

ゲノム編集関連製品・サービス

Genome Editing ver.2

富士フイルム和光純薬はCRISPR-Cas9によるゲノム編集の製品・サービスを幅広くラインアップしております。ゲノム編集をこれから始める研究者はもちろん、ゲノム編集が上手くいかずに困っている研究者にもお勧めの製品・サービスをご紹介します。

ガイドRNA
合成キット

ガイドRNAを自分で大量合成したい

ニッポンジーン *CUGA*® 7 gRNA Synthesis Kit

Cas9
mRNA

高活性のCas9 mRNAを使いたい

TriLink社 CleanCap® Cas9 mRNA

Cas9
タンパク質

15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の高濃度Cas9タンパク質でゲノム編集の効率を上げたい

ニッポンジーン Cas9 Nuclease protein NLS

Cas9
Nickase
タンパク質

CRISPR-Cas9によるオフターゲット効果を抑制したい

ニッポンジーン Cas9 Nickase protein NLS

dCas9
タンパク質

CRISPR-Cas9による転写抑制などを行いたい

ニッポンジーン dCas9 protein NLS

トランス
フェクション
試薬

Cas9タンパク質とガイドRNAをトランスフェクション試薬で導入したい

石原産業 *GenomONE*®-GE

低分子
化合物

ゲノム編集の効率や特異性を上げたい

Tocris社 ゲノム編集関連 低分子化合物

変異導入
確認キット

変異検出に必要な試薬を揃えたい

ニッポンジーン Rapid Indel Detection Kit

変異導入
確認試薬

ゲノム編集による遺伝子変異を簡便に検出したい

ニッポンジーン T7 Endonuclease I reaction Mix

抗Cas9
タンパク質
抗体

ウェスタンブロットニングで高感度にCas9タンパク質を検出したい

ニッポンジーン 抗Cas9モノクローナル抗体

受託サービス

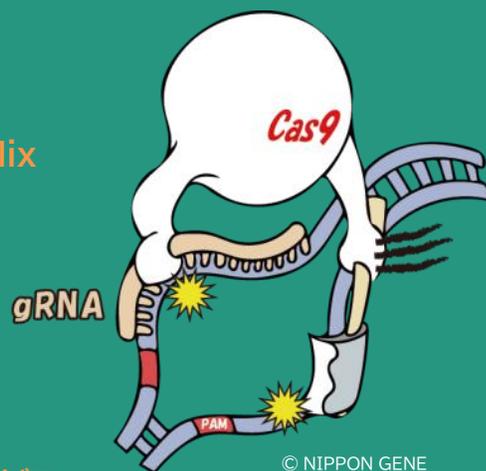
遺伝子改変動物の作製を依頼したい

特殊免疫研究所 遺伝子改変動物作製サービス

受託サービス

遺伝子改変細胞の作製を依頼したい

特殊免疫研究所 iPS細胞/がん細胞の遺伝子改変サービス



概要

CUGA[®] 7 gRNA Synthesis Kitは、ゲノム編集に必要なガイドRNA (gRNA)等の短鎖RNAを合成・精製するためのキットです。独自開発した改良型 T7 RNA Polymeraseを *in vitro* 転写反応に用いることで、目的のgRNAを正確かつ大量に調製することができます。



※本キットには 転写反应用試薬およびスピncラムを用いたgRNA精製用試薬が含まれています。

in vitro 転写反応に必要な鋳型DNAおよび鋳型DNA調製用試薬は本品に含まれておりませんので、別途ご用意いただく必要があります。

特長

- *in vitro* 転写でgRNAを正確かつ大量に合成
- single guide RNA (sgRNA)の合成も可能
- スピncラムを用いてgRNAを精製
- 得られたgRNAは化学合成gRNAと同等に機能

実験データ

▼ sgRNA合成量の比較

本品及びA社 gRNA合成キット(*in vitro* 転写法)を用いて、37℃、1~4 時間の条件でsgRNAの合成を行った。反応後各社マニュアルに従ってsgRNAを精製し、合成量を比較した。

本品はA社と比べて約3倍のsgRNAを合成できた。

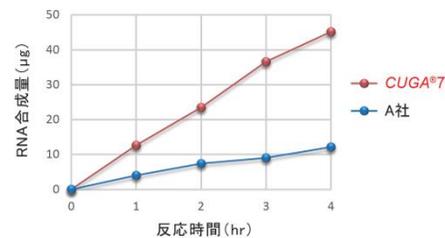


図1 sgRNA合成量の比較

▼ 電気泳動による比較

本品及びA社 gRNA合成キットを用いて、37℃で2 時間反応し、精製したgRNA (250 ng)をアガロースゲル電気泳動により比較した。

本品で合成したgRNAは単一のバンドで得られ、正確に合成できていることが分かった。

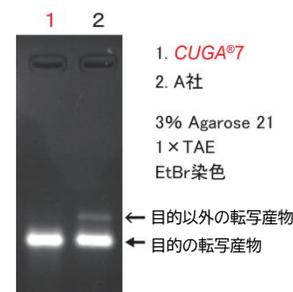


図2 電気泳動による比較

▼ *in vitro* 切断チェック (化学合成gRNAとの比較)

本品で合成したsgRNA(A)と、化学合成gRNA (crRNA / tracrRNA, B)を用いて、標的配列を含むDNA断片を*in vitro*で切断した。

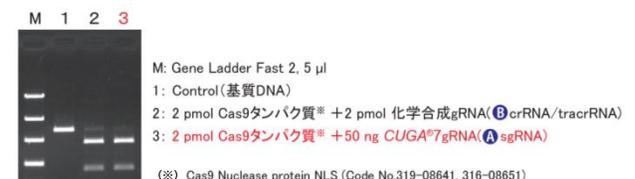
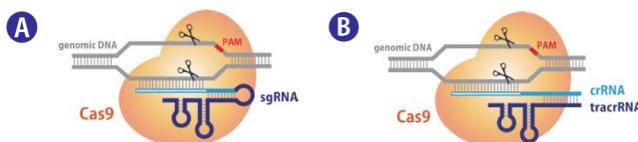


図3 *in vitro* 切断チェック (化学合成gRNAとの比較)

本品で合成したgRNAは化学合成品と同等に機能することが確認できた。

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
314-08691	CUGA [®] 7 gRNA Synthesis Kit	50 回用	54,000

※ CUGA[®] 7 gRNA Synthesis Kitは、ERS Genomics社からゲノム編集ライセンスを受けて製造・販売しております。ライセンスの範囲は、メーカーホームページをご参照ください。

概要

mRNAのキャッピングは、mRNAの安定化や生物活性の維持、自己/非自己認識による免疫応答の回避において重要な役割を果たします。TriLink社のCleanCap® mRNAは生体内での免疫反応を回避するキャッピング(Cap1)により、*in vivo*条件での翻訳効率が改善されており、高活性なCas9 mRNAとしてご使用いただけます。

特長

- パターン認識受容体を活性化させないCap1構造により、免疫反応を回避
- Cap0 (ARCA)に比べて*in vivo*条件での翻訳効率が大きく改善
- エンザイムキャッピングと比較して大幅なコストダウンを実現

5-methoxyuridine修飾について

mRNAからウリジンを削減し、かつ残ったウリジンを5-methoxy Uridine (5moU)に置換することで遺伝子発現量が増加します。TriLink社では5moU修飾されたCas9 mRNAをラインアップしています。

コードNo.	メーカーコード	製品名	容量	希望納入価格 (円)
556-33821	L-7606-20	CleanCap® Cas9 mRNA	20 μ g	30,000
552-33823	L-7606-100		100 μ g	71,000
550-33824	L-7606-1000		1 mg	390,000
-	L-7606-5		1 mg \times 5	照会
554-33741	L-7206-20	CleanCap® Cas9 mRNA (5moU)	20 μ g	36,000
550-33743	L-7206-100		100 μ g	85,000
558-33744	L-7206-1000		1 mg	465,000
-	L-7206-5		1 mg \times 5	照会
551-33751	L-7207-20	CleanCap® Cas9 Nickase mRNA (5moU)	20 μ g	36,000
557-33753	L-7207-100		100 μ g	85,000
555-33754	L-7207-1000		1 mg	465,000
-	L-7207-5		1 mg \times 5	照会

※ Cas9 mRNAはBroad, MIT, Harvard, Iowa, UTokyo, およびRockefellerによって付与された制限付きライセンスの下で提供されます。

任意の修飾塩基や合成スケールでRNAを受託合成

TriLink社 RNA受託合成サービス

TriLink社はアメリカ サンディエゴに拠点を置く、オリゴヌクレオチド合成メーカーです。修飾塩基を使用した核酸合成や長鎖のRNA合成を得意としており、製品やサービスの品質が高いことで研究者から支持されています。TriLink社ではご指定いただいた配列のガイドRNA (gRNA)合成が可能です。合成スケール、修飾塩基、精製方法などをご指定いただけます。

gRNA受託合成をご希望の方は、弊社営業もしくは販売代理店までお問い合わせください。ご依頼内容を伺った上、御見積もりを提示させていただきます。なお*in vitro*転写合成によるmRNAの受託合成も可能ですのでご相談ください。

サービス内容例 (ガイドRNA合成の場合)

- 合成スケール: 1 μ mol \sim
- 修飾核酸: Phosphorothioate, 2' -OMeなど
- 精製方法: HPLC精製など

※ gRNAの設計サービスは行っておりません。gRNAの全長配列情報が必要です。

概要

Cas9 Nuclease protein NLSは、*Streptococcus pyogenes* 由来のCas9ヌクレアーゼを、組換え大腸菌で発現・精製したものです。核移行シグナル (NLS: nuclear localization sequence) を有しており、合成したガイドRNA (gRNA) と組み合わせることでゲノム編集に利用することができます。

特長

- 高純度・高品質のCas9タンパク質
- 15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ の高濃度品をラインアップ
- 核移行シグナル (NLS) を付加
- 低エンドトキシン (1 EU/ μg 未満)
- 国内製造の為、大容量バルクの供給や特注製造にも対応可能

実験データ

▼ ヒトiPS細胞の遺伝子ノックイン

Cas9 Nuclease protein NLS (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) を用いて、ヒト末梢血単核球 (PBMC) 由来iPS細胞201B7株のノックイン (KI) 細胞株を作製した。また、ドナーDNAとして、XX遺伝子に存在する制限酵素 (HindIII) サイトをEcoRI に置換した150 ntのssODNを使用した。ゲノム編集により、HindIIIサイトがある標的配列にノックアウト、ノックインなどの遺伝子変異が生じると、HindIIIでは切断されない。また、ssODNにはEcoRIサイトを付加しているため、ssODNによるKIに成功するとEcoRIによって切断されるバンドが生じる。よって、図1において両アレルKI (ホモKI) 候補は6、16、21レーンのサンプルである。

【装置】: 4D-Nucleofector (Lonza)
 【細胞数】: 0.5×10^6 cells/EP
 【Cas9タンパク質】: 100 pmol Cas9タンパク質 (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)
 【セレクション方法】: 限界希釈・ピッキング
 【薬剤選抜】: 無

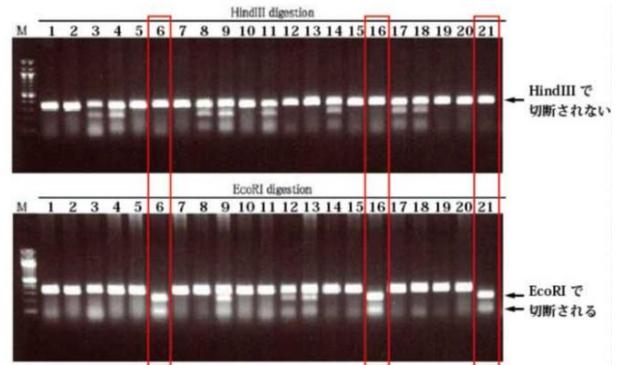


図1 シングルクローン細胞株のスクリーニング (ホモKIサンプル例)

▼ ノックインマウスの作出

マウス *Smpd3* 遺伝子を標的として、Cas9 Nuclease protein NLS (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) とgRNAおよびノックインドナーDNAを混合し、C57BL/6Jマウス受精卵の前核と細胞質にマイクロインジェクションした。マウス2細胞期胚を仮親に移植し、誕生した仔マウスについて遺伝子ノックインの有無を確認した (表1及び図2)。結果、誕生した11匹の仔マウスのうち6匹のマウスにおいて遺伝子ノックインが確認された。

受精卵注入		産仔作出結果		
注入胚数	移植胚数	総胎児数	ノックアウト匹数 (%)*	ノックイン匹数 (%)*
123	114	11	6/11 (54.5%)	6/11 (54.5%)

※ 総胎児数あたり

表1 Cas9 Nuclease protein NLSを用いた遺伝子変異動物作製結果

【注入溶液】: [Cas9タンパク質 (最終濃度30 ng/ μl)], [gRNA (最終濃度50 ng/ μl)], [100 base ssODN (最終濃度100 ng/ μl)]
 【注入方法】: 細胞質と前核の2step-injection [マウス系統]: C57BL/6J Jcl [ssODN]: loxPを含む一本鎖オリゴヌクレオチド

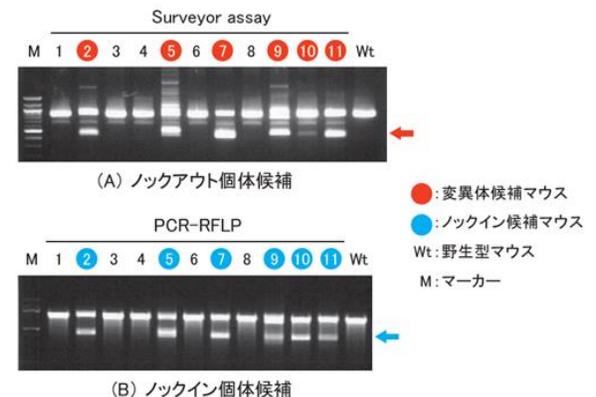


図2 ノックアウト及びノックイン個体候補の確認

(A) Surveyorアッセイによる変異導入の確認。変異導入されたサンプルでは、Cel-Iヌクレアーゼにより切断されたPCR産物が観察された (→)。
 (B) PCR-RFLPによる変異導入の確認。ドナーDNAに予め制限酵素 (BamHI) サイトを付加し、PCR後、BamHIで消化した (→)。

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
319-08641	Cas9 Nuclease protein NLS (3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	75 μg	23,000
316-08651	Cas9 Nuclease protein NLS (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)	300 μg	75,000

* Cas9 Nuclease protein NLSは、ERS Genomics社からゲノム編集ライセンスを受けて製造・販売しております。ライセンスの範囲は、メーカーホームページをご参照ください。

在庫限り

Cas9 Nuclease protein NLS (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) サンプル提供中

当社ではニッポンジーン Cas9 Nuclease protein NLS (15 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) のサンプル (75 μg) を無償提供中です。ご希望のお客様は当社ホームページにてお申し込みください。
 ※提供は予告なしに終了させていただく場合がございます。

Cas9タンパク質 和光純薬

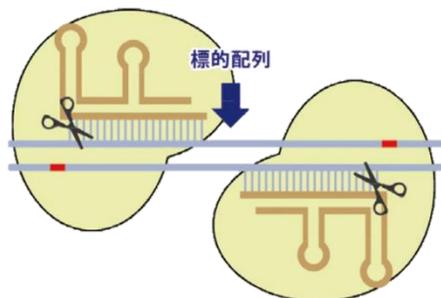
検索



概要

Cas9 Nickase protein NLSは、*Streptococcus pyogenes* 由来のCas9ヌクレアーゼに変異(D10A)を導入し、組換え大腸菌で発現・精製したタンパク質です。ニックアーゼ改変型Cas9はDNAの一本鎖のみを切断しニックを入れる活性をもちます。

Cas9 Nickase によるDNA切断機構



Nickase型Cas9は同時に2種類のガイドRNAを使用することでゲノム編集を行うことができ、オフターゲット効果を抑制します。

特長

- DNAの一本鎖のみを切断
- 2種類のガイドRNAで オフターゲット効果を抑制
- 核移行シグナル(NLS)を付加
- 15 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ の高濃度

内容

起源	遺伝子組換え大腸菌
酵素形状	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% Glycerol
構成成分	Cas9 Nickase protein NLS

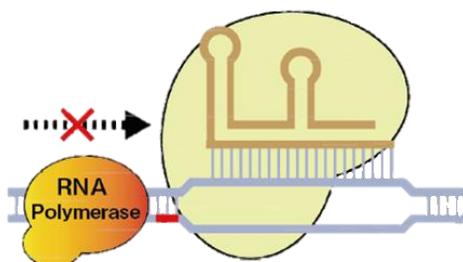
コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
317-09161	Cas9 Nickase protein NLS (15 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	300 μg	75,000

※ Cas9 Nickase protein NLSは、ERS Genomics社からゲノム編集ライセンスを受けて製造・販売しております。ライセンスの範囲は、メーカーホームページをご参照ください。

概要

dCas9 protein NLSは、*Streptococcus pyogenes* 由来のCas9ヌクレアーゼに変異(D10A, H840A)を導入し、組換え大腸菌で発現・精製したタンパク質です。DNA切断活性をもちません。ガイドRNAを介して標的配列に結合することができ、転写抑制などの研究に応用が期待されます。

dCas9による転写抑制機構



ガイドRNAを介して転写開始部位の下流にdCas9が結合すると転写伸長を阻害し転写を抑制します。

特長

- DNA切断活性をもたない
- ガイドRNAにより標的配列を認識し結合
- 核移行シグナル(NLS)を付加
- 15 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$ の高濃度

内容

起源	遺伝子組換え大腸菌
酵素形状	10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 50% Glycerol
構成成分	dCas9 protein NLS

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
314-09171	dCas9 protein NLS (15 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$)	300 μg	75,000

※ dCas9 protein NLSは、ERS Genomics社からゲノム編集ライセンスを受けて製造・販売しております。ライセンスの範囲は、メーカーホームページをご参照ください。

概要

GenomONE®-GEはセンダイウイルスのゲノムを不活化した粒子(HVJ-E)であり、簡便な操作でCas9タンパク質およびガイドRNA(gRNA)を動物細胞に導入することができるトランスフェクション試薬です。エレクトロポレーションのように特別な装置は必要なく、バイオセーフティーレベル1の実験室で使用することができます。これまでトランスフェクションが困難であった免疫細胞に対しても、高効率でCas9タンパク質とgRNAを導入することが可能です。

キット構成と使用量

コードNo.	メーカーコード	キット構成				使用可能回数 (Wells)			
		HVJ-E	Reagent F	Reagent G	Buffer	6-well plate	24-well plate	48-well plate	96-well plate
384-15261	GG001	1本	1本	1本	1本	16	65	130	325
380-15263	GG004	4本	1本	1本	1本	65	260	520	1,300
388-15264	GG016	16本	4本	4本	2本	260	1,040	2,080	5,200

実験データ

▼ Mouse primary T cellへのCas9タンパク質及びgRNAの導入 (ノックアウト)

T cellはBALB/cマウスから採取したSplenocyteをPMA/ionomycinで1日間刺激後、カラムを用いて分離した。GenomONE®-GE、他社製品C、他社製品Tを用いてCas9タンパク質およびCyclophilin B標的のgRNAを導入した。2日後、T7 Endonuclease I アッセイでゲノム編集効率を検証した。

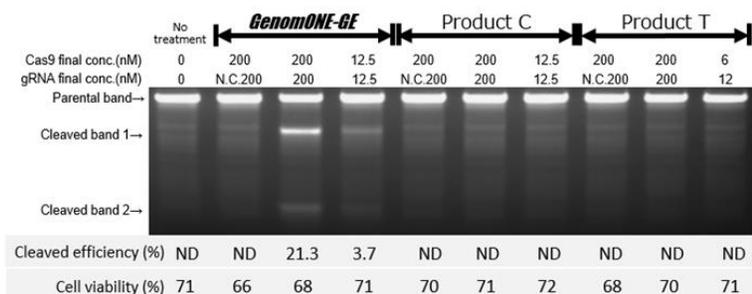


図1 Mouse primary T cellへのCas9タンパク質およびgRNAの導入 (N.C.はNegative Control)

GenomONE®-GEでは他社試薬よりも高いゲノム編集効率を得られた。

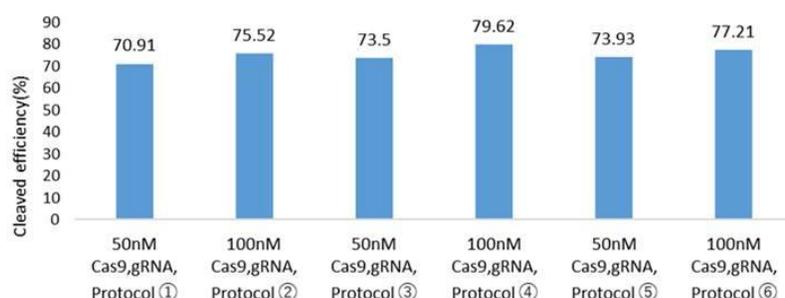
Cleaved efficiency (%) = sum of cleaved band intensities / (sum of the cleaved and parental band intensities) x100

▼ Jurkat細胞 (ATCC: TIB-152)へのCas9タンパク質及びgRNAの導入 (ノックアウト)

ハウスキーピング遺伝子Cyclophilin B遺伝子をターゲットとして、Cas9タンパク質(ニッポンジーン、コードNo. 316-08651)とsgRNAをトランスフェクションした。37 °C、5% CO₂で2日間培養後にノックアウト効果をT7 Endonuclease I アッセイで評価した。

Step	手順	Protocol ①	Protocol ②	Protocol ③	Protocol ④	Protocol ⑤	Protocol ⑥
1	HVJ-E 懸濁液 をチューブに採取	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	8 µL	8 µL
2	Cas9タンパク質溶液 を添加し、ピペティングで十分に混合	0.8 µL	1.6 µL	0.8 µL	1.6 µL	0.8 µL	1.6 µL
3	Reagent F を添加し、ピペティングで十分に混合	1.6 µL	1.6 µL	1.6 µL	1.6 µL	3.2 µL	3.2 µL
4	10,000g, 4°C, 5min, 遠心後、上清除去						
5	Buffer で再懸濁 (均一な白濁状態になるまでピペティング)	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL	8 µL	8 µL
6	50µM gRNA溶液を添加し、ピペティングで十分に混合	0.5 µL	1 µL	0.5 µL	1 µL	0.5 µL	1 µL
7	Reagent G を添加し、ピペティングで十分に混合	1 µL	1 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
8	Step 1-7 で調製したベクターを細胞に添加	5.5 µL /well	6 µL /well	6.5 µL /well	7 µL /well	10.5 µL /well	11 µL /well

- 細胞密度
80,000 cells / well / 500µL
(トランスフェクション試薬調製直前にプレーティング)
- 培地
RPMI1640 + 10% FBS
- Plate
24-well plate



標準的なプロトコルであるProtocol①で70.9%の編集効率を得られた。またReagent Gの使用量を増やしたProtocol③で73.5%、Cas9タンパク質とsgRNAの使用量を増やしたProtocol④で79.6%のゲノム編集効果が観られた。

▼ HeLa細胞へのCas9タンパク質及びgRNAの導入（ノックイン）

GenomONE®-GE を用いてCas9タンパク質、gRNA、ドナーDNA (ssODN) をHeLa細胞に導入した。2日後、ターゲット遺伝子を含む断片をPCRで増幅後に制限酵素BamHI処理したサンプルをアガロースゲル電気泳動にて解析した。

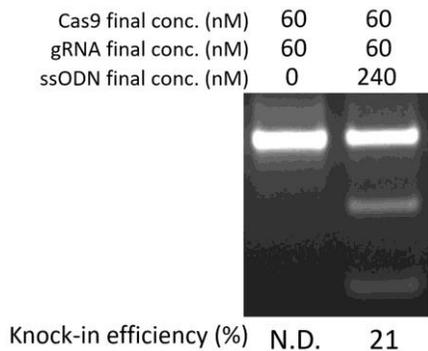
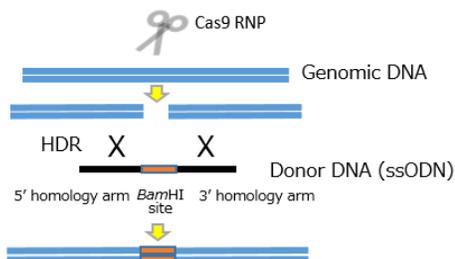


図2 HeLa細胞へのCas9タンパク質、gRNA、ドナーDNAの導入（ノックイン）

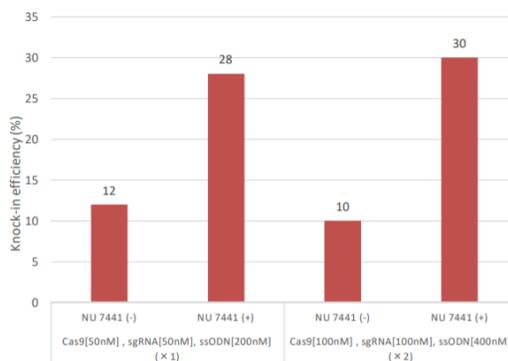
GenomONE®-GEにより21%のノックイン効率を得られた。

▼ U-937細胞へのCas9タンパク質及びgRNAの導入（ノックイン）

GenomONE®-GE を用いてCas9タンパク質（ニッポンジーン、コード No. 316-08651）、gRNA、ドナーDNA (ssODN)をU-937細胞 (ATCC:CRL-1593.2) に導入した。

またノックインの効率を向上させるエンハンサーとしてNU7441 (Tocris コードNo. 513-90411)をトランスフェクションの1時間後に添加し、1日後新しい培地に交換した。

トランスフェクションの2日後、RFLP (BamHI処理)でノックイン効率を測定した。



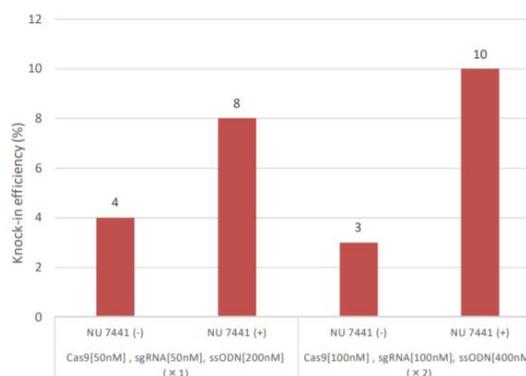
エンハンサーNU7441により、U-937細胞においてノックイン効率の向上(10→30%)が確認された。

▼ K-562細胞へのCas9タンパク質及びgRNAの導入（ノックイン）

GenomONE®-GE を用いてCas9タンパク質（ニッポンジーン、コード No. 316-08651）、gRNA、ドナーDNA (ssODN)をK-562細胞 (ATCC:CCL-243) に導入した。

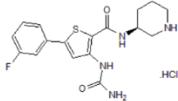
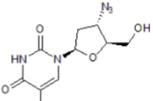
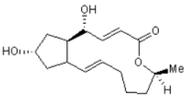
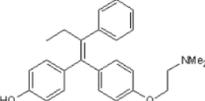
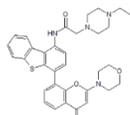
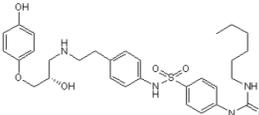
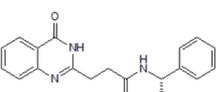
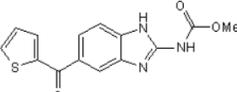
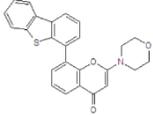
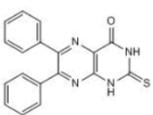
またノックインの効率を向上させるエンハンサーとしてNU7441 (Tocris、コードNo. 513-90411)をトランスフェクションの1時間後に添加し、1日後新しい培地に交換した。

トランスフェクションの2日後、RFLP (BamHI処理)でノックイン効率を測定した。



エンハンサーNU7441により、K-562細胞においてノックイン効率の向上(3→10%)が確認された。

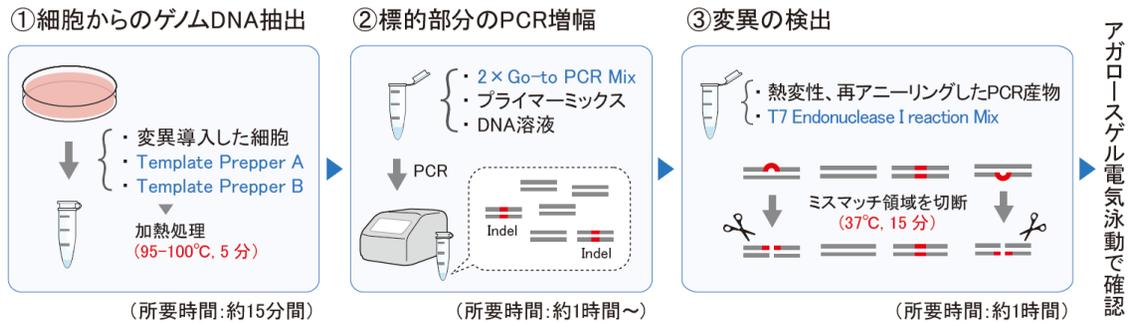
コードNo.	メーカーコード	製品名	容量	希望納入価格(円)
384-15261	GG001	GenomONE®-GE	1セット	28,000
380-15263	GG004		4セット	75,000
388-15264	GG016		16セット	280,000

コードNo.	メーカーコード	製品名	容量	希望納入価格(円)
-	5199/10	AZD 7762 hydrochloride	10 mg	59,000
		iPS細胞においてCRISPR-Cpf1によるゲノム編集の効率を向上させます。 <参考文献> Ma, X., et al. : <i>Nature communications</i> , 9(1), 1303(2018).		
-	4150/50	Azidothymidine	50 mg	17,000
		CRISPR-Cas9による相同組換え修復(HDR)の効率を低下させます。 <参考文献> Yu, C., et al. : <i>Cell stem cell</i> , 16(2), 142(2015).		
-	1231/5	Brefeldin A	5 mg	38,000
		iPS細胞においてCRISPR-Cas9によるHDRの効率が最大で約2倍向上します。 <参考文献> Yu, C., et al. : <i>Cell stem cell</i> , 16(2), 142(2015).		
-	3412/10	(Z)-4-Hydroxytamoxifen	10 mg	49,000
		CRISPR-Cas9のオフターゲット作用を低減し、最大25倍高い特異性を示します。 <参考文献> Davis, KM., et al.: <i>Nature chemical biology</i> , 11(5), 316(2015).		
-	4840/10	KU 0060648	10 mg	72,000
		CRISPR-Cas9の非相同末端結合(NHEJ)を最大40%抑制し、HDR効率が2~4倍向上します。 <参考文献> Robert, F., et al.: <i>Genome medicine</i> , 7(1), 93(2015).		
530-94041	2197/10	L-755,507	10 mg	46,000
		iPS細胞においてCRISPR-Cas9によるHDR効率が、大きなフラグメントでは2-3倍、ポイントミューテーションでは約9倍向上します。 <参考文献> Yu, C., et al.: <i>Cell Stem Cell</i> , 16(2), 142(2015).		
-	5054/10	ME 0328	10 mg	56,000
		CRISPR-Cas9によって誘導したHER2遺伝子変異の頻度が向上することが報告されています。 <参考文献> Wang, H. and Sun, W.: <i>Cancer letters</i> , 385, 137(2017).		
556-37841	1228/10	Nocodazole	10 mg	24,000
		CRISPR-Cas9によるHDR効率が9-31%向上します(細胞周期による)。 <参考文献> Lin, S., et al.: <i>elife</i> , 3, e04766(2014).		
513-90411	3712/10	NU 7441	10 mg	50,000
		CRISPR-Cas9によるNHEJを最大40%抑制し、HDR効率を2-3倍向上させます。 <参考文献> Robert, F., et al.: <i>Genome Medicine</i> . 7(1), 93(2015).		
550-37501	5342/10	SCR7 pyrazine	10 mg	62,000
		<i>in vitro</i> においてCRISPR-Cas9によるNHEJを抑制し、HDR効率を最大19倍向上させます。 <参考文献> Chu, TV., et al.: <i>Nature biotechnology</i> , 33(5), 543(2015). Maruyama, T., et al.: <i>Nature biotechnology</i> , 33(5), 538(2015).		

概要

Rapid Indel Detection Kitは、ゲノム編集による変異導入を迅速に確認できるキットです。本品は、簡易DNA抽出試薬、高正確性PCR酵素、変異(挿入または欠失:Indel)の検出に使用するT7 Endonuclease I reaction Mix(次ページ参照)で構成されています。

使用例



実験データ

Indel切断の確認

18塩基を欠失させたDNA断片と、欠失のないDNA断片の割合が理論上5~50%になるように調製したDNAを鋳型に2 x Go-to DNA Mixを用いてPCR増幅した。熱変性、再アニールしたPCR産物とT7 Endonuclease I reaction Mixを反応させた後、電気泳動を行った。

変異の割合が5%でも検出することができた。

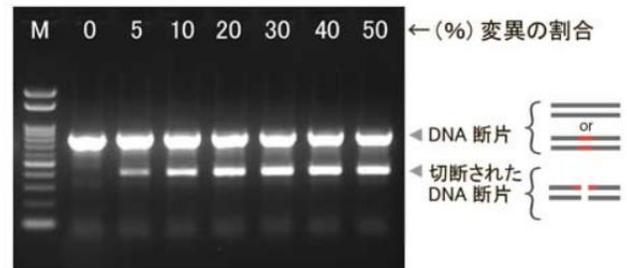


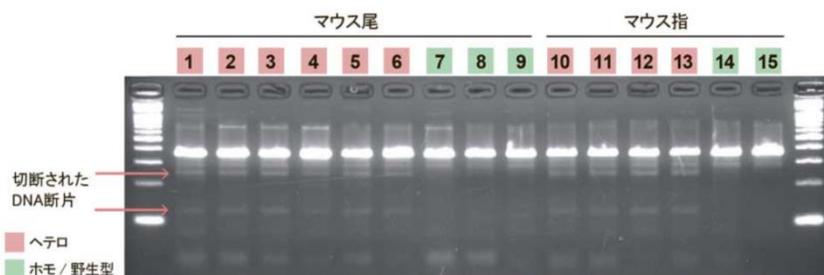
図1 T7 Endonuclease Iで切断されたDNA断片

ゲノム編集マウスのホモ(または野生型)及びヘテロの個体識別

本キットを用いて、F2世代のゲノム編集マウスについて、ホモ(または野生型)、ヘテロの個体識別を行った。マウス尾または指から抽出したゲノムDNAを鋳型に、標的部位を含む領域をPCRで増幅した。



PCR産物を熱変性により解離させ、再アニールした二本鎖DNAを基質とし、T7 Endonuclease I reaction Mixで反応させた後、アガロースゲル電気泳動を行った。また、同時にシーケンス解析を行い、ホモ(または野生型)、ヘテロの判定を行った。



本キットを用いた判定とシーケンス解析結果が一致したことから、本キットがヘテロのマウス個体を正しく検出することを確認できた。

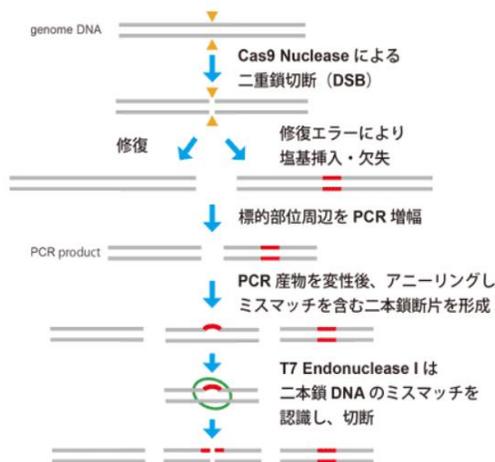
図2 本キットを用いたゲノム編集マウスのホモ(または野生型)、ヘテロの個体識別結果

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
313-08921	Rapid Indel Detection Kit	50 回用	30,000

概要

T7 Endonuclease I reaction Mixは、T7 phage 由来のヌクレアーゼとその反応バッファーが1液タイプになったプレミックス試薬です。本品に含まれるT7 Endonuclease I は、二本鎖DNA のミスマッチを認識・切断する活性を有しており、ゲノム編集技術を用いた変異導入の確認に利用できます。

原理



実験データ

▼ iPS細胞を用いた切断活性試験 (データ提供: 株式会社 特殊免疫研究所)

切断活性の高いgRNAを選定するため、エレクトロポレーション法にてgRNAとCas9からなるRNPをiPS細胞に導入し、バルク細胞集団よりゲノムを回収・変異導入解析を行った。



図1 iPS細胞を標的とした切断活性確認試験

A社切断酵素では切断出来なかった変異導入細胞のゲノムについて、T7 Endonuclease I reaction Mixで切断確認することができた。

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
313-08801	T7 Endonuclease I reaction Mix	50 μ L	15,000

ウェスタンブロットティングにおいてCas9タンパク質を高感度に検出可能

ニッポンジーン 抗Cas9モノクローナル抗体

概要

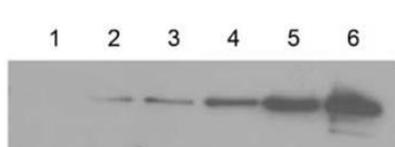
本品は*Streptococcus pyogenes* 由来のCas9タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体です。ウェスタンブロットティングにおいてニッポンジーンの野生型Cas9タンパク質で良好な結果が得られることを確認しています。

特長

- 組換えCas9 タンパク質に対するマウスモノクローナル抗体
- ウェスタンブロットティングにおいて高感度に検出可能

実験データ

Cas9 Nuclease protein NLS に対し、本品を用いてウェスタンブロットティングを行った。



Lane 1: Cas9 0.625 ng
 Lane 2: Cas9 1.25 ng
 Lane 3: Cas9 2.5 ng
 Lane 4: Cas9 5 ng
 Lane 5: Cas9 10 ng
 Lane 6: Cas9 20 ng

● 一次抗体
 Anti-Cas9 Monoclonal Antibody (1 μ g/ μ L) 1:1000
 ● HRP標識二次抗体
 1:5000
 ● HRP検出試薬
 イムノスター® Zeta (富士フイルム和光純薬) *exposure 30sec.

コードNo.	製品名	容量	希望納入価格(円)
310-08431	Anti-Cas9 Monoclonal Antibody	50 μ g	55,000

概要

特殊免疫研究所ではノックアウト/ノックイン動物作製の受託サービスを行っております。塩基置換モデル動物などの作成が可能で、マウスの他、これまでゲノム編集が困難であったラットにも対応しています。標準納期は約3か月です。

作製事例

一塩基置換ノックインラット作製

注入数	生存数	移植数	産仔数
141個	131個	122個	35匹

ラット系統 Wistar系

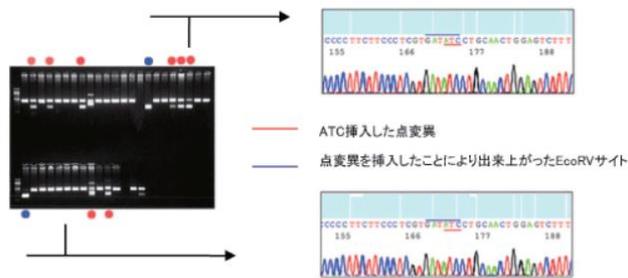
標的遺伝子 ROSA

注入条件 Cas9 mRNA/gRNA/ssODN 100/50/100 (ng/μL)を受精卵細胞質へ注入

Rosa領域に点変異 (EcoRV)を挿入したノックインラット (ホモ個体)のシーケンス確認結果

Wild type ATTCCTTCCCCCTTCTCCCTCGTGAT---CTGCAACTGGAGTCTTTCTGGAAGATAGG
 ホモ個体(上段●) ATTCCTTCCCCCTTCTCCCTCGTGATATCTGCAACTGGAGTCTTTCTGGAAGATAGG
 ホモ個体(下段●) ATTCCTTCCCCCTTCTCCCTCGTGATATCTGCAACTGGAGTCTTTCTGGAAGATAGG

ホモ候補のゲノムDNAをテンプレートにPCRを行い、得られたPCRプロダクトをダイレクトシーケンスした。



【遺伝型解析】

ssODNとして導入した制限酵素サイトを利用したPCRスクリーニング

【実験結果】

変異体取得35 匹中 12 匹(移植胚あたりで約10%)

ノックイン個体10 匹 (●) そのうち2 匹がホモ変異体 (●)

標準価格表

遺伝子変異 indelタイプ作製 (標準作業 Basicプラン:遺伝子変異個体納品)

工程	作業工程	希望納入価格	
		マウス	ラット
1	受精卵への注入物質の準備 gRNA配列設計 CRISPR/Cas9発現ベクターの準備 gRNAおよびCas9 mRNAの調製	45万円	
2	インジェクション作業 受精卵細胞注入100個 作業中の動物維持費(12週間)	90万円	115万円
3	ファウンダー産仔の遺伝型解析 Surveyor Assay 20検体分	40万円	
合計		175万円	200万円

遺伝子変異 塩基置換モデル作製 (標準作業 Basicプラン:遺伝子変異個体納品)

工程	作業工程	希望納入価格	
		マウス	ラット
1	受精卵への注入物質の準備 gRNA配列設計 ssDNAデザイン CRISPR/Cas9発現ベクターの準備 gRNAおよびCas9 mRNAの調製	55万円	
2	インジェクション作業 受精卵細胞注入 200個 作業中の動物維持費(12週間)	125万円	150万円
3	ファウンダー産仔の遺伝型解析 PCR-RFLP 20検体分	45万円	
合計		225万円	250万円

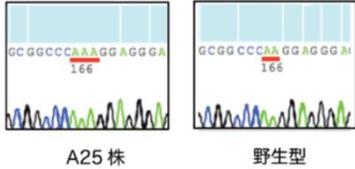
概要

ヒト由来の細胞から細胞初期化 (iPS化)された細胞やがん細胞の特定遺伝子をCRISPR-Cas9を使用して遺伝子を破壊する受託サービスです。単一遺伝子および複数遺伝子の同時破壊も可能です。

作製事例

単一遺伝子DNMT 3Aに対するガイドRNAを作製し細胞に導入後にシーケンス確認を行った。

DNMT3A wt 183>TGATGCGCGGCCAA-GGAGGGAGATGATCGCCCTTCTTCTGGCTCTTTGAGAATGTGG>241
 25A 152>TGATGCGCGGCCAAAGGAGGGAGATGATCGCCCTTCTTCTGGCTCTTTGAGAATGTGG>211



iPS細胞株: 特殊免疫研究所にて樹立したiPS細胞 (Epi5により初期化されたPBMC由来細胞)
 遺伝子導入法: エレクトロポレーション (4D-Nucleofector)
 選抜方法: Puromycin選抜
 gRNAデザイン: gcatgatgcgcgcccgaagg agg (ex20をターゲット)
 Target PAM

[参考資料] Liao, J., et al.: *Nature genetics* 47(5), 469 (2015).

最終納品物

- 凍結保存細胞バイアル1本 (3×10⁶ cells)
- PCRまたはSurveyor assayによる遺伝型解析
- ターゲット領域のシーケンス確認

標準価格表

工程	作業工程	希望納入価格 (円)
1	遺伝子導入 株化細胞をご提供いただきます (融解、培養、増殖、継代) 特殊免疫研究所への細胞導入のための微生物検査 遺伝子導入 Cas9-gRNA発現プラスミド (通常2つの条件で遺伝子導入を実施) 播種、細胞培養	40万円
2	細胞セレクション プラスミド導入後、限界希釈によるサブクローン化作業 培養、増殖、継代 100クローンを目標に作業を行います	80万円
3	解析 (ゲノム抽出から遺伝子解析まで) 取得した全クローンからゲノム抽出 抽出したゲノムDNAを用いたSurveyor Assay (またはPCRスクリーニング)による遺伝子変異の確認 遺伝子変異を確認できた株のシーケンス解析	40万円
4	エキスパンド作業-凍結保存 選抜されたクローンを培養、継代し、細胞を増殖 細胞の増殖作業を終えた後、バイアル作製 (1バイアルあたり5×10 ⁶ -1×10 ⁷ cells/mL)	5万円
合計		165万円

※ ヒトiPS細胞のノックアウト細胞の樹立は247万円となります。
 ※ 限界希釈法による細胞株取得作業が困難と判断した場合、ご依頼者様と協議の上、細胞株の純化作業を進めます。(薬剤耐性遺伝子使用の有無等)
 ※ 工程3にて目的の細胞株が得られていないと確認された場合、ご依頼者様と協議の上、作業を再度実施いたします。

- 本文に記載しております試薬は、試験・研究の目的にのみ使用されるもので、「医療品」、「食品」、「生活用品」などとして使用できません。
- 希望納入価格には消費税等が含まれておりません。

富士フイルム 和光純薬株式会社

本社 〒540-8605 大阪市中央区道修町三丁目1番2号 TEL 06-6203-3741 (代表)
 東京本店 〒103-0023 東京都中央区日本橋本町二丁目4番1号 TEL 03-3270-8571 (代表)

- 九州営業所
- 中国営業所
- 東海営業所
- 横浜営業所
- 筑波営業所
- 東北営業所
- 北海道営業所

フリーダイヤル 0120-052-099
 試薬URL: <https://labchem-wako.fujifilm.com>

■ FUJIFILM Wako Chemicals U.S.A. Corporation
 1600 Bellwood Road, Richmond, VA 23237, USA
 TEL: +1-804-714-1920 FAX: +1-804-271-7791

■ 富士フイルム和光 (香港) 有限公司
 Room 1111, 11/F, International Trade Centre,
 11-19 Sha Tsui Road, Tsuen Wan, N.T., Hong Kong
 TEL: +852-2799-9019 FAX: +852-2799-9808

■ FUJIFILM Wako Chemicals Europe GmbH
 Fuggerstr 12, 41468 Neuss, Germany
 TEL: +49-2131-3111-0 FAX: +49-2131-311-100

■ 富士フイルム和光 (広州) 貿易有限公司
 广州市越秀区先烈中路69号东山广场30楼3002-3003室
 TEL: +86-20-8732-6381 (广州)
 TEL: +86-21-6288-4751 (上海)
 TEL: +86-10-6413-6388 (北京)