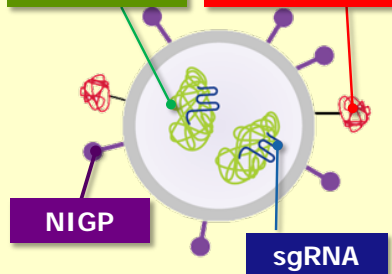


エキソソーム様小胞(Gesicle)によるCas9タンパク質/sgRNAの導入システム Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle System

エキソソーム様小胞(Gesicle)を用いてCas9タンパク質/sgRNAを導入します。
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)でも効率良くゲノム編集が可能です。

Cas9タンパク質 CherryPicker



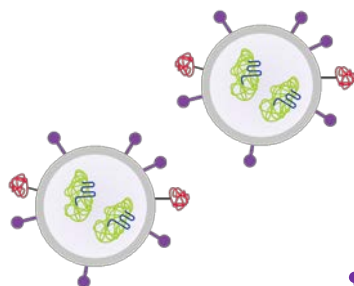
NIGP sgRNA
Cas9/sgRNA Gesicle

Gesicleとは?

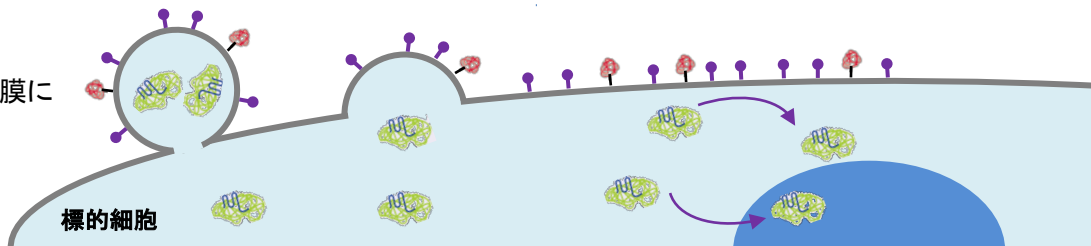
- ◆細胞膜に親和性を持つNanovesicle-inducing Glycoprotein (NIGP)を表面に有する粒子
- ◆NIGPを発現するプロデューサー細胞を用いて産生され、プロデューサー細胞内に存在するタンパク質・核酸等の封入が可能
- ◆さまざまな細胞に融合し、粒子内に封入された物質を移送
- ◆表面にCherryPicker™赤色蛍光タンパク質がついており、蛍光によるGesicleの産生および導入効率のモニターが可能

Cas9/sgRNA Gesicleの細胞内での動き

1 標的細胞へGesicleを添加する



2 Gesicleが細胞膜に融合する



3 Cas9/sgRNAが細胞内へ放出される

4 Cas9/sgRNAが核へ移行する

5 Cas9は細胞内で分解・代謝される



CherryPicker™による標的細胞の蛍光を観察



| 製品名 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) | 備考 |
|---|------|--------|----------|-----|
| Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System ★ | 10回 | 632613 | ¥150,000 | ラ 営 |
| Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Packaging Set | 10回 | 632616 | ¥98,000 | ラ 営 |
| pGuide-it-sgRNA1 Vector System | 10回 | 632612 | ¥68,000 | |
| Gesicle Producer 293T Cell Line ★ | 1 ml | 632617 | ¥59,700 | |

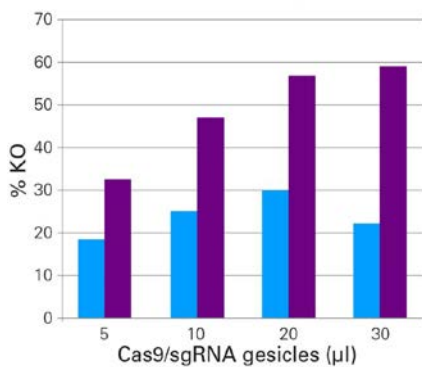
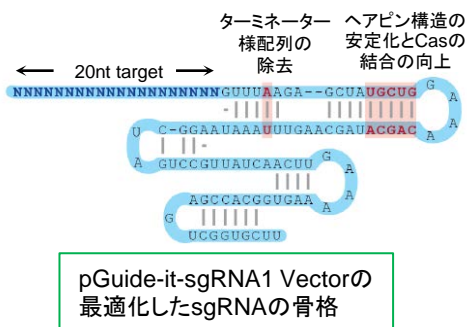
☞ ご購入に際してライセンス確認書が必要となります。 ☞ 営 営利施設の場合、ご購入前にライセンス(有償)を取得する必要があります。

★ Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System(製品コード 632613)は、Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Packaging Set(製品コード 632616)とpGuide-it-sgRNA1 Vector System(製品コード 632612)のセット品です。

★ Gesicleの作製には、専用のGesicle Producer 293T Cell Line(製品コード 632617)の使用を推奨しています。

中面ではGesicleの作製手順や実験例をご紹介します。

■ 最適化した骨格のsgRNA



AcGFP1発現ユニットをゲノム上に1コピー挿入したHT1080細胞株に、通常の骨格のsgRNAおよび最適化した骨格のsgRNAを用いて作製したAcGFP1を標的とするCas9/sgrNA Gesicleを添加し、AcGFP1のノックアウト(KO)効率を比較した。

■ 通常のsgRNAの骨格
■ 最適化したsgRNAの骨格

最適化した骨格のsgRNAの方が高いノックアウト効率を示しました。

■ 最適な標的配列のデザイン

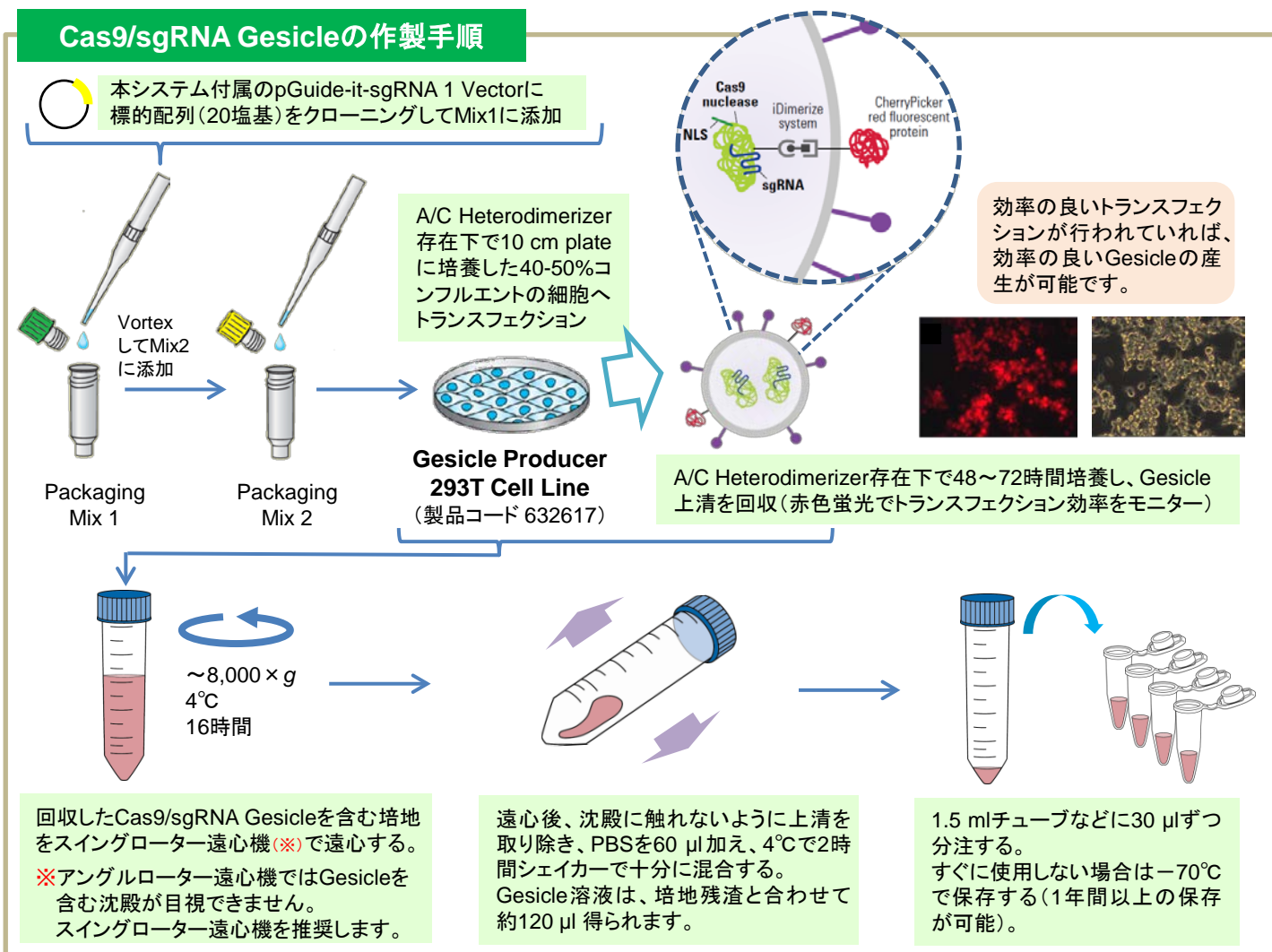
Gesicleの作製において、標的配列の20塩基のうち**最初の配列をGにし、17番目をA/T**にすることが最適な標的配列のデザインであることが判明しました。

その配列で設計したCas9/sgrNA Gesicleは、試験したすべての標的細胞において、KOの効率が最も高くなりました。

Optimal guides: **G** at position 1; **A/T** at position 17

| Target | Target-specific sgRNA sequence |
|----------|---------------------------------------|
| CD81 | G CAGCCCTCCACTCCC A TGG |
| CXCR4 | G GGCAATGGATTGGTC A TCC |
| EMX1 | G AGTCCGAGCAGAAGA A GA |
| AcGFP1 | G TGAATCGCATCGAGCT G AC |
| ZsGreen1 | G ACCATGAAGTACCGC A TGG |

Cas9/sgrNA Gesicleの作製手順



Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System (製品コード 632613)

【製品内容】

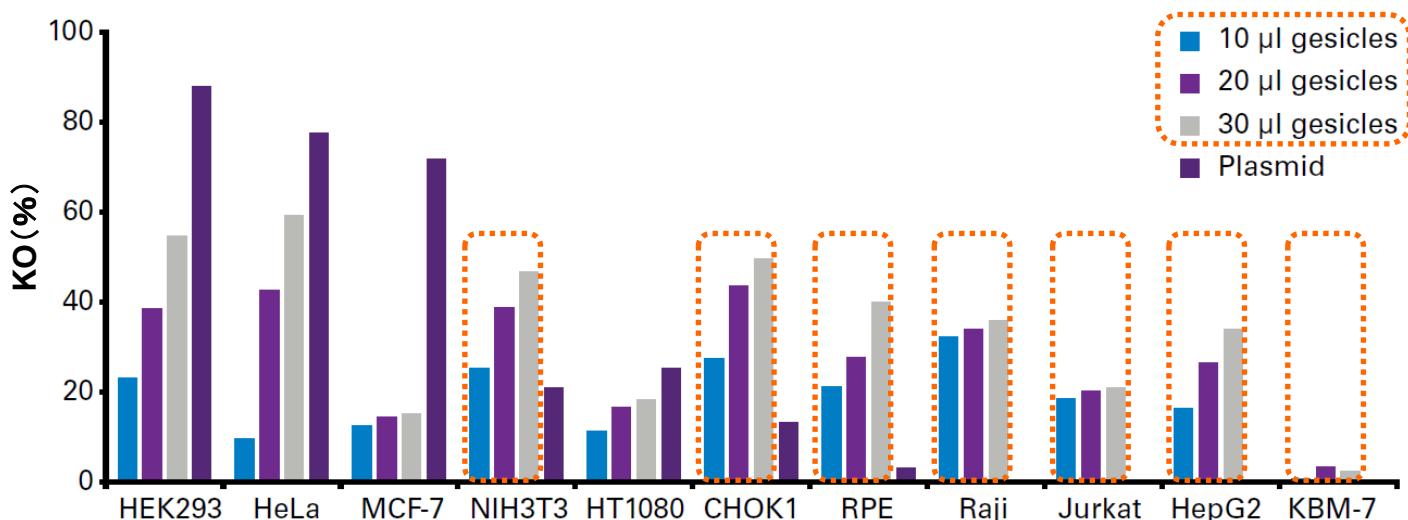
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Packaging Set (製品コード 632616)

- Guide-it CRISPR/Cas9 Gesicle Packaging Mix 1 (緑) 10本
- Guide-it CRISPR/Cas9 Gesicle Packaging Mix 2 (黄) 10本
- A/C Heterodimerizer (500 nM) 50 μl
- Protamine Sulfate (4 mg/ml) 200 μl

pGuide-it-sgrNA1 Vector System (製品コード 632612)

- Guide-it Ligation Components v2 10回
- pGuide-it-sgrNA1 Vector (Linear) (7.5 ng/μl) 20 μl
- Stellar Competent Cells 10回

■ 実験例1: さまざまな細胞におけるノックアウト効率の比較

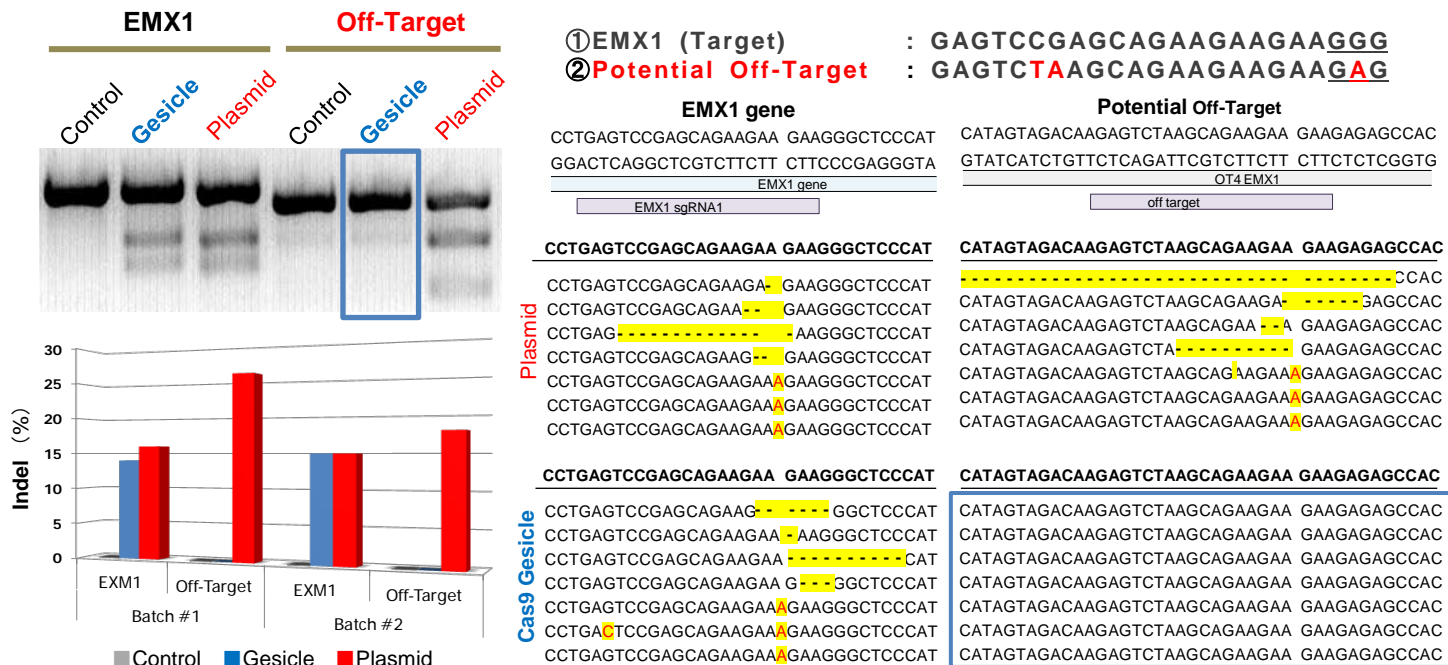


【方法】

ZsGreen1発現ユニットをゲノム上に1コピー挿入した様々な細胞株を樹立し、Cas9/sgrNA Gesicleによるゲノム編集(遺伝子ノックアウト)を行った。ZsGreen1を標的として設計したCas9/sgrNA Gesicle(それぞれ10 µl, 20 µl, 30 µl添加)、または比較としてCas9/sgrNAを発現するプラスミドで処理し、フローサイトメトリーによりノックアウト(KO)効率を評価した。

Cas9/sgrNA Gesicleでは、Jurkat等のトランスフェクションが比較的難しい細胞を含むさまざまな細胞において、高いノックアウト効率を示しました。

■ 実験例2: Off-Target効果の比較

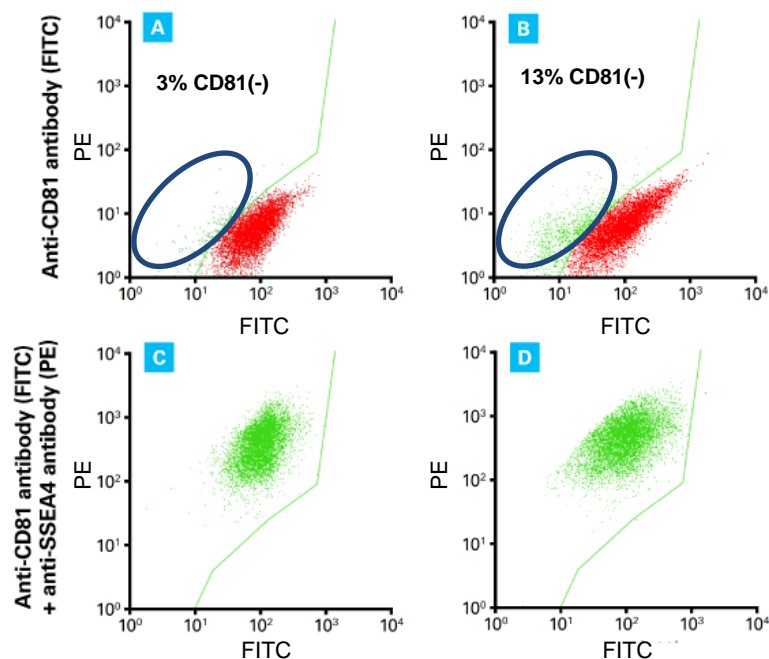


【方法】

①はEMX1を標的遺伝子とする配列、②は①に対してオフターゲットが予測される配列である。①を標的配列とするCas9/sgrNA Gesicleを作製してHEK293T細胞に加え、①およびオフターゲットが予測される②に対するゲノムDNAへの変異導入効率を、Guide-it Mutation Detection Kit(製品コード 631448)を用いて比較した(左図:アガロース電気泳動後、デンシトメーターで変異導入の割合を測定)。比較実験として、プラスミドベクターをトランスフェクション試薬を用いて導入し、同様に変異導入の割合を測定した。さらにこれらの細胞からクローン化細胞を取得して、シーケンス解析を行った(右図:下線配列は元の配列を示す)。

Cas9/sgrNA Gesicleを用いた場合、左図の電気泳動においても、右図のシーケンス解析においても、②のOff-Targetが予想される配列への変異導入は確認できませんでした。

■ 実験例3: 未分化状態を維持した状態でのヒトiPS細胞のゲノム編集



【方法】

Cellartis DEF-CS Culture System (製品コード Y30010) を用いて Cellartis human iPS cell line 18 (製品コード Y00305) を未分化状態で 48 well plate で培養し、ヒト CD81 を標的として設計された Cas9/sgRNA Gesicle を添加した。コントロールとして、Gesicle が含まれない同様の条件下で培養を行った。

培養後の iPS 細胞のノックアウト効率ならびに未分化状態維持を、CD81 を認識する FITC 標識抗体、SSEA4 (※) を認識する PE 標識抗体をそれぞれ用いて、フローサイトメリーにより解析した。

※SSEA4: iPS 細胞の未分化マーカーの1つ

- A** Gesicle (-) Anti-CD81 (FITC)
- B** Gesicle (+) Anti-CD81 (FITC)
- C** Gesicle (-) Anti-CD81 (FITC), Anti-SSEA4 (PE)
- D** Gesicle (+) Anti-CD81 (FITC), Anti-SSEA4 (PE)

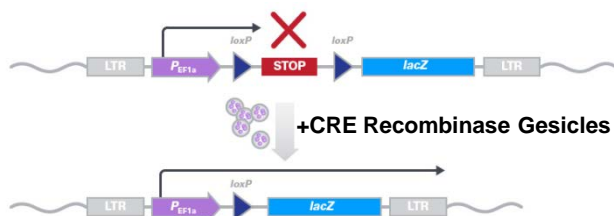
Cas9/sgRNA Gesicle での処理により、未分化状態を維持したまま (パネル D)、約 10% の CD81 ノックアウトが確認できました (パネル B)。

こちらも便利！

CRE Recombinase Gesicles

CRE Recombinase Gesicle が事前に調製された **プレメイドの Cre タンパク質導入試薬** です。試薬を添加するだけの簡単操作で幅広い細胞に Cre タンパク質を効率良く導入が可能です。

■ 実験例: Cre 発現プラスミドと CRE Recombinase Gesicles の比較



左図のような LacZ 遺伝子を含むレポーター細胞株を用いて Cre リコンビナーゼ発現プラスミド、または CRE Recombinase Gesicles で処理し、Beta-Galactosidase Staining Kit (製品コード 631780) により LacZ 遺伝子の発現を検出した。

CRE Recombinase Gesicles を用いた処理で、効率良く LacZ 遺伝子が発現しました。

| 製品名 | 容量 | 製品コード | 価格(税別) |
|--------------------------|--------|--------|---------|
| CRE Recombinase Gesicles | 200 µl | 631449 | ¥82,000 |

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。

- ・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2016年4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。

2016年4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

TaKaRaテクニカルサポートライン

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

Website <http://www.takara-bio.co.jp>

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

取扱店