous

コスモ・バイオ株式会社　お問い合わせ先：TEL: 03-5632-9610　FAX: 03-5632-9619　E-mail: mail@cosmobio.co.jp

EGFR Mutations Covered by ASC				
Exon	CDS Mutation	AA Mutation	Mutation ID	Mutation State
	c.2239_2248TTAAGAGAAG>C	p.L747_A750>P		Homozygous
	c.2238_2248>GC	p.L747_A750>P		Homozygous
	c.2239_2247del9	p.L747_E749delLRE		Homozygous
	c.2235_2248>AATTC	p.E746_A750>IP		Homozygous
Exon 20	c.2303G>T	p.S768I		Homozygous
	c.2307_2308insGCCAGCGTG	p.V769_D770insASV		Homozygous
	c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG		Homozygous
	c.2319_2320insCAC	p.H773_V774insH		Homozygous
	c.2369C>T	p.T790M		Homozygous
Exon 21	c.2573T>G	p.L858R		Homozygous
	c.2582T>A	p.L861Q		Homozygous

KRAS Mutations Covered by ASC				
Exon	CDS Mutation	AA Mutation	Mutation ID	Mutation State
Exon 2	c.34G>T	p.G12C	COSM516	
	c.34G>A	p.G12S	COSM517	
	c.34G>C	p.G12R	COSM518	
	c.35G>T	p.G12V	COSM520	Homozygous
	c.35G>A	p.G12D	COSM521	
	c.35G>C	p.G12A	COSM522	
	c.37G>T	p.G13C	COSM527	Homozygous
	c.37G>A	p.G13S	COSM528	Homozygous
	c.37G>C	p.G13R	COSM529	Homozygous
	c.38G>A	p.G13D	COSM532	Homozygous
	c.38G>C	p.G13A	COSM533	
	c.38G>T	p.G13V	COSM534	Homozygous
Exon 15	c.1798_1799GT>AA	p.V600K	COSM473	Homozygous
	c.1798_1799GT>AG	p.V600R	COSM474	Homozygous
	c.1799_1800TG>AA	p.V600E	COSM475	Homozygous
	c.1799T>A	p.V600E	COSM476	Homozygous
	c.1799_1800TG>AT	p.V600D	COSM477	Homozygous
	c.1798G>A	p.V600M	COSM1130	Homozygous
	c.1799T>G	p.V600G	COSM6147	Homozygous

ONCOREF™ MAPK アイソジェニック細胞株

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号：ASC】

内容	品番	希望販売価格
Cell Lines EGFR ID:6252 c.2155G>A p.G719S	ASE-8000	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6253 c.2155G>T p.G719C	ASE-8001	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6239 c.2156G>C p.G719A	ASE-8002	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6255 c.2239_2256del18 p.L747_S752del	ASE-8003	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12370 c.2240_2257del18 p.L747_P753>S	ASE-8004	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6220 c.2238_2255del18 p.E746_S752>D	ASE-8005	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12387 c.2239_2258>CA p.L747_P753>Q	ASE-8006	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12367 c.2237_2254del18 p.E746_S752>A	ASE-8007	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12384 c.2237_2255>T p.E746_S752>V	ASE-8008	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12728 c.2236_2253del18 p.E746_T751del	ASE-8009	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12678 c.2237_2251del15 p.E746_T751>A	ASE-8010	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6254 c.2239_2253del15 p.L747_T751del	ASE-8011	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12369 c.2240_2254del15 p.L747_T751del	ASE-8012	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12386 c.2237_2252>T p.E746_T751>V	ASE-8013	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:13551 c.2235_2252>AAT p.E746_T751>I	ASE-8014	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:26038 c.2233_2247del15 p.K745_E749del	ASE-8015	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6223 c.2235_2249del15 p.E746_A750del	ASE-8016	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6225 c.2236_2250del15 p.E746_A750del	ASE-8017	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12383 c.2239_2251>C p.L747_T751>P	ASE-8018	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6210 c.2240_2251del12 p.L747_T751>S	ASE-8019	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12419 c.2238_2252>GCA p.L747_T751>Q	ASE-8020	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12382 c.2239_2248TTAAGAGAAG>C p.L747_A750>P	ASE-8021	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12422 c.2238_2248>GC p.L747_A750>P	ASE-8022	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6218 c.2239_2247del9 p.L747_E749del	ASE-8023	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:13550 c.2235_2248>AATTC p.E746_A750>IP	ASE-8024	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6241 c.2303G>T p.S768I	ASE-8025	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12376 c.2307_2308insGCCAGCGTG p.V769_D770insASV	ASE-8026	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12378 c.2310_2311insGGT p.D770_N771insG	ASE-8027	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:12377 c.2319_2320insCAC p.H773_V774insH	ASE-8028	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6240 c.2369C>T p.T790M	ASE-8029	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6224 c.2573T>G p.L858R	ASE-8030	¥ 322,000
Cell Lines EGFR ID:6213 c.2582T>A p.L861Q	ASE-8031	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:516 c.34G>T p.G12C	ASE-8032	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:517 c.34G>A p.G12S	ASE-8033	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:518 c.34G>C p.G12R	ASE-8034	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:520 c.35G>T p.G12V	ASE-8035	¥ 322,000

内容	品番	希望販売価格
Cell Lines KRAS ID:521 c.35G>A p.G12D	ASE-8036	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:522 c.35G>C p.G12A	ASE-8037	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:527 c.37G>T p.G13C	ASE-8038	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:528 c.37G>A p.G13S	ASE-8039	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:529 c.37G>C p.G13R	ASE-8040	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:532 c.38G>A p.G13D	ASE-8041	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:533 c.38G>C p.G13A	ASE-8042	¥ 322,000
Cell Lines KRAS ID:534 c.38G>T p.G13V	ASE-8043	¥ 322,000

内容	品番	希望販売価格
Cell Lines BRAF ID:473 c.1798_1799GT>AA p.V600K	ASE-8044	¥ 322,000
Cell Lines BRAF ID:474 c.1798_1799GT>AG p.V600R	ASE-8045	¥ 322,000
Cell Lines BRAF ID:475 c.1799_1800TG>AA p.V600E2	ASE-8046	¥ 322,000
Cell Lines BRAF ID:476 c.1799T>A p.V600E1	ASE-8047	¥ 322,000
Cell Lines BRAF ID:477 c.1799_1800TG>AT p.V600D	ASE-8048	¥ 322,000
Cell Lines BRAF ID:1130 c.1798G>A p.V600M	ASE-8049	¥ 322,000
Cell Lines BRAF ID:6137 c.1799T>G p.V600G	ASE-8050	¥ 322,000
RKO	ASE-8051	¥ 134,000
HCT116	ASE-8052	¥ 134,000

※上記商品の包装は1vial（1×10^6 cells）、貯蔵温度は液体窒素です。

ONCOREF™ MAPKゲノムDNA（gDNA）リファレンス スタンダード

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号：ASC】

内容	品番	包装	希望販売価格
PIK3CA ID:775 c.3140A>G p.H1047R	ASE-6051G-05	500ng	¥ 42,000
PIK3CA ID:775 c.3140A>G p.H1047R	ASE-6051G-1	1μg	¥ 51,000
PIK3CA ID:760 c.1624G>A p.E542K	ASE-6053G-05	500ng	¥ 42,000
PIK3CA ID:760 c.1624G>A p.E542K	ASE-6053G-1	1μg	¥ 51,000
PIK3CA ID:763 c.1633G>A p.E545K	ASE-6054G-05	500ng	¥ 42,000
PIK3CA ID:763 c.1633G>A p.E545K	ASE-6054G-1	1μg	¥ 51,000
PIK3CA ID: 764 c.1634A>G p.E545G	ASE-6055G-05	500ng	¥ 42,000
PIK3CA ID: 764 c.1634A>G p.E545G	ASE-6055G-1	1μg	¥ 51,000
PIK3CA ID:766 c.1636C>A p.Q546K	ASE-6057G-05	500ng	¥ 42,000
PIK3CA ID:766 c.1636C>A p.Q546K	ASE-6057G-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:554 c.183A>C p.Q61H	ASE-6062G-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:554 c.183A>C p.Q61H	ASE-6062G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:564 c.35G>A p.G12D	ASE-6065G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:564 c.35G>A p.G12D	ASE-6065G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:563 c.34G>A p.G12S	ASE-6066G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:563 c.34G>A p.G12S	ASE-6066G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:562 c.34G>T p.G12C	ASE-6067G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:562 c.34G>T p.G12C	ASE-6067G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:569 c.37G>C p.G13R	ASE-6069G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:569 c.37G>C p.G13R	ASE-6069G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:584 c.182A>G p.Q61R	ASE-6071G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:584 c.182A>G p.Q61R	ASE-6071G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:580 c.181C>A p.Q61K	ASE-6072G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:580 c.181C>A p.Q61K	ASE-6072G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:583 c.182A>T p.Q61R	ASE-6073G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:583 c.182A>T p.Q61R	ASE-6073G-1	1μg	¥ 51,000
HRAS ID:486 c.37G>C p.G13R	ASE-6078G-05	500ng	¥ 42,000
HRAS ID:486 c.37G>C p.G13R	ASE-6078G-1	1μg	¥ 51,000
HRAS ID:496 c.181C>A p.Q61K	ASE-6079G-05	500ng	¥ 42,000
HRAS ID:496 c.181C>A p.Q61K	ASE-6079G-1	1μg	¥ 51,000

内容	品番	包装	希望販売価格
HRAS ID:487 c.182A>G p.Q61R	ASE-6080G-05	500ng	¥ 42,000
HRAS ID:487 c.182A>G p.Q61R	ASE-6080G-1	1μg	¥ 51,000
TP53 ID:6932 c.733G>A p.G245S	ASE-6087G-05	500ng	¥ 42,000
TP53 ID:6932 c.733G>A p.G245S	ASE-6087G-1	1μg	¥ 51,000
TP53 ID:43606 c.734G>A p.G245D	ASE-6088G-05	500ng	¥ 42,000
TP53 ID:43606 c.734G>A p.G245D	ASE-6088G-1	1μg	¥ 51,000
TP53 ID:11196 c.734G>T p.G245V	ASE-6089G-05	500ng	¥ 42,000
TP53 ID:11196 c.734G>T p.G245V	ASE-6089G-1	1μg	¥ 51,000
TP53 ID:11081 c.733G>T p.G245C	ASE-6090G-05	500ng	¥ 42,000
TP53 ID:11081 c.733G>T p.G245C	ASE-6090G-1	1μg	¥ 51,000
NRAS ID:5044298 c.183_183delA p.E62fs*6	ASE-6200G-05	500ng	¥ 42,000
NRAS ID:5044298 c.183_183delA p.E62fs*6	ASE-6200G-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6252 c.2155G>A p.G719S	ASO-6000-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6252 c.2155G>A p.G719S	ASO-6000-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6253 c.2155G>T p.G719C	ASO-6001-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6253 c.2155G>T p.G719C	ASO-6001-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6239 c.2156G>C p.G719A	ASO-6002-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6239 c.2156G>C p.G719A	ASO-6002-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6255 c.2239_2256del18 p.L747_S752del	ASO-6003-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6255 c.2239_2256del18 p.L747_S752del	ASO-6003-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12370 c.2240_2257del18 p.L747_P753>S	ASO-6004-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12370 c.2240_2257del18 p.L747_P753>S	ASO-6004-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6220 c.2238_2255del18 p.E746_S752>D	ASO-6005-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6220 c.2238_2255del18 p.E746_S752>D	ASO-6005-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12387 c.2239_2258>CA p.L747_P753>Q	ASO-6006-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12387 c.2239_2258>CA p.L747_P753>Q	ASO-6006-1	1μg	¥ 51,000

内容	品番	包装	希望販売価格
EGFR ID:12367 c.2237_2254del18 p.E746_S752>A	ASO-6007-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12367 c.2237_2254del18 p.E746_S752>A	ASO-6007-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12384 c.2237_2255>T p.E746_S752>V	ASO-6008-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12384 c.2237_2255>T p.E746_S752>V	ASO-6008-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12728 c.2236_2253del18 p.E746_T751del	ASO-6009-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12728 c.2236_2253del18 p.E746_T751del	ASO-6009-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12678 c.2237_2251del15 p.E746_T751>A	ASO-6010-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12678 c.2237_2251del15 p.E746_T751>A	ASO-6010-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6254 c.2239_2253del15 p.L747_T751del	ASO-6011-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6254 c.2239_2253del15 p.L747_T751del	ASO-6011-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12369 c.2240_2254del15 p.L747_T751del	ASO-6012-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12369 c.2240_2254del15 p.L747_T751del	ASO-6012-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12386 c.2237_2252>T p.E746_T751>V	ASO-6013-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12386 c.2237_2252>T p.E746_T751>V	ASO-6013-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:13551 c.2235_2252>AAT p.E746_T751>I	ASO-6014-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:13551 c.2235_2252>AAT p.E746_T751>I	ASO-6014-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:26038 c.2233_2247del15 p.K745_E749del	ASO-6015-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:26038 c.2233_2247del15 p.K745_E749del	ASO-6015-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6223 c.2235_2249del15 p.E746_A750del	ASO-6016-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6223 c.2235_2249del15 p.E746_A750del	ASO-6016-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6225 c.2236_2250del15 p.E746_A750del	ASO-6017-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6225 c.2236_2250del15 p.E746_A750del	ASO-6017-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12383 c.2239_2251>C p.L747_T751>P	ASO-6018-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12383 c.2239_2251>C p.L747_T751>P	ASO-6018-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6210 c.2240_2251del12 p.L747_T751>S	ASO-6019-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6210 c.2240_2251del12 p.L747_T751>S	ASO-6019-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12419 c.2238_2252>GCA p.L747_T751>Q	ASO-6020-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12419 c.2238_2252>GCA p.L747_T751>Q	ASO-6020-1	1μg	¥ 51,000

内容	品番	包装	希望販売価格
EGFR ID:12382 c.2239_2248TTAAGAGAAG>C p.L747_A750>P	ASO-6021-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12382 c.2239_2248TTAAGAGAAG>C p.L747_A750>P	ASO-6021-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12422 c.2238_2248>GC p.L747_A750>P	ASO-6022-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12422 c.2238_2248>GC p.L747_A750>P	ASO-6022-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6218 c.2239_2247del9 p.L747_E749del	ASO-6023-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6218 c.2239_2247del9 p.L747_E749del	ASO-6023-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:13550 c.2235_2248>AATTC p.E746_A750>IP	ASO-6024-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:13550 c.2235_2248>AATTC p.E746_A750>IP	ASO-6024-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6241 c.2303G>T p.S768I	ASO-6025-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6241 c.2303G>T p.S768I	ASO-6025-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12376 c.2307_2308insGCCAGCGTG p.V769_D770insASV	ASO-6026-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12376 c.2307_2308insGCCAGCGTG p.V769_D770insASV	ASO-6026-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12378 c.2310_2311insGGT p.D770_N771insG	ASO-6027-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12378 c.2310_2311insGGT p.D770_N771insG	ASO-6027-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:12377 c.2319_2320insCAC p.H773_V774insH	ASO-6028-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:12377 c.2319_2320insCAC p.H773_V774insH	ASO-6028-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6240 c.2369C>T p.T790M	ASO-6029-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6240 c.2369C>T p.T790M	ASO-6029-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6224 c.2573T>G p.L858R	ASO-6030-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6224 c.2573T>G p.L858R	ASO-6030-1	1μg	¥ 51,000
EGFR ID:6213 c.2582T>A p.L861Q	ASO-6031-05	500ng	¥ 42,000
EGFR ID:6213 c.2582T>A p.L861Q	ASO-6031-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:516 c.34G>T p.G12C	ASO-6032-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:516 c.34G>T p.G12C	ASO-6032-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:517 c.34G>A p.G12S	ASO-6033-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:517 c.34G>A p.G12S	ASO-6033-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:518 c.34G>C p.G12R	ASO-6034-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:518 c.34G>C p.G12R	ASO-6034-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:520 c.35G>T p.G12V	ASO-6035-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:520 c.35G>T p.G12V	ASO-6035-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:521 c.35G>A p.G12D	ASO-6036-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:521 c.35G>A p.G12D	ASO-6036-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:522 c.35G>C p.G12A	ASO-6037-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:522 c.35G>C p.G12A	ASO-6037-1	1μg	¥ 51,000

内容	品番	包装	希望販売価格
KRAS ID:527 c.37G>T p.G13C	ASO-6038-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:527 c.37G>T p.G13C	ASO-6038-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:528 c.37G>A p.G13S	ASO-6039-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:528 c.37G>A p.G13S	ASO-6039-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:529 c.37G>C p.G13R	ASO-6040-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:529 c.37G>C p.G13R	ASO-6040-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:532 c.38G>A p.G13D	ASO-6041-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:532 c.38G>A p.G13D	ASO-6041-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:533 c.38G>C p.G13A	ASO-6042-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:533 c.38G>C p.G13A	ASO-6042-1	1μg	¥ 51,000
KRAS ID:534 c.38G>T p.G13V	ASO-6043-05	500ng	¥ 42,000
KRAS ID:534 c.38G>T p.G13V	ASO-6043-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:473 c.1798_1799GT>AA p.V600K	ASO-6044-05	500ng	¥ 42,000
BRAF ID:473 c.1798_1799GT>AA p.V600K	ASO-6044-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:474 c.1798_1799GT>AG p.V600R	ASO-6045-05	500ng	¥ 42,000

※上記商品の貯蔵温度は4℃です。

内容	品番	包装	希望販売価格
BRAF ID:474 c.1798_1799GT>AG p.V600R	ASO-6045-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:475 c.1799_1800TG>AA p.V600E	ASO-6046-05	500ng	¥ 42,000
BRAF ID:475 c.1799_1800TG>AA p.V600E	ASO-6046-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:476 c.1799T>A p.V600E	ASO-6047-05	500ng	¥ 42,000
BRAF ID:476 c.1799T>A p.V600E	ASO-6047-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:477 c.1799_1800TG>AT p.V600D	ASO-6048-05	500ng	¥ 42,000
BRAF ID:477 c.1799_1800TG>AT p.V600D	ASO-6048-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:1130 c.1798G>A p.V600M	ASO-6049-05	500ng	¥ 42,000
BRAF ID:1130 c.1798G>A p.V600M	ASO-6049-1	1μg	¥ 51,000
BRAF ID:6137 c.1799T>G p.V600G	ASO-6050-05	500ng	¥ 42,000
BRAF ID:6137 c.1799T>G p.V600G	ASO-6050-1	1μg	¥ 51,000
RKO Genomic DNA WT	ASO-6051-05	2.5μg	¥ 42,000
RKO Genomic DNA WT	ASO-6051-1	5μg	¥ 51,000
HCT116 Genomic DNA WT	ASO-6052-05	2.5μg	¥ 42,000
HCT116 Genomic DNA WT	ASO-6052-1	5μg	¥ 51,000

ONCOREF™ FFPE ブロックリファレンス スタンダード

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号：ASC】

内容	品番	希望販売価格
EGFR ID:6252 c.2155G>A p.G719S	ASO-4000	¥ 569,000
EGFR ID:6253 c.2155G>T p.G719C	ASO-4001	¥ 569,000
EGFR ID:6239 c.2156G>C p.G719A	ASO-4002	¥ 569,000
EGFR ID:6255 c.2239_2256del18 p.L747_S752del	ASO-4003	¥ 569,000
EGFR ID:12370 c.2240_2257del18 p.L747_P753>S	ASO-4004	¥ 569,000
EGFR ID:6220 c.2238_2255del18 p.E746_S752>D	ASO-4005	¥ 569,000
EGFR ID:12387 c.2239_2258>CA p.L747_P753>Q	ASO-4006	¥ 569,000
EGFR ID:12367 c.2237_2254del18 p.E746_S752>A	ASO-4007	¥ 569,000
EGFR ID:12384 c.2237_2255>T p.E746_S752>V	ASO-4008	¥ 569,000
EGFR ID:12728 c.2236_2253del18 p.E746_T751del	ASO-4009	¥ 569,000
EGFR ID:12678 c.2237_2251del15 p.E746_T751>A	ASO-4010	¥ 569,000
EGFR ID:6254 c.2239_2253del15 p.L747_T751del	ASO-4011	¥ 569,000
EGFR ID:12369 c.2240_2254del15 p.L747_T751del	ASO-4012	¥ 569,000
EGFR ID:12386 c.2237_2252>T p.E746_T751>V	ASO-4013	¥ 569,000
EGFR ID:13551 c.2235_2252>AAT p.E746_T751>I	ASO-4014	¥ 569,000
EGFR ID:26038 c.2233_2247del15 p.K745_E749del	ASO-4015	¥ 569,000
EGFR ID:6223 c.2235_2249del15 p.E746_A750del	ASO-4016	¥ 569,000
EGFR ID:6225 c.2236_2250del15 p.E746_A750del	ASO-4017	¥ 569,000
EGFR ID:12383 c.2239_2251>C p.L747_T751>P	ASO-4018	¥ 569,000
EGFR ID:6210 c.2240_2251del12 p.L747_T751>S	ASO-4019	¥ 569,000
EGFR ID:12419 c.2238_2252>GCA p.L747_T751>Q	ASO-4020	¥ 569,000
EGFR ID:12382 c.2239_2248TTAAGAGAAG>C p.L747_A750>P	ASO-4021	¥ 569,000

内容	品番	希望販売価格
EGFR ID:12422 c.2238_2248>GC p.L747_A750>P	ASO-4022	¥ 569,000
EGFR ID:6218 c.2239_2247del9 p.L747_E749del	ASO-4023	¥ 569,000
EGFR ID:13550 c.2235_2248>AATTC p.E746_A750>IP	ASO-4024	¥ 569,000
EGFR ID:6241 c.2303G>T p.S768I	ASO-4025	¥ 569,000
EGFR ID:12376 c.2307_2308insGCCAGCGTG p.V769_D770insASV	ASO-4026	¥ 569,000
EGFR ID:12378 c.2310_2311insGGT p.D770_N771insG	ASO-4027	¥ 569,000
EGFR ID:12377 c.2319_2320insCAC p.H773_V774insH	ASO-4028	¥ 569,000
EGFR ID:6240 c.2369C>T p.T790M	ASO-4029	¥ 569,000
EGFR ID:6224 c.2573T>G p.L858R	ASO-4030	¥ 569,000
EGFR ID:6213 c.2582T>A p.L861Q	ASO-4031	¥ 569,000
KRAS ID:516 c.34G>T p.G12C	ASO-4032	¥ 569,000
KRAS ID:517 c.34G>A p.G12S	ASO-4033	¥ 569,000
KRAS ID:518 c.34G>C p.G12R	ASO-4034	¥ 569,000
KRAS ID:520 c.35G>T p.G12V	ASO-4035	¥ 569,000
KRAS ID:521 c.35G>A p.G12D	ASO-4036	¥ 569,000
KRAS ID:522 c.35G>C p.G12A	ASO-4037	¥ 569,000
KRAS ID:527 c.37G>T p.G13C	ASO-4038	¥ 569,000
KRAS ID:528 c.37G>A p.G13S	ASO-4039	¥ 569,000
KRAS ID:529 c.37G>C p.G13R	ASO-4040	¥ 569,000
KRAS ID:532 c.38G>A p.G13D	ASO-4041	¥ 569,000
KRAS ID:533 c.38G>C p.G13A	ASO-4042	¥ 569,000
KRAS ID:534 c.38G>T p.G13V	ASO-4043	¥ 569,000
BRAF ID:473 c.1798_1799GT>AA p.V600K	ASO-4044	¥ 569,000
BRAF ID:474 c.1798_1799GT>AG p.V600R	ASO-4045	¥ 569,000
BRAF ID:475 c.1799_1800TG>AA p.V600E2	ASO-4046	¥ 569,000
BRAF ID:476 c.1799T>A p.V600E1	ASO-4047	¥ 569,000
BRAF ID:477 c.1799_1800TG>AT p.V600D	ASO-4048	¥ 569,000

内容	品番	希望販売価格
BRAF ID:1130 c.1798G>A p.V600M	ASO-4049	¥ 569,000
BRAF ID:6137 c.1799T>G p.V600G	ASO-4050	¥ 569,000

※上記商品の包装は1block、貯蔵温度は−20℃です。

内容	品番	希望販売価格
RKO FFPE Block	ASO-4051	¥ 569,000
HCT116 FFPE Block	ASO-4052	¥ 569,000

ONCOREF™ FFPE スクロールリファレンス スタンダード

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号：ASC】

内容	品番	希望販売価格
EGFR ID:6252 c.2155G>A p.G719S	ASO-5000	¥ 49,000
EGFR ID:6253 c.2155G>T p.G719C	ASO-5001	¥ 49,000
EGFR ID:6239 c.2156G>C p.G719A	ASO-5002	¥ 49,000
EGFR ID:6255 c.2239_2256del18 p.L747_S752del	ASO-5003	¥ 49,000
EGFR ID:12370 c.2240_2257del18 p.L747_P753>S	ASO-5004	¥ 49,000
EGFR ID:6220 c.2238_2255del18 p.E746_S752>D	ASO-5005	¥ 49,000
EGFR ID:12387 c.2239_2258>CA p.L747_P753>Q	ASO-5006	¥ 49,000
EGFR ID:12367 c.2237_2254del18 p.E746_S752>A	ASO-5007	¥ 49,000
EGFR ID:12384 c.2237_2255>T p.E746_S752>V	ASO-5008	¥ 49,000
EGFR ID:12728 c.2236_2253del18 p.E746_T751del	ASO-5009	¥ 49,000
EGFR ID:12678 c.2237_2251del15 p.E746_T751>A	ASO-5010	¥ 49,000
EGFR ID:6254 c.2239_2253del15 p.L747_T751del	ASO-5011	¥ 49,000
EGFR ID:12369 c.2240_2254del15 p.L747_T751del	ASO-5012	¥ 49,000
EGFR ID:12386 c.2237_2252>T p.E746_T751>V	ASO-5013	¥ 49,000
EGFR ID:13551 c.2235_2252>AAT p.E746_T751>I	ASO-5014	¥ 49,000
EGFR ID:26038 c.2233_2247del15 p.K745_E749del	ASO-5015	¥ 49,000
EGFR ID:6223 c.2235_2249del15 p.E746_A750del	ASO-5016	¥ 49,000
EGFR ID:6225 c.2236_2250del15 p.E746_A750del	ASO-5017	¥ 49,000
EGFR ID:12383 c.2239_2251>C p.L747_T751>P	ASO-5018	¥ 49,000
EGFR ID:6210 c.2240_2251del12 p.L747_T751>S	ASO-5019	¥ 49,000
EGFR ID:12419 c.2238_2252>GCA p.L747_T751>Q	ASO-5020	¥ 49,000
EGFR ID:12382 c.2239_2248TTAAGAGAAG>C p.L747_A750>P	ASO-5021	¥ 49,000
EGFR ID:12422 c.2238_2248>GC p.L747_A750>P	ASO-5022	¥ 49,000

※上記商品の包装は1each（1scroll）、貯蔵温度は4℃です。

内容	品番	希望販売価格
EGFR ID:6218 c.2239_2247del9 p.L747_E749del	ASO-5023	¥ 49,000
EGFR ID:13550 c.2235_2248>AATTC p.E746_A750>IP	ASO-5024	¥ 49,000
EGFR ID:6241 c.2303G>T p.S768I	ASO-5025	¥ 49,000
EGFR ID:12376 c.2307_2308insGCCAGCGTG p.V769_D770insASV	ASO-5026	¥ 49,000
EGFR ID:12378 c.2310_2311insGGT p.D770_N771insG	ASO-5027	¥ 49,000
EGFR ID:12377 c.2319_2320insCAC p.H773_V774insH	ASO-5028	¥ 49,000
EGFR ID:6240 c.2369C>T p.T790M	ASO-5029	¥ 49,000
EGFR ID:6224 c.2573T>G p.L858R	ASO-5030	¥ 49,000
EGFR ID:6213 c.2582T>A p.L861Q	ASO-5031	¥ 49,000
KRAS ID:516 c.34G>T p.G12C	ASO-5032	¥ 49,000
KRAS ID:517 c.34G>A p.G12S	ASO-5033	¥ 49,000
KRAS ID:518 c.34G>C p.G12R	ASO-5034	¥ 49,000
KRAS ID:520 c.35G>T p.G12V	ASO-5035	¥ 49,000
KRAS ID:521 c.35G>A p.G12D	ASO-5036	¥ 49,000
KRAS ID:522 c.35G>C p.G12A	ASO-5037	¥ 49,000
KRAS ID:527 c.37G>T p.G13C	ASO-5038	¥ 49,000
KRAS ID:528 c.37G>A p.G13S	ASO-5039	¥ 49,000
KRAS ID:529 c.37G>C p.G13R	ASO-5040	¥ 49,000
KRAS ID:532 c.38G>A p.G13D	ASO-5041	¥ 49,000
KRAS ID:533 c.38G>C p.G13A	ASO-5042	¥ 49,000
KRAS ID:534 c.38G>T p.G13V	ASO-5043	¥ 49,000
BRAF ID:473 c.1798_1799GT>AA p.V600K	ASO-5044	¥ 49,000
BRAF ID:474 c.1798_1799GT>AG p.V600R	ASO-5045	¥ 49,000
BRAF ID:475 c.1799_1800TG>AA p.V600E2	ASO-5046	¥ 49,000
BRAF ID:476 c.1799T>A p.V600E1	ASO-5047	¥ 49,000
BRAF ID:477 c.1799_1800TG>AT p.V600D	ASO-5048	¥ 49,000
BRAF ID:1130 c.1798G>A p.V600M	ASO-5049	¥ 49,000
BRAF ID:6137 c.1799T>G p.V600G	ASO-5050	¥ 49,000
RKO FFPE Scroll	ASO-5051	¥ 49,000
HCT116 FFPE Scroll	ASO-5052	¥ 49,000

ONCOREF™ 凍結細胞ペレット

Applied StemCell, Inc.【メーカー略号：ASC】

内容	品番	希望販売価格
PIK3CA ID:775 c.3140A>G p.H1047R	ASE-6051P	¥ 143,000
PIK3CA ID:760 c.1624G>A p.E542K	ASE-6053P	¥ 143,000
PIK3CA ID:763 c.1633G>A p.E545K	ASE-6054P	¥ 143,000
PIK3CA ID: 764 c.1634A>G p.E545G	ASE-6055P	¥ 143,000
PIK3CA ID:766 c.1636C>A p.Q546K	ASE-6057P	¥ 143,000
KRAS ID:554 c.183A>C p.Q61H	ASE-6062P	¥ 143,000
NRAS ID:564 c.35G>A p.G12D	ASE-6065P	¥ 143,000
NRAS ID:563 c.34G>A p.G12S	ASE-6066P	¥ 143,000
NRAS ID:562 c.34G>T p.G12C	ASE-6067P	¥ 143,000
NRAS ID:569 c.37G>C p.G13R	ASE-6069P	¥ 143,000

※上記商品の包装は1vial（1vial of 1×10^6 cells）、貯蔵温度は−70℃です。

内容	品番	希望販売価格
NRAS ID:584 c.182A>G p.Q61R	ASE-6071P	¥ 143,000
NRAS ID:580 c.181C>A p.Q61K	ASE-6072P	¥ 143,000
NRAS ID:583 c.182A>T p.Q61R	ASE-6073P	¥ 143,000
HRAS ID:486 c.37G>C p.G13R	ASE-6078P	¥ 143,000
HRAS ID:496 c.181C>A p.Q61K	ASE-6079P	¥ 143,000
HRAS ID:487 c.182A>G p.Q61R	ASE-6080P	¥ 143,000
TP53 ID:6932 c.733G>A p.G245S	ASE-6087P	¥ 143,000
TP53 ID:43606 c.734G>A p.G245D	ASE-6088P	¥ 143,000
TP53 ID:11196 c.734G>T p.G245V	ASE-6089P	¥ 143,000
TP53 ID:11081 c.733G>T p.G245C	ASE-6090P	¥ 143,000
NRAS ID:5044298 c.183_183delA p.E62fs*6	ASE-6200P	¥ 143,000

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。

www.cosmobio.co.jp

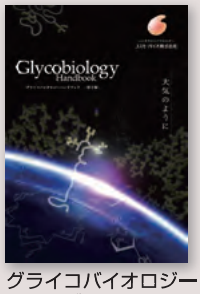
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第４版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック

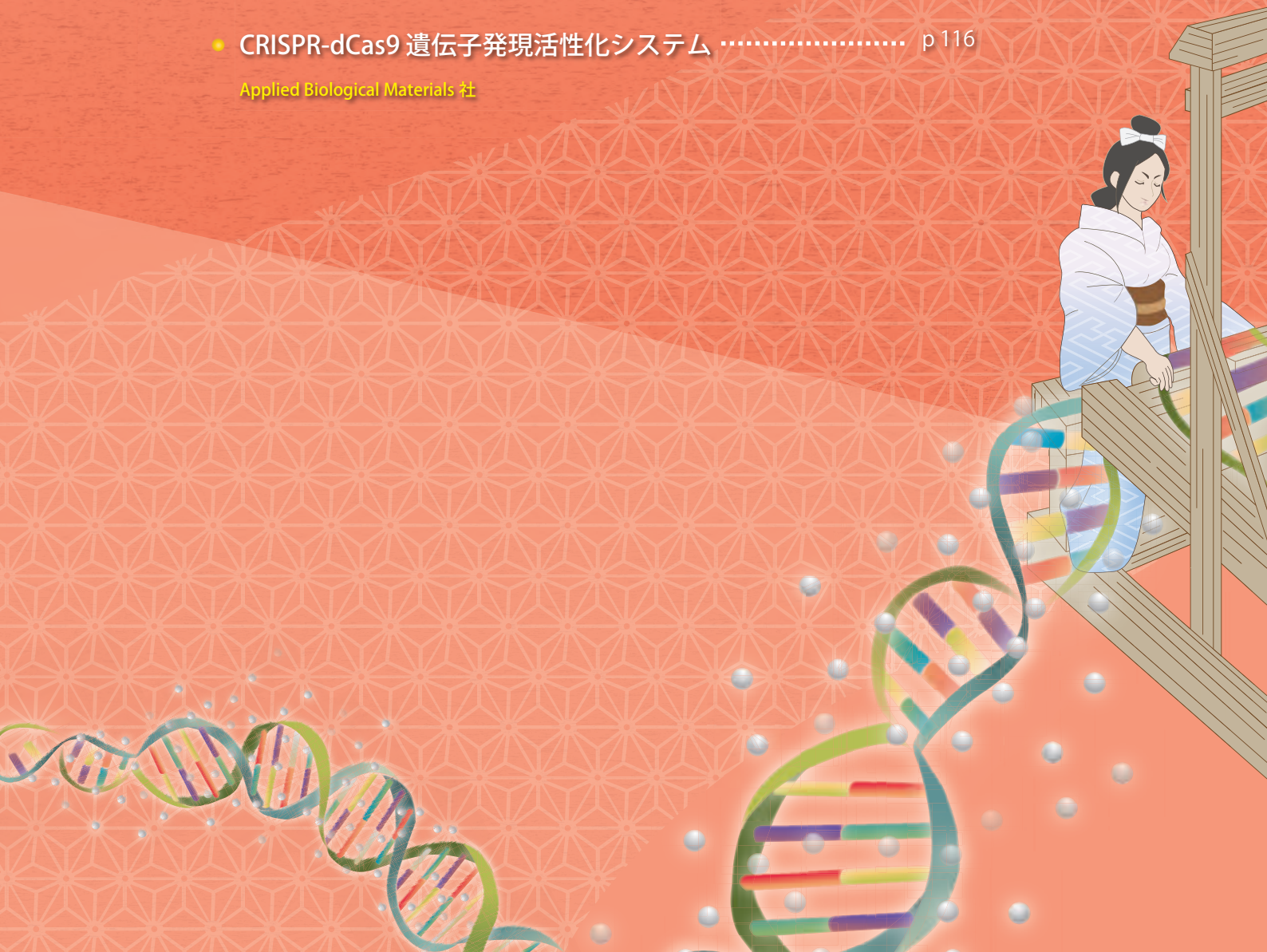


グライコバイオロジー
ハンドブック

第 7 章

CRISPR/Cas 9 技術 応用編 "dCas"

- CRISPR/dCas Activation システム ..... p 114
  Santa Cruz 社
- CRISPR-dCas9 遺伝子発現活性化システム ..... p 116
  Applied Biological Materials 社



Santa Cruz社

CRISPR/dCas Activationシステム

WEBへどうぞ
記事ID：14683

内在性のプロモーター活性を強力に亢進→標的遺伝子発現を活性化。レンチウイルス粒子もあります！

日本語プロトコールあります

CRISPR/dCas Activationシステム プロトコールを133ページ、WEB 記事ID：14683に掲載しています。

CRISPR/Cas9システムを応用することで、遺伝子ノックアウトだけでなく内在性遺伝子発現の強い活性化が可能です。

本システムでは3種類のプラスミドを利用し、細胞内にSAM複合体（Synergistic Activation Mediator Complex）を形成させます。3種類のプラスミドはそれぞれ、転写活性化因子VP64と融合した不活性型Cas9（dCas9）ヌクレアーゼ、さまざまな転写因子の動員を促進するMS2-p65-HSF1融合タンパク質、およびMS2-p65-HSF1融合タンパク質に選択的に結合するアプタマー修飾型sgRNAをコードします。

特長

- 3種のプラスミドの質量比1:1:1で構成
  - ▶ 転写活性化因子VP64に融合した不活性型Cas9（dCas9）ヌクレアーゼ（D10AとN863A）とブラストサイジン耐性遺伝子をコードするプラスミド
  - ▶ MS2-p65-HSF1融合タンパク質とハイグロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミド
  - ▶ sgRNA配列とピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミド
- SAM複合体が内在性プロモーターを強力に活性化し、標的遺伝子の内在性発現を促進
- ヒト、マウス遺伝子をゲノムワイドに網羅
- プラスミドがトランスフェクションされた細胞を薬剤選択可能
- 2種の製品フォーマット：精製済みプラスミドとレンチウイルス粒子

システムの概要

CRISPR/dCas9 Activationプラスミドは、3種類のプラスミドが質量比1:1:1で構成されます。

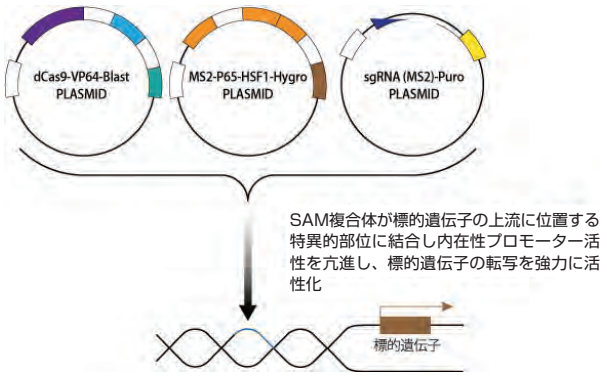
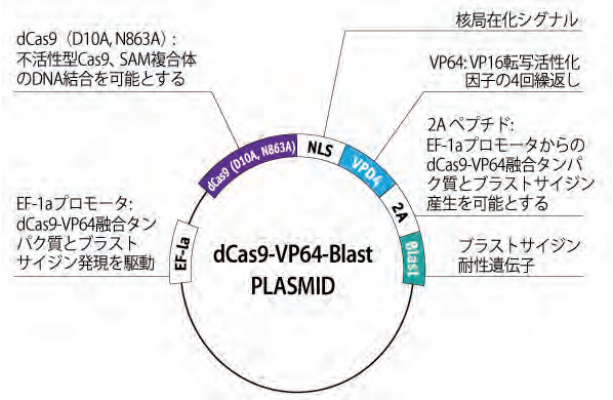
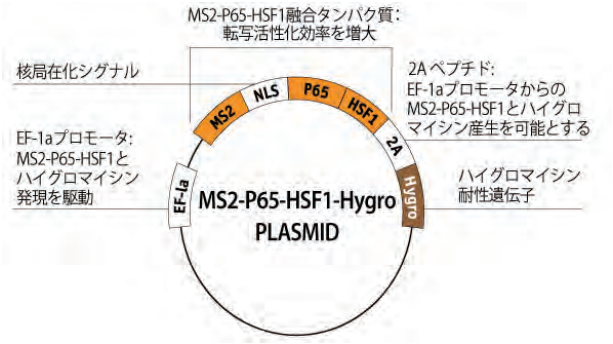


図1　SAM転写活性化システム

- CRISPR/dCas9-VP64 plasmid
  転写活性化因子に融合した不活性型Cas9（dCas9）ヌクレアーゼ（D10AとN863A）とブラストサイジン耐性遺伝子をコードするプラスミド



- MS2-p65-HSF1 plasmid
  MS2-p65-HSF1融合タンパク質とハイグロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミド



- sgRNA (MS2) plasmid U6
  sgRNA配列とピューロマイシン耐性遺伝子をコードするプラスミド

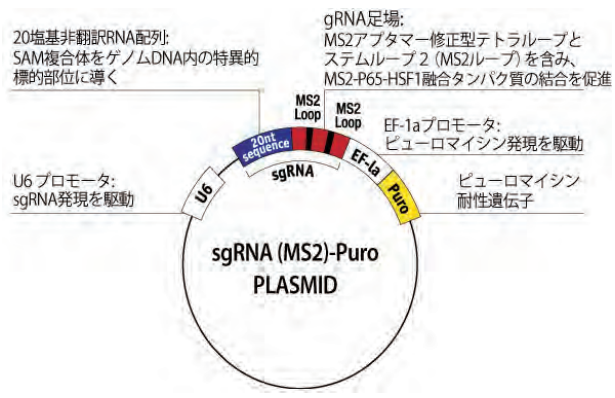


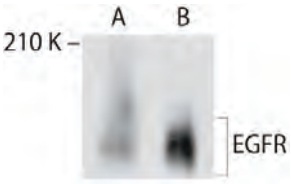
図2　使用する3種類のプラスミド

CRISPR/dCas9レンチウイルスActivationシステム*

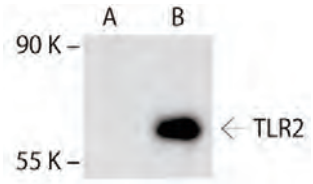
- 3種類のCRISPR/dCas9 Activationプラスミドをパッケージングした、高タイターのレンチウイルス粒子（200µℓ、1×10^{6}IFU）
- ヒトおよびマウス遺伝子を網羅
- トランスフェクションが困難な細胞に

*CRISPR/dCas9レンチウイルスActivationシステムは、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

使用例

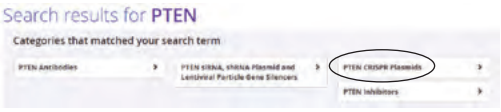
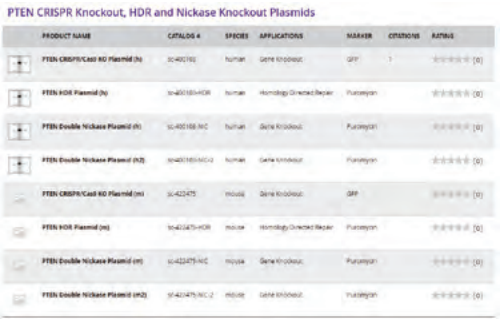


ヒトEGFRタンパク質の発現解析
（A）HEK293T細胞
（B）ヒトEGFR CRISPR Activation プラスミドを導入したHEK293T細胞



ヒトTLR2タンパク質の発現解析
（A）HEK293T細胞
（B）ヒトTLR2 CRISPR Activation プラスミドを導入したHEK293T細胞

CRISPR/dCas Activationプラスミド 商品検索方法

1	SantaCruz社WEBサイト（https://www.scbt.com/scbt/home?&_requestid=3583553）へアクセスし、検索ウィンドウに遺伝子名を入力してください。	
2	検索結果のカテゴリーから「CRISPR plasmids」をご選択ください。	
3	ご希望のプラスミド、またはレンチウイルス粒子をご選択ください。	

参考文献

1. Cong, L., *et al*. 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339: 819-823.
2. Mali, P., *et al*. 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339: 823-826.
3. Maeder, M.L., *et al*. 2013. CRISPR RNA-guided activation of endogenous human genes. *Nat. Methods* 10: 977-979.
4. Hsu, P., *et al*. 2014. Development and applications of CRISPR/Cas9 for genome editing. *Cell* 157: 1262-1278.
5. Van der Oost, J., *et al*. 2014. Unraveling the structural and mechanistic basis of CRISPR/Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol*. 7: 479-492.
6. Konermann, S., *et al*. 2014. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR/Cas9 complex. *Nature*. E-published.

■関連商品

Santa Cruz Biotechnology, Inc.【メーカー略号：SCB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
UltraCruz® Transfection Reagent	SC-395739	0.2 mℓ	¥ 19,000	㊄
Plasmid Transfection Medium	SC-108062	20 mℓ	¥ 1,000	㊄
Control CRISPR Activation Plasmid	SC-437275	20 µg	¥ 16,000	㊊
Blasticidin S HCl Solution	SC-495389	1 mℓ（10 mg/mℓ）	¥ 7,000	㊊
Hygromycin B Solution	SC-29067	1 g（50 mg/mℓ）	¥ 19,000	㊄
Puromycin Dihydrochloride	SC-108071	25 mg	¥ 6,000	㊊
Zeocin™ Selection Reagent	SC-496345	1.25 mℓ（100 mg/mℓ）	¥ 7,000	㊊
RIPA Lysis Buffer System	SC-24948A SC-24948	500 mℓ 50 mℓ	¥ 35,000 ¥ 6,000	㊊ ㊊

- UltraCruz® Transfection Reagent
  －CRISPR/Cas9プラスミドのトランスフェクションに最適です（WEB 記事ID：15526）

Applied Biological Materials社

CRISPR-dCas9 遺伝子発現活性化システム

WEBへどうぞ
記事ID: 16865

標的遺伝子のプロモーターを特異的に活性化するCRISPR-dCas9レンチウイルス／ベクター

CRISPR-dCas9活性化システムとは、CRISPR-Cas9の標的遺伝子を特異的に認識するシステムを応用することで、目的の遺伝子発現を特異的かつ強力に誘導する方法です。

このCRISPR-dCas9活性化システムでは、以下の2種類の配列を2つのエレメントを細胞内に導入する必要があります。
①dCas9-Synergistic Activation Mediator（SAM）複合体
DNA切断の機能を不活化したdCas9がDNAに結合し、転写活性化因子であるSAMにより遺伝子発現を誘導します。
②CRISPR Activation sgRNA
sgRNAが標的遺伝子特異的なプロモーター領域にdCas9-SAM複合体を誘導します。

特長

- dCas9-SAM-sgRNA転写活性化システムにより、目的遺伝子の転写を特異的かつ効果的に活性化
- dCas9-SAMとsgRNAのみでアッセイが可能
- 試験目的に応じてプラスミドとレンチウイルスを選択可能

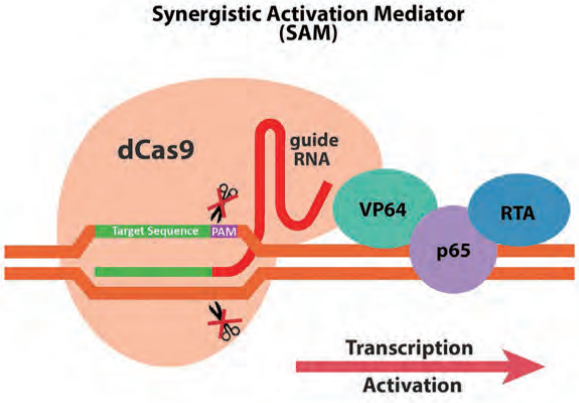


図1　dCas9-SAMによる転写活性化

使用例

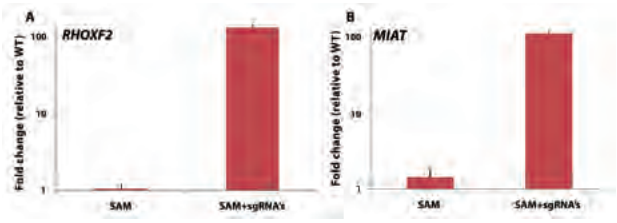


図2　HEK293細胞における遺伝子発現誘導
CRISPR-dCas9遺伝子発現活性化システムを用いて、HEK293細胞のRHOXF2（A）およびMIAT（B）の遺伝子発現をそれぞれ誘導し、mRNA発現量をqPCRで測定してそれぞれWTと比較した。

■dCas9 Synergistic Activation Mediator Lenti Vector / Virus

dCas9はD10AおよびH840Aに変異が入っておりヌクレアーゼおよびニッカーゼ活性が完全に消失しています。そのため、sgRNAの標的特異性に依存して、DNAを切断することなくDNAの特定部位に結合することができます。

本製品のプラスミドコンストラクト上では、dCas9のC末端に3種類のsynergistic activation mediator（SAM）が続きます。

これらのdCas9-SAMは、レンチベクターかパッケージング済のレンチウイルス粒子からお選びいただけます。

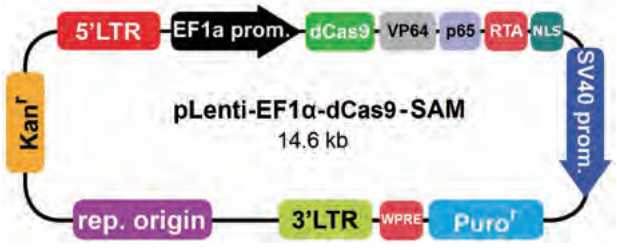


図3　pLenti-EF1a-dCas9-SAMのベクターマップ

■CRISPR Activation sgRNA Lenti Vector / Virus

ヒト、マウス、ラットの各種遺伝子特異的に設計されたsgRNA発現CRISPR活性化プラスミドおよびレンチウイルス粒子です。dCas9-SAMを標的のプロモーター領域に誘導することで、ほとんどの遺伝子発現を特異的に誘導することが可能です。

これらのCRISPR sgRNAは、レンチベクターかパッケージング済のレンチウイルス粒子からお選びいただけます。

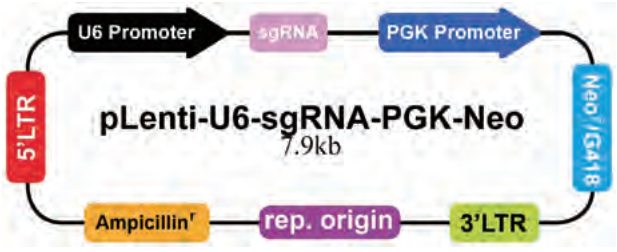


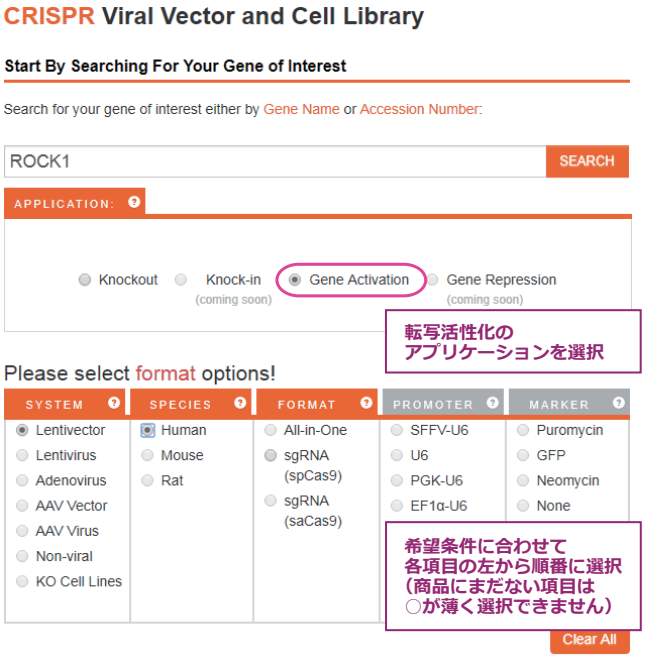
図4　pLenti-U6-sgRNA-PGK-Neoのベクターマップ

CRISPR Activation sgRNA Vector/Virusの商品検索方法

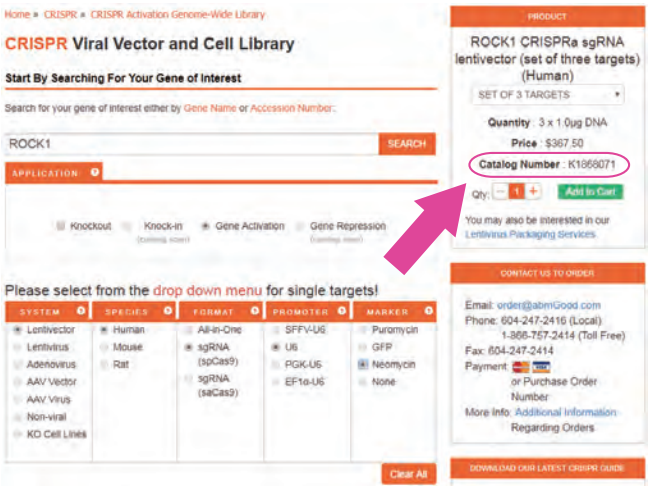
標的遺伝子のCRISPR Activation sgRNA商品の検索は、以下の手順を参考にしてください。
もし検索して見つからない場合はカスタムサービスもございますのでご相談ください。

1. Applied Biological Materials社WEBサイトにアクセスし、検索ウィンドウに遺伝子の名前（例：ROCK1）もしくはアクセッション番号を入力して検索してください。

2. APPLICATIONのGene Activationにチェックが付いていることを確認し、ご希望のベクターあるいはウイルスタイプ、生物種、Cas9種別、プロモーター、マーカーを選択してください。



3. 該当商品の品番がページの右上に表示されますので、ご利用代理店へお伝えください。



Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
dCas9 Synergistic Activation Mediator Lentivector	K015	10 µg	¥ 55,000	㊒
dCas9 Synergistic Activation Mediator Lentivirus	K016	300 µℓ（10^7 IU/mℓ）	¥ 182,000	凍

■関連製品

Applied Biological Materials Inc.【メーカー略号：APB】

品名	品番	包装	希望販売価格	貯蔵
Scrambled sgRNA CRISPR Lentivector	K018	1 µg	¥ 25,000	㊒
CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit	G932	25 rxn	¥ 55,000	㊒

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

エクソソーム
ハンドブック

細胞培養ミニカタログ

好評配布中！

いつもお手元にハンドブック

カタログは弊社ウェブサイトからご請求いただけます。
www.cosmobio.co.jp

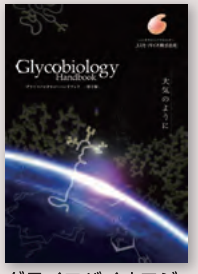
電気泳動ハンドブック
～ウェスタン
ブロッティングまで～

受託サービス
ハンドブック【第４版】

シグナル伝達
ハンドブック

細胞・生体試料
ハンドブック【第2版】

遺伝子・タンパク質操作
ハンドブック



グライコバイオロジー
ハンドブック

第8章

ゲノム編集技術情報

Applied Biological Materials 社
CRISPR/Cas9－実験計画を立てる！ …… p120

Applied Biological Materials 社
CRISPR/Cas9－gRNA デザイン …… p123

GeneCopoeia 社
CRISPR と TALEN の利点と欠点を解説 …… p126

GeneCopoeia 社
ゲノム編集技術によるノックアウトと RNAi 技術による
ノックダウンの比較 …… p129

Applied Biological Materials 社
CRISPR/Cas9 レンチウイルスシステムを用いた
ヒト胚性腎臓細胞における GFP レポーターノックアウト … p131

Santa Cruz 社
CRISPR/dCas Activation システムプロトコール …… p133

Applied Biological Materials 社
CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール　プロトコール …… p136

Applied Biological Materials 社
FAQ：CRISPR/Cas9 ゲノム編集用製品について …… p144

GeneCopoeia 社
FAQ：CRISPR/Cas9 商品と受託サービスについて …… p147

OriGene 社
FAQ：CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ガイドベクターについて… p149

Santa Cruz 社
FAQ：CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ツールについて …… p152

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー/スクリーニング
技術情報
ライブラリー/スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

CRISPR/Cas9ー実験計画を立てる！

ウイルスを利用した送達方法や非ウイルス系の手法などすみずみまで解説

WEBへどうぞ
記事ID：15668

abm®
Applied Biological Materials Inc.
メーカー略号：APB

CRISPR/Cas9システム（*C*lustered *R*egularly *I*nterspaced *S*hort *P*alindromic *R*epeats *C*RISPR-*As*sociated Proteins *9*）は、20塩基のsgRNA（ガイドRNA、gRNA）とCas9エンドヌクレアーゼを利用することで、どのような対象遺伝子でも効率よくノックアウトまたはノックインできるシステムです。その使い勝手の良さから、CRISPR/Cas9を利用した多様なアプリケーションが開発され、より労力を要するZFNやTALEN手法を大きく凌ぎ遺伝子改変手法の中心となる可能性があります。CRISPR/Cas9技術を用いた遺伝子改変では、sgRNAおよびCas9ヌクレアーゼを生体システムに効率よく導入することが重要となります。現在、ゲノム編集を目的としてCRISPR/Cas9技術を利用する手段や手法は数々ありますが、本稿では既存技術を簡単に要約してご紹介します。

1 CRISPR/Cas9ー遺伝子送達手法

遺伝子送達には、ウイルスや非ウイルス系システムを利用するものを含めいくつかの手法があります[1][2][3]。これらの手法にはそれぞれ利点と欠点があるため、実験目的に最も適した手法を選択することが重要です。全てのアプリケーションに“完璧なベクター”は存在しないため、最も適した遺伝子送達媒体を選択するために以下の要因を検討します。

1. ***in vitro*または*in vivo*実験**
   *in vivo*アプリケーション（遺伝子治療ベクター）では要求条件がより多岐にわたります。例えば、ベクター送達後の免疫応答誘発が最小限であること、多くの場合においてベクターが特定組織や細胞種を標的する能力をもつこと、などがあげられます[3][4]。
2. **標的遺伝子サイズ**
   通常、ウイルスベクターが送達できる遺伝子材料はそのゲノムサイズにより制限があります。非ウイルス系送達手法では、より長鎖のタンパク質コード配列をもつ遺伝子発現が可能です。
3. **標的細胞種**
   ニューロン、肝細胞、筋細胞など、細胞種によっては細胞分裂が完了しており、これらの細胞種を使用する場合には非分裂細胞への送達が可能なベクターを使用する必要があります[4]。
4. **一過性または常（安定）的発現**
   ベクターによって、定常的な遺伝子発現が可能なものや短期的な発現のみ可能なものがあります。例えば、多くのウイルスベクターは宿主ゲノムに組込むことができるため、目的遺伝子を安定発現する細胞の構築が可能です[4]。

CRISPR/Cas9システムを利用したゲノム編集を良好に行うためには、sgRNAとCas9ヌクレアーゼを生細胞に効率よく送達することが重要です。

＊モデル細胞株をお探しの場合には、Applied Biological Materials社の広範なヒト初代培養細胞（WEB 記事ID：13673）、マウス、ラット、ハムスター初代培養細胞（WEB 記事ID：13674）および不死化細胞（WEB 記事ID：13926）のラインアップをご参照ください。

2 CRISPR/Cas9ーウイルスベクター

長年にわたり、遺伝子送達においてウイルスのもつ細胞侵入特性を利用したウイルスベクターが活用されています。レンチウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスなどでは安全性の問題から、多くのウイルスの病原性部分はキャリア媒体として機能するよう改変されています。ウイルス媒介型遺伝子送達全てに共通する特徴として、その著しい感染効率が挙げられます[1]。その注目すべき感染効率の一方、ウイルスベクターによっては以下の弱点があります[1]。

- ウイルスにより送達可能な遺伝子サイズに限度がある
- ウイルスベクターによる急性免疫応答
- ウイルスベクター構築が困難

＊Applied Biological Materials社では、レンチウイルス、アデノウイルス、およびAAVの全てのプラットフォームに対応したCRISPR/Cas9 sgRNA発現システム（17ページ、WEB 記事ID：13443）をご提供しています。

■ レンチウイルスベクター

レンチウイルスはレトロウイルスのサブクラスであるものの、他のレトロウイルスとは異なり、増殖性細胞や静止期の細胞の何れにも感染できる特有の能力をもっています[1]。レンチウイルスは感染後、宿主ゲノムに非特異的に組込まれるた

め、導入遺伝子の長期にわたる安定発現が可能となります[1]。中程度の大きさのウイルスであることから、レンチウイルスベクターは最大5.0 kbまでの外来遺伝子を送達することができます。レンチウイルスの指向性（tropism）はウイルス産生時に異なる種類のエンベロープタンパク質を使用することで改変できるため、天然のレンチウイルス感染に必須のT細胞受容体タンパク質であるCD4依存性を軽減できます[4]。組換え型レンチウイルスベクターにおいて最も繁用されている異種性エンベロープタンパク質は、“水疱性口内炎ウイルス糖タンパク質（VSV-G）”です。VSV-Gは細胞膜上の数々の受容体のリン脂質成分と相互作用できることから、VSV-G偽型レンチウイルスはより広範な細胞を宿主とします[2][4]。

■ アデノウイルスベクター

アデノウイルスはゲノムサイズが大きいことから最大8～9 kbのDNAを収容することができ、ウイルス介在型でより大きい導入遺伝子を送達する手法として利用できます。アデノウイルスの細胞侵入は高発現した細胞表面コクサッキーウイルスBアデノウイルス受容体（CAR）を介するため、多くの細胞種において高い感染効率を示します[2]。アデノウイルスは広範な分裂および非分裂細胞に感染することができる一方、非識別型の指向性（tropism）により生体システムにおいては非標的細胞へのトランスダクションを導くことがあります。他の組込み型ウイルスと異なり、アデノウイルスベクターは細胞内でエピソームとして留まることから一過性遺伝子発現のみを生じます[1][4]。アデノウイルスは*in vitro*における急性免疫応答誘導が非常に大きな問題であり、遺伝子治療における組織局在化を目指した医療用アプリケーションへの応用が困難です[1][2][5]。

■ アデノ随伴ウイルスベクター（AAV）

アデノウイルスと異なりAAVには病原性がないことから、*in vivo*アプリケーションに適したベクターといえます。AAVは分裂細胞と非分裂細胞の両方に感染することができ、その細胞侵入はヘパリン硫酸化プロテオグリカンとインテグリンを介します[5]。天然に存在するAAVはそのRepタンパク質機能を介して第19染色体上の特異的部位に組込まれますが、現在使用されている組換え型AAVはRepをコードしておらず、染色体外DNAとして存続します[4]。異なるAAV血清型からは異なる指向性が得られます。ウイルス産生の際に異なるカプシドタンパク質を使用することで、特定種の細胞に感染する組換え型AAVを構築することもできます。AAVはゲノムサイズが小さいことが欠点で、最大3.4 kbの導入遺伝子しか使用できません。表1に特定組織種に対するAAV血清型の指向性を示しました。

表1　AAV血清型およびそれぞれの指向性

AAV血清型	CNS/網膜	心臓	肺	肝臓	骨格筋
AAV1	×	×	×		×
AAV2	×			×	×
AAV3	×	×		×	
AAV4	×	×			
AAV5	×		×		
AAV6		×	×	×	×
AAV7	×			×	×
AAV8	×			×	×
AAV9	×	×	×	×	×
AAV10	×		×		

■ 各ウイルス手法の比較

表2に、一般的に使用されている市販のウイルスベクターシステムの比較を示しました。他にもヘルペスシンプレックスウイルス（HSV-1）、ワクシニアウイルス、センダイウイルス、EBVおよびシンドビスおよびセムリキ森林アルファウイルスを骨格とするベクターシステムも知られています。前述のウイルスシステムほど一般的ではないものの、これらのベクターがほかの利点を持つ場合もあります[5]。

表2　レンチウイルス、アデノウイルス、およびAAVベクターの特性

特徴	レンチウイルス	アデノウイルス	AAV
パッケージング許容量	5 kb	8-9 kb	3.4 kb
効率	★★★	★★★★	★★★
細胞種	多くの分裂／非分裂細胞	多くの分裂／非分裂細胞 初代培養細胞に対する高いトランスダクション効率	全細胞種
組込み	生ずる	生じない	90%生じない、 10%組込まれる可能性あり
免疫応答	★★★	★★★★★	★★

3 CRISPR/Cas9－非ウイルス系遺伝子送達

非ウイルス系遺伝子送達は、化学的なものと物理的なものの2つのカテゴリーに大別できます[1][2]。ウイルス介在型手法と比較すると、非ウイルス系手法は遺伝子送達効率が低い可能性がありますが、費用対効果がはるかに高く、特に導入遺伝子サイズの制限がないうえ免疫応答を憂慮する必要がありません[1]。

＊Applied Biological Materials社では、非ウイルス系遺伝子送達手法用CRISPR/Cas9 sgRNA発現システム（17ページ、WEB 記事ID：13443）をご提供しています。

■物理的な非ウイルス系遺伝子送達

微量注入法、エレクトロポレーションおよびパーティクル・ガン法といった物理的手法では、遺伝子を細胞内に侵入させるために物理的な力を用いて細胞膜を破壊します[2]。これらの技術は直接的で実行が容易であるものの、実験には特殊な機器が必要です。さらに、これらの手法では物理的に細胞膜を破壊するため細胞死や組織損傷を生ずることがあります[1][2]。

■化学的な非ウイルス系遺伝子送達

ネイキッドのDNA分子は親水性構造をもつため細胞に効率よく侵入できません。化学的手法では負の電荷をもつ核酸（DNAなど）とポリカチオンのポリマーや脂質粒子間の静電気的な相互作用を利用し、エンドサイトーシスによる細胞侵入を推進します[1]。これらの化学的キャリアには以下の3種の機能があります[3]。

- DNAの負電荷を遮蔽する
- DNA分子をより小さいサイズに圧縮する
- 細胞内ヌクレアーゼからのDNA分解を保護する

化学的手法での大きな欠点として、短期的な遺伝子発現しか得られないだけでなく、その送達効率が標的細胞種に依存することや、標的細胞における実験条件の最適化が厄介になることもあります。

4 CRISPR/Cas9ー実験計画を立てる

4.1 「何を達成するか」最終目標を考慮してCRISPR/Cas9システムを選択

CRISPR/Cas9のアプリケーションは、遺伝子ノックアウト（挿入欠損変異など）、遺伝子活性化または抑制、遺伝子情報の的確な編集など様々です。コスモ・バイオWEBサイト上のCRISPR/Cas9 基本の「き」の記事にある「CRISPR/Cas9ーシステムの多様性」の項（WEB 記事ID：15520）などを参照いただき、どのCas9バリアントが最も目的に適するかをご検討ください。ご利用になるCRISPR/Cas9システムが決まったら、次はsgRNAをデザインします。

＊Applied Biological Materials社では、バラエティーに富んだCas9（17ページ、WEB 記事ID：13443）をラインアップしています。

4.2 対象遺伝子に対するsgRNAデザイン

CRISPR/Cas9システムによるゲノム編集効率は、Cas9エンドヌクレアーゼを期待するゲノム標的へと誘導するsgRNAの特異性に大きく依存します。sgRNAをデザインし標的配列を選択する際には、オフターゲット作用の可能性を最小限に抑えるため、数々の点を考慮する必要があります。「CRISPR/Cas9 sgRNAデザインガイド」（123ページ、WEB 記事ID：15764）をご参照ください。標的配列に対するsgRNAがデザインできれば、そのsgRNAを適切な発現ベクターにクローニングします（「遺伝子送達手法」の項をご参照ください）。

＊Applied Biological Materials社では、レンチウイルスベクターにあらかじめ組込み済のCRISPR/Cas9 sgRNAコレクション（17ページ、WEB 記事ID：13443）をゲノムワイドにご提供しています。

4.3 sgRNAおよびCas9の実験モデルへの送達

sgRNAとCas9の2つの構成要素を送達するために最良な方法は、モデルシステムによって異なります。例えば、初代培養細胞株はトランスフェクションよりもウイルス感染により感受性が高く、幹細胞はエレクトロポレーションが向いているようです。どの遺伝子送達手法がご自身の実験モデルに適しているかを事前に決定する必要があります。一般的なウイルス系および非ウイルス系手法に関しては、前述のガイドラインをご参照ください。

4.4 ゲノム編集効率の評価

ゲノム修正を良好に進めるためには、PCR、配列決定、エンドヌクレアーゼミスマッチ検出アッセイ、またはSurveyorアッセイといったその後の実験検証が必要です。CRISPR/Cas9ノックアウト実験と機能検証の手順（2ページ、WEB 記事ID：15521）を参照いただき、CRISPR/Cas9実験をどのように評価するべきかご検討ください。

参考文献

1. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Nayerossadat, Nouri, *et al.* 27, s.l. : *Adv BioMed Res.*, September 4, 2012, Vol. 1, pp. E2579-E2586.
2. Gene Delivery Systems: Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. Cevher, Erdal, Demir Sezer, Ali and Şefik Çağlar, Emre. s.l. : *InTech*, May 23, 2012, p. 172.
3. Gene therapy and DNA delivery systems. Ibraheem, D, Elaissari, A and Fessi, H. 1-2, s.l. : *International Journal of pharmaceutics*, March 17, 2014, Vol. 459.
4. Gene therapy: trials and tribulations. Somia, N. and Verma, I.M. s.l. : Nature Reviews Genetics, November 11, 2000, *PLoS Computational Biology*, Vol. 1, pp. 474-483.
5. Viral vectors for gene delivery and gene therapy within the endocrine system. Stone, D, *et al.* s.l. : *Journal of endocrinology*, Jun 2000, Vol. 164, pp. 467-477.

CRISPR/Cas9－gRNAデザイン

特異性の高いゲノム編集の鍵、ガイドRNA設計方法を解説！

WEBへどうぞ
記事ID：15764

abm®
Applied Biological Materials Inc.
メーカー略号：APB

RNA誘導型のゲノム編集最新ツールであるCRISPR/Cas9システムでは、特異性の高いゲノム編集が可能です。この技術は、使用方法が簡単で、かつ如何なるゲノム座位も20塩基対のRNAオリゴをデザインすることで標的できる、という点で遺伝子工学を改革したといえます。sgRNAは、CRISPR/Cas9システムにおいて重要な構成要素であり、その配列のデザインには数々の点を考慮する必要があります。

1 CRISPR/Cas9－crRNA、tracrRNA、およびgRNA

細菌や古細菌では、CRISPR RNA（crRNA）とトランス活性化型CRISPR RNA（tracrRNA）が複合体を形成し、侵入してきた外来の遺伝物質にCas9ヌクレアーゼを配向させる帰巣装置として機能します（詳細はCRISPR/Cas9システム ガイドライン（Ⅳページ）をご参照ください）。tracrRNAとcrRNAを組み合わせて単一の合成gRNAとすることで、実験デザインを簡易化できるだけでなく、同等またはより高いガイド効果が得られます（図1）[1]。3'末端に異なるtracrRNA配列長をもつ様々な構造のsgRNAがデザインされ、試行されました。全体のsgRNAデザイン内に占める本来のtracrRNA配列部分が増大するごとに編集効率の上昇がみられました[2]。最も一般的に使用されるsgRNAは100塩基長です。sgRNAの5'末端側の20塩基対を変更することで、CRISPR/Cas9システムによりsgRNAの相補配列をもつどのようなゲノム領域をも標的することができます。

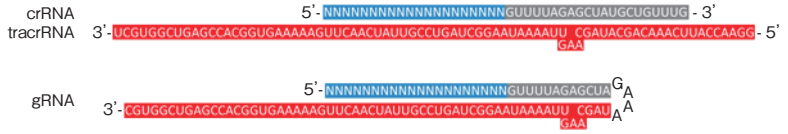


図1　crRNA-tracrRNA複合体とgRNAの例

＊Applied Biological Materials社のCRISPR sgRNAベクター（17ページ、WEB 記事ID：13443）は、レンチウイルス型とアデノウイルス型のいずれにおいても最大限の編集効率が得られるようデザインされています。

2 CRISPR/Cas9－一般的なsgRNAデザインガイド

CRISPR/Cas9システムの標的特異性は、sgRNAの5'末端に位置する20塩基配列により決定します。SpCas9の場合、期待する標的配列は5'-NGGプロトスペーサー隣接モチーフ（PAM、詳細はCRISPR/Cas9システム ガイドライン（Ⅳページ）をご参照ください）の直前に配置される必要があります。sgRNAは、Cas9ヌクレアーゼを“相補的な塩基対を形成できる標的配列”に先導し、Cas9ヌクレアーゼはPAM配列から～3塩基程度上流において二本鎖切断を媒介します（図2）。PAM配列はsgRNA配列の20塩基対に含まれないものの、CRISPR/Cas9ゲノム編集においてゲノムDNA上にこの配列が存在することは必須条件です。

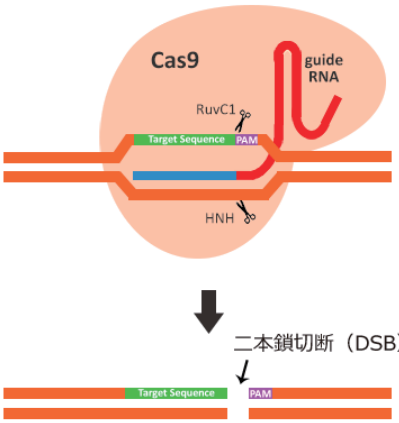


図2　SpCas9を用いる場合、標的配列は5'-NGG PAM配列の直前に隣接している必要がある。sgRNAは標的配列の反対鎖と相補的塩基対を形成し、Cas9ヌクレアーゼを介してPAM配列の～3塩基上流に二本鎖切断を生ずる反応を媒介する。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

いくつかのプロモーターは標的部位選択とsgRNAデザインを制限してしまう可能性もありますが、sgRNA発現の駆動に適切なプロモーターを選択することは非常に重要です。例えば、RNAポリメラーゼⅢ依存型U6プロモーター、またはT7プロモーターは、転写開始のためにRNA配列の5'末端に「G」または「GG」がそれぞれ必要です[2]。したがって、U6またはT7プロモーターを*S. pyogenes* CRISPRシステムに使用する場合、標的配列はそれぞれ「GN16-19NGG」または「GGN15-18NGG」に限定されます。あるいは、20塩基対の先導配列の5'末端に余分なGまたはGGを付加しておくことでこの制限を回避することもできます（図3）。

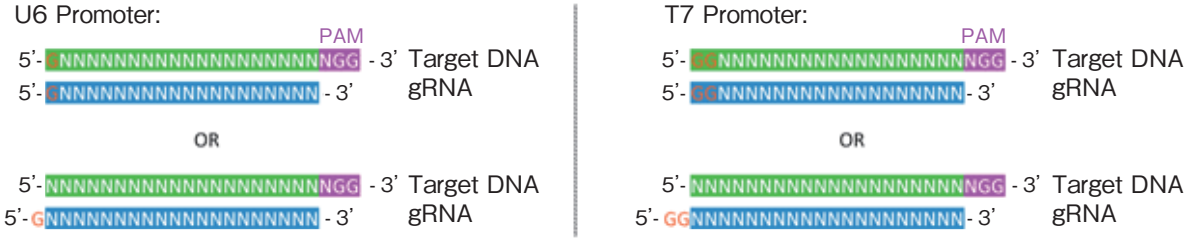


図3　U6やT7 RNAポリメラーゼⅢプロモータをsgRNA発現に使用することで生ずる配列制限は、回避することが可能

sgRNAの20塩基対先導配列をデザインする際は、以下の3点を考慮する必要があります。

- GC含量：一般的なGC含量は40%～80%。GC含量が高いほどRNA:DNA二量体を安定化させて、オフターゲットハイブリダイゼーションを不安定化する。
- 鎖長：鎖長は調整することができ、その範囲は17～24塩基対である。より短鎖の配列はオフターゲット効果を最小化する。
- デザインしたsgRNAによりオフターゲットサイトとなる可能性。

sgRNAと標的部位間のミスマッチ許容性は、CRISPR/Cas9システムのオフターゲット作用を誘発することになり、一般的にその頻度は以下の項目に依存します。

- ガイド配列の5'末端におけるミスマッチは、最初の8～4塩基対と比較して、より許容性を示す。
- sgRNAと標的配列間に、3塩基以上のミスマッチがある場合、オフターゲット作用を阻害する。
- オフターゲット作用はgRNA配列にも依存し、sgRNAによってはミスマッチに対して低い許容性を示す。
- 細胞内に導入されたCas9とsgRNAの量や比率もオフターゲット作用に影響を及ぼすため、Cas9とsgRNAを慎重に滴定することでこれらの効果を低減できる[3]。

非相同性末端結合（NHEJ）を利用して小さな挿入欠損を導入する場合、どのようなタンパク質にも数々の標的可能部位が存在します。タンパク質コード領域のN末端側を標的する方がC末端側を標的するより望ましく、これは多くのタンパク質が翻訳されていない段階でフレームシフトが生ずる方が、より有害となり得るためです。また、挿入欠損変異体を構築する場合は、ゲノムDNAのコード鎖と非コード鎖のいずれも標的とすることができ、いずれに対しても同等に効果的です。もし、ゲノム編集に相同組換え型修復（HDR）を使用する場合、標的配列選択は挿入したい領域に限定されることになります。sgRNAをデザインする際には、実験計画ごとに生じる要件を注意深く考慮する必要があります。sgRNAを慎重に設計することで、より高い編集効率とオフターゲット作用の低減が可能となります。

＊Applied Biological Materials社では、実験にすぐにご利用頂けるsgRNAベクターあるいはウイルス粒子（17ページ、WEB 記事ID：13443）をヒト、マウス、ラット遺伝子を網羅してご提供しています。

3 CRISPR/Cas9－ダブルニッキング用の配列設計において特に考慮すること

一組のsgRNAペアとニッカーゼ改変型Cas9による二本鎖切断（ダブルニッキング法）を利用する場合には、前述の内容に加えて、さらに以下の内容を考慮する必要があります（図4）。

- 理論的にはニッキングで5'末端オーバーハングが産生される必要がある。
- 2種のsgRNAの間隔は種々異なり、お互いが直接隣接する場合もあれば最大20塩基対離れる場合もある。
- 2種のsgRNAは標的配列に対してそれぞれが反対鎖側になるようデザインする必要がある。PAM配列が標的配列の直前に来ることに注意[4]。

2種のsgRNAをデザイン後、これらを1:1の比率で混合し、ニッカーゼ改変型Cas9（D10A変異型Cas9）と共に標的細胞へと送達します。送達手法の詳細は、CRISPR/Cas9－実験計画を立てる！（120ページ、WEB 記事ID：15668）をご参照ください。

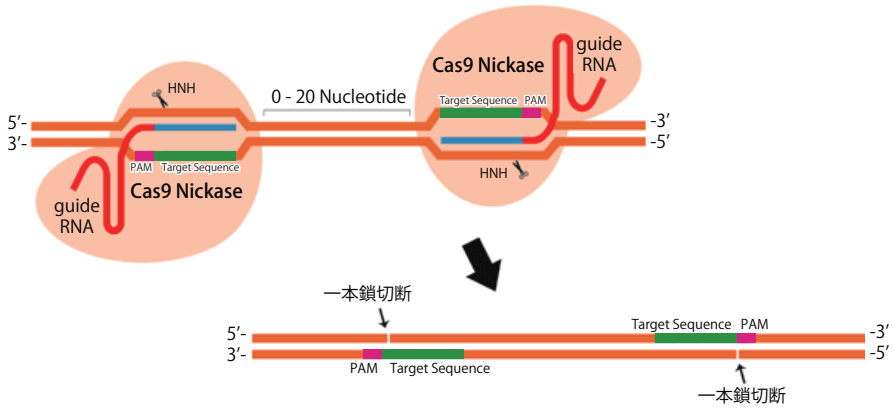


図4　ダブルニッキング法を利用する場合、gRNAデザインについてさらに考慮する必要がある。例えば、5'オーバーハングを産生すること、2種のsgRNAの間隔、および2種のsgRNA標的部位の相対的な位置などである。

＊Applied Biological Materials社では、ニッカーゼ改変型Cas9と組み合わせて使用するsgRNAペア（17ページ、WEB 記事ID：13443）をゲノムワイドにご提供しています。

4 CRISPR/Cas9－sgRNAデザインツール

現在、さまざまなsgRNAデザインに役立つツールが公開されています。本稿では、Chop Chop HarvardとCRISPR Designの2種類のデザインツールをご紹介します。

■Chop Chop Harvard

特定の核酸配列または対象遺伝子のアクセッション番号をChop Chop Harvard（図5）に入力すると、ソフトウェアが配列を分析し、PAM配列を直後にもった（5'-NGG）20塩基配列候補を全て確認します。その後、GC含量やオフターゲット部位といった予め設定した基準に応じてsgRNAに評価（点数）をつけ、点数の高いものから低いものへと並び替えを行います。特定のsgRNA配列について詳細情報を確認したい場合は、そのsgRNA配列をクリックします。新規ページが開き、特定sgRNAによりオフターゲット作用の可能性がある部位、これらのオフターゲット配列により生ずる変異をSurveyorアッセイによりスクリーニングするためのプライマー配列が示されます。Surveyorアッセイの詳細は、CRISPR/Cas9ノックアウト実験と機能検証の手順（2ページ、WEB 記事ID：15521）をご参照ください。

図5　順位、エキソン位置、潜在的オフターゲット部位数に焦点をあてたChop Chop Harvard結果ページ

■CRISPRデザイン

CRISPRデザインを使用する主な利点は、全てのsgRNA候補におけるオフターゲット作用の可能性について詳細情報が得られることです。全てのsgRNA配列をBLASTにかけ、そのオフターゲット位置、およびミスマッチ数をsgRNA配列とともに詳細にレポートします。このソフトウェアは、ダブルニッキング法に使用する2種のsgRNAペアをデザインする場合にも有用で、お互いに近接位置に配置された2種のsgRNAを自動的にデザインします。しかし、本ソフトウェアには一度に500塩基ずつしか解析できないといった欠点もあります。したがって、sgRNA配列候補の選択にはChop Chop Harvardを使用し、さらなる分析にCRISPRデザインツールを使用することがよいかもしれません。

＊Applied Biological Materials社では、遺伝子ファミリーや情報伝達経路を対象とした、最大100標的遺伝子をノックアウトするプール型sgRNAライブラリーカスタム構築サービス（105ページ、WEB 記事ID：14300）をご提供しています。sgRNAデザイン作業の負担が大きい場合にはご検討ください。

参考文献

1. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. Mali, Prashant, *et al.* 6121, January 3, 2013, *Science*, Vol. 339, pp. 823-826.
2. CRISPR/Cas system for editing, regulating and targeting genomes. Sander, Jeffry D and Joung, J Keith. 4, April 2014, *Nature Biotechnology*, Vol. 32, pp. 347-355.
3. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. Hsu, Patrick D, *et al.* July 21, 2013, *Nature Biotechnology*, Vol. 31, pp. 827-832.
4. Genome engineering using the CRISPR/Cas9 system. Ran, F Ann, *et al.* 11, October 24, 2013, *Nature Protocols*, Vol. 8, pp. 2281-2308.

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

CRISPRとTALENの利点と欠点を解説

ゲノム編集するなら、どちらの技術がよいか…？

WEBへどうぞ
記事ID：14598

GeneCopoeia™ Expressway to Discovery
GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

標的ゲノム部位に特異的に変異を入れること（欠損、置換、挿入）ができるCRISPR/Cas9等のゲノム編集ツールは、生物学および医学の研究者にとって非常に有用です（Bogdanove & Voytas, 2011; van der Oost, *et al*., 2013）。近年、植物の病変形成や適応免疫といった細菌のシステムを利用する2種類のゲノム編集技術が登場しました。それが、TALENとCRISPR/Cas9です。TALENとCRISPR/Cas9の何れの技術も、実質的にゲノム上の如何なる標的配列に対しても二本鎖切断を誘導するエンドヌクレアーゼを利用することで、遺伝子ノックアウト、ノックイン、遺伝子タグ付けおよび遺伝的欠陥矯正といった様々なアプリケーションに利用されています。どちらの技術もよく認知されているものの、どちらの技術を選択すべきか判然としない場合もあります。ここでは、TALENとCRISPR/Cas9の利点と欠点を比較し、最終的に個々の実験系においてどちらの技術を選択すべきかご判断頂くための情報をご提供します。

1 ゲノム編集とは（概略）

ゲノム編集は、まず標的DNAに効率よく二本鎖切断を導入することから始まります（図1）。二本鎖切断は相同組換え（HR）あるいは、ドナーテンプレートが存在しない場合において、非相同性末端結合（NHEJ）を介して修復されます。NHEJは切断末端に短鎖の挿入、または欠失を導入しこれらを結合します。この挿入欠失が生じる傾向を簡便な遺伝子ノックアウト手法として利用します。

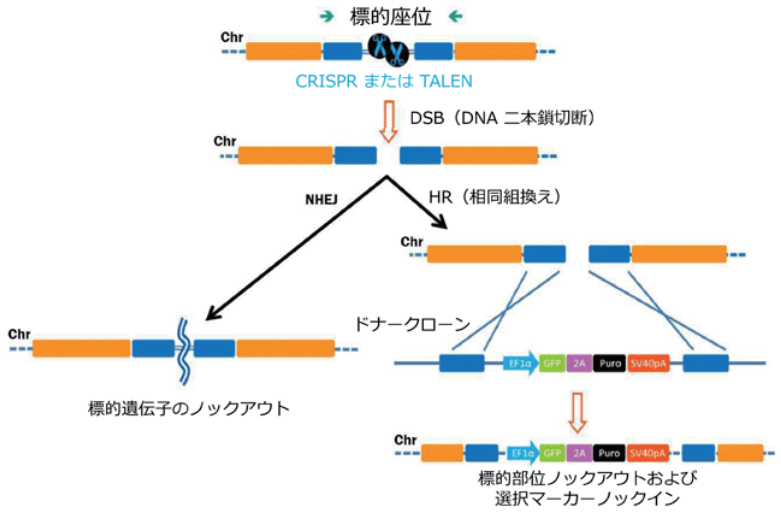


図1　ゲノム編集ツールにより誘発された二本鎖切断の修復経路
左：非相同性末端結合（NHEJ）
右：ドナーテンプレート存在下での相同組換え（HR）

2 CRISPR/Cas9とTALENの比較

CRISPR/Cas9とTALENのどちらを利用するかを検討する際に考慮する4つのポイントを以下に示します。

2.1 特異性

CRISPR/Cas9とTALENの何れの手法も非常に高い標的特異性をもち、遺伝子変異を導入することができます。CRISPR/Cas9の場合、2種の天然に存在する短鎖RNAを人工的に融合させたsgRNAを介してこの特異性を獲得します（Jinek, *et al*. 2012）。sgRNAは、*S. pyogenes*由来のCas9ヌクレアーゼを染色体上の20塩基の標的部位に誘導しますが、この標的配列はPAM（proto spacer adjacent motif）といわれるN-G-Gの3塩基が直後に続く必要があります（図2）。sgRNAはPAM部位の相補鎖とハイブリダイズしCas9ヌクレアーゼがDNAを切断します。近年、多くの論文においてCRISPR/Cas9は高頻度で標的部位に二本鎖切断を誘導することが示されています。しかし、sgRNAは期待しない部位を最大5ヶのミスマッチ（ワトソンークリック塩基対ではない）をもって標的する可能性があり（Fu, *et al*., 2013）、そのため、CRISPR/Cas9はゲノム上の様々なオフターゲット部位と物理的に会合することも示されています（Kuscu, *et al*, 2014）。高頻度で意図しない部位に挿入欠失を形成することがいくつか報告されている（Fu, *et al*. 2013）ものの、他の研究者からはオフターゲット変異誘発性に関する当初の見積もりが誇張されていたことも指摘されて

います（Li, *et al*., 2013; Yang, *et al*., 2013; Wang, *et al*., 2014）。

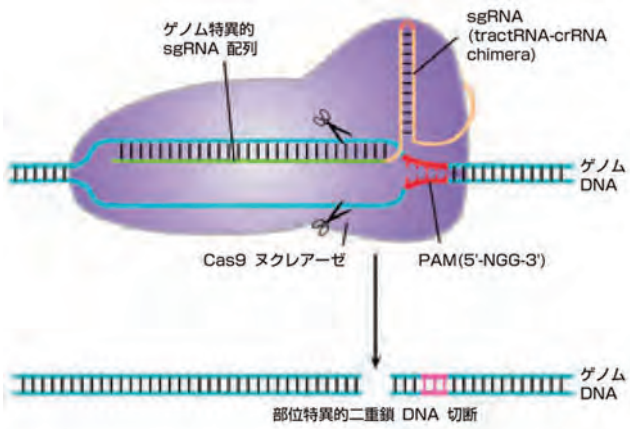


図2　CRISPR/Cas9標的認識

近年の技術開発によりCRISPR/Cas9の特異性は飛躍的に改善されています。手法としては、標的部位を挟んだ両鎖を2種類のsgRNAで標的し、ニッカーゼによる1対の一本鎖切断を利用するものです（Mali, *et al*., 2013; Ran, *et al*., 2013）。各ニッカーゼによりオフターゲットが生じた場合でも、ニックは二本鎖切断に比べて変異原性が低いため、1対のニッカーゼを利用することでオフターゲットを劇的に低減できます。さらに、sgRNA内の標的配列を最短17塩基まで短くすることでオフターゲットが抑えられることが報告されています（Fu, *et al*., 2014）。不活性型Cas9ヌクレアーゼとFok I ヌクレアーゼの二量体を利用し、さらに切断特異性を高めた手法（RNA-guided Fok I　Nuclease；RFN）も開発されています（Tsai, *et al*., 2014）。

一方、TALENではオフターゲットの問題は低いといわれています。一般に、TALENは34アミノ酸の18回繰返しで構成されます。この繰返しは“反復可変二残基”（RVD）とよばれ、アミノ酸第12位と13位において可変です。RVDを介するDNA結合コード（図3）によりDNA結合特異性が得られます。TALENペアは標的部位において、14～20塩基からなる“スペーサー”によって分割された相補鎖にそれぞれ結合する必要があります（図4）。Fok I が活性を示すためには二量体を形成する必要があるため、このオフセットデザインが必要となります。ゲノム上では、このように長鎖のDNA結合部位（約36塩基）は非常にまれであると考えられます。RVD-DNA結合コードには縮重がみられることもあり（Bogdanove and Voytas, 2011）、TALENにおけるミスマッチ寛容やオフターゲット活性はほとんど報告されていません。近年のiPS細胞株を高活性TALENにより編集した例では、標的部位と相同性をもつ他のゲノム領域において変異原性活性がみられなかったと報告されています（Park, *et al*., 2014）。

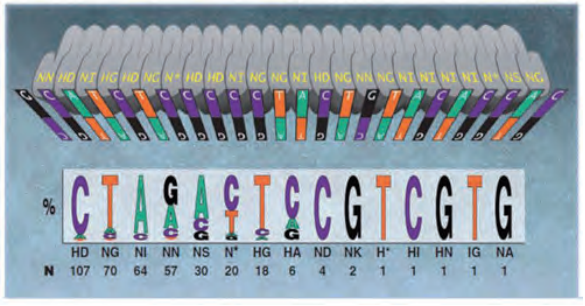


図3　TALEN用DNA結合コード。Bogdanove & Voytas（2011）より引用

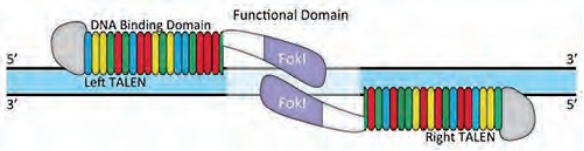


図4　一般的なTALENデザイン

2.2 標的部位選択

前述の通り、CRISPR/Cas9の標的部位はNGG（PAM配列）の直前に位置する必要があります。ノックアウトを目的とする場合、NGG部位を探すことはそれほど困難ではありませんが、他のアプリケーションでは問題となることもあります。さらに、ダブルニッキング法やRFN法を利用する場合、sgRNAのデザインに制約がかかります。何れの場合も2つのsgRNAはPAM部位がお互いに末端に位置する（尾部と尾部に配向：Mali, *et al*. 2013; Ran, *et al*., 2013; Shen, *et al*. 2014; Tsai, *et al*., 2014）よう方向付けを行う必要があります。1対のニッカーゼは8～30塩基の間隔をもつときに最もよく機能します（最適な間隔は0～20塩基）。RFN法では、その間隔はより限定的です。13～18塩基の間隔が必要であり、最適な間隔は16～17塩基となります。一方で、TALENでは決められた間隔をもつオフセット結合タンパク質が必要となるものの、デザイン上の制約は現時点でこれ以外に報告されていません。従って、TALENによりゲノム上の如何なる部位も標的でき、標的部位選択においてCRISPRに比べてより自由度と柔軟性が高いともいえます。

2.3 ゲノム編集効率

CRISPR/Cas9は染色体上の標的部位に高効率で変異導入可能であることもあり、生物学や医学の分野で注目をあびています。挿入欠失形成率が70%以上であるとの報告もあります。予想されたように、短縮sgRNA、ニッカーゼ、およびRFN法では挿入欠失形成効率がより低くなります。

TALENもまた、高い効率でゲノム編集が可能です。Parkらの報告では、1つのTALENペアでは挿入欠失形成率が33%でした。この挿入欠失形成効率はCRISPR/Cas9に匹敵するものです。しかし、TALENはシトシンメチル化に感受性であり、特にCpGジヌクレオチドにおいて感受性が高いことが知られています。これはDNAサイレンシングにおいて一般的かつよく知られた機序です。CpGメチル化はプロモーター領域においてよく見られますが、タンパク質をコードするDNA配列においても生じます。TALENペアによっては変異誘発活性がほとんどない、または全く示さないものがありますが、このメチル化への感受性が要因ではないかと考えられています。

2.4 デザインと構築の簡便性

CRISPR/Cas9はデザインやその使用が簡便です。標的部位ごとに必要な作業は、「20塩基の標的配列を含むsgRNAをプラスミドに組込むこと」のみです。プラスミド構築は簡単かつ単純であるため、複数の標的遺伝子を扱うことも容易です。実際のゲノム編集実験では、sgRNAはCas9ヌクレアーゼと同時に導入します。ダブルニッキング法やRFN法では、1対のsgRNAが協調して機能するようデザインする必要があるものの、sgRNAデザインや構築は前述した内容と同様です。第一次世代のCRISPR/Cas9では標的デザインはほぼいつでも成功するとの評判でしたが、短縮sgRNA、ダブルニッキング法、またはRFN法ではこの限りではありません。論文報告に準じてデザインした場合であっても、デザインによっては成功することもありますが、うまくいかないものもあります。また、CRISPR/Cas9はメチル化に対して感受性ではありません。

TALENを構築する場合、標的ごとに新規タンパク質を再設計する必要がありますが、TALENデザインはクローニング量が削減可能な反復併用型モジュールの利用によって合理化されてきています。前述の通り、TALENはシスチンメチル化に感受性があり、5-メチルシトシンにはN* RVDを利用する方法もあります（図3）が、標的部位がメチル化されていることを認識しておく必要があります。本課題の対処法のひとつとしてCpG部位を避けることが挙げられます。もちろん、これにより新たな制約を与えることになるものの、もし成功すればゲノム編集ツールとしてTALENがより魅力的なツールとなるでしょう。

3 CRISPRとTALENのどちらを選択するか

CRISPR/Cas9はより新しく簡便で複数遺伝子の編集が可能な技術です。TALENはその比較的制約の少ない標的部位要求性や高い特異性から未だに利用価値の高い手法であるといえます。TALENとCRISPR/Cas9の何れを使用するべきか決める際には、これら2つのシステムの違いをよく理解しておくことが重要です（表1）。実験計画におけるアプリケーションの種類も考慮する必要があります。例えば、試験的な実験の一環として遺伝子ノックアウトを迅速に行いたい場合、第一次世代のCRISPR/Cas9が妥当ではないでしょうか。比較的制約の少ないデザインでオフターゲットの少ない変異誘発を行う必要がある場合には、TALENを試すことも有用です。

特性	TALEN	CRISPR/Cas9
認識の種類	タンパク質-DNA	RNA-DNA
複数遺伝子の標的	○	◎
メチル化	感受性	感受性ではない
オフターゲット効果	確認されたオフターゲット効果が少ない	TALENやZFNに比べよりオフターゲット効果の可能性が高い

表1　TALENとCRISPRの比較

参考文献

- Bogdanove & Voytas (2011). TAL Effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843.
- Fu, *et al.* (2013). High-frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR/Cas nucleases in human cells. *Nature Biotechnology* 31, 822.
- Fu, *et al.* (2014). Improving CRISPR/Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnology* 32, 279.
- Li, *et al.* (2013). Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR/Cas system. *Nat. Biotechnol.* 31, 681.
- Jinek, *et al.* (2012). A programmable dual-RNA?guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816.
- Kuscu, *et al.* (2014). Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nature Biotechnology*.
- Mali, *et al.* (2013). Cas9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnology* 31, 833.
- Park, *et al.* (2014). Targeted inversion and reversion of the blood coagulation factor 8 gene in human iPS cells using TALENs. *Proc. Natl. Acad. Scie. U.S.A.*
- Ran, *et al.* (2013). Double Nicking by RNA-Guided CRISPR/Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell* 154, 1380.
- Shen, *et al.* (2014). Efficient genome modification by CCRISPR/Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature Methods* 11, 399.
- Tsai, *et al.* (2014). Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing van der Oost, *et al.* (2013). New Tool for Genome Surgery. *Science* 339, 768.
- Wang, *et al.* (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 343, 80.
- Yang, *et al.* (2013). One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas- mediated genome engineering. *Cell* 154, 1370.

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the GeneCopoeia, Inc. for providing CRISPR and TALEN information presented here.

ゲノム編集技術によるノックアウトとRNAi技術によるノックダウンの比較

CRISPR/Cas9やTALEN技術とshRNAやsiRNAの違い

WEBへどうぞ
記事ID：15517

GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

近年、CRISPR/Cas9やTALENを利用して遺伝子を標的し、永久的変化を起こすゲノム編集技術が目覚ましく進歩し、分子遺伝学を一変させています。実験計画において、これらの新規技術と、より確立された技術である短鎖ヘアピンRNA（shRNA）や短鎖干渉RNA（siRNA）を介してノックダウンを行うRNA干渉（RNAi）技術から、いずれの手法を利用するか選択できるようになりました。本稿では、遺伝子機能断絶におけるこれら2種類の手法の違いと、一方の技術がより適していると思われる状況について探究します。

1 RNAiを介した遺伝子サイレンシング

高等真核生物において対象遺伝子産物を細胞から枯渇させる場合、RNAiを介するノックダウンは一般的な手法です。しかし、通常、RNAiでは遺伝子発現を完全に遮断することはできません。一般に、短鎖（およそ20～25塩基）二本鎖RNA分子はヘアピン形状の前駆体（shRNA）から産生させるか、細胞外より導入（siRNAオリゴ）します。shRNAやsiRNAが細胞内に導入されると、Dicerによるプロセシングを経て、一本鎖RNAが標的mRNAと塩基対を形成します（Ketting, 2013）。生物種に応じて、アルゴノート（Argonaute）タンパク質を通じたmRNA崩壊、または翻訳阻害によりRNAi介在性遺伝子サイレンシングが生じます（図1）。その結果として、遺伝子コードを変化させることなく遺伝子発現の転写後下方制御が生じます（Mittal, 2004）。機能をもつRNAやタンパク質の一部は残り、低レベルで翻訳されるため、RNAi技術を用いた遺伝子機能抑制は「ノックダウン」と表現されます。すなわち、遺伝子機能は低減するものの完全に除去されることはありません。

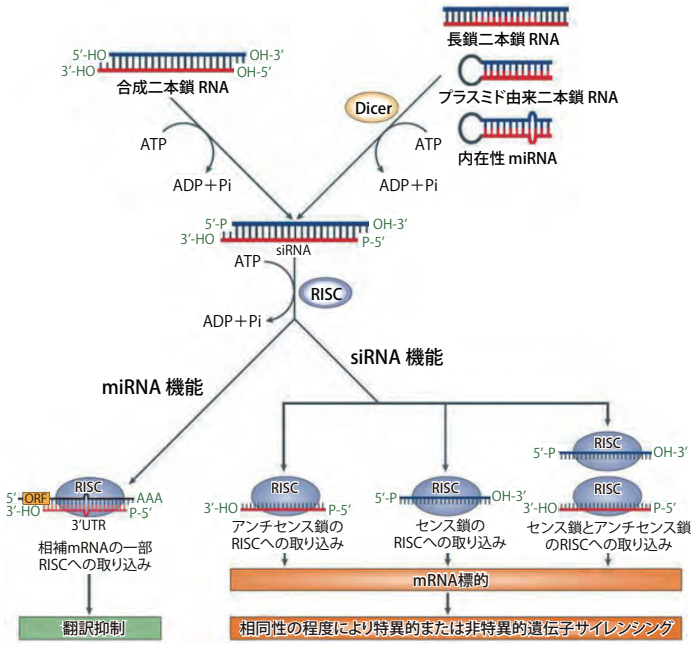


図1　RNAi経路の一般的模式。Mittel（2004）より引用

2 ゲノム編集を利用した遺伝子ノックアウト

一方、ゲノム編集では遺伝子コードを変更し、通常「ノックアウト」を誘導するか、または遺伝子機能を完全除去します。この過程では、まず染色体上にDNA二本鎖切断を生じます（Bogdanove & Voytas, 2011）。近年、TALENおよびCRISPR/Cas9の2種類のゲノム編集ツールが開発されています（Bogdanove & Voytas, 2011; Jinek, *et al.*, 2012; Shalem, *et al.*, 2014; Wang, *et al.*, 2014）。これらのいずれのツールも、植物病変形成（TALEN）、あるいは挿入変異原性からのゲノム防御（CRISPR/Cas9）といった細菌システムを利用したものです。TALENはFok Ⅰヌクレアーゼに融合した部位特異的DNA結合タンパク質からなるキメラタンパク質です。一方、CRISPR/Cas9は、部位特異的な20塩基を含む単鎖ガイドRNA（sgRNA、gRNA）を利用してCas9ヌクレアーゼをその標的部位に誘導します。TALENとCRISPR/Cas9のいずれにおいても、ヌクレアーゼが標的DNAの二本鎖を切断します。この切断を修復しなく

ては細胞死となる可能性があるため、真核細胞では主に2種類の機序で修復応答します（図2）。一つは非相同性末端結合（NHEJ）であり、染色体上の2つの遊離末端を再度結合させます。しかし、NHEJは誤りを起こし、しばしば遺伝子の破壊（ノックアウト）につながる短い挿入や欠失を生じます。二つ目は相同組換え（HR、HDR）による二本鎖切断修復であり、遺伝子ノックアウトを行う上でさらなる選択肢となり得ます。挿入や欠失、または一塩基置換などのアプリケーションが考えられます。

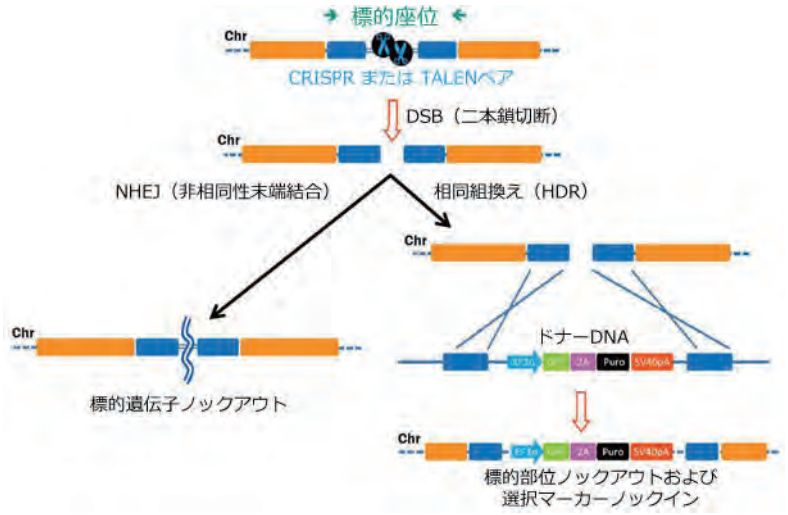


図2　ゲノム編集ツールにより誘導されたDSB（DNA二本鎖切断）の修復経路
左：非相同性末端結合
右：ドナー鋳型存在下における相同組換え（HDR）

3 RNAi技術とゲノム編集技術の比較

それでは、RNAi介在型ノックダウンとゲノム編集介在型ノックアウトではどちらの手法がよいのでしょうか。これは実験目的次第ともいえます（表1）。実際、ゲノム編集を「ノックダウン」と呼ぶなど、これらの2種類の方略を混同しているケースもまだあり、これはゲノム編集が可能となるまで幾年にもわたり、高等真核生物における遺伝子機能切断の実用的な手法がRNAiであったことによる混乱であると推測されます。つまり、研究者は「ノックダウン」という用語に慣れ親しんでいる、ともいえます。

表1　RNAi干渉とゲノム編集手法の比較

手法	ノックダウン	ノックアウト	遺伝的コード変更	発現レベル変化	クローン単離の必要性
RNAi（shRNA、siRNA）	✔			✔	
ゲノム編集（TALEN、CRISPR）		✔	✔	✔	✔

基本的に、遺伝コードを変化させることが望ましくない場合には、ゲノム編集よりもRNAiによるノックダウンの方が好ましいといえます。例えば、遺伝子機能を一時的に低減させたい場合、siRNAを細胞に一過性でトランスフェクションすることができます。数継代後、siRNAは失われ、正常な遺伝子機能が回復します。あるいはshRNAをゲノムに組込み、誘導性プロモーターからこのshRNAを発現させることもできます。この場合、期待する時期または特異的組織において対象遺伝子発現を抑制し、また正常に戻すといったことを繰返し行うことができます。ゲノム編集によるノックアウトと異なり、shRNAによるノックダウンでは単一クローンを単離する必要がないため、労力がより少なくてすみます。さらに、遺伝子機能を完全に除去すると細胞傷害を起こす可能性がありますが、部分的抑制であればこの可能性が低くなります。

一方で、真の遺伝的Null対立遺伝子を構築する場合には、ゲノム編集を選択するほうがよいでしょう（Wang, *et al.*, 2013）。さらに、部分変異を導入したり既存の変異を野生型に戻したい場合や、タグを挿入したい場合には、ゲノム編集技術を利用することとなります。

参考文献

- Bogdanove & Voytas (2011). TAL Effectors: Customizable proteins for DNA targeting. *Science* 333, 1843.
- Jinek, *et al.* (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816.
- Ketting (2011). The many faces of RNAi. *Dev. Cell* 20, 148.
- Mittal (2004). Improving the efficiency of RNA interference in mammals. *Nat. Rev. Genet.* 5, 355.
- Shalem, *et al.* (2014). Genome-scale CRISPR/Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 343, 84.
- Wang, *et al.* (2013). TALEN-mediated editing of the mouse Y chromosome. *Nature Biotech.* 31, 530.
- Wang, *et al.* (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR/Cas9 system. *Science* 343, 80.

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the GeneCopoeia, Inc. for providing genome editing and RNAi information presented here.

CRISPR/Cas9レンチウイルスシステムを用いたヒト胚性腎臓細胞におけるGFPレポーターノックアウト

Applied Biological Materials社のゲノム編集ツールを用いた実験検証

WEBへどうぞ
記事ID：14909

Applied Biological Materials Inc.
メーカー略号：APB

CRISPR/Cas9システムは、高い特異性とフレキシブルなゲノム編集を可能とするRNA誘導型のエンドヌクレアーゼ技術です。Applied Biological Materials社では、特異性が高く、オフターゲット作用を最小限に抑えた効率のよい標的ゲノム編集ツールおよびサービスを提供しています。とくに、二本鎖切断（DSB）を導入するための標的配列特異的ガイドRNAコンストラクトは、ヒト、マウス、ラットの遺伝子を網羅しており、各々非ウイルスベクター、AAV ベクター、AAV粒子、レンチウイルスベクター、レンチウイルス粒子、アデノウイルス粒子の6種の形態でご提供しています。

ここでは、Applied Biological Materials社のCRISPR/Cas9システムのうち、レンチウイルス粒子フォーマットを用いてヒト胚性腎臓細胞におけるGFPレポーターのノックアウト効率を検証しました。

1 使用材料

・細胞：GFP安定発現HEK293細胞（品番：M019）

・レンチウイルス（sgRNA）：レンチU6-sgGFP（タイター：4×10^7/mℓ）

・GFP標的配列：GCACGGGCAGCTTGCCGG

・レンチウイルス（Cas9）：Lenti SFFV-Cas9-E2A-Puro（1×10^7/mℓ）（品番：K003）

・HEK293-GFP用培養培地：10% FBSと1%ペニシリン/ストレプトマイシン（品番：G255）添加Prigrow Ⅲ（WEB 記事ID：13449）

2 実験手法

ヒト胚性腎臓GFP陽性細胞を10% FBSと1% Pen/Strepを添加したPrigrow Ⅲ（WEB 記事ID：13449）を用いて培養した。細胞を12ウェルプレートの各ウェルに100,000cellsずつ播種し、ウイルスをMOI=10で適用した。sgRNAウイルスのみ、またはCas9ウイルスのみを感染させた細胞をコントロールとした。両方のウイルスを感染させた細胞ではGFPノックアウトが見られることが期待される。細胞は5% CO_2インキュベーター内で、37℃で一晩培養した。ウイルスは翌朝に洗浄除去し、細胞に新鮮培地を添加後、さらに2～3日培養した。

日本語プロトコールは136ページ、WEB 記事ID：14042
CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール　プロトコールをご用意しております。レンチウイルスのパッケージングなど、より詳細なプロトコールも用意しています。

3 実験結果

3～4日後、大幅なGFP発現の減少が見られた。トランスダクションから6～7日後、90%以上の細胞においてGFP発現が完全に消失した。以上はFACSおよび蛍光顕微鏡により観察できた。

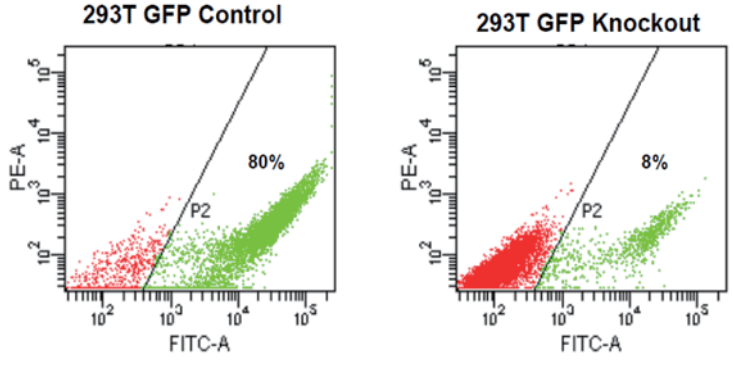


図1　GFP発現量変化のFACS分析
GFPを安定発現する293T細胞にLenti EF1-Cas9およびLenti U6-sgGFPをMOI=10でトランスダクションした。トランスダクションから7日後にFACS分析を行った。CRISPR/Cas9システムを利用することでGFPレポーター遺伝子を良好にノックアウトすることができた。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

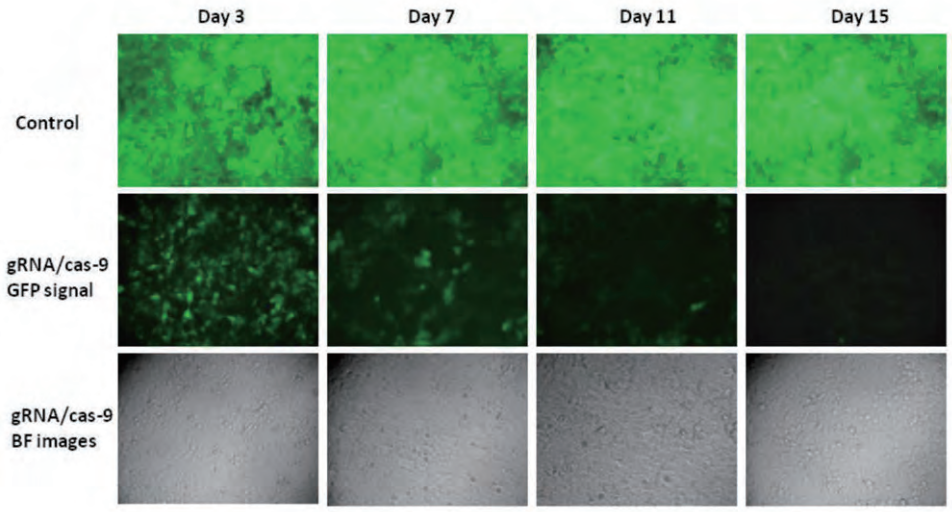


図2　GFP発現量変化の蛍光顕微鏡観察
GFPを発現しているHEK293T細胞にLenti U6-sgRNAとLenti EF1-Cas9をMOI=10の条件でトランスダクションした。GFPシグナルの低下を定期的に確認することができた。

4 格安ではじめられるCRISPR/Cas9実験

- Applied Biological Materials社　CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ガイドRNAコレクション
（17ページ、WEB記事ID：13443）

Human、Mouse、Rat遺伝子を標的するsgRNAをすべてデザイン済！非ウイルスベクター、AAV ベクター、AAV 粒子、レンチウイルスベクター、レンチウイルス粒子、アデノウイルス粒子の6種の形態からお好みのフォーマットをご利用頂けます。Cas9発現ベクターは、野生型SpCas9やSaCas9もしくはニッカーゼ改変型から選択し、Co-transfectionして使用します。同じ研究室内で複数の細胞を扱う場合にはこちらがおすすめです。
sgRNAとCas9を同一ベクターで発現する、All-in-Oneベクターもご用意しています。

Cosmo Bio would like to acknowledge and thank the Applied Biological Materials Inc. for providing the data that CRISPR efficiency to use the lenti-virus presented here.

CRISPR/dCas Activation システムプロトコール

WEBへどうぞ
記事ID：15330、15331

Santa Cruz Biotechnology, Inc.
メーカー略号：SCB

1 CRISPR/dCas Activationプラスミド トランスフェクションプロトコール

1.1 フェーズ1： CRISPR活性化プラスミド　一過性トランスフェクション

本プロトコールは、6ウェル細胞培養プレートの1ウェル用です。6ウェルプレート以外のプレートやディッシュを使用する場合は、サイズに応じて細胞数や試薬の量を調整してください。

・トランスフェクション24時間前に、6ウェル細胞培養プレートに、1ウェルあたり1.5×10^5～2.0×10^{5}個の細胞を、抗生物質不含の標準的な増殖培地3 mℓ 中に播種します。細胞を40～80%コンフルエントに増殖させます。最初に播種する細胞数と、24時間後の細胞密度は、トランスフェクションに使用する細胞の増殖速度に基づいて決定します。CRISPR活性化プラスミドトランスフェクションを成功させるには、状態が良く、サブコンフルエントになった細胞が必要となります。

注：最適な「プラスミドDNA：UltraCruz®トランスフェクション試薬」品番：SC-395739（115ページ、WEB記事ID：15526）の比率は、プラスミドDNA 1μgに対してUltraCruz®トランスフェクション試薬5～15 μℓの範囲で予備試験を行い、決定します。トランスフェクション試薬の量を、細胞毒性が最小限になるように最適化し、プラスミドDNA濃度を1～3 μg／ウェルの範囲で調整します。UltraCruz®トランスフェクション試薬の最適な量が10 μℓの場合は、プラスミドDNA濃度は1～3 μg/10 μℓの範囲で試験します（例：プラスミドDNA/UltraCruz®トランスフェクション試薬量：1 μg/10 μℓ、2 μg/10 μℓ、3 μg/10 μℓ）。プラスミドDNA/UltraCruz®トランスフェクション試薬複合体の適切な量（1ウェルあたり）は、トランスフェクション効率が最大となるように、予備試験を行って決定してください。

・次の溶液を調製します。

溶液A：1回のトランスフェクションにつき、プラスミドDNA 1～3 μgを、プラスミドトランスフェクション培地（品番：SC-108062）（115ページ、WEB記事ID：14683）で最終容量が150 μℓになるように希釈します。ピペッティングにより混合します。

溶液B：1回のトランスフェクションにつき、UltraCruz®トランスフェクション試薬（品番：SC-395739）（115ページ、WEB記事ID：15526）5～15 μℓを、十分な量のプラスミドトランスフェクション培地（品番：SC-108062）で最終容量が150 μℓになるように希釈します。ピペッティングにより混合します。室温で5分間静置します。

注：プラスミドトランスフェクション培地（品番：SC-108062）には抗生物質を加えないでください。

・プラスミドDNA溶液（溶液A）を、希釈したUltraCruz®トランスフェクション試薬（溶液B）に、ピペットを用いて直接滴下します。すばやくボルテックスし、室温で20分以上インキュベートします。

・トランスフェクションの前に、培地を新しい抗生物質不含の増殖培地に交換します。プラスミドDNA/UltraCruz®トランスフェクション試薬複合体（溶液A＋溶液B）300 μℓを、ウェルに滴下して加えます。

・プレートをゆっくりと回して混合します。

・細胞を、通常の培養条件で24～72時間インキュベートします。トランスフェクション後の最初の24時間は、培地を交換する必要はありません。トランスフェクション24～72時間後に、必要に応じて培地を足すか、交換します。

・CRISPR活性化プラスミドをトランスフェクションした細胞を用いて、トランスフェクション48～72時間後にアッセイを行います。

1.2 フェーズ2： 細胞アッセイ

・タンパク質解析

細胞溶解の3日前に、培地を標準増殖培地に交換します。接着細胞を溶解する場合は、培地を吸引した後、細胞をPBSで洗浄し、掻き取ってから低速で遠心して細胞をペレットにします。浮遊細胞の場合は、培養細胞を遠心チューブに移し、低速で遠心して細胞をペレットにします。PBSで1回洗浄し、再度遠心します。100%コンフルエントのHEK 293細胞やHeLa細胞を使用する場合は、RIPA溶解バッファーシステム（品番：SC-24948、115ページ）（WEB 記事ID：14132）100µℓ をペレットに加えます。それ以外の細胞株や密度の異なる細胞を使用する場合は、RIPA溶解バッファーシステムの量を実験により決定してください。細胞を超音波処理、または他の方法で破砕します。サンプルを氷上で10分間インキュベートした後にボルテックスし、再度氷上で10分間インキュベートします。細胞ライセートを4℃、10,000 rpmで20分間遠心します。BCAタンパク質アッセイキット（品番：SC-202389）を使用して、タンパク質濃度を測定します。

・RT-PCR解析用のRNAの抽出

下記文献の手法を用いるか、市販のRNA抽出キットを使用します。

P. Chomczynski and N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159)

参考文献
1. PMID: 24157548
2. PMID: 23287718

2 CRISPR/dCas Activation レンチウイルス粒子　トランスダクションプロトコール

2.1 レンチウイルス粒子　トランスダクション

本プロトコールは、6ウェル細胞培養プレートの1ウェル用です。6ウェルプレート以外のプレートやディッシュを使用する場合は、サイズに応じて細胞数や試薬の量を調整してください。

■ 1日目

トランスフェクション24時間前に、6ウェル細胞培養プレートに、1ウェルあたり1.5×10^5～2.5×10^{5}個の細胞を標準増殖培地 3 mℓ 中に播種します（培地に血清や抗生物質が含まれていてもかまいません）。細胞を40～80%コンフルエントに増殖させます。最初に播種する細胞数と、24時間後の細胞密度は、トランスダクションに使用する細胞の増殖速度に基づいて決定します。レンチウイルス粒子を用いたトランスダクションを成功させるには、状態が良く、サブコンフルエントになった細胞が必要となります。

■ 2日目

完全培地にPolybrene®（品番：SC-134220）を加え、終濃度 5 µg/mℓになるように調製します。プレートのウェルから培地を除去し、Polybrene®を添加した培地 3 mℓ／ウェル（6ウェルプレートの場合）に交換します。

注：Polybrene®は、電荷の相互作用を中和し、偽ウイルスカプシドと細胞膜を結合しやすくするポリカチオンです。Polybrene®の最適濃度は、細胞の種類によって異なるため、実験により決定する必要がある場合があります（通常は2～10 µg/mℓの範囲内）。Polybrene®添加培地で長時間（12時間以上）培養すると、細胞によっては毒性を示すことがあります。

レンチウイルス粒子を室温で解凍し、使用前に穏やかに混合します。培地にレンチウイルス粒子を添加し、細胞に感染させます。プレートをゆっくり回して混合し、一晩インキュベートします。使用するウイルス粒子の量は、細胞株により大幅に変わります。

注：解凍したレンチウイルス粒子は氷上で保管します。凍結融解を繰り返したり、ウイルス粒子を長時間室温に置いたりすると、ウイルスの力価が低下することがあります。

注：初めて細胞にトランスダクションを行う際には、レンチウイルス粒子の量を複数段階ご検討いただくことを推奨します。さらに、ウェルの内1つは、コントロールのレンチウイルス粒子（品番：SC-437282）を細胞にトランスダクションすることを推奨します。

■ 3日目

培地を除去し、標準培地（Polybrene®不含）3 mℓに交換します。細胞を一晩インキュベートします。

4日目

安定的に活性化された細胞を選択するために、細胞の種類に応じて細胞を1:3から1:5で継代し、完全培地中で24～48時間インキュベートを続けます。抗生物質による選択（詳細は下記）を行う間、細胞をサブコンフルエントな状態で維持する必要があります。

5日目以降

ピューロマイシン二塩酸塩（品番：SC-108071）、ハイグロマイシンB（品番：SC-29067）、ブラストサイジンS硫酸塩（品番：SC-495389）（全て115ページ参照）を用いて、安定的に活性化された細胞を選択します。選択に用いる抗生物質は、トランスダクションされなかった細胞を死滅させるのに十分な量を使用します。通常は、ピューロマイシン：濃度2～10 μg/mℓ、ハイグロマイシンB：濃度200～500 μg/mℓ、ブラストサイジンS硫酸塩：濃度1～20 μg/mℓで十分ですが、使用する全ての細胞株で、選択に用いる抗生物質の容量検討を行うことを推奨します。耐性細胞を同定するまで、3～4日ごとに、選択に使用する抗生物質を含む新しい培地に交換します。数種類の細胞を選択して拡大培養し、標的遺伝子が安定的に活性化されているかを試験します。

注：選択によって得られた抗生物質耐性細胞は、ゲノムにCRISPR/dCas Activationコンストラクトがランダムに挿入されているため、標的遺伝子の活性化レベルにばらつきがある可能性があります。

注：ウェスタンブロットによるタンパク質発現解析には、次の方法で細胞ライセートを調製します。
細胞を溶解する3日前に、培地を標準増殖培地（選択用抗生物質不含）に交換します。接着細胞を溶解する場合は、培地を吸引した後、細胞をPBSで洗浄し、掻き取ってから低速で遠心して細胞をペレットにします。浮遊細胞の場合は、培養細胞を遠心チューブに移し、低速で遠心して細胞をペレットにします。PBSで1回洗浄し、再度遠心します。100%コンフルエントのHEK 293細胞やHeLa細胞を使用する場合は、RIPA溶解バッファーシステム（品番：SC-24948）（WEB 記事ID：14132）100 μℓ をペレットに加えます。それ以外の細胞株や密度の異なる細胞を使用する場合は、RIPA溶解バッファーシステムの量を実験により決定してください。細胞を超音波処理、または他の方法で破砕します。サンプルを氷上で10分間インキュベートした後にボルテックスし、再度氷上で10分間インキュベートします。4℃で20分間高速で遠心し、ライセートをクリアにします。BCAタンパク質アッセイキット（品番：SC-202389）を使用して、タンパク質濃度を測定します。

注：RT-PCRによる遺伝子発現解析には、下記文献の手法を用いてRNAを抽出するか、市販のRNA抽出キットを使用します。

P. Chomczynski and N. Sacchi (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159)

バイオセーフティー

レンチウイルス粒子は、標準的なバイオセーフティーレベル2の組織培養設備でお取り扱いいただけます（また、他の感染性試薬と同じレベルの慎重さで取り扱ってください）。レンチウイルス粒子は複製能力がなく、トランスダクションによりコンストラクトが標的細胞のゲノムDNAに挿入された後、自己不活性化するように設計されています。

＊レンチウイルス粒子は、2004年2月19日に施行されました「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」（通称カルタヘナ法）の使用規制対象品です。ご使用に際しては、規制に則し、適切にお取扱いください。

CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール　プロトコール

WEBへどうぞ
記事ID:14042

abm®
Applied Biological Materials Inc.
メーカー略号：APB

1 プラスミド増幅

Applied Biological Materials（APB）社では、通常、プラスミドDNAを10 mM Trisに入れてご提供しており標準的なDH5α *E.coli*株に直接形質転換することを想定しています。APB社より入手した何れのプラスミドを増幅する場合も、DH5αコンピテントセルに形質転換し、単一コロニーを拾って一般的なプラスミドミニプレップを行います（タンパク質発現用*E.coli*株はプラスミド抽出や精製に向かない場合があるため、プラスミド増幅への使用はお奨めしません）。プラスミドの抗生物質選択を確認してください。コードされている耐性遺伝子は通常、アンピシリン、カナマイシンまたはスペクチノマイシンですが、テトラサイクリンやクロラムフェニコールをもつ場合もあります。推奨抗生物質濃度は以下の表をご参照ください。APB社のpLentiベクターは全て高コピー数プラスミドです。

表1　推奨抗生物質濃度表

KanR	50 μg/mℓカナマイシン	TetR	12.5 μg/mℓテトラサイクリン
AmpR	100 μg/mℓカルベニシリン/アンピシリン	CamR	50 μg/mℓクロラムフェニコール
SpecR	50 μg/mℓスペクチノマイシン		

A　形質転換

1A.1　氷水上で、ProClone™ DH5α Competent Cells (Applied Biological Materials社、品番：E003)を融解し、形質転換反応ごとに50 μℓ ずつ分注する。細胞が融解した後、チューブを優しく指でたたき、混合する。

1A.2　1 μℓ のプラスミドDNA（10 ng/μℓ）を50 μℓ のコンピテントセルに添加する。

1A.3　ピペットの先端で混ぜて混合する。細胞が損傷しないように、上下にピペッティングしないよう注意する。

1A.4　DNAと細胞混合液を氷上で30分間静置する。

1A.5　混合液を42℃のウォーターバスで正確に45秒間熱処理する。

1A.6　混合液を直ちに氷上に戻して2分間静置し、冷却する。その後、滅菌済/抗生物質無添加のLB培地150 μℓ を添加する。

1A.7　37℃の震盪培養器（240 rpm）で1時間培養し、細胞を回復させる。同時に、プレートを37℃の培養器で温めておく。

1A.8　細胞全量を適切な抗生物質（推奨抗生物質濃度表を参照）を含むLB寒天培地に撒き、寒天側を下にして37℃で10分間培養する。

1A.9　プレートを反転させ、寒天側を上に向けて37℃で一晩（約16時間）培養してコロニー形成を促す。コロニーが多すぎる場合、100 μℓ のLBプールより1 μℓ の細胞をとり、新鮮な抗生物質入りLB寒天培地に播種する。

1A.10　翌日、プラスミドミニプレップ後、制限酵素切断を行ってクローンをスクリーニングする。

B　プラスミド調製（ミニプレップ）

1B.1　各プレートより2コロニーを選択し、3～4 mℓ の抗生物質入りLB培地にそれぞれ播種する。

1B.2　培養液を一晩（16～18時間）37℃におき、240 rpmに設定した震盪培養器で培養する。

1B.3　Column-Pure Plasmid Miniprep Kit（Applied Biological Materials社、品番：D504）などを使用して各培養液のミニプレップを行い、溶出バッファー40 μℓ で溶出する。

C　プラスミドの確認（制限酵素切断）

1C.1　ミニプレップDNA（～300 ng）5 μℓ を、KpnI（Applied Biological Materials社、品番：E054）を用いて制限酵素切断し、確認する。

ミニプレップ DNA	5 μℓ
0X Universal Restriction Enzyme Reaction Buffer（Applied Biological Materials社、品番：E204）	2 μℓ
KpnI（Applied Biological Materials社、品番：E054）	0.25 μℓ
ddH_2O	17.75 μℓ
Total	20 μℓ

1C.2　制限酵素反応溶液を37℃で30分間培養する。

1C.3　制限酵素反応後、1%アガロースゲルに電気泳動し、バンドの大きさを確認する。

1C.4　pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-Puro Vectorでは、5.5と6.3kbの2本のバンドがみられる。pLenti-U6-sgRNA-PGK-Neo Vectorでは、7.8kbに1本のバンドがみられる。

1C.5　正しいクローンが得られたら、ミディプレップやマキシプレップで形質転換やレンチウイルスパッケージングに十分量のDNAを調製する（Cas9およびsgRNAの送達法に応じる）。AAVベクターの場合、プラスミドマップを参照し適切な制限酵素を選択する。

2 トランスフェクション

2.1　トランスフェクションの18～24時間前に、1～3×10^5の接着細胞（通常使用している血清と抗生物質入りの適切な培養培地2 mlに懸濁）を6ウェルプレートに播種する。細胞を37℃のCO_2インキュベーターで50～70%コンフルエントになるまで培養する。

2.2　翌日、トランスフェクション反応のセットアップを行う。各サンプルについて、DNAfectin™ 2100 Transfection Reagent（Applied Biological Materials社、品番：G2100）とDNA複合体を以下に準じて調製する。
a）各2 µgのベクター（sgRNAベクターとCas9ベクターあるいはAll-in-Oneベクター）を100 µl の無血清、抗生物質無添加の培地に添加する。
b）DNAfectin™ 2100は使用前にボルテックスミキサーでよく混合する。DNAfectin™ 2100 12 µl を無血清、抗生物質無添加の培地に添加する。
c）ステップa）のDNA溶液と、ステップb）のDNAfectin™ 2100溶液を混合し、穏やかに混合して均一に分散させる。
d）室温で20分間静置し、DNAfectin™ 2100＝DNA複合体を形成させる。複合体は室温で3～5時間安定である。

2.3　無血清、抗生物質無添加の培地800 µl をDNAfectin™ 2100＝DNA複合体に添加する。

2.4　培養細胞より生長培地を吸引除去する。

2.5　ウェルごとにDNAfectin™ 2100＝DNA複合体1mlを細胞に滴下させる。

2.6　細胞をさらに4～6時間、37℃、5% CO_2で培養する。

2.7　培養後、10% FBS 100 µl を直接各ウェルに添加し、37℃、5% CO_2で18～24時間培養する。

2.8　トランスフェクションから24時間後に1：10（または、より高い希釈率）で細胞を新鮮培地に継代し、選択試薬を添加する前に1～2日間細胞を観察する。

注：このトランスフェクションを行う際には、トランスフェクションが成功したかどうかを確認するため、適切なGFPコントロールベクターを並行して行うことを推奨しています。

3 レンチウイルスベクターのパッケージングとトランスダクション

ほ乳類細胞へのレンチウイルストランスダクション効率は実験条件実験条件によって大きな差が生じます。この要因として、ウイルス濃度、ウイルスへの曝露時間、および感染に使用したプレート等の生長領域などがあげられます。

1日目

ウイルス感染時に20～25%の細胞密度が得られるよう、ウイルス感染の24時間前に細胞を10%密度で播種。細胞を37℃、5% CO_2で一晩培養する。

例：6ウェルプレートはおよそ1×10^6 cells/wellでコンフルエントになる。したがって、細胞を1×10^5 cells/wellで播種し、感染時に20～30%の細胞密度になるようにする。

注：トランスダクションに使用するプレートは6ウェルでなくともよいが、ウェル／プレートの生長面積に応じて細胞数を調整する。

2日目

トランスダクション効率が最大となるよう、使用するウイルスの感染多重度（MOI；ウイルス粒子数/細胞）を最適化する。通常、レンチウイルスは1、5、10、および50のMOIで検討される。

例：ウイルス感染を行う日の細胞密度は20%とする。ウイルスタイターが10^7 IU/mlの場合、目的のMOIが得られるよう以下のウイルス量を1×10^5細胞に添加する。

ウイルス量	MOI
10 µl	1
50 µl	5*
100 µl	10
500 µl	50

*ほとんどの細胞株では、MOI＝5の条件で良好なトランスダクション効率が得られる。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー/スクリーニング
技術情報
ライブラリー/スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

$$MOI = \frac{\text{ウイルス量} \times \text{ウイルスタイター}}{\text{感染時の細胞数 / ウェル}} = \frac{10\mu\ell \times 10{,}000\ IU/m\ell}{100{,}000\ 細胞} = 1$$

したがって、MOI=1で感染させるためには、細胞密度20%の細胞に感染させるとして10^7 IU/mℓのウイルスを10 μℓ使用する。標的細胞のトランスダクション効率が低い場合には、ViralPlus Transduction Enhancer（Applied Biological Materials社、品番：G698）を1：100比率（または、特定のトランスダクションに最適化した希釈率）で添加する。感染細胞は、37℃、5% CO_2で一晩培養し、薬物選択ステップへ進む。

注：スクリーニングを検証の初期手法として使用し、1標的遺伝子に対して複数のsgRNAが存在する場合、各sgRNAを異なるウェルで感染させることを推奨する。
注：プレート中の1ウェルにはポジティブコントロールとしてGFPコントロールウイルス(Applied Biological Materials社、品番：LVP690など)を使用し、1ウェルはレンチウイルス感染を行わず、セレクションコントロールとする。

3日目

細胞をさらに24～48時間、37℃、5% CO_2で培養し、回復させる。Applied Biological Materials社のpLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-GFP vectorを使用している場合は、この段階で感染シグナルを確認する。

4 構築済みアデノウイルスの増幅

Applied Biological Materials社の構築済みアデノウイルスはシードストックとしてのみご提供しています。そのため、*in vitro*トランスダクション等を行う前に増幅して頂く必要があります。*in vivo*注入用には大容量でのウイルス産生と精製が必要となります。

重要情報

アデノウイルスシードストックは可能であれば1つずつ個別の滅菌ベンチや培養装置を使用して増幅することを推奨します。もし、これらの機器の保有台数が少なく各アデノウイルスごとに使い分けることが難しい場合には、各ウイルスを経時的に増殖し、使用した後に30分間のUV照射を行います。2種類以上のアデノウイルスを同時に使用することが相互汚染の主な原因となることから、ウイルスごとに異なるトリプシンや培地容器のご利用をお奨めします。

増幅プロトコール

4.1　組換え型アデノウイルスを入手後、2～3回分に分注して1つを293細胞内での増幅に使用する。他の分注品はシードストックとして−70℃で保存する。

4.2　アデノウイルスを60～70%の細胞密度のHEK 293細胞で増幅する。60㎜ディッシュでは70 μℓのアデノウイルス、100㎜ディッシュでは200 μℓのアデノウイルスを使用して細胞感染を行う。

4.3　95%以上の293細胞がディッシュより剥離した際、細胞と培地の両方を大きめのコニカルチューブに回収する。

4.4　回収した溶液を−70℃の冷凍庫かドライアイス／エタノール内で凍結後、37℃のウォーターバスで溶解する。この凍結溶解を3回繰り返す。

4.5　3,000 rpmで10分間、室温で遠心し、細胞片を沈渣させる。

4.6　上清を新しいチューブに移す。すぐに使用する場合（2～3週間程度）は4℃で保存し、長期保存する場合はグリセロールを最終濃度10%となるように加え−70℃で凍結する（1～2年程度安定）。

4.7　**トランスダクション手順：**
ウイルスを*in vitro*トランスダクションに使用する場合、ほとんどのヒト細胞株においてウイルス上清がほぼ100%の導入効率を示すため、ウイルス上清を2回繰り返してCsCl精製する必要はない。*in vivo*実験の場合には、欠損粒子、細胞片および残余する培地成分により顕著な免疫応答誘導が生ずることがあるため、これらを除去するためにCsCl精製が必須となる。さらに、CsCl精製により*in vivo*注入に適したレベルのウイルス濃度に濃縮することができる。

① トランスダクション前日に、標的細胞を70%の細胞密度となるよう6ウェルプレートまたは10 ㎝ディッシュに播種する。
② 培養培地を吸引除去し、ウイルス培養上清（6ウェルプレートには1㎖、10 ㎝ディッシュには4～5 ㎖）を加えて細胞を覆い、培養器内で1時間培養する。
③ ウイルス含有培地を除去し新しい完全培地と交換する。
④ ゲノム編集はトランスダクションから48～72時間後にウェスタンブロット、配列決定またはSurveyorアッセイなどにより評価することができる。

5 死滅曲線

安定細胞株構築には、安定してトランスフェクションあるいはトランスダクションされた細胞を選択することが重要です。発現システムが薬物耐性遺伝子をもつ場合、培養細胞に抗生物質を添加すると安定してトランスフェクション/トランスダクションされた細胞のみが生存できます。薬物死滅曲線を作成することで、トランスフェクション/トランスダクションしていない細胞を死滅させるために最低限必要な選択薬物量を決定することができます。

注：使用するベクターの薬剤耐性マーカーを事前に確認する。Applied Biological Materials社のAll-in-Oneシステム（pLenti-U6-sgRNA-SFFV- Cas9-2A-Puro Vector）では、ピューロマイシン（Applied Biological Materials社、品番：G264）、デュアルベクターシステム（pLenti-U6-sgRNA- PGK-Neo Vector）では、ネオマイシン/ジェネテシン（Applied Biological Materials社、品番：G418）が使用されています。

■ 1日目

6ウェルプレートに親細胞を低密度で播種（2×10^{5}cells/well 程度）し、推奨培養条件で培養する。

■ 2日目

ピューロマイシン（Applied Biological Materials社、品番： G264）0、0.2、0.4、0.6、0.8および1 μg/mℓのように、抗生物質の濃度を振って添加した培地を使用する。

注：細胞株によって、高濃度の抗生物質を必要とする場合もあるため、細胞株ごとにセレクションに最適な抗生物質濃度を確認する必要がある。

■ 3日目以降

2〜3日ごとに新しく調整した選択培地を細胞に添加し、顕微鏡下で細胞死を確認する。

ほとんどの細胞は1μg/mℓで死滅するが、死滅しない場合には、1、1.2、1.5、1.8 および 2 μgのように、より高濃度の抗生物質を使用する。95%以上の細胞死が確認できる抗生物質濃度を同定することが重要で、これがセレクションに使用する最低限の抗生物質濃度となる。ピューロマイシンの場合には、1〜4日で95%以上の細胞死が生じ、ネオマイシン/ジェネテシンの場合には、7〜14日で生じる。

抗生物質濃度の最適化後に、再度アッセイを行って決定した抗生物質濃度が正確であることを確認する。

注：薬剤感受性は細胞密度に非常に依存する。したがって、抗生物質を添加する際は、死滅曲線を決定したときと同程度の細胞密度を使用する。

6 薬剤選択

相同遺伝子編集をもつ細胞のモノクローナル集団を構築する場合には、薬物選択による細胞スクリーニングが非常に重要なステップで、以下の2回のスクリーニングを要します。

1） ゲノム編集がなされた細胞集団を決定する初期スクリーニング
2） 期待どおりにゲノム編集された単一細胞を単離するモノクローナルスクリーニング

以下のプロトコールは両方のスクリーニングを含んでおり、相同遺伝子編集されたクローン集団が最終産物となります。Applied Biological Materials社のAll-in-One システム（pLenti-U6-sgRNA-SFFV- Cas9-2A-Puro Vector）では、ピューロマイシン（Applied Biological Materials社、品番：G264）、デュアルベクターシステム（pLenti-U6-sgRNA- PGK-Neo Vector）では、ネオマイシン/ジェネテシン（Applied Biological Materials社、品番：G418）耐性を付与します。

6.1　トランスダクションから48〜72時間後、死滅曲線ステップで決定した濃度で抗生物質を添加する。

6.2　細胞を抗生物質存在下で培養（ピューロマイシンの場合は追加で2〜3日、ネオマイシン/ジェネテシンは追加で7〜14日）する。トランスダクションされていない細胞は死滅し、トランスダクションされたコロニーは選択薬物に対する耐性遺伝子をもつため生存する。

6.3　この段階でゲノム編集が成功したかどうかを確認する方法としては、CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）などがあります。本製品は、シンプルなPCRを利用したアッセイであり、どのクローンプールがそれ以降の単離とノックアウトのキャラクタライズに適しているのか知ることができる。

6.4　単一細胞希釈を用いてモノクローナル選択を調製する。この段階で選択された単一クローンにおける遺伝子編集は、サンガーシーケンシングで確認することもできる（概要はⅦページ参照）。

6.5　CRISPR Genomic Cleavage Detection Kitアッセイの結果をもとに、さらなる単一クローン単離のためのクローンプールを選択する。以下のステップは最初のクローンプールから2つの希釈系列を用いて単一細胞を単離する方法である。

6.6　培養培地（死滅曲線で決定した濃度の薬剤を含む）100 µℓ を96ウェルプレートに添加する。

6.7　初期の細胞懸濁液200 µℓ をウェルA1に添加する（図1）。

注：クローンプールの最初の細胞密度は20,000 cells/mℓであり、これはA1ウェル内の4,000細胞に相当する。１回目と２回目の段階希釈後、ウェルA12はおよそ1細胞/ウェルになっている。

6.8　1回目の段階希釈系列を作製する（図1、赤矢印）。垂直方向に、A1ウェルから100 µℓ をB1ウェルに添加して1：2希釈系列を作製する。よく混合し、ウェルB1の100 µℓ をC1に添加、最後のウェル（H1）までくりかえす。最後のウェルから100 µℓ を除去し、全てのウェルを一定量（100 µℓ）とする。

6.9　カラム1の各ウェルに100 µℓ の培地を添加し、各ウェルの全量を200 µℓ とする。

6.10　続けて、2回目の希釈系列を作製する（図1、青矢印）。マルチチャネルピペットでカラム1の細胞懸濁液100 µℓ をカラム2に添加、同じ操作をカラム12まで続けて行う。各ウェルより100 µℓ ずつ除去して、各ウェルの全量を一定量（100 µℓ）とする。

6.11　このプレートの各ウェルに100 µℓ の新鮮培地を添加し、各ウェルの全量を200 µℓ とする。37℃、5% CO_2で培養する。

6.12　クローンが確認できるまで2週間程度要する。

6.13　各単一クローンを単層形成まで生育し、細胞を24ウェルレートへ継代、さらに6穴プレートで増殖させる。この増殖クローンそれぞれから単離したゲノムDNAを、CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）やサンガーシークケシングによるゲノム編集検証実験に使用する。

注：検証実験を行っている間は、万が一のために各クローンを培地中で保存しておくことを推奨。

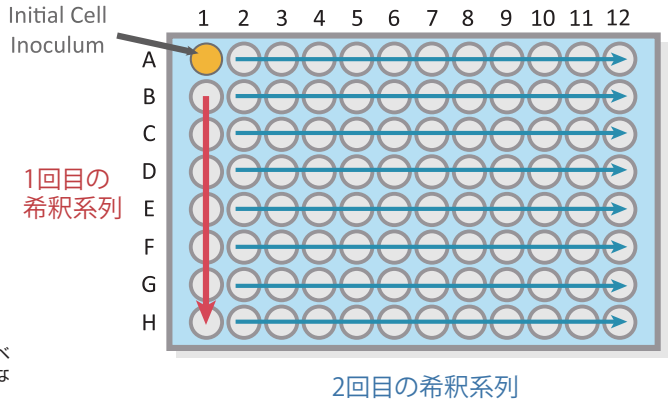


図1　モノクローナル単離に向けた１番目と２番目の希釈系列の模式図
１番目と２番目の希釈系列が完了すると、右側のウェルは単一細胞レベルまで希釈されているため、単一細胞クローンが入っていることになる。

7 CRISPR/Cas9によるゲノム編集効果の検証

1 gDNA PCRプライマーデザイン

以下のPCRプライマーデザインプロトコールは、CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）やサンガーシークケシングによるゲノム編集検証実験を同一のPCR産物で行うことを想定しています。

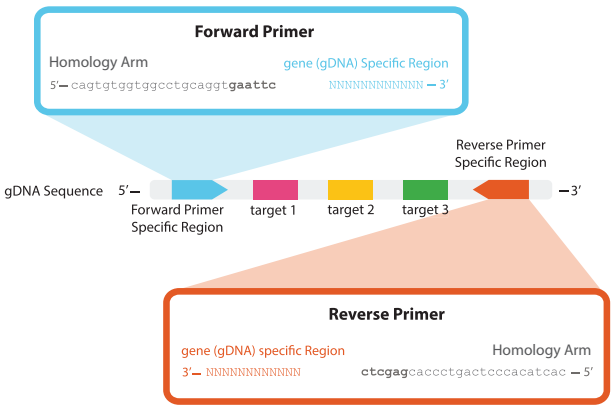


図2　gDNA PCRプライマーデザインの概略図
プライマーはgDNA内でお互いからおよそ1kb離れた位置、かつ、sgRNA切断部位がその中心から外れるよう配置する。CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）を用いる場合、標的部位から非対称な距離にプライマーを設計した方が２つの異なる産物のバンドを同定しやすい。フォワードプライマー、リバースプライマーともにクローニングベクターに相補的な20塩基のホモロジーアームが含まれる必要がある。
プライマーデザインと配列を示すため、ここではEcoRIとXhoIで開環したLenti-III-HA Expression Vector（Applied Biological Materials社、品番：LV022）を例示する。

Forward Primer 5’ - cagtgtggtggcctgcaggtgaattcgaattatccgaatggc -3’
Reverse Primer 5’ - gtgatgtgggagtcagggtgctcgagattagctattgcgagatc -3’
青色は共通のホモロジーアーム、赤色は遺伝子特異的領域を示す。

2 CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit　プロトコール

CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）は、未編集DNAと編集済DNA間のDNAミスマッチを利用したアッセイです。検出酵素によりミスマッチDNAを切断し、これにより2つの異なるゲル産物を生ずることでゲノム編集を確認することができます（図3）。

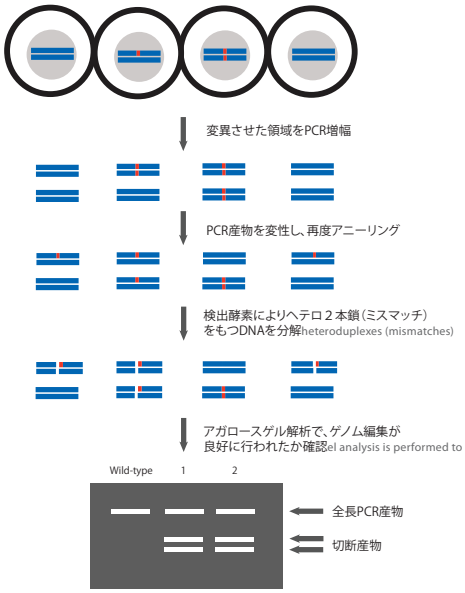


図3　CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）を用いたゲノム編集効率の検出

表2　CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）構成

製品構成	サイズ	Cat. No./Part No.
Cell Lysis Buffer	1.25 mℓ	G932-1
Protein Degrader	50 µℓ	G932-2
Detection Enzyme	13 µℓ	G932-3
10X Detection Buffer	50 µℓ	G932-4
Control Primer and Template	10 µℓ	G932-5
2X PCR Bestaq™ MasterMix	1 mℓ	G464
Nuclease-free H_2O	1 mℓ	RT-0

A　細胞溶解

7A.1　5×10^4から2×10^6細胞を含む細胞沈殿を準備する。

7A.2　Cell Lysis Buffer 50 µℓ に2 µℓ の Protein Degraderを添加する。

7A.3　Protein Degrader/Cell Lysis Buffer混合溶液 50 µℓ を細胞沈殿に添加して再懸濁する。

7A.4　チューブを68℃で15分間培養し、95℃で10分間熱処理する。

7A.5　細胞溶解後、直ちにPCR増幅を行う。または、可溶化物を−20℃で保存する。

B　PCR増幅

7B.1　PCR増幅の準備を行う。交差汚染を防ぐため、DNAサンプル調製、反応セットアップ、およびPCR反応は異なる場所で実施する。切断部位が増幅産物の中央に来ないようプライマーのデザインに注意し、切断反応後に2つの区別可能なバンドが同定できるようにする（セクション7-1のgDNA PCRプライマーデザイン参照）。GC含量が高い反応には、5-10% DMSOを添加する。

7B.2　2X PCR Bestaq™ MasterMix（Applied Biological Materials社、品番：G464）とプライマーをAS融解し、氷上に静置する。溶液を完全に混合する。

7B.3　氷上で滅菌PCRチューブに以下の反応溶液をセットアップする。よく混合し短時間遠心する。

表3　PCR増幅反応セットアップ例

構成要素	陽性	サンプル	陰性	最終濃度
コントロールプライマー & 鋳型	1 µℓ	—	—	1X
細胞可溶化液	—	2 µℓ	—	可変
プライマー混合溶液	—	1 µℓ	1 µℓ	200 nM
2X PCR Bestaq™ MasterMix	25 µℓ	25 µℓ	25 µℓ	1X
Nuclease-free H_2O	24 µℓ	22 µℓ	24 µℓ	—

7B.4　表4に示したPCR増幅を行う。

表4　PCR増幅サイクル条件

ステップ	温度	時間	サイクル数
酵素の活性化	95℃	10 分	1
変性	95℃	30 秒	40
アニーリング	45～72℃ （コントロールは55℃）	30 秒	
伸長	72℃	3.5 kb/min （コントロールは1分）	
最終伸長	72℃	5 分	1
保持	4℃	保持	1

7B.5　PCR産物5 µℓ を1%ゲルで泳動し、PCR増幅を確認する。期待する大きさで、顕著な非特異的増幅物のない、きれいなPCR産物のバンドが得られた場合、次のステップ（切断アッセイ）へ進む。

7B.6　切断アッセイ用に以下の反応を氷上で滅菌PCRチューブに準備する。よく混合し短時間遠心する。

表5　切断アッセイ セットアップ例

構成要素	反応容量
PCR産物	1- 6 µℓ
10X Detection Buffer	1 µℓ
Nuclease-free H_2O	up to 9.5 µℓ

7B.7　表6に示した再アニーリング反応を行う。

表6　PCR再アニーリングサイクル設定の例

ステップ	温度	時間	温度/時間
1	95℃	5 分	—
2	95～85℃	—	−2℃/秒
3	95℃	—	−0.1℃/秒
4	4℃	保持	—

C　切断産物のゲル分析

7C.1　切断産物のゲル分析用に、陽性、陰性コントロールを含む全てのサンプルにDetection Enzyme 0.5 µℓ を添加する。よく混合し、短時間遠心する。

7C.2　37℃で1時間培養する。

7C.3　サンプルをボルテックスミキサーで遠心して沈降させる。

7C.4　各サンプル 10 µℓ とDNAラダーおよびローディングダイを1～2%アガロースゲルで約30分、低電位で電気泳動する。

7C.5　ゲルをUVトランスイルミネーターで目視確認し、ゲル画像システムで写真をとる。期待される野生型バンドより下に、より短鎖の切断産物が2本見られたら遺伝子編集が生じたことが示唆される。

7C.6　ゲル解析ソフトウェアを用いて、各バンドに含まれるDNAの相対量を決定することができる。以下の数式から切断効率を算出することもできる。

切断効率 = 1−（1−切断された断片）1/2

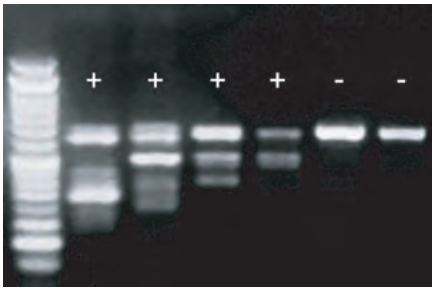


図4　CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ） 結果例
（+）：編集済み、（−）：サンブルは編集されておらず、野生型コントロールサンプルと同一

必要に応じて、CRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）で同定された陽性サンプルをサンガーシーケンシング法でさらに検証します。

8　ゲノム編集結果確認のためのシーケンシングプロトコール例

細胞プールから調整したPCR産物には、ゲノム編集済みの鋳型と未編集のものが含まれている可能性があり、PCR産物を直接サンガーシーケンシングした結果を解析するのは困難です。そのため、PCR産物はシーケンシングを行う前にベクターにクローンし、単一の鋳型に対して配列決定して結果を確認しやすくします。

A　サンガーシーケンシング用CRISPR/Cas9ゲノム調整サンプルの調製

8A.1　Lenti-III-HA Expression Vector（Applied Biological Materials社、品番：LV022）などのクローニングベク

ター 3 µg（プライマーにホモロジーアームとの互換性があればどのベクターでも使用可能）を適切な制限酵素で処理して開環する。37℃、1時間30分培養し、ベクターをゲル精製して30 µℓ 溶出する。

8A.2　開環したクローニングベクターとCRISPR Genomic Cleavage Detection Kit（品番：G932、41ページ）で陽性と同定したgDNA PCRサンプルを用いて Ligation-free cloning reaction（Applied Biological Materials社、品番：E001 またはE002）を行う。

2 µℓ	クローニングベクター
1 µℓ	各PCR産物
4 µℓ	5× Ligation-free cloning MasterMix
13 µℓ	Nuclease Free H_2O
20 µℓ	全量

4℃で30分間*培養する。

注：反応直後に形質転換した方が成功しやすいため、Ligation-free reactionはコンピテントセルへの形質転換の30分前にセットアップする。

8A.3　Ligation free クローニング反応後の形質転換

a）コンピテントセル（ProClone™ DH5α Competent Cells, Applied Biological Materials社、品番：E003など）60 µℓ をLigation-freeクローニング反応に加える。ピペットの先端で渦巻き状に混ぜて混合する。細胞を損傷する恐れがあるためピペッティングはしない。
b）4℃で30分間培養する。
c）ヒートショック　42℃、45秒間。
d）150 µℓ の滅菌済みLB培地（抗生物質を含まない）を添加し、震盪器（180rpm）で37℃、1時間培養する。
e）カナマイシン（Applied Biological Materials社、品番：G022）プレート上に細胞を播種する。
f）寒天側を下に向け（フタが上）培養器に設置して5分培養後、プレートを逆さまにして37℃で一晩培養する。

8A.4　ミニプレップ用に5クローンを選び、LB+カナマイシン（50 µg/mℓ）に接種する。ミニプレップ後、EcoRI（Applied Biological Materials社、品番：E048） と XhoI（GMbiolab社、品番：SZ090Sなど）で切断する。PCR産物の切り出しのため、適切な大きさのバンドを予測する。もし、PCR産物内にEcoRI/XhoI認識部位がある場合、より小さなバンドが複数みられる。

8A.5　成功したクローンのミニプレップ産物が同定できたら、各gDNA PCR産物由来の各5クローンを分注する。Lenti-III-HA Expression Vector（Applied Biological Materials社、品番：LV022）を使用した場合は、CMV Forward primer（5'-CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG-3'）を用いてサンガーシーケンシングを行い配列を決定する。挿入物より上流に結合する適切なシーケンシングプライマーを使用する。

B　サンガーシーケンシング結果の解析

8B.1　サンガーシーケンシング結果をraw RNA/DNA配列としてアライメントプログラムに取り込む。

8B.2　サンプル配列をsgRNA標的と参照配列に対してアラインする。

8B.3　sgRNA標的部位の挿入や欠損でフレームシフト変異を生ずるものは、早熟の停止コドンとなり遺伝子をノックアウトする。単一クローンの二対立遺伝子ノックアウトでは2種類の挿入欠損のみが見られ、いずれも観察できるはずである。ExPasy翻訳ツールなどを用いて変異配列を翻訳し、変異により早熟停止コドンが生じたかを確認する。

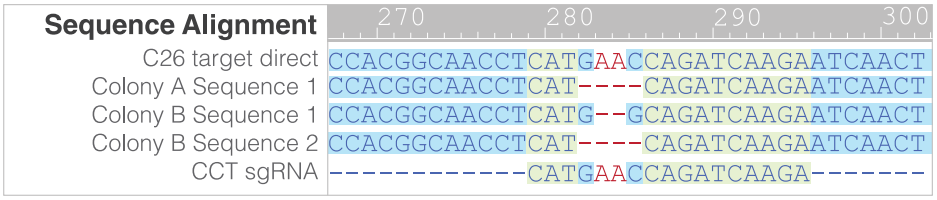


図5　編集した配列を参照配列と比較してフレームシフト変異を同定
ここでは、参照配列とsgRNA標的配列（“C26 target direct” と “CCT sgRNA”）と比較し、2種類のフレームシフト変異（4塩基と2塩基欠損）が見られた。

8B.4

a）両方の対立遺伝子にフレームシフト変異をもつ単一クローンである場合、形質転換プレートから追加でいくつかのクローンを選んでミニプレップサンプルの配列を同定する。単一gDNA PCR産物より最低10個の配列同定結果を取得する。

b）形質転換から1週間以上経過している場合は、同一のgDNA PCR産物を用いて新たにLigation-freeクローニング（プロトコール8A参照）反応を行い、スクリーニング用のコロニーをさらに取得する。

8B.5　10個のサンガーシーケンシング結果から野生型配列が見られる場合、再度単一細胞希釈を行い、単一クローンの二対立遺伝子ノックアウトを単離し薬物選択をくりかえす（プロトコール6参照）。

FAQ：CRISPR/Cas9 ゲノム編集用製品について

WEBへどうぞ
記事ID：14043

abm®
Applied Biological Materials Inc.
メーカー略号：APB

- 技術情報　CRISPR/Cas9 ゲノム編集用製品　プロトコール（136ページ、WEB 記事ID：14042）
- 商品詳細　CRISPR/Cas9 ゲノム編集ツール（17ページ、WEB 記事ID：13443）

Q1. Applied Biological Materials社で保証できるノックアウト率を教えてください。また、3種の標的何れもノックアウトできなかった場合、他の候補を提供してもらえますか？

A1. Applied Biological Materials社の経験では、デザインしたコンストラクトの90%以上が20～90%の細胞において完全なノックアウトを達成しています。感染後ピューロマイシン選択した細胞の50%以上において、ほとんどのコンストラクトから完全なノックアウトが得られています。実証例からsgRNAはshRNAやsiRNAよりかなり優秀であることが示唆されます。3コンストラクトの何れからも顕著なノックアウトが得られないというのは非常にまれな状況です。もし、何れのコンストラクトを用いても適切なノックアウトが得られない場合、異なる3種のコンストラクトを無料でデザイン致します。交換は1回のみに限ります。交換には細胞のモニターが必須条件で、Surveyorアッセイの分析証明をご提供ください。標的配列増幅用PCRプライマーを設計しT7Eで分解させます。

Q2. 本システムを長鎖ノンコーディングRNAに使用した経験はありますか？

A2. 本システムでは、長鎖ノンコーディングRNAやmiRNA、もしくは短鎖DNA断片を二本鎖sgRNAによりノックアウトすることも可能です。しかし、ノックアウト効率はタンパク質コーディング遺伝子に比べて非常に低く、～1%程度です。したがって、単一細胞クローニングが必要となります。Applied Biological Materials社では、lncRNAの最初と最後を標的とする3種のsgRNAを今後上市する計画もあります（3×2コンストラクト）。標的lncRNAのノックアウト用に3×3の組み合わせがあるため、PCRスクリーニングにより最良の組み合わせを確認します。その後、2つの最もよいsgRNAをトランスダクションした後、単一細胞クローニングします。1～5%のクローンにおいてlncRNAの完全ノックアウトが期待されます。

Q3. ノックアウトがみられるまでにどのくらいの時間が必要ですか？

A3. ピューロマイシン選択後1週間です。

Q4. 推奨する培養条件を教えてください。

A4. レンチウイルストランスダクションの標準型プロトコールに準ずるとともに、ご利用の特定細胞に対して最適化された培養条件をお確かめの上ご利用ください。

Q5. 代替品に対するsgRNAガイドラインを教えてください。

A5. Applied Biological Materials社では、セットでご購入いただいた3種のsgRNAコンストラクトのうち少なくとも1つは、トランスダクションと薬物選択後、50%以上の細胞においてフレームシフト変異による完全な遺伝子ノックアウトを示すことを保証します。遺伝子ノックアウト効率はSurveyorアッセイで迅速に確認することができ、ウェスタンブロットまたは他の機能解析により確かめることができます。非常にまれな事例ではありますが、もし顕著なノックアウトが得られない場合は、sgRNAコンストラクト3種を再設計して代替品として1回のみご提供致します。代替品提供をご希望の場合、まずSurveyorアッセイ結果をご提示頂きApplied Biological Materials社にて内容を確認致します。代替品セットは保証対象外です。もし代替品のコンストラクトも効果がない場合、おそらく原因究明は困難です。Applied Biological Materials社では、代替品のご提供は1回のみとなりますので、お問い合わせいただく前に、お客様ご自身でMOIの増大（10程度まで）、感染時間（最長72時間）およびノックアウトアッセイの前にクローンのスクリーニングを行うなど、可能な限り実験系の最適化を行っていただきますようお願い致します。

Q6. 野生型Cas9を使用する場合とニッカーゼ改変型Cas9を使用する場合では、どのような違いがありますか？ゲノム編集において、何れかの方がより優れていますか？

A6. 通常、野生型Cas9を使用して二本鎖切断を行うことで非相同末端結合（NHEJ）が生じます。これにより、数塩基欠損が生じ、フレームシフトにより標的遺伝子をノックアウトすることができます。

オフターゲット作用が憂慮される実験系では、ニッカーゼ改変型Cas9を推奨しています。ダブルニッキング法では、2種類の近接した標的部位において、各々の一本鎖切断が必要であるため、標的遺伝子に合わせてsgRNAペアをデザインします。ノックアウト効率が若干低くなる可能性がありますが、より高い特異性が得られます。APB社独自の設計アルゴリズムにより、オフターゲット作用を低減しながらも高いノックアウト効率を得ることができます。

Q7. siRNAウイルス粒子とsgRNAウイルス粒子が各々ノックダウンあるいはノックアウト効果を示すまでにどれくらい時間を要しますか？何か違いはありますか？

A7. 通常、siRNAレンチウイルスプラスミドでは、トランスフェクションから72時間程度の時間を要します。siRNAレンチウイルス粒子でも同様にトランスダクション後72時間程度必要ですが、この場合は薬物処理ステップも必要です。sgRNAレンチウイルス粒子では、ノックアウトがみられるまでにおよそ1週間かかります。sgRNAアデノウイルス粒子においても、1週間が目安になります。

Q8. ニッカーゼ改変型のCas9用にデザインされたsgRNA配列をCas9ヌクレアーゼ（野生型）に使用できますか？

A8. はい、できます。

Q9. ニッカーゼ改変型のCas9に対して1種のsgRNA配列のみを使用することもできますか？これらのsgRNAは同一のエキソンを標的としますか？または2つの異なるコード領域を標的としますか？

A9. ニッカーゼ改変型のCas9はCas9ヌクレアーゼ（野生型）の変異型です。ニッカーゼ改変型Cas9は各ガイドRNAを利用して一本鎖切断を生じます。そのため、野生型Cas9ヌクレアーゼのような二本鎖切断を引き起こすためにはお互いに非常に近接した部位を標的とする2種のガイドRNAが必要となります。

もし、3種類のsgRNA（例：3ペアのsgRNA、計6コンストラクト）を検討されている場合には、ご希望であれば異なるエキソンを標的とするsgRNAをカスタム構築することもできます。コスモ・バイオ（欄外参照）までお問合せください。1ペア（例：1ペアのsgRNA、2構築）をご注文頂いた場合、同一領域を標的して二本鎖にニックをいれる必要があるため、同一エキソン内でデザイン致します。

Q10. オフターゲットの頻度を教えてください。

A10. APB社ではゲノム上の他の部位との相同性を決定するソフトを使用してオフターゲット作用を「予測」しています。通常、このオフターゲットマッチの値が「0」である標的配列を選択しています。

Q11. もしサンガーシーケンシングの結果、ゲノム編集が二倍体または三倍体細胞において見つかった場合、ホモノックアウト細胞の構築を確認するためにはどのような結果が必要ですか？

A11. サンガーシーケンシングの場合、確認したい標的領域をPCR増幅してクローンし、複数のクローンの配列決定を行う方法が考えられます。これらのクローンより野生型配列が見られなければ、ホモノックアウト細胞と考えられます。一方、ゲノム編集済みクローンと野生型のものが混在している場合は、ヘテロ接合性ノックアウトと考えられます。

これらは、あくまでガイドラインですので、ご利用になるお客様ご自身で、お客様の実験系において適切であるか等をご判断ください。

Q12. もしSurveyor assayの結果ゲノム編集が二倍体または三倍体細胞において見つかった場合、ホモノックアウト細胞の構築を確認するためにはどのような結果が必要ですか？

A12. ノックアウトを目的としている場合、必ずしもホモ変異体である必要はありません。フレームシフトの二対立遺伝子変異で十分なケースも多々あります。CRISPR/Cas9の場合、両方の対立遺伝子において同一変異が生ずることは滅多にありません。1つのアレルでゲノム編集が成功しており他方のアレルでゲノム編集が生じていない場合であっても、Surveyor assayでは分解がみられるはずです。もし両方のアレルでゲノム編集が成功していることが確認できた場合（おそらく異なる変異だと思われますが）もSurveyor assayで分解が確認できるかと思われます。ホモノックアウトの確認方法としては、これらのクローンをさらにサンガーシーケンシングにより配列決定し、単一対立遺伝子ノックアウトか二対立遺伝子ノックアウトかを確認することが最もよい方法だと考えられます。これらは、あくまでガイドラインですので、ご利用になるお客様ご自身で、お客様の実験系において適切であるか等をご判断ください。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

Q13. Surveyor assay、サンガーシーケンシングまたはウェスタンブロットのうち、ノックアウト細胞検出に最も適しているのはどれですか？

A13. Surveyor assayにより簡単なスクリーニングを行った後、単一細胞から増殖させてサンガーシーケンシングを行って全ての対立遺伝子において期待する変異がみられることを確認することが、完全な遺伝子ノックアウトを確認する方法として最も厳密なアプローチであると考えます。これらは、あくまでガイドラインですので、ご利用になるお客様ご自身で、お客様の実験系において適切であるか等をご判断ください。

Q14. pLenti-U6-sgRNA-SFFV-Cas9-2A-PuroのU6フォワードシークエンシングプライマー配列を教えてください。

A14. プライマー配列はU6プロモーター領域内に位置します。
5'--TACGTCCAAGGTCGGGCAGGAAGA--3'

Q15. sgRNA発現用プロモーターをU6プロモーターではなくEF1aプロモーターに変更できますか？

A15. U6やH1といったRNA polⅡプロモーターはsiRNA、miRNAおよびsgRNAといった短鎖RNA発現に一般的に使用されています。APB社では、sgRNA発現用にEF1aが使用可能か確認する試験を行った経験がなく、機能しない可能性があるため、お奨めしておりません。多くの論文報告には、sgRNA発現にU6やH1プロモーターを使用していると記載されています。

Q16. Applied Biological Materials社のCas9にはNLS配列を含んでいますか？

A16. はい。Applied Biological Materials社システムのCas9はNLS配列を含んでいます。

Q17. ノックアウト検証用プライマーはどのようにデザインすればよいですか？

A17. ノックアウトを確認する最良の方法は、Surveyorアッセイと同様にゲノム領域にプライマーをデザインし、ゲノム編集で標的としたゲノム領域をPCR増幅してベクターに組込み、このプラスミドDNAの配列決定を行うことです。配列決定を行うことでゲノム編集において生ずる可能性のある変異等も確認できます。

Q18. CRISPR産物の標的遺伝子が長鎖ノンコーディングRNAの場合、全遺伝子のノックアウトが得られるのでしょうか？または一部分のみでしょうか？スクリーニング用プライマーデザインにも関わる質問です。

A18. 長鎖ノンコーディングRNAの場合、ウイルスプールの使用をお奨めしています。この方法では、2種またはそれ以上の異なった方法でノックアウトが生ずる可能性があるためです。

1. 細胞が単一のCRISPRレンチウイルスに感染した場合、遺伝子は1ヶ所で切断され、平均的に1～20塩基離れた挿入/欠損が生じます。機能のノックアウトには十分かもしれませんし、十分ではないかもしれません。
2. 細胞が2つのCRISPRレンチウイルスに感染した場合、遺伝子は2ヶ所で切断される可能性があります。この場合、より大きな欠損が生じてノックアウト効果が増強される可能性があります。

FAQ：CRISPR/Cas9商品と受託サービスについて

WEBへどうぞ
記事ID:12554

GeneCopoeia, Inc.
メーカー略号：GCP

- サービス詳細：Genome-CRISP™ Custom CRISPR/Cas9受託サービス（72ページ、WEB記事ID：12069）
- 商品詳細：GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9ノックアウトシステム（27ページ、WEB記事ID：15479）
- 商品詳細：GeneCopoeia社 CRISPR/Cas9 HR（HDR）用ドナーベクター（39ページ、WEB記事ID：14734）
- 商品詳細：GeneCopoeia社 Genome-CRISP™ CRISPR/Cas9 stable cell line（99ページ、WEB記事ID：14484）
- 商品詳細：GeneCopoeia社 Genome-CRISP™ human single guide RNA（sgRNA）ライブラリー（97ページ、WEB記事ID：14485）
- 商品詳細：GeneCopoeia社 TALEN / CRISPR/Cas9 挿入欠損検出システム（40ページ、WEB記事ID：14700）

Q1. gRNAおよびCas9とドナーテンプレートを同時に導入する必要がありますか？

A1. はい。ドナーテンプレートが修復鋳型として利用されるためには、DNA二本鎖切断が形成した時点でドナーテンプレートが存在している必要があります。未修復のDNA二本鎖切断は細胞にとって致死的であるため、ドナーテンプレートが存在しない場合には、非相同性末端結合（NHEJ）を利用してDNA二本鎖切断を修復します。

Q2. プラスミドは染色体に組み込まれますか？

A2. CRISPR/Cas9プラスミドを導入する実験系では、通常、宿主ゲノムに組込まれません。ただし、ゲノム編集した細胞クローンの選択後、プラスミドを欠損したクローンをスクリーニングすることをおすすめします。プラスミドにコードされている耐性遺伝子の抗生物質に感受性であるか、または、プラスミドにコードされている蛍光マーカーを発現しないかなどを確認する方法が利用できます。レンチウイルス粒子は染色体上にランダムに組込まれます。

より詳細な情報は、CRISPR/Cas9－実験計画を立てる！（120ページ、WEB記事ID：15668）をご参照ください。

Q3. 選択マーカーがない場合の変異検出はどのように行えばよいのでしょうか？

A3. ドナーテンプレートを使用せずにCRISPRによる標的遺伝子の変異を導入した場合、編集されたクローンを同定するために多くの作業が必要になります。Cas9、gRNA導入後、可能な限り多くの細胞を単離する必要があります。以下に示すように、スクリーニング工程はどのようなゲノム編集を実施したかによって異なります。

1. 挿入や欠失を導入する場合、最も簡便なスクリーニング方法は修正部位を挟んだ位置に設計したプライマーを用いてPCR増幅することです。ただし、挿入または欠失が一般的なアガロースゲル電気泳動法で検出可能な大きさである必要があります。
2. 挿入や欠損が非常に小さい場合、クローンのスクリーニングにはミスマッチを含む二本鎖DNAを切断することで変異を検出するT7エンドヌクレアーゼⅠアッセイが利用できます。リアルタイムPCRを利用することもできます。GeneCopoeia社では、挿入欠損検出用のT7エンドヌクレアーゼⅠ切断アッセイキットをご提供しています。
3. 点変異を導入する場合、修正検出にはT7エンドヌクレアーゼⅠアッセイまたはリアルタイムPCRが利用できます。
4. ゲノム編集を実施したことによって、制限酵素サイトが産生または破壊される場合、PCR産物の酵素切断により修正済みまたは未修正の対立遺伝子を区別することができます。
5. PCR産物のサンガーシークエンシングや全ゲノムの次世代型シークエンシングを利用して修正を確認する方法もあります。

いずれのスクリーニング手法を選択しても、一部分のみが編集されたのか、全対立遺伝子が編集されたのかを同定することが重要です。編集されたクローンを同定するために要する時間と労力を削減するためにドナーテンプレートのご使用をおすすめします。GeneCopoeia社ではドナープラスミドカスタム構築サービスを提供しています。
本サービスでは、ホモロジーアームとピューロマイシン耐性等の選択マーカー、蛍光マーカーを含むドナープラスミドをデザイン・構築します。マーカーはloxPに隣接しているためCreにより除去することができます。

Q4. セーフ・ハーバーへの組換えや相同組換え（HR、HDR）を用いたゲノム編集が成功したかどうかをどのように検証すれば良いのでしょうか？

A4. セーフ・ハーバーへの組込み検証には、組換え座位を増幅するようデザインしたプライマーを使用してPCRを行うか、サザンブロッティングにより検証できます。GeneCopoeia社のGenome CRISP™ Human AAVS1 Safe Harbor Gene knock-in Kitには検証のためのPCRプライマーペアが含まれています。相同組換え（HR、HDR）を用いた他のゲノム編集実験にも編集部位同定にPCRが利用で

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー／スクリーニング
技術情報
ライブラリー／スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

きます。PCR法では、野生型と変異型間のPCR産物サイズの変化が確認できます。変異型において期待するサイズの単一バンドが得られた場合、全コピーに変異が導入されたことが示唆されます。もし2本のバンドが得られた場合、少なくとも1つの対立遺伝子は未編集であることが示唆されます。サザンブロッティングもランダム組込みを検出するために有効です。

Q5. CRISPR/Cas9システムは、希望のゲノム編集のあとも継続して染色体を切断し続けるのですか？

A5. GeneCopoeia社のCRISPR/Cas9プラスミドベクターは、宿主ゲノムに組込まれたり、複製されないようにデザインされています。一過性に導入されたプラスミドは、通常、数回の細胞分裂後に消失し、宿主細胞にそれ以上影響を及ぼしません。トランスフェクション後、細胞を低密度で播種して単一コロニー形成させ、これらのコロニーをスクリーニングしてプラスミドが消失したことを確認します。プラスミドにコードされていた耐性遺伝子の抗生物質に感受性であるか、あるいは、プラスミドにコードされていた蛍光マーカーを発現しないかなどを確認する方法が利用できます。Cas9やsgRNAの確実な一過的発現／導入にはプラスミドDNAの代わりにCas9タンパク質とmRNA（sgRNA）のご使用を推奨致します。

Q6. 野生型Cas9の代わりにニッカーゼ/改変型Cas9を使用できますか？

A6. はい。GeneCopoeia社ではCas9 D10A/ニッカーゼを含むプラスミドをご用意しており、ダブルニッカーゼデザインを用いた試験において、良好な結果を得ています。ただし、ダブルニッキング法によりDNA二本鎖切断を行うためには、適切な間隔をもち、お互いが相補鎖に配置され、かつ切断場所を挟んだ2つのgRNA（sgRNA、ガイドRNA）が正確に標的する必要があります。さらに、適切なgRNA（sgRNA、ガイドRNA）標的には認識部位の直後に5'-NGG-3'“PAM”配列が存在する必要があり、どのような場合でもニッカーゼ/改変型Cas9をDNA二本鎖切断に使用できるわけではありません。

より詳細な情報は、CRISPR/Cas9オフターゲット作用をコントロールする（27ページ、WEB 記事ID：15301）をご参照ください。

Q7. ダブルニッキング法でドナーテンプレートを利用できますか？

A7. 利用できます。ダブルニッキング法によりDNA二本鎖切断を行うためには、適切な間隔をもち、お互いが相補鎖に配置され、かつ切断場所を挟んだ2つのgRNA（sgRNA、ガイドRNA）が正確に標的する必要があります。この手法は非相同末端結合の発生率を減らすことによりオフターゲット切断のリスクを低下させることができます。ただし、適切なgRNA（sgRNA、ガイドRNA）標的には認識部位の直後に5'-NGG-3'“PAM”配列が存在する必要があり、どのような場合でもニッカーゼ/改変型Cas9をDNA二本鎖切断に使用できるわけではありません。

より詳細な情報は、CRISPR/Cas9オフターゲット作用をコントロールする（27ページ、WEB 記事ID：15301）をご参照ください。

Q8. レンチウイルスベクターを利用したCRISPR/Cas9システムを提供していますか？

A8. はい。レンチウイルスプラスミドベクターとレンチウイルスベクター（粒子）の両方をご提供しています。レンチウイルス粒子作製サービスも承っており、Cas9とgRNA（sgRNA、短鎖RNA）の両方を導入するレンチウイルス粒子をお届け致します。

商品の詳細情報は、CRISPR/Cas9ノックアウトシステムをご参照ください。レンチウイルス粒子作製サービスについては、下記にお問合せください。

お問い合わせ先：製品情報部 受託担当
TEL　：03-5632-9615
FAX　：03-5632-9614
E-mail：jutaku_gr@cosmobio.co.jp

Q9. 相同組換え（HR、HDR）にレンチウイルスを利用した導入法を使用できますか？

A9. 残念ながらできません。レンチウイルスは細胞にRNAとして侵入しますが、ドナーテンプレートはCas9やgRNA（sgRNA、短鎖RNA）と同時にDNAとして細胞内に導入されなくてはなりません。

FAQ：CRISPR/Cas9ゲノム編集用ガイドベクターについて

WEBへどうぞ
記事ID：12367

ORIGENE Your Gene Company
OriGene Technologies, Inc.
メーカー略号：ORG

OriGene社　CRISPR/Cas9ゲノム編集用ガイドベクターの商品情報は「Cas9ゲノム編集用ガイドベクター」（32ページ、WEB記事ID：12003）をご参照ください。

Q1. NGGは必ず20 bp標的配列の3'末端直後に配置する必要がありますか？

A1. はい。NGGは20 bp標的特異的配列の3'末端直後に必要です。

Q2. 20 bp標的配列のデザイン方法を教えてください。

A2. 20 bp標的配列はNGG（PAM）の前に来ます。20 bp標的配列のシード領域（12 bp PAM近位）をBLASTにかけ、この配列がゲノム上でユニークであり、特異性を示すことを確認してください。シード領域（5'-NNNNNNNNNNNN-NGG-3'）は対象とするゲノム上で特異的である必要があります。シード領域に続いてNGGやNAGをもつ配列であっても、シード領域に3 bp以下のミスマッチをもつ配列は使用できません。

Q3. pCas9システム（32ページ、WEB記事ID：12003）ではオフターゲット作用に関してどのように対処していますか？

A3. 標的配列をデザインする際、配列をBLASTにかけます。もし、オフターゲット配列がPAM（NGG）をもたない場合、その配列はCRISPR/Cas9に標的されません。また、標的配列にはオフターゲット配列と比べて3'末端8～14塩基にミスマッチをもつものを選択します。これにより、オフターゲット作用のリスクが格段に下がります。医薬品開発目的の場合、一本鎖切断を行うニッカーゼ/改変型Cas9の利用もご検討ください。

Q4. ゲノム編集プロジェクトを行う場合、いくつくらいの標的RNA配列を使用するべきですか？

A4. gRNAの性質上、予測不可能であることを考慮し、少なくとも1つのターゲティング配列が機能することを目指して2つ以上のgRNAターゲティング配列をデザインすることをおすすめします。

Q5. ドナーテンプレートが蛍光タンパク質マーカーや抗生物質耐性マーカーを持たない場合のゲノム編集評価方法を教えてください。

A5. 標的遺伝子が内在性タンパク質と区別可能なタンパク質をコードする場合、ウェスタンブロット法が利用できます。または、プライマーの一方をドナー配列内に設計し他方のプライマーをドナー配列外に設計して「ジャンクションPCR」を行い、ドナー配列を検出することもできます。

Q6. Cas9/gRNA複合体による特異的切断部位はどこですか？つまり、標的配列のどの部分が切断されるのでしょうか？

A6. Cas9はゲノム上の標的配列の3'末端から3塩基離れた部分を切断します。

Q7. なぜgRNAとCas9発現にT7に制御されるベクターを使用する必要があるのですか？

A7. 遺伝子ノックアウトマウスやショウジョウバエといった他の生物種においてゲノム編集を行う場合、gRNAとCas9 mRNAを細胞にマイクロインジェクションする場合があります。このgRNAとCas9のmRNAを作製するためです。

Q8. ガイドRNAとドナープラスミドの両方を細胞にトランスフェクションする必要がありますが、トランスフェクションが限定因子なのでしょうか？

A8. ご利用の細胞に適したトランスフェクション試薬を選択することができるかと思います。トランスフェクションが困難な細胞の場合、エレクトロポレーションを利用する研究者も多くいらっしゃいます。ORIGENE社のトランスフェクションが困難な細胞用の脂質を含まないウイルス様ポリマートランスフェクション試薬Viromer®（WEB記事ID：14377）もぜひお試しください。pCas-Guide-EF1a-GFP（品番：GE100018）（32ページ、WEB記事ID：12003）のGFP発現をトランスフェクション効率のモニターやトランスフェクトされたGFP陽性細胞の選別用に利用することもできます。

ゲノム編集総説
CRISPR/Cas9システムガイドライン
商品選択用フローチャート
ノックアウト
技術情報
ノックアウトの前に
NHEJ
NHEJ/HDR
ノックアウトベクター
HDR用ドナーベクター
機能検証
細胞
ノックイン
部位特異的ノックイン
セーフ・ハーバー部位へのノックイン
CRISPR/Cas9タンパク質と抗体
タンパク質
抗体
ゲノム編集効率改善
技術情報
ゲノム編集効率改善
ゲノム編集受託サービス
カスタムsgRNA/HDRテンプレート
実験動物のゲノム編集
細胞のゲノム編集
ゲノム編集細胞株によるタンパク質作製
ライブラリー/スクリーニング
技術情報
ライブラリー/スクリーニング
CRISPR/Cas9技術応用編"dCas"
ゲノム編集
技術情報

Q9. 使用している細胞株のトランスフェクション効率はわずか20%です。CRISPR/Cas9が導入された細胞を濃縮する方法はありますか？

A9. pCas-Guide-EF1a-GFP（品番：GE100018）からはGFPも発現するため、GFP発現がみられる細胞をもとに導入された細胞を選別することができます。ORIGENE社ではpCas-Guide-EF1a-CD4ベクター（32ページ、WEB 記事ID：12003）もご用意しており、CD4抗体ビーズを用いて導入された細胞の濃縮を行うことができます。

Q10. 標的遺伝子のノックアウトには、ドナーテンプレートは必要ありませんか？

A10. 必須ではありませんがドナーテンプレートが存在しない場合、二本鎖切断はNHEJによる修復を受け、フレームシフトを生ずる欠損／挿入が導入された細胞をスクリーニングする必要があります。ドナーテンプレートを用いると、希望する挿入／欠損／変異を入れることができます。

Q11. ドナーテンプレートのホモロジーアームはどのくらいの長さが適当ですか？

A11. CRISPR/Cas9における相同組換えでは、左右それぞれ600～1000 bp のホモロジーアームが適当であると思われます。

Q12. OriGene社のデザイン済みドナーベクター（例：OriGene社ゲノム編集ノックアウトキットに含まれるHDRプラスミド）（31ページ、WEB 記事ID：13159）を使って、全てのスプライシングバリアントをノックアウトするにはどうすればよいですか？

A12. ひとつのpre-mRNAがスプライシングを受けて異なるスプライシングバリアントの遺伝子が生じます。ORG社において全てのスプライシングバリアントをノックアウトできるよう標的配列をデザインする際には、最も長鎖のスプライシングバリアントの開始コドン（ATG）周辺に標的配列をデザインします。ドナーベクターの相同左腕の3'末端は開始コドン（ATG）のすぐ上流となります。相同組換えにより、ゲノム上の最長鎖スプライシングバリアントのコード領域の一部がGFP/Puroカセットと置換されます。GFP/Puro機能をもつカセットの3'末端には転写終止シグナルがあり、残りの標的遺伝子は転写されません。

Q13. 構築した細胞プールからノックアウト細胞株をクローニングする方法はありますか？

A13. 単一細胞に単離する必要があります。

Q14. 効率よく修復を行うために、細胞にトランスフェクションする前にドナープラスミドを直鎖にする必要がありますか？

A14. 無作為な組込みを回避するため、ドナープラスミドを直鎖にしないことが好ましいです。

Q15. ドナーテンプレートに長鎖オリゴを使用した場合、どのようにして陽性クローンを選択すればよいですか？

A15. 単一細胞を単離し、遺伝子ノックアウトやタグ付加の場合はウェスタンブロットを、変異導入（挿入欠失）の場合はゲノムPCRやシークエンス解析を行います。

Q16. CRISPR/Cas9ベクターをトランスフェクション後、どのようにして編集済み細胞をスクリーニングすればよいですか？

A16. 遺伝子ノックアウトの場合、ウェスタンブロットを行って確認することができます。ゲノムPCRを行ってゲノムへの組込みを確認することもできます。変異の場合、ゲノム配列を増幅して配列決定します。遺伝子ノックアウトを行う場合、ドナーテンプレート内の選択マーカーを利用することもできます。必要であれば、ゲノムへの特定変異導入や他のアプリケーション用に各細胞コロニーを単離することもできます。

Q17. CRISPR/Cas9システムは非分裂細胞にも使えますか？

A17. NHEJ修復は非分裂細胞でも機能しますがHDRは活性をもちません。ドナーテンプレートを使用せず、CRISPR/Cas9システムを用いて遺伝子を破壊することはできます。

Q18. CRISPR/Cas9を用いて単一対立遺伝子ノックアウトや二対立遺伝子ノックアウトを行うことはできますか？

A18. CRISPR/Cas9による二本鎖切断は非常に効率的です。もしCRISPR/Cas9ベクターのみを使用して挿入欠損を導入する場合でトランスフェクション効率が高い場合、より二対立遺伝子ノックアウトが生じます。ドナーテンプレート存在下では、これが相同組換えの限定要因となるため、単一対立遺伝子ノックアウトが生じた細胞と二対立遺伝子ノックアウトが生じた細胞がみられます。

Q19. CRISPR/Cas9を用いて特定遺伝子をノックアウトしたい場合、どのようなネガティブコントロールを使えばよいですか？

A19. pCas-Scramble（品番：GE100003）（WEB 記事ID：12003）またはpCas-Scramble-EF1a-GFP（品番：GE100021）（33ページ、WEB 記事ID：12003）といったスクランブルコントロールをご利用ください。

Q20. 複数の遺伝子破壊を行う場合、その限界はなんですか？

A20. CRISPR/Cas9システムを使用してマルチプレックスを行うことができます。複数のガイドRNAを使用細胞あるいは動物モデルに同時導入（またはインジェクション）することで複数の遺伝子破壊またはゲノム編集が得られます。ただし、トランスフェクション効率が限定要因になる可能性があります。

Q21. レンチウイルスベクターを使用する場合、どのようにしてCas9が組込まれないことを確認すればよいですか？

A21. スクリーニング目的や短期的には、Cas9がゲノムに2週間組込まれても細胞に影響を及ぼしません。トランスダクション後にレンチウイルスが組込まれない非組込み型レンチウイルスパッケージングキットも販売しています。

Q22. プロモーターやエンハンサーをはじめ、ゲノム上のどの領域にも変異を導入することができますか？

A22. 可能です。ただし、20塩基の標的配列の後にNGG配列が必要です。

Q23. 細胞株によって成功率は異なりますか？

A23. 細胞株や標的配列によって、ゲノム編集成功率は異なります。

Q24. 標的遺伝子に蛍光ラベル（タグ付加）したい場合、ドナーコンストラクトをもつ細胞を希釈するためにトランスフェクションした細胞を培養する必要がありますか？

A24. もしドナーコンストラクトの蛍光タンパク質が哺乳類の発現プロモーターをもたない場合（例えば相同左腕がプロモーターを含まない場合）、蛍光細胞を識別することができます（トランスフェクションされた細胞内でのみドナーDNAがわかります）。単一細胞コロニーを抽出する必要がない場合もあります。もしドナーコンストラクトの蛍光タンパク質が哺乳類の発現プロモータをもつ場合、トランスフェクションされた遺伝子を数回継代し、ドナーコンストラクトを含む細胞を希釈する必要があります。

Q25. 他のゲノム編集アプローチと比べて、既知の効率はどの程度ですか？

A25. 一般に、CRISPR/Cas9によるゲノム編集効率はTALENと同等またはそれ以上と考えられています。さらに、CRISPR/Cas9はほかのゲノム編集技術と比べて非常にシンプルかつ簡単に利用できます。CRISPR/Cas9ではRNAを利用するのに対し、TALENシステムでは新規DNA配列ごとにこれを認識するタンパク質を作成しなければならない可能性があります。

Q26. 第3世代のレンチウイルスベクターの特徴を教えてください。

A26. 第3世代のレンチウイルスベクターは第2世代ベクターより安全面で優れています。第3世代のパッケージングシステムではgagとpolをひとつのプラスミドベクターから、revを他のプラスミドベクターから発現させます。第3世代のパッケージングシステムではtat（転写のトランス活性化因子）を発現させません。

Q27. レンチウイルス産生にはどの細胞株を使用すればよいですか？

A27. レンチウイルス産生には通常HEK293T細胞が使用されます。コスモ・バイオではさまざまな細胞を扱っておりますが、Cell Biolab社の293LTV Cell Line（品番：LTV-100）（WEB 記事ID：4108）は、レンチウイルス用に選択されたセルラインです。293T cell lineに比べ、高レンチウイルス収率や培養プレートへの安定結合、より早い増殖能を持つといった特長があり、おすすめです。

Q28. pLentiベクターに第2世代のパッケージングシステムを使用できますか？

A28. 第2世代のパッケージングシステムも理論的にはORG社の第3世代pLentiベクターに使用できるはずですが、実験的検証は行っておりません。pLenti-vectorには、ORIGENE社の第3世代パッケージングキット（品番：TR300022）をご利用ください。

FAQ：CRISPR/Cas9 ゲノム編集用ツールについて

WEBへどうぞ
記事ID:14019

Santa Cruz Biotechnology, Inc.
メーカー略号：SCB

● 商品詳細　Santa Cruz社のCRISPR/Cas9 ゲノム編集用ツール（23ページ、WEB 記事ID：14017）

Q1. RNA干渉（RNAi）と比べてCRISPR/Cas9システムの利点はなんですか？

A1. RNA干渉ではmRNAを標的し崩壊させるのに対し、CRISPR/Cas9システムはゲノムDNAを標的し編集することで対象タンパク質をノックアウトします。ゲノムDNAが編集されると、この変化は永久に持続します。

Q2. ジンクフィンガーヌクレアーゼ（ZFN）やTALENよりCRISPR/Cas9ゲノム編集ツールが好まれるのはなぜですか？

A2. CRISPR/Cas9システムはこれらより安価かつ切断効率と特異性がより優れています。

Q3. ガイドRNA（gRNA）配列のデザイン方法を教えてください。

A3. Santa Cruz社では、GeCKO v2ライブラリーより公表されている3種のgRNA標的配列プールを利用します。公表されているこれらの配列は編集効率が高く、オフターゲット作用が低いことが示されています。

Q4. gRNA配列は提供されますか？

A4. はい、gRNA配列はご購入後、お客様に開示致します。コスモ・バイオ（欄外参照）までお問合せください。

Q5. なぜCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドは3種の標的RNA配列をプールして提供されるのですか？

A5. SCB社では十分な遺伝子破壊を確実に行うため、3種のgRNA配列をプールしてCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドとしてご提供しています。

Q6. CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドを3種のgRNAプールではなく単独で提供してもらえますか？

A6. はい。CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドセットをご購入頂き、その後、カスタムオーダーとして個別のgRNAのCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドをご購入いただくことが可能です。コスモ・バイオ（欄外参照）までお問合せください。

Q7. HDRプラスミドは3種のプールとして提供されますか？

A7. はい。各HDRプラスミドはそれぞれ相当するgRNAに対して機能するようデザインしており、2～3種のプールとして提供されます（遺伝子により異なります）。

Q8. CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドのみを遺伝子機能のノックアウトに単独で使用できますか？

A8. はい。ただし、非相同末端結合（NHEJ）が起こり、挿入欠失が生ずる可能性があります。挿入欠失により読み取り枠（ORF）が変わり、二本鎖切断（DSB）以降のアミノ酸配列が大きく変わったり、本来のORFの途中に停止コドンが生じたりする可能性があります。NHEJにより生じた挿入欠損はランダム変異となる可能性もあり、遺伝子破壊の種類や範囲を確認する必要があります。

Q9. 自分の細胞にCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドがトランスフェクションできたかどうか調べる方法を教えてください。

A9. GFP発現を確認してトランスフェクション効率を決定することができます。また、遺伝子ノックダウンの程度を確認するため、さらなるアッセイも必要となります。

Q10. 自分の細胞にHDRプラスミドがトランスフェクションできたかどうか調べる方法を教えてください。

A10. RFP発現を確認してトランスフェクション効率を決定することができます。また、遺伝子ノックダウンの程度を確認するため、さらなるアッセイも必要となります。

Q11. CRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドとHDRプラスミドを用いてゲノム編集が問題なく生じたことを調べる方法を教えてください。

A11. 編集が行われた細胞にはそのゲノムDNAにピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれているため、ピューロマイシン選択を行うことができます。

Q12. HDRプラスミドの各ホモロジーアームの長さはどれくらいですか？

A12. 相同組換えを確実なものとするため、約800塩基あります。

Q13. CRISPRコントロールはありますか？

A13. Santa Cruz社ではCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドに1つのスクランブルgRNA配列を組み込んだネガティブコントロール（品番：SC-418922）をご用意しています。スクランブルgRNA配列はゲノム標的DNAに結合せず、また、Cas9/gRNA複合体は結合せず、DSBを生じません。

Q14. Cas9/gRNA複合体はゲノムDNAのどの位置を切断するのですか？

A14. Cas9はゲノムDNA内の標的配列3'末端、PAM配列の上流約3～5番目の塩基対を切断します。

Q15. CRISPR/Cas9システムは分裂細胞と非分裂細胞の双方に使えますか？

A15. はい、両方に使えます。分裂細胞ではNHEJまたはHDR経路が利用され、非分裂細胞ではNHEJ経路のみが利用されると考えられます。

Q16. 細胞株の種類によって効果にばらつきがみられますか？

A16. はい。効果は細胞株や標的配列によって変動します。

Q17. CRISPR/Cas9システムでは、標的遺伝子のノックアウトをどのように確認しますか？

A17. 遺伝子ノックアウトを確認する方法はいくつかあります。ピューロマイシンによりHDRプラスミドにより編集された細胞を選択することができます。ウェスタンブロット分析によりタンパク質ノックダウンの確認が可能です。また、ゲノムPCRによりゲノム組込みを確認できるでしょう。ゲノム配列を増幅後、PCR断片をクローニングして配列決定することで変異の検出もできるかもしれません。

Q18. トランスフェクションの検証を行う場合、ウェスタンブロットや免疫蛍光法はどのように利用できますか？

A18. ウェスタンブロットを利用してCas9タンパク質の発現が確認できます。また、RFPマーカーを利用して顕微鏡下で蛍光の可視化も可能です。

Q19. 一度にいくつの遺伝子をノックアウトできますか？

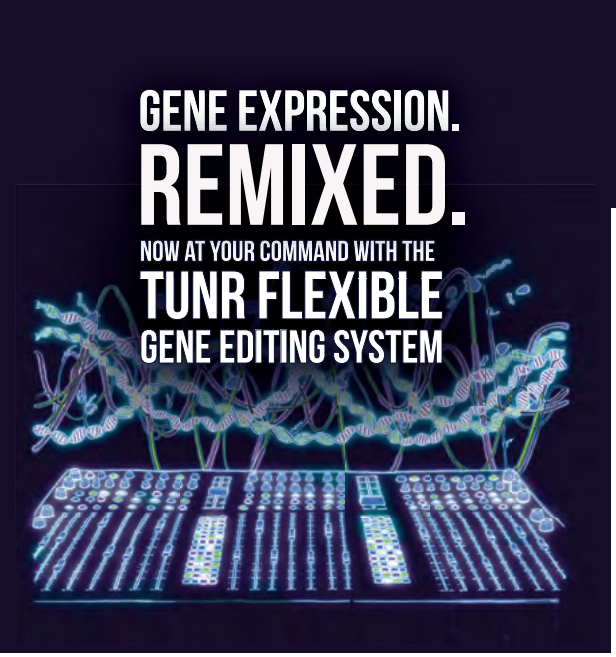
A19. 一度にノックアウトできる最大遺伝子数はまだよくわかっていません。種々の研究より一度に複数の遺伝子をノックアウトできることが示唆されていますが、これは細胞への同時導入がどれだけできるかによります。Santa Cruz社のCRISPR/Cas9ノックアウトプラスミドに関しては1標的遺伝子ずつご利用いただくことを推奨し、保証しています。

Q20. HDRプラスミドはダブルニッカーゼプラスミドと組み合わせて使用できますか？

A20. いいえ。HDRプラスミドはKOプラスミド（野生型Cas9）用にデザインされており、ダブルニッカーゼプラスミド（ニッカーゼ/改変型Cas9）と組み合わせた使用はできません。

Q21. CRISPR/dCas9 Lentiviral Activation Particle（ウイルス粒子）（114ページ、WEB記事ID：14683）をトランスダクションした場合、ゲノムにインテグレートされて、安定的に標的遺伝子のプロモーターを活性化することができますか？

A21. 理論的には細胞にレンチウイルス粒子を感染させた場合、レンチウイルスは細胞ゲノムに組み込まれ安定的に発現します。しかしながら、遺伝子の活性化が安定して生じるためには、CRISPR/dCas9 Activationシステムを構成する3種の遺伝子すべてがゲノムに組み込まれ、SAM複合体が形成される必要があり、そのような状況になるかどうかは定かではありません。



CANOPY BIOSCIENCES

siRNA で満足されていない皆様へ

調整可能なノックダウン

TUNR Flexible Gene Editing System

TUNR Flexible Gene Editing System は標的遺伝子発現量の段階的な調整を可能にします。お客様の計画に合う試薬をキットとして提供致します。

背　景

アデニン塩基の繰り返し配列 TUNR sequence (PolyA tracks) を開始コドンの後ろに挿入する事により、mRNA およびタンパク質の発現量を抑制（ノックダウン）します。挿入する PolyA tracks の長さによりノックダウン率を調整可能です。TUNR 配列は CRISPR-Cas9 により正確に目的遺伝子に挿入されます。この技術はワシントン大学 Sergej Djuranovic 研究室により *Nature Communications* 紙で報告されました。[1]

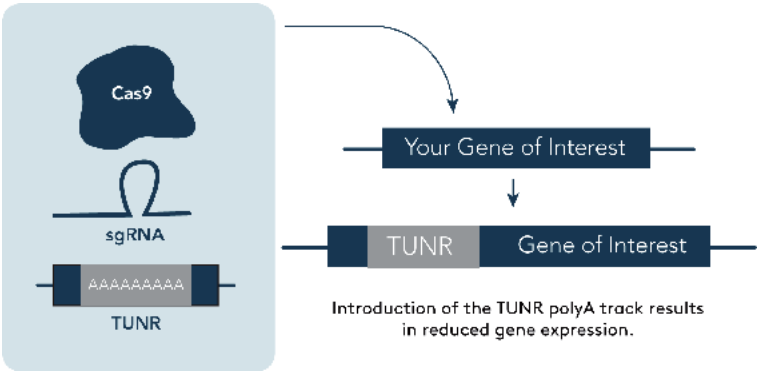


図 1. TUNR 遺伝子発現調整システムについて

特　長

- 遺伝子発現を 100% ～ 0%（ノックアウト）で調整可能
- 内在性遺伝子の発現を制御
- 患者集団における多様性を反映する遺伝子発現量モデルを作製可能
- ノックアウトできない必須遺伝子（致死性遺伝子）のノックダウンに利用可能

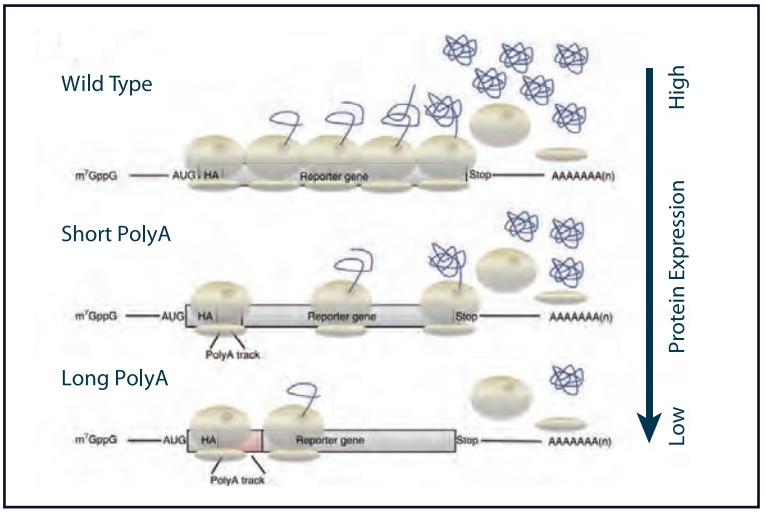


図 2. PolyA track の挿入による mRNA とタンパク質発現量の減少

野生型では正常な発現量だが、短い PolyA track を挿入すると中程度に発現量が減少し、長い PolyA track を挿入するとさらに大幅に発現量が減少する。

参考文献
1. Arthur, L. L. *et al.* Rapid generation of hypomorphic mutations. *Nat. Commun.* **8**, 14112 doi: 10.1038/ncomms14112 (2017)

詳しい情報は、コスモ・バイオ Web サイト「記事 ID 検索」で。
記事 ID 18337 クリック！

Canopy Biosciences, LLC　　メーカー略号：CNP

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

使用例

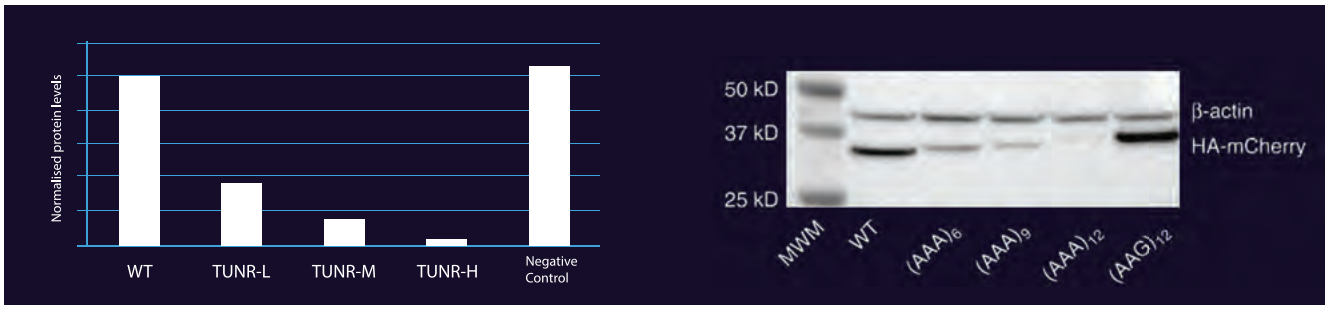


図 3　TUNR (PolyA tracks) は HeLa 細胞のタンパク質発現量を減少させる。

HA-mCherry への TUNR の挿入に依り、HA-mCherry の発現量が減少した。TUNR-H（12 個の AAA コドン（アデノシン 36 個）の挿入は、TUNR-M（9 個の AAA）、TUNR-L（6 個の AAA）で最も発現量減少効果が高い。同じリジンである AAG コドン 12 個の挿入ではタンパク質発現量に影響を与えなかった。

※上記データ（Arthur *et al.* 2017(1)）では、TUNR-L：6AAA、TUNR-M：9AAA、TUNR-H：12AAA で掲載しておりますが、商品は TUNR-L：4AAA、TUNR-ML：6AAA 、TUNR-MH：9AAA、TUNR-H：12AAA です。

商品ラインアップ

商品は、ゲノム上の目的遺伝子に TUNR 配列を組み込むための試薬キット、ならびに目的遺伝子に TUNR 配列を組み込んだプラスミドセットとなります。お問い合わせの際は、ご希望の動物種、目的遺伝子の Gene ID ／ Accession 番号をご用意ください。

TUNR Flexible Gene Editing System

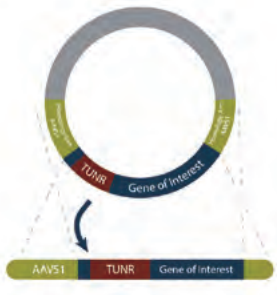
目的の内在性遺伝子について、4 段階の異なるノックダウン率の細胞株を作製できます。
CRISPR-Cas9 技術を利用して TUNR 配列を目的遺伝子に導入します。

【キット構成内容】

- crRNA
- tracrRNA
- Cas9 タンパク質
- オリゴヌクレオチド　4 種類
  - TUNR-L　• TUNR-ML　• TUNR-MH　• TUNR-H
- プライマー

TUNR Targeted Transgenic kit

AAVS1 領域（ヒト）または ROSA26 領域（マウス）に TUNR 配列を組み込んだ目的遺伝子を導入するキットです。導入には CRISPR-Cas9 を利用し、2 種類の異なるノックダウン率の細胞株を作製できます。

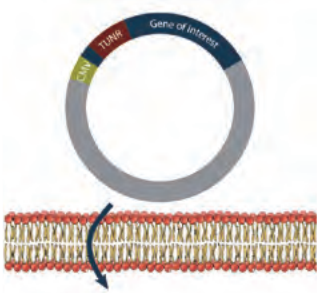


【キット構成内容】

- AAVS1 または ROSA26 を標的とした crRNA
- tracrRNA
- プライマー
- プラスミド　2 種類
  - TUNR-ML　• TUNR-H

TUNR Plasmid-Delivered Transgenes kit

TUNR 配列を組み込んだ遺伝子を含むプラスミドを導入するキットです。



【キット構成内容】

- プラスミド　4 種類
  - TUNR-L　• TUNR-ML　• TUNR-MH　• TUNR-H
- プライマー

次世代シーケンシング受託サービス

広範なシーケンスプラットフォームで最高水準のサービスをご提供します!

Humanizing Genomics macrogen JAPAN

マクロジェン社はアメリカ、ヨーロッパ、韓国に拠点を置き、60ヶ国以上のお客様に次世代シーケンシング受託サービスをお届けしています。GS-FLX, HiSeq, MiSeq, Ion Proton, PacBio という幅広いシーケンサーをご用意し、HiSeq X Ten は民間企業として世界で唯一のサービスプロバイダーです。適正な価格、迅速な対応でお客様のニーズに応える最高品質の解析結果をお届けします。

Technologies

HiSeq X
HiSeq 2000 / 2500
MiSeq
Ion PGM / Proton
454 GS-FLX Plus / PacBio RS II

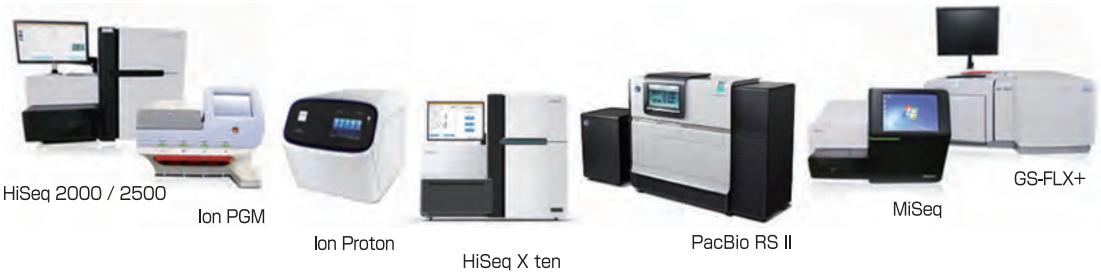
Bioinformatics

de novo Assembly
Reference Mapping
Variant Calling (SNPs / Indel)
CNV & SV
Gene Expression
Functional Annotations

Humanizing Genomics macrogen JAPAN

Applications

Whole Genome (*de novo* / Re-seq)
Cancer Panel
Exome / Targeted Sequencing
Transcriptome (mRNA / small RNA)
Epigenome
Metagenome



Overview of Macrogen's Research Applications and Platforms

次世代シーケンス解析例

株式会社マクロジェン・ジャパン　　メーカー略号：MAG

サービス項目	使用機種	データ量	リード長	シーケンス方法	参考価格 (税抜)	納期（QC 合格後）
PacBio RS II Sequencing	PacBio RS II	0.5~1 Gb (非保証)	Ave. ～ 10,000 bp	1 SMRT Cell P6-C4	274,000 円 / サンプル	4 週間
mRNA-seq	HiSeq 2000	4 Gb (40M reads)	100 bp	Paired End	139,000 円 / サンプル	シーケンス：6-8 週間 データ解析：1-2 週間
Human Exome Sequencing	HiSeq 4000	5 Gb 相当	100 bp	Paired End	105,000 円 / サンプル	シーケンス：6-8 週間 データ解析：1-2 週間

マクロジェン社の受託サービスは、コスモ・バイオで承ります。Web サイトに、より詳細な情報を掲載しています。

お見積りやお問い合わせもこちらから行えます！　http://www.cosmobio.co.jp/

記事 ID 検索 13587 詳しい情報はコスモ・バイオ Web サイトへ

コスモ・バイオホームページのサイト内検索エンジン「記事 ID 検索」に、この商品のページ ID（上記のアイコンの数字）を入力してください。ダイレクトにページへ行くことができます。

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

人と科学のステキな未来へ

コスモ・バイオ株式会社

コスモ・バイオでは、取扱いメーカーを全てメーカー略号を用いて注文しやすくしています。
同様の品番を複数メーカーで用いている場合がございますので、ご注文時には品番だけでなく品名や包装サイズ、メーカー略号もしくはメーカー名の確認をお願いいたします。
弊社取扱い代理店経由でご注文下さい。

営業部 お問い合わせ先

TEL : (03) 5632-9610　FAX : (03) 5632-9619
TEL : (03) 5632-9620
弊社ホームページ経由でもお問い合わせいただけます。
ホームページ : http://www.cosmobio.co.jp/

■ メーカー略号紹介

APB	Applied Biological Materials Inc.
ASC	Applied StemCell, Inc.
BRT	Biorbyt Ltd.
CLT	Cellecta, Inc.
DNA	ATUM (Former DNA2.0 Inc.)
GCP	GeneCopoeia, Inc.
ITL	Ingenious Targeting Laboratory, Inc
LUC	Lucigen Corporation.
MAG	株式会社マクロジェン・ジャパン
ORG	OriGene Technologies, Inc.
PGI	Proteintech Group, Inc.
SCB	Santa Cruz Biotechnology, Inc.
STE	株式会社セツロテック
XCB	Xcess Biosciences, Inc.

もっと情報が知りたい方へ

www.cosmobio.co.jp

アルミマット保温装置
HIENAI Mat 01R

ひえないマット 01R

通常の実験台はもちろん、クリーンベンチでも使えるマットウォーマー！

- **高い温度均一性を実現**
  アルミマット表面全体を 37℃に加温
- マイクロプレート 9 枚分の広さ
- クリーンベンチ内での細胞培養に
- ELISA や酵素反応などに
- 実験動物（ラットやマウス）の体温保温に

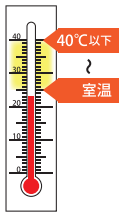
クリーンベンチでの使用例

HIENAI Mat カスタマイズ

ご希望の温度にカスタマイズ可能です。

- 室温（25℃）プラス 15℃まで（40℃以下）
- 品番：HMAT01R-CT
- 希望販売価格：30,000 円

※ 本体（品番：HMAT01R）ご注文時に併せてご依頼ください。



製品仕様

コスモ・バイオ株式会社　メーカー略号：PMC

品名	HIENAI MAT 01R
品番	HMAT01R
温度	固定式 37℃
温度分布精度	±2℃
制御方法	NTC サーミスタによるループ制御
発熱体	薄型ラバーヒーター
安全機能	電源ヒューズ (ガラス管)
サービスコンセント	AC100 V　50/60 Hz（100W 以下でご使用下さい）
重量	マット部　約 1.0 kg 電源ボックス　約 0.8 kg
外寸 (W x D x H mm)	マット部　410×272×10 電源ボックス　140×140×42
希望販売価格	￥168,000

詳しい情報は、コスモ・バイオ Web サイトの検索エンジン「記事 ID 検索」で。 14315 クリック！

取扱店

お願い / 注意事項

記載の社名·商品名等の名称は、弊社または各社の商標または登録商標です。

希望販売価格　記載の希望販売価格は 2017 年 11 月 1 日現在の価格で、予告なく改定される場合があります。また、「希望販売価格」「 キャンペーン中の参考価格」は参考価格であり、販売店様からの実際の販売価格ではございません。ご注文の際には販売店様へご確認くださいますようお願い申し上げます。表示価格に消費税は含まれておりません。

使用範囲　記載の商品およびサービスは全て、「研究用」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。

人と科学のステキな未来へ
コスモ・バイオ株式会社

— 商品の価格・在庫・納期に関するお問い合わせ
TEL: 03-5632-9630（受付時間 9:00 ～ 17:30）
FAX: 03-5632-9623

— 商品に関するお問い合わせ
TEL: 03-5632-9610（受付時間 9:00 ～ 17:30）
FAX: 03-5632-9619

本社所在地　〒135-0016　東京都江東区東陽 2-2-20 東陽駅前ビル