

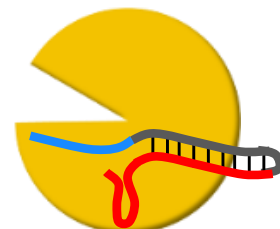
明日からはじめるゲノム編集

－ 効率のよいCRISPR/Cas9を行うために大事なこと －

遺伝子のノックアウトやノックインが行える「CRISPR/Cas9」は、基本的にCas9とsgRNAさえ用意すればスタートできるとてもシンプルな技術で、その簡単さと有効性から多くの研究室で実施されています。ただ、シンプルな中でも効率Upのために大事なポイントがいくつかあります。

本書では、効率と成功率の高いCRISPR/Cas9を行うためのポイントや必要な製品について、Q & A方式で分かりやすくご紹介します。

CRISPR/Cas9に興味はあるけど試したことがない方は、ぜひ本書をきっかけに「明日から」始めてみてください！



Contents

(1) Cas9 & sgRNA導入システムの選択

(2) sgRNAの設計・合成・有効性の確認

(3) 効率のよいノックイン実験のために

(4) Cas9 & sgRNA導入後の変異導入確認方法

[まとめ]

CRISPR/Cas9を行うために必須、もしくは使った方がよい試薬

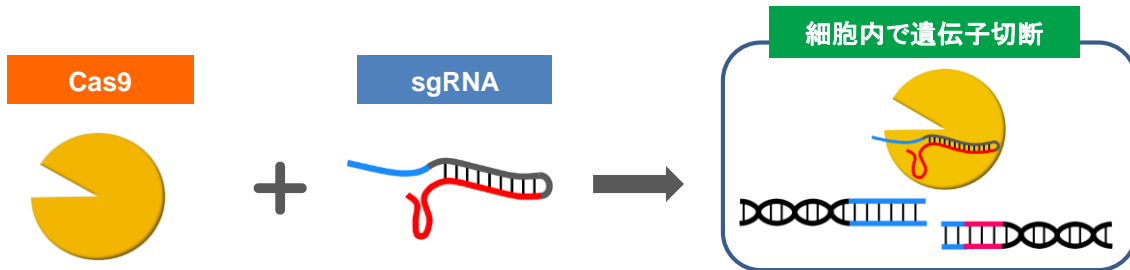
that's
GOOD
science!

(1) Cas9 & sgRNA導入システムの選択

Q1. CRISPR/Cas9は何？

A1. CRISPR/Cas9は、ゲノムDNA切断酵素「Cas9」とゲノム上の狙った箇所を認識するRNA分子「sgRNA」を使用し、ゲノムDNA上の任意の領域を切断することによって遺伝子変異導入を行う技術です。

ゲノムDNAの切断を受けると生体内における修復過程で塩基の欠失・挿入が高確率で生じ、アミノ酸をコードするDNAのフレームシフトが起こり、結果、ターゲット遺伝子が破壊（ノックアウト）されます。つまり、なんらかの形でCas9とsgRNAを導入するだけで遺伝子のノックアウトが行えます。



Q2. CRISPR/Cas9を使ってノックインするためにはどうすればいいの？

A2. Cas9、sgRNAと一緒にノックインしたい配列を含む「ドナーDNA」を導入すれば、ノックインに系が動きます。効率を少しでもUpするノックインのポイントについては(3)Q12で説明しています。

Q3. Cas9、sgRNA の導入には、プラスミドベクター、ウイルスベクター、Cas9タンパク質そのものを使う方法などいろいろあるけど、どれが一番いいの？

A3. Cas9タンパク質そのものを使う方法が第一推奨です。なぜなら下記の通り、多くのメリットがあるからです。

- プラスミドシステムよりゲノム編集効率が高い
- Cas9遺伝子が残存してCas9を発現し続けることによるオフターゲットリスクが少ない
- ほとんどすべての生物で同じCas9タンパク質を使用できる
- タンパク質への転写・翻訳・発現にかかるプロセスがないのでタイムラグがなく効率的
- 低コスト

タカラバイオでは、使いやすく変異導入効率の高いCas9タンパク質をご用意しています。タンパク質が導入できる系をお持ちであれば、ぜひCas9タンパク質をお試しください。

■ 核移行シグナル(NLS)付き、高濃度、低グリセロールのCas9タンパク質

製品名	濃度	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)	3 µg/µl	100 µg	632641	¥25,000
		100 µg × 3	632640	¥68,000

Q4. Cas9タンパク質を使うとき、sgRNAはどう準備すればいいの？

A4. sgRNAを別途調製し、Cas9タンパク質と複合体(RNP)を形成した上で導入します。

sgRNAの調製には、*in vitro* transcription (IVT)を利用してユーザー様ご自身で作製する方法や受託合成を利用する方法があります。タカラバイオではIVT用のキットをご用意しており、詳しくは(2)Q10で説明しています。

Q5. Cas9タンパク質とsgRNA複合体(RNP)の導入方法は？

A5. 培養細胞の場合は、トランスフェクション試薬が有効な場合があります。タカラバイオではRNPの導入に有効なトランスフェクション試薬 *TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System* をご用意しています。トランスフェクションでの導入が難しい場合は、エレクトロポレーションをお試ください。培養細胞だけでなく、組織や受精卵などへの実績もあります。詳しい導入条件につきましては、エレクトロポレーション装置メーカーにお問い合わせください。

■ RNPの導入に最適なトランスフェクション試薬

無料サンプルあります！
ウェブからお申し込みください。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System	0.3 ml	MIR6003	¥22,000
	0.75 ml	MIR6004	¥55,000
	1.5 ml	MIR6000	¥89,000

Q6. プラスミドベクターを使ったCas9とsgRNAの導入にメリットはないの？

A6. いいえ、Cas9タンパク質の導入は難しくてもプラスミドなら入るケースはありますし、sgRNA配列さえクローニングすれば1ベクターでCas9、sgRNA両方の導入ができるというお手軽さも魅力です。タカラバイオでは、1ベクターでCas9とsgRNAの両方を発現でき、さらに蛍光マーカを搭載したプラスミド *Guide-it[™] CRISPR/Cas9 System (Green / Red)* をご用意しています。とにかく簡単にまずはやってみたいときには、プラスミドの使用をおすすめします。

■ 蛍光マーカを搭載したCas9とsgRNAを同時発現するプラスミドベクター

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it[™] CRISPR/Cas9 System (Green)	1 Kit	632601	¥73,000
Guide-it[™] CRISPR/Cas9 System (Red)	1 Kit	632602	¥73,000

ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

Q7. Cas9タンパク質やプラスミドベクターでうまく導入できない場合、どうすればいいの？

A7. 原理の異なる導入システム、例えばウイルスベクターなどをお試ください。タカラバイオではアデノ随伴ウイルス(AAV)を使用した導入システム *AAVpro[®] CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)* (製品コード 632619) をご用意しており、プラスミドでは入りづらい細胞でも変異導入が行えた実績があります。

また、タカラバイオオリジナルの「Gesicle」を使った導入システム *Guide-it[™] CRISPR/Cas9 Gesicle Production System* (製品コード 632613) もあります。エキソソーム様小胞である「Gesicle」は、非ウイルスでありながら、ウイルスの感染機構を利用してCas9タンパク質とsgRNAそのものを直接目的細胞に導入でき、特にトランスフェクション効率が低い細胞(分裂細胞、非分裂細胞、iPS細胞など)に有効です。

■ P1レベルで取り扱うことができる、汎用性の高い1ベクタータイプのウイルスベクター

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
AAVpro[®] CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 Kit	632619	¥150,000

■ 独自の導入原理でトランスフェクション効率が低い細胞に威力を発揮

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it[™] CRISPR/Cas9 Gesicle Production System	1 Kit	632613	¥150,000

ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

(2) sgRNAの設計・合成・有効性の確認

Q8. sgRNAの設計はどうすればいいの？

A8. 一般的なCas9(SpCas9)を用いる場合、標的サイト中でPAM配列(5'-NGG-3'; Nは任意)を探し、その5'側上流の20塩基をsgRNA配列として採用します。もし見つからない場合は、逆鎖側で候補となる5'-CCN-3'を探します。現在は便利なオンラインツールが多数ありますので、それらをお使いいただくのがおススメです。以下に比較的良好に使用されているツールをご紹介します。

- ・CRISPRdirect
- ・CRISPR design tool
- ・CHOPCHOP

また、設計ツールではないですが、短い配列の高速塩基配列検索ができるGGGenomeを使用すれば、他の遺伝子に対する詳細な相同性検索が行えます。

Q9. sgRNAの設計においてオフターゲットを抑えるポイントは？

A9. 現時点で100%オフターゲットを抑制できる配列設計方法はありません。ただ、選択したsgRNA配列が、他の遺伝子サイト中に完全一致配列を持つような著しい相同性を示すものは避けた方がよいです。少し話が変わりますが、変異導入実験を行って得られた表現型の変化がオフターゲットに因るものかどうかを確認するには、同一ターゲット遺伝子に対して複数のsgRNAを設計して変異導入実験を行い、同じ表現型が得られればオフターゲットに起因する可能性は低いと考えられます。

Q10. sgRNAの合成はどうすればいいの？

A10. 試すsgRNA数が少ない場合は、化学合成による受託サービスを利用するのも一つです。ただ、1ターゲット遺伝子に対し複数のsgRNAを試した方がいいと言われており、ターゲットが増えると合成するsgRNAの数も増えてコストもかかります。

ユーザー様ご自身が*in vitro* transcription (IVT) でsgRNAを合成いただくとコストはかなり下がります。

タカラバイオは、IVTに必要な試薬がすべて入ったオールインワンの合成キットGuide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kitをご用意しています。選択したsgRNA配列20塩基を含む約60塩基のプライマーだけ別途ご準備いただく必要がありますが、後はキットに入っている試薬ですべてまかなえ、簡単な操作でコストパフォーマンスの高いsgRNA合成が可能です。しかも1回の合成で12 µg以上のsgRNAが調製できますので、標準的なプロトコールで数十回の実験が行えます。

■ 高品質のsgRNAを簡単操作で合成できるキット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	50回	632635	¥150,000

Q11. sgRNAの有効性を事前に確認するいい方法はないの？

A11. 最終的にどれくらいの変異導入効率になるのかは、実際に試してみないと分かりません。ただ、ゲノムDNAの切断が起こらなければその後の変異導入も起こらないことを考えると、設計したsgRNAが切断活性を持つかどうかを事前に確認することに意味はあります。

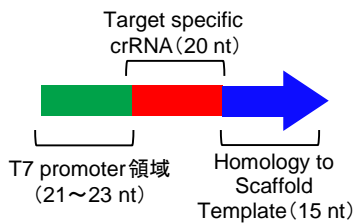
タカラバイオでは、設計したsgRNAがちゃんとゲノムDNAのターゲット領域を切断するかどうかを実サンプルを使わずに *in vitro* の環境で確認できるキットGuide-it™ Complete sgRNA Screening Systemをご用意しています。このキットには、実際にsgRNAを合成するために必要な試薬とCas9タンパク質が入っており、正にCRISPR/Cas9を試験管の中で再現するイメージです。sgRNAを合成する部分は、実はQ10でご紹介したGuide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kit と全く同じですので、切断活性が確認されたsgRNAはそのまま実サンプルを使った本番実験にご使用いただけます。

もちろん、実際の生体内での変異導入には様々なファクターがあり、「切断活性がある＝変異導入が起こる」とは限りませんが、少なくとも切断活性がない、もしくは著しく低くて本番実験でも失敗するリスクを持つsgRNAを使うことは回避できます。ゲノム編集の成功率Upのために、ぜひご利用ください。

■ Guide-it™ Complete sgRNA Screening Systemの各操作ステップ

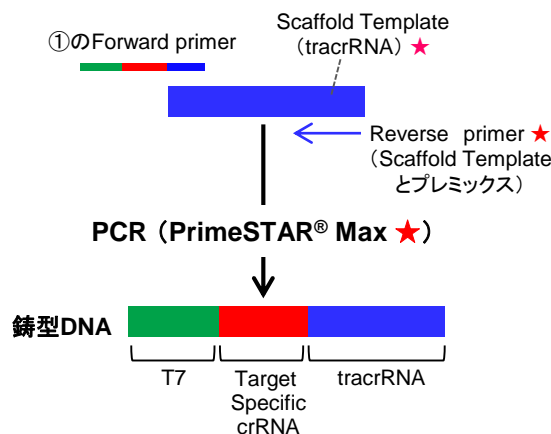
1. sgRNAを合成する

① Forward primerの設計

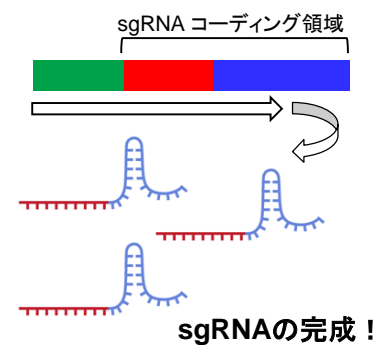


ご自身で設計したターゲット配列にT7 promoter領域とScaffold Template相同領域を付加した形で、Forward primerを合成してください

② PCRによる鑄型DNAの調製

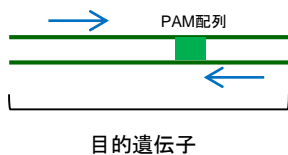


③ *In vitro* transcriptionによるsgRNAの合成

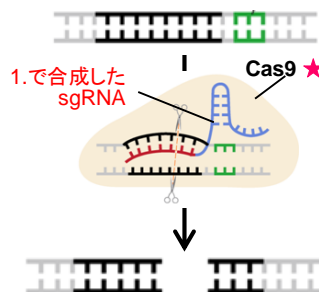


2. 切断効率を確認する

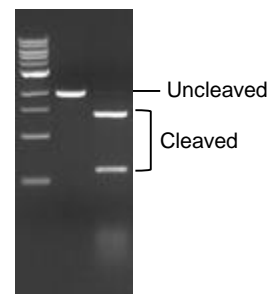
④ 切断確認用ターゲットDNAをPCR (Terra™ PCR Mix ★) で調製



⑤ sgRNAとCas9によるターゲットDNAの切断



⑥ 電気泳動による切断確認



(★は本システムに添付しています。)

■ sgRNAの切断活性を*in vitro*で確認するキット

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	50回	632636	¥180,000

(3) 効率のよいノックイン実験のために

Q12. ノックイン効率をUpするにはどうすればいいの？

A12. ノックインを行うには、ノックインしたい配列を持つドナーDNAを調製する必要があります。

ドナーDNAには、ノックインしたい箇所の上流部分・下流部分をアームとして、挿入配列の左右に持たせる必要がありますが、アームをどのくらいの長さにしたら効率のかについては様々な知見があり定まっていません。ただ、挿入配列が短かければ片アームを30~60 basesくらい、数キロになる長い配列の場合は片アーム200~600 basesくらいが一つの目安となるようです。

また、ドナーDNAは二本鎖DNA(dsDNA)ではなく、一本鎖DNA(ssDNA)で用意した方が効率が良いと言われています。ssDNAの調製は、200 basesくらいまでなら化学合成で行うのが一般的ですので、ポイントミューテーションを入れたい場合はこちらでカバーできます。蛍光・薬剤マーカー、プロモーター、発現カセット、loxP配列など長鎖ssDNAの合成(0.5~5 kbくらい)となると技術的に難しい部分がありましたが、タカラバイオが2017年6月に発売したGuide-it™ Long ssDNA Production System(製品コード 632644)を使用すれば、PCRと酵素処理といった簡単な手法で、長鎖ssDNAが収量よく調製できます。

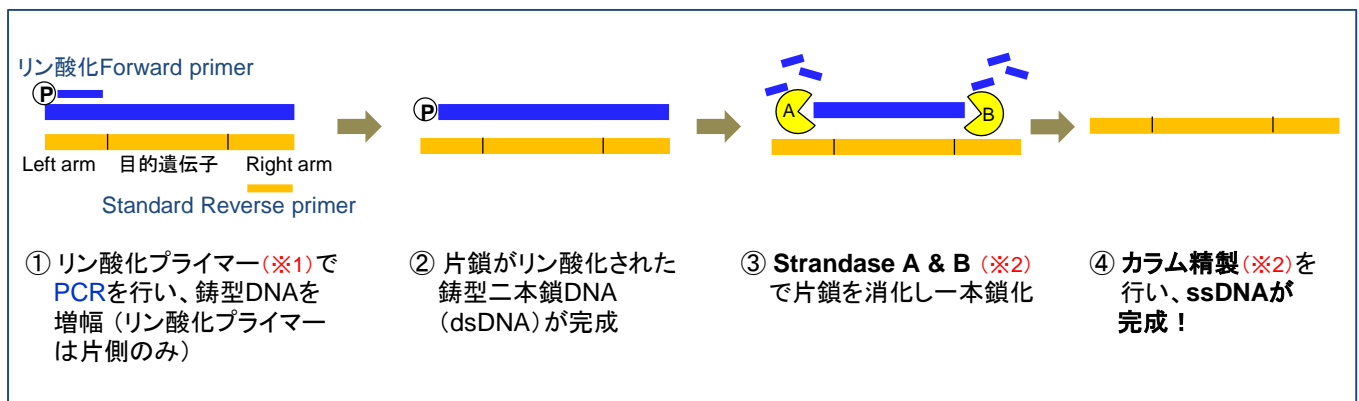
特に長鎖DNAをノックインする場合、dsDNAを使用すると、1)ランダムインテグレーションが起きやすい、2)細胞毒性が高い、など目的クローンの取得効率の低下につながる現象が起こりやすいことが分かっていますので、Guide-it™ Long ssDNA Production Systemを使用してssDNAのノックインドナーを調製することを強くおすすめします。

以下に本システムの特長とプロトコルの概要をご紹介します。

■ Guide-it™ Long ssDNA Production Systemの特長

- CRISPR/Cas9のノックインドナー用長鎖ssDNA調製キット
- 500 bases~5 kbまでのssDNAが調製可能
- 独自技術の「Strandase処理」で二本鎖を一本鎖化
- クローニング操作、ゲル抜き精製不要の簡単プロトコール
- 10 µgのdsDNAから2~4 µgのssDNAを調製

■ プロトコール概要



※1 別途リン酸化プライマーをご準備いただく必要があります。 ※2 本キットに含まれます。

■ 長鎖ssDNAが簡単、高収量で調製可能

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Long ssDNA Production System	25回 ※3	632644	¥75,000

※3 1回分の反応試薬で、センス鎖ssDNAとアンチセンス鎖ssDNAが調製できます。

(4) Cas9 & sgRNA導入後の変異導入確認方法

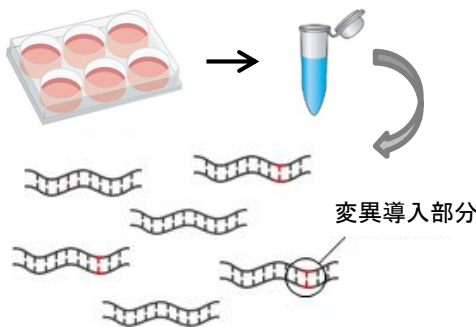
Q13. 変異導入を確認するには、シーケンスするしかないの？

A13. 最終的には、例えば培養細胞であればシングルセルクローニングを行い、目的の変異導入かどうかをシーケンスによって確認する必要があります。しかし、もし変異導入が全く起こっていない、もしくは著しく効率が低い場合にシーケンスなどの詳細な解析を行っても、目的クローンが得られる確率はゼロもしくはとても低いので、結果的に解析にかかった時間、試薬などの多くが無駄になってしまいます。そこでゲノム編集を行うユーザー様の多くは、T7E1アッセイと呼ばれるPCRと電気泳動といった簡単な手法で、そもそも変異導入が起こっているのか、起こっているならどれくらいの効率かをざっくり確認されています。つまり、コストがあまりかからないT7E1アッセイを行って当たりを付け、ある程度の変異導入が起こっていることが確認できた上で、次の大事な解析に進むという訳です。

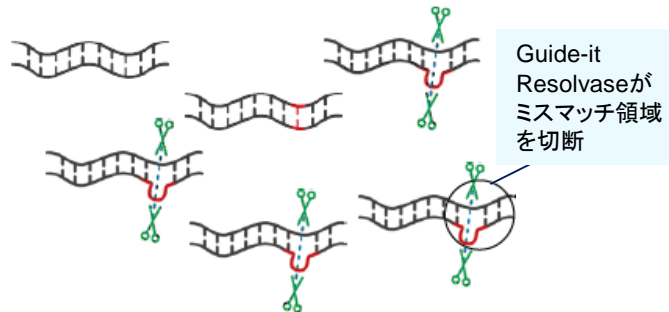
タカラバイオでは、厳密にはT7E1アッセイとは異なりますが、全く同じ目的で使用するGuide-it™ Mutation Detection Kitをご用意しています。本キットは、すべての生物・組織などで幅広く使えます。目的クローンの取得効率Upのために、ぜひ本キットをご利用ください。

■ Guide-it™ Mutation Detection Kitの各操作ステップ

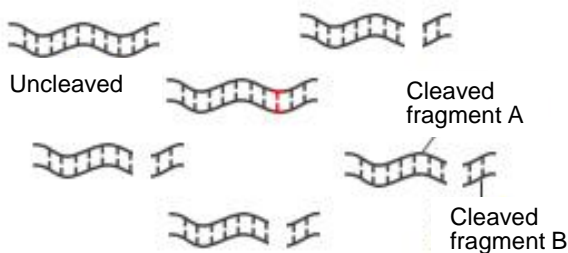
1. 細胞ライセートからTerra™ PCR Direct Polymerase Mixを用いて標的配列を直接増幅



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



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



4. アガロースゲル電気泳動による切断フラグメントの確認(切断=変異導入あり)



■ ざっくり簡単に変異導入効率の確認が可能

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Mutation Detection Kit	25回	631448	¥28,000
	100回	631443	¥88,000

【まとめ】 CRISPR/Cas9を行うために必須、もしくは使った方がよい試薬

■ CRISPR/Cas9を行うために必須の試薬

★Cas9 & sgRNA導入にはCas9タンパク質とsgRNAそのものを使う方法が第一推奨です。


製品名	濃度	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)	3 µg / µl	100 µg	632641	¥25,000
		100 µg × 3	632640	¥68,000

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	50回	632635	¥150,000

★Cas9タンパク質の導入が難しいときや、とにかく簡単にCRISPR/Cas9を行いたいときにはプラスミドベクターがおすすめです。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green)	1 Kit	632601	¥73,000
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red)	1 Kit	632602	¥73,000

 ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。

 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

★ノックアウトDNAの調製キットです。一本鎖DNA(ssDNA)の形で使用することで効率Upにつながります。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Long ssDNA Production System NEW	25回	632644	¥75,000

■ 効率のよいCRISPR/Cas9を行うために使った方がよい試薬

★本番実験前のsgRNAの有効性確認キットです。

切断活性を持たない、もしくは著しく低いsgRNAを用いてしまうリスクを減らせます。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	50回	632636	¥180,000

★変異導入効率を簡単に確認するキットです。目的クローンの取得効率Upにつながります。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Mutation Detection Kit	25回	631448	¥28,000
	100回	631443	¥88,000

・本パンフレットで紹介した製品はすべて研究用として販売しております。ヒト、動物への医療、臨床診断用には使用しないようご注意ください。また、食品、化粧品、家庭用品等として使用しないでください。

・タカラバイオの承認を得ずに製品の再販・譲渡、再販・譲渡のための改変、商用製品の製造に使用することは禁止されています。

・本パンフレットに記載された社名および製品名は、特に記載がなくても各社の商標または登録商標です。

・ライセンス情報については弊社ウェブサイトにてご確認ください。

・本パンフレット記載の価格は2017年8月1日現在の希望小売価格です。価格に消費税は含まれておりません。

2017年7月作成G

タカラバイオ株式会社

東京支店 TEL 03-3271-8553 FAX 03-3271-7282

関西支店 TEL 077-565-6969 FAX 077-565-6995

テクニカルサポートライン

TEL 077-565-6999 FAX 077-565-6995

ウェブサイト <http://www.takara-bio.co.jp>

Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店