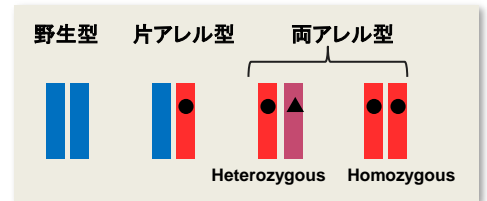


# ゲノム編集後のクローン化細胞の遺伝子型同定に！ **NEW** Guide-it™ Genotype Confirmation Kit

CRISPR/Cas9ゲノム編集システムで、こんなことに困っていませんか？

ゲノム編集でクローン化した細胞の遺伝子型は4パターン

- ◆ 両アレル改変クローンがなかなかとれず、大量のシーケンスでコストと手間がかかる...
- ◆ 3倍体や4倍体のゲノムを扱っていてシーケンスが大変...

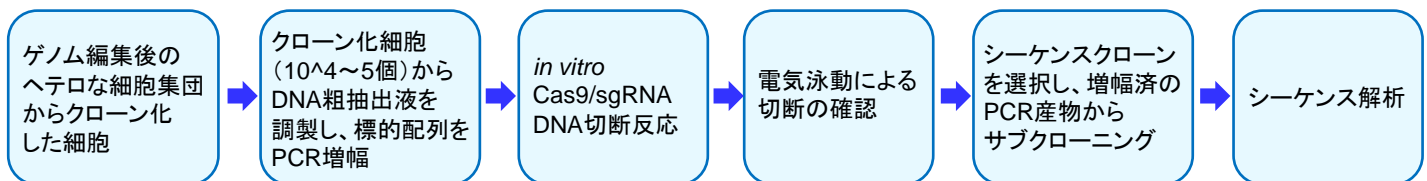


本キットなら両アレル改変クローンの選択ができます！

「Guide-it™ Genotype Confirmation Kit」は、ゲノム編集後のクローン化細胞の粗抽出液から直接PCRを行って標的配列を増幅し、Cas9/sgRNAの*in vitro* DNA切断反応により遺伝子型(野生型、片アレル型、両アレル型)を同定するキットです。これによりシーケンス前にクローンのスクリーニングを行うことができます。

that's  
**GOOD**  
science!

## Guide-it™ Genotype Confirmation Kitの操作フロー



★本キットにはsgRNAの合成するキットは付属していません。sgRNAの合成にはGuide-it sgRNA *In Vitro* Transcription Kit (製品コード631438)を推奨します。

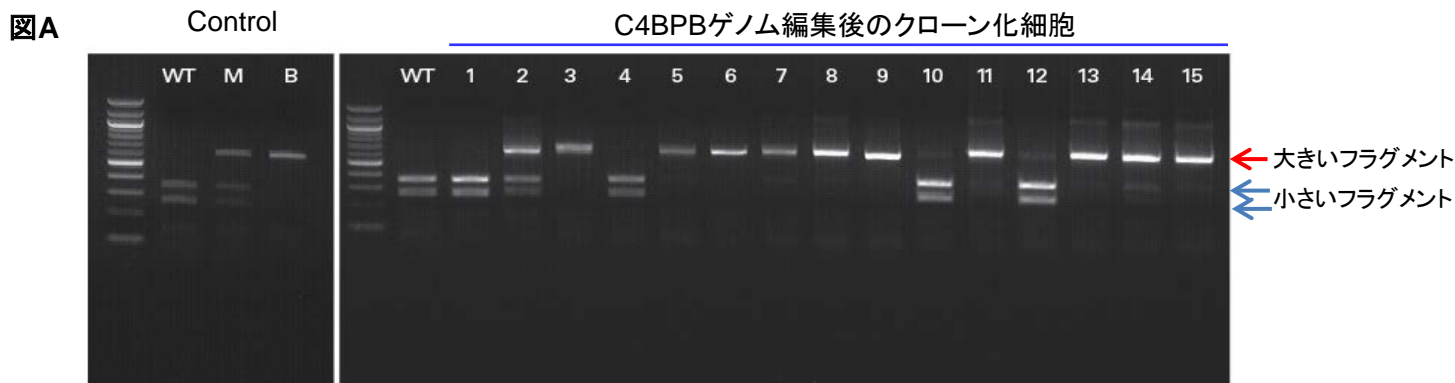
## ◆ Cas9/sgRNAの*in vitro* DNA切断反応による遺伝子型同定の原理

遺伝子型	クローン化細胞からの増幅配列	Cas9/sgRNAによるDNA切断反応	電気泳動パターン
野生型		両方とも切断	2本 小さいフラグメント
片アレル型		片方切断	3本 大きいフラグメント 小さいフラグメント
両アレル型		切断されない	1本 大きいフラグメント

は、Cas9/sgRNAにより認識され、DNA切断反応により完全に切断される。  
 は、ゲノム編集による改変が入っているため、Cas9/sgRNAにより認識できず切断されない。

製品名	容量	製品コード	価格(税別)
Guide-it™ Genotype Confirmation Kit	100回	632611	¥88,000
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	10回	631438	¥70,000

## ◆実験例: クローン化したゲノム編集細胞(HEK293)のジェノタイプング結果(図A)とシーケンス解析結果(図B)



1、4、10、12のクローンは変異が入っていない野生型(WT)。2のクローンは片アレル変異体(M)、3、5~9、11、13~15のクローンは両アレル変異体(B)であることが確認できました。

### 図B

#### Clone #2

Target site: **caatgaccactacatcct** PAM: **caagggcagcaatcggagccagtgctag**

Ref\_2: **aaatcacg tttatg tgc aatgaccactacatcct caagggcagcaatcggagccagtgctag**

allele\_1: **AAATCACGTTTATGTGCAATGACCACTACATCCT CAAGGGCAGCAATCGGAGCCAGTGTCTAG** (4/16)

allele\_2: **AAATCACGTTTATGTGCAATGACCACTACATCCT CAAGGGCAGCAATCGGAGCCAGTGTCTAG** (5/16)

allele\_3: **AAATCACGTTTATGTGCAATGACCACTACATCCT CAAGGGCAGCAATCGGAGCCAGTGTCTAG** (6/16)

HEK293細胞株のゲノムコピー数多型に起因する3パターンのアレル変異。上から変異なし、1変異の挿入、2変異の挿入が起きた片アレル変異型

#### Clone #7

Target site: **caatgaccactacatcct** PAM: **caagggcagcaatcggagccagtgctaga**

Ref\_2: **aaatcacg tttatg tgc aatgaccactacatcct caagggcagcaatcggagccagtgctaga**

allele\_1: **AAATCACGTTTATGTGCAATGACCACTACATCCT CAAGGGCAGCAATCGGAGCCAGTGTCTAGA** (6/14)

allele\_2: **AAATCACGTTTATGTGCAATGACCACTACA AGGGCAGCAATCGGAGCCAGTGTCTAGA** (8/14)

両アレル変異型だがそれぞれ欠失と挿入が起こり異なる変異が入ったヘテロ変異型

#### Clone #9

Target site: **caatgaccactacatcct** PAM: **caagggcagcaatcggagccagtgctagag**

Ref: **aaatcacg tttatg tgc aatgaccactacatcct caagggcagcaatcggagccagtgctagag**

allele\_1: **AAATCACGTTTATGTGCAAT CCGGAGCCAGTGTCTAGAG** (5/5)

両方同じ欠失が起こったホモ変異型

#### Clone #11

Target site: **caatgaccactacatc** PAM: **ctcaagggcagcaatcg**

Ref: **gcaatgaccactacatc ctcaagggcagcaatcg**

allele\_1: **GCAATGACCACTACATCTAGACATTATGTGCAATGACCTCTAGACACTA GGCAGCAATCG** (6/6)

両方同じ挿入と欠失が起こったホモ変異型

図A: C4BPB遺伝子をターゲットとするsgRNAとCas9を用いてHEK293細胞のゲノム編集を行い、得られた15個のクローン化細胞についてGuide-it Genotype Confirmation Kitを用いてターゲット領域のジェノタイプングを行った。電気泳動結果(左)はコントロールの解析例を示す(WT: 野生型、M: 片アレル変異、B: 両アレル変異)。  
図B: 図Aで変異が検出された4つのクローンについてシーケンス解析を行った。小文字は野生型の配列を示す。

### Guide-it™ Genotype Confirmation Kit (製品コード 632611、容量 100回)

- <製品内容>
- Extraction Buffer 1 (5 ml × 4)
  - Extraction Buffer 2 (2 ml)
  - Guide-it Recombinant Cas9 Nuclease (25 µg, 50 µl)
  - 15 × Cas9 Reaction Buffer (100 µl)
  - Terra PCR Direct Polymerase Mix (1.25 U/µl, 100 µl)
  - 2 × Terra PCR Direct Buffer (with Mg<sup>2+</sup>, dNTP) (1 ml × 3)
  - RNase-Free Water (2.5 ml × 4)
  - 15 × BSA (100 µl)
  - Monoallelic Mutant Control Fragment (20 ng/µl, 15 µl)
  - Biallelic Mutant Control Fragment (20 ng/µl, 15 µl)
  - Control Fragment (20 ng/µl, 15 µl)
  - Control sgRNA (50 ng/µl, 10 µl)

・本チラシ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。  
・本チラシ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。  
・本チラシ記載の価格は2015年10月7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。

2015年10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 077-543-6999 FAX 077-543-6995  
 Website <http://www.takara-bio.co.jp>  
 Facebook <http://www.facebook.com/takarabio.jp>

取扱店