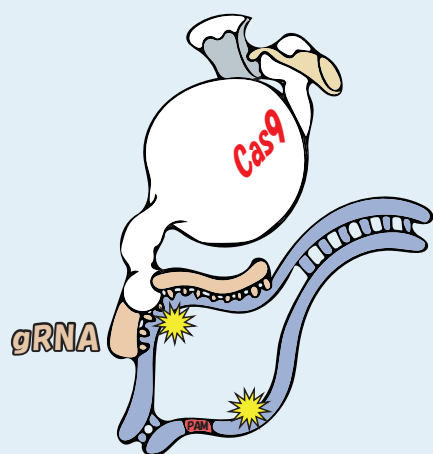




ゲノム編集ツール

ガイドRNA調製から変異導入の確認まで

ゲノム編集の実験フロー



ステップ1

in vitro 転写でのガイドRNA合成

CUGA®7 gRNA Synthesis Kit p.2

ステップ2

Cas9タンパク質の準備

Cas9 Nuclease protein NLS (3 µg/µl), (15 µg/µl) p.3

Cas9 Nickase protein NLS (15 µg/µl) p.3

dCas9 protein NLS (15 µg/µl) p.3

ステップ3

Cas9およびgRNAの細胞導入

ステップ4

変異導入の確認

T7 Endonuclease I reaction Mix p.4

Rapid Indel Detection Kit p.4

【関連製品】 Cas9タンパク質の検出

Anti-Cas9 Monoclonal Antibody p.4

製造元 **株式会社ニッポンジーン**

〒930-0834 富山市問屋町二丁目7番18号
TEL: 076-451-6548 FAX: 076-451-6547
URL: <https://www.nippongene.com>

販売元 **富士フイルム 和光純薬株式会社**

本社 〒540-8605 大阪府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)

フリーダイヤル 0120-052-099 フリーファックス 0120-052-806

CUGA®7 gRNA Synthesis Kit

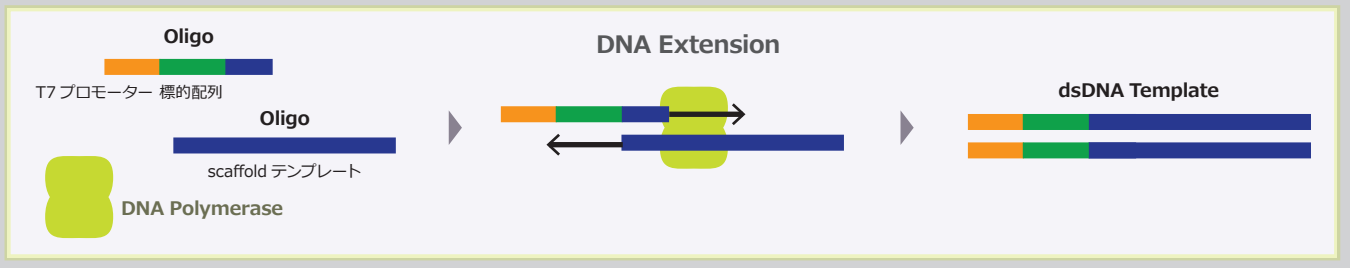
本キットは、ゲノム編集に必要なガイドRNA (gRNA, sgRNA) 等の短鎖RNAを合成・精製するためのキットです。独自開発した改良型T7 RNA Polymerase (CUGA®7 RNAポリメラーゼ) を *in vitro* 転写反応に用いることで、目的のガイドRNAを正確かつ大量に調製することができます。



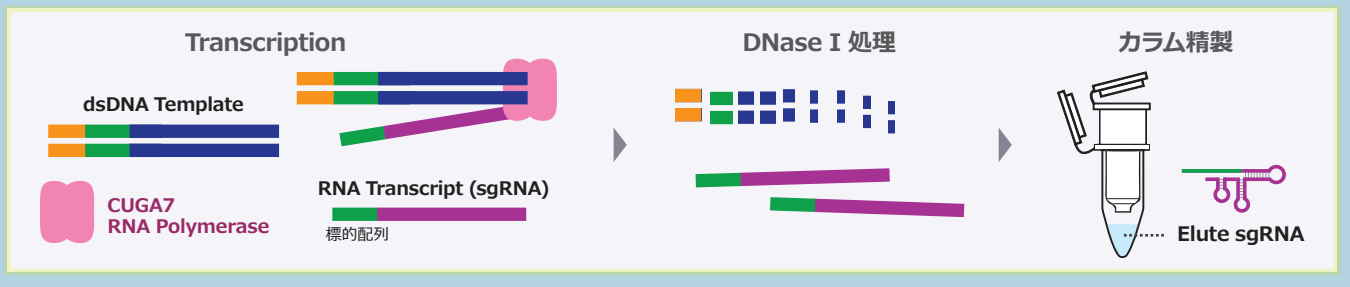
- *in vitro* 転写でgRNAやsgRNAを正確かつ大量に合成
- 転写反応からgRNA精製までの必要試薬を含む*1
- 化学合成gRNAと同等に機能する

<ガイドRNA合成の流れ>

STEP 1. ガイド RNA 合成用鋳型 dsDNA を用意 (キットには含まれません)



STEP 2. CUGA®7 gRNA Synthesis Kit で ガイド RNA を正確かつ大量に合成・精製



<キット構成成分>

ガイドRNA合成用試薬

1. CUGA7 Enzyme Solution
2. 5× Transcription Buffer
3. 0.1 M DTT
4. NTP mix
5. DNase I (RNase free)

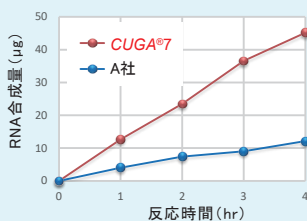
ガイドRNA精製用試薬

1. gRNA Binding Buffer
2. gRNA Wash Buffer
3. Spin Column
4. ddWater (RNase free)

(*1) *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。

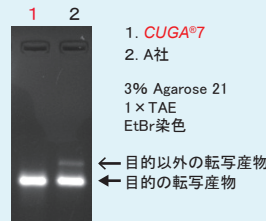
<実験データ>

実験例 1 : gRNA合成量の比較



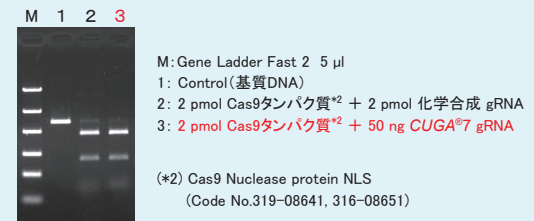
本品及びA社gRNA合成キット(*in vitro*転写法)を用いて、37°Cで1~4時間の条件でsgRNAの合成を行った。反応後、各社マニュアルに従いgRNAを精製し、合成量を比較した。結果、本品はA社と比べて約3倍のgRNAを合成できた。

実験例 2 : 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°Cで2時間反応させgRNAを合成した。精製したgRNA(250 ng)をアガロースゲル電気泳動に供した。結果、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。

実験例 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(single guide RNA:sgRNA)と、化学合成したgRNA(crRNA/tracrRNA)を用いて、標的配列を含むDNA断片を*in vitro*で切断した。結果、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。

Code No.	製品名	容量	希望納入価格
314-08691	CUGA®7 gRNA Synthesis Kit	50 回用	¥54,000

野生型Cas9ヌクレアーゼ <高純度・高濃度> ライセンス対象製品

Cas9 Nuclease protein NLS

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 (nuclear localization sequence: NLS) 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。

- 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の高濃度品をラインナップ!
- 核移行シグナル (NLS) 付加
- 低エンドトキシン (1 EU/ μg 未満)

高濃度品は、グリセロール等の持ち込みを最小限に抑えることができます。

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

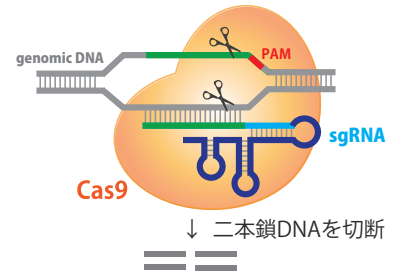


図 1. CRISPR/Cas9 の模式図

ガイド RNA と相補的に結合した任意の配列を二本鎖切断し、DNA 損傷修復機構を利用して遺伝子変異を引き起こします。

Code No.	製品名	容量	希望納入価格
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

改変型Cas9ニッカーゼ ライセンス対象製品

Cas9 Nickase protein NLS

野生型 Cas9 Nuclease に変異 (D10A) が導入されているため、二本鎖DNAの一本鎖のみを切断しニックを入れる活性を持ちます。CRISPR/Cas9システムのゲノム編集の際は同時に2種類のガイドRNAが必要となり、オフターゲットを抑制することができます。核移行シグナル (NLS) を有します。

- 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の高濃度品!
- DNAの一本鎖のみを切断

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

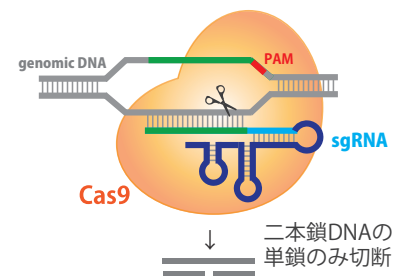
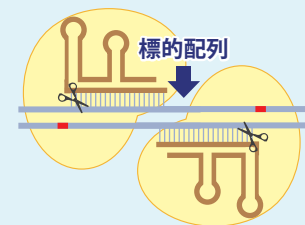
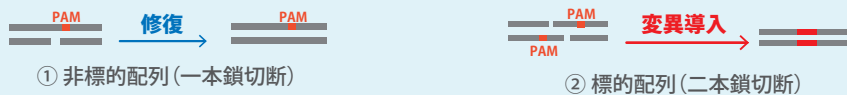


図 2. 改変型 Cas9 ニッカーゼ

標的部位の単鎖のみ切断してニックを挿入します。

オフターゲットを抑制

一本鎖切断 (ニック) は無傷の相補鎖を鋳型として直ちに修復されるため、オフターゲット (非特異的切断により予測していない部位に変異が生じる) が抑制されます (①)。Cas9ニッカーゼによるゲノム編集では、近接した2種類のgRNAをデザインし標的配列の二本鎖を切断します (②)。



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

不活性型dCas9タンパク質 ライセンス対象製品

dCas9 protein NLS

Streptococcus pyogenes 由来のCas9 Nuclease の改変体で、Cas9 (D10A, H840A 変異型) 遺伝子を導入した大腸菌で発現させ、精製したタンパク質です。DNA切断活性を持ちません。本品は15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の高濃度品で、核移行シグナル(NLS)を有します。

- 15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の高濃度品!
- DNA切断活性をもたない

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

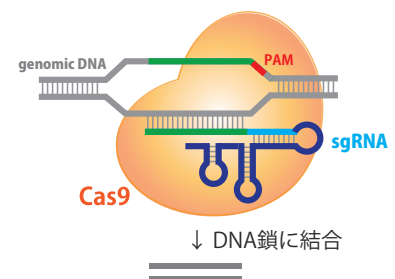


図 3. 不活性型 Cas9 (dead Cas9; dCas9)

ガイド RNA を介して標的配列に結合することができ、転写抑制等の研究への応用が期待されます。

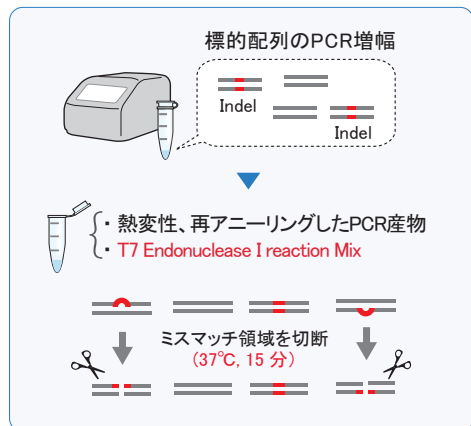
Code No.	製品名	容量	希望納入価格
314-09171	dCas9 protein NLS (15 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	300 μg	¥75,000

ミスマッチ切断酵素 <変異導入の確認>

T7 Endonuclease I reaction Mix

本品は、T7 phage 由来のNuclease とその反応バッファーが一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し、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。

- T7 Endonuclease I と反応Bufferのプレミックス試薬
- 二本鎖DNAのミスマッチを認識し切断
- 大容量バルク供給や特注製造可能



<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、電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。

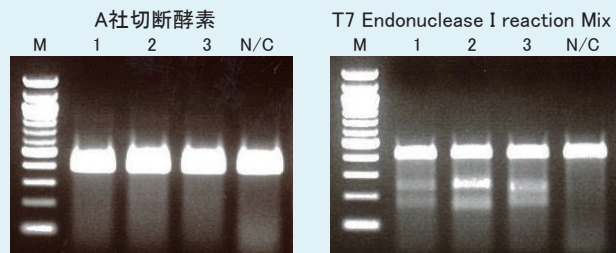


図1 iPS細胞を標的とした切断活性確認試験 M: 100 bp Ladder
1: gRNA 1
2: gRNA 2
3: gRNA 3
N/C: Negative Control (iPS細胞ゲノム)

A社切断酵素では切断でき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。

Code No.	製品名	容量	希望納入価格
313-08801	T7 Endonuclease I reaction Mix	50 μ l	¥15,000

迅速変異導入検出キット

Rapid Indel Detection Kit

本品は、ゲノム編集技術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(Indel)検出用試薬に使用するT7 Endonuclease I reaction Mixで構成されています

- 約15分間でDNAを抽出可能
- PCRと電気泳動で簡単に変異の有無を検出可能
- 変異導入クローンのスクリーニングが可能

<キット構成成分>

簡易DNA抽出試薬

1. Template Prepper A
2. Template Prepper B

高正確性PCR酵素

1. 2×Go-to PCR Mix

変異(Indel)検出用試薬

1. T7 Endonuclease I reaction Mix

Code No.	製品名	容量	希望納入価格
313-08921	Rapid Indel Detection Kit	50 回用	¥30,000

【関連製品】抗Cas9モノクローナル抗体 (Cas9タンパク質の検出)

Code No.	製品名	容量	希望納入価格
310-08431	Anti-Cas9 Monoclonal Antibody	50 μ g	¥55,000

Cas9タンパク質、T7 Endonuclease I 等について
大容量バルクの供給や特注製造も可能です。
お気軽にご相談ください。

ニッポンジーン

検索

日本製

ライセンス対象製品

- Cas9 タンパク質 (野生型、改変型、不活性型)
- ガイドRNA合成キット



Label License (ERS Genomics Limited) はこちら ↑

- 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、「医薬品」、「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。