

DharmaconTM

Edit-RTM CRISPR-Cas9

ゲノム編集試薬カタログ

簡便で高効率なゲノム編集実験を可能に

遺伝子ノックアウト

遺伝子ノックイン & 塩基配列の挿入・欠失・置換

遺伝子の転写活性化

DharmaconTM

Edit-RTM CRISPR-Cas9ゲノム編集試薬

確実なゲノムエンジニアリングのための最適ツール

Dharmacon Edit-R CRISPR-Cas9ゲノム編集試薬システムでは、機能性の高いデザイン済みガイドRNAが、簡便で高効率なゲノム編集実験を可能にします。遺伝子のノックアウト・ノックイン・転写活性化に対応した製品をラインアップしています。

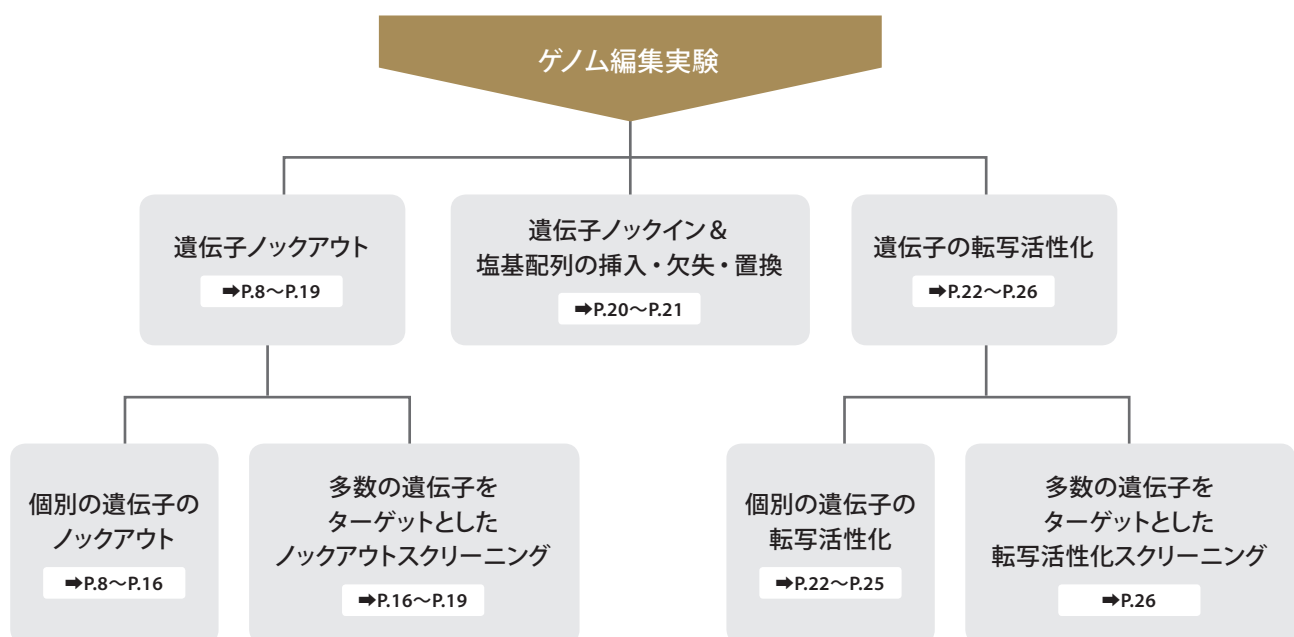
- Dharmacon Edit-RガイドRNA（ノックアウト用）の配列設計には、ノックアウト効率が高く、オフターゲット効果を回避する独自のEdit-R algorithmを採用
- クローニングと精製が不要な化学合成タイプとレンチウイルスベクタータイプの2種類のガイドRNAから選択可能
- アレイ化およびプール化ガイドRNAライブラリーが網羅的なCRISPRスクリーニングを実現
- Horizon Discovery社は、市販化されている中で最大級の使用許諾を保有し、CRISPR-Cas9ゲノム編集試薬を研究用途に提供しています。



Contents

■ お客様の声	4
■ Edit-R CRISPR-Cas9ゲノム編集アプリケーション概要	6
遺伝子ノックアウト	
遺伝子ノックイン&塩基配列の挿入・欠失・置換	
遺伝子の転写活性化	
■ 遺伝子ノックアウト	8
Edit-Rゲノム編集 遺伝子ノックアウト ワークフロー	
ノックアウト用ガイドRNA	
Cas9ヌクレアーゼ	
ライブラリー製品	
■ 遺伝子ノックイン&塩基配列の挿入・欠失・置換	20
■ 遺伝子の転写活性化	22
■ 関連試薬	27
■ (参考) 遺伝子ノックダウン用デザイン済みsiRNA	30
■ 製品検索・注文のご案内	31

下記のフローチャートをご参照いただき、実施するアプリケーションごとに最適な製品を選択してください。



* 細胞への試薬の導入にトランスフェクション試薬を使用する場合は、⇒P.28～P.29 を参照してください。

お客様の声

1

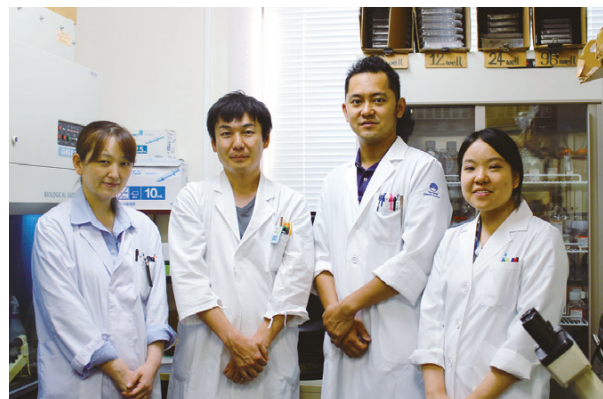
荻原 秀明 様

国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ ゲノム生物学研究分野

ターゲットごとに ベクターを作る必要なし!

がん細胞において、変異頻度の高い遺伝子に着目し、合成致死遺伝子の探索をするという仕事をしています。そこで、変異頻度の高い遺伝子を人工的にノックアウトして、スクリーニングをかけることにしました。そこで、今回はじめてゲノム編集の技術を採用することとなりました。製品選定の際、他社のゲノム編集製品では、1つ1つベクターを、ターゲットごとに作らなければいけないところが、価格面でも、作業量の上でもネックになっていました。その矢先にDharmaconの営業担当者よりDharmaconのゲノム編集製品の紹介がタイムリーにありました。

DharmaconのEdit-R CRISPR-Cas9プラットフォームは、ガイドRNA発現ベクターをクローニングする必要がありません。すぐにトランスフェクション可能なDNAおよびRNAコンポーネントが含まれており、トランスフェクション操作だけでノックアウトできるところがポイントとのことでした。他社と比較すると価格もリーズナブルであり、Webで簡単に設計できると聞き、魅力的な製品であると感じ、採用しました。



また、実験を進める内、Edit-R Lentiviral Blast-Cas9 Nuclease Particlesを用い、Cas9をステイブルに発現させたほうが、ゲノム編集効率が高いという傾向にあることが分かってきました。引き続き、作成したノックアウト細胞を利用し実験を進めているところです。

お客様の声

2

服部 奈緒子 様

国立がん研究センター研究所 分子診断・個別化医療開発グループ エピゲノム解析分野

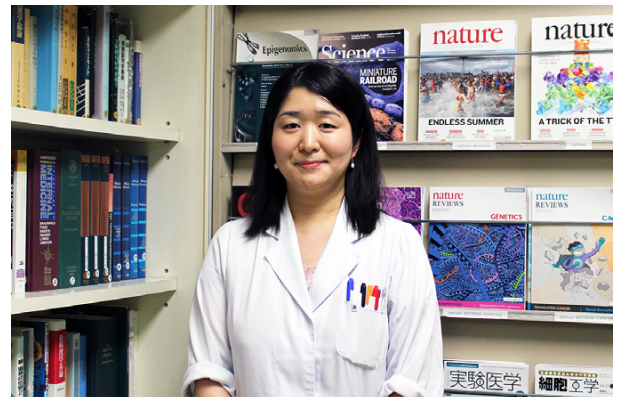
細胞が死なないガイドRNAのクオリティを求めて

服部先生は、がんの発生や予防、治療に関する研究を、エピジェネティックスの観点から進められていらっしゃいます。短期間の薬剤処理実験には Accell siRNA **→P.30** によるノックダウンが有効な手段であるものの、薬剤処理が長期間におよぶ実験にはCRISPR-Cas9によるノックアウト法が適切と考えた服部先生は、ゲノム編集実験にも取り組まれてこられました。そこで、これまでの経験から大事と考えるポイントについて服部先生に伺いました。

大事なポイントその① ガイドRNAのクオリティ

当時実施していたゲノム編集実験では、オリゴヌクレオチドから *in vitro* 転写でガイドRNAを作り、精製カラムを通し、トランスフェクションしていました。最初に使用した細胞株では問題は生じなかったのですが、その後の実験で使用した細胞株が、ガイドRNAのトランスフェクションのみで死んでしまいました。精製カラムで取り除ききれない夾雑物が原因と分かり、手法を変える必要に迫られました。

“細胞を死なせない” ガイドRNAのクオリティは Dharmacon Edit-R CRISPR-Cas9のシステムを導入することでクリアしました。化学合成のため、細胞の生育を阻害するような夾雑物が少ないですし、何よりcrRNAとtracrRNAを混ぜるだけで実験できるので簡便です。



大事なポイントその② ガイドRNA配列デザインのアルゴリズム

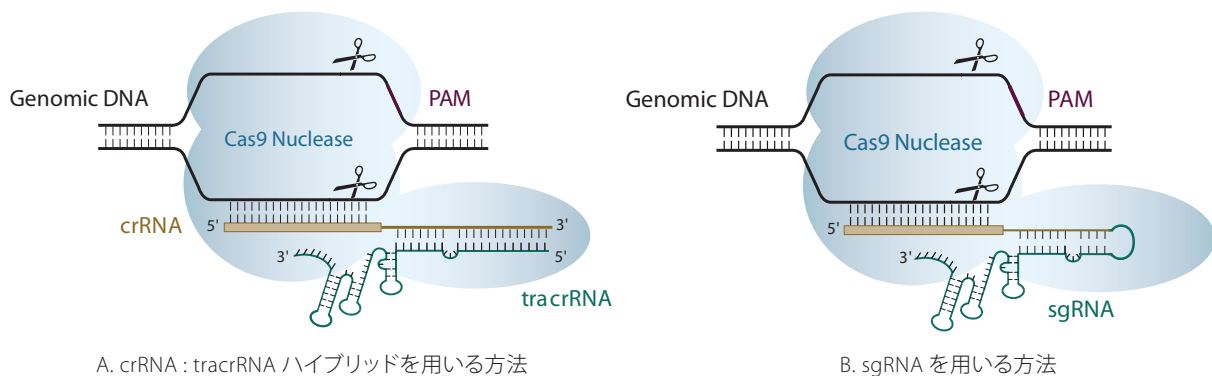
ターゲット遺伝子に対するガイドRNAの配列デザインに取り組んだ際、デザインしたどの配列もオフターゲット効果が出てしまう可能性が高く、困っていました。「この遺伝子に対するガイドRNA設計は無理なのかな」と思いながらも、ゲノム編集に詳しい方に相談したところ、その先生が独自に開発したアルゴリズムでは配列設計ができました。また、Dharmaconのアルゴリズムでも適切な設計ができていました。つまり、失敗要因は遺伝子にあった訳ではなく、配列設計のアルゴリズムにあったのです。今後さまざまな遺伝子に対するゲノム編集実験が増えてくことを考えると、1つ1つ自分たちで配列を設計することは難しく、デザイン済みのガイドRNAを購入できることが望ましいと考えています。どんなガイドRNA配列デザインのアルゴリズムを持っているか、はメーカーを選ぶポイントの1つです。「信頼のDharmacon」ということですかね(笑)。

Edit-R CRISPR-Cas9 ゲノム編集 アプリケーション概要

Horizon Discovery社では、3つのアプリケーションに合わせて、CRISPR-Cas9システムによるゲノム編集に必要なコンポーネントであるガイドRNA (guide RNA) ・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNA (donor DNA) をご用意しています。

遺伝子ノックアウト

塩基配列は既知だが機能のよくわかっていない遺伝子を研究する際に用いられます。RNA干渉 [⇒P.30](#) によるmRNAレベルでの遺伝子ノックダウンでは表現型の違いが検出されない遺伝子の機能研究に有効です。



CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子ノックアウトのメカニズム

Cas9ヌクレアーゼが、ターゲット配列に相補的なガイドRNAと複合体を形成してゲノムDNAのターゲット配列を認識し、PAM配列より上流の二本鎖DNAを切断します。切断されたゲノムは修復機構が働いて再結合しますが、切断されたゲノムの末端は高頻度で欠損あるいは変異します。したがって再結合してもDNAのフレームがシフトし、切断個所の遺伝子がノックアウトされます。

ガイドRNAとしてCRISPR RNA (crRNA) : trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) ハイブリッドを用いる方法と、シングルガイドRNA (single guide RNA: sgRNA) を用いる方法があります。

遺伝子ノックイン&塩基配列の挿入・欠失・置換

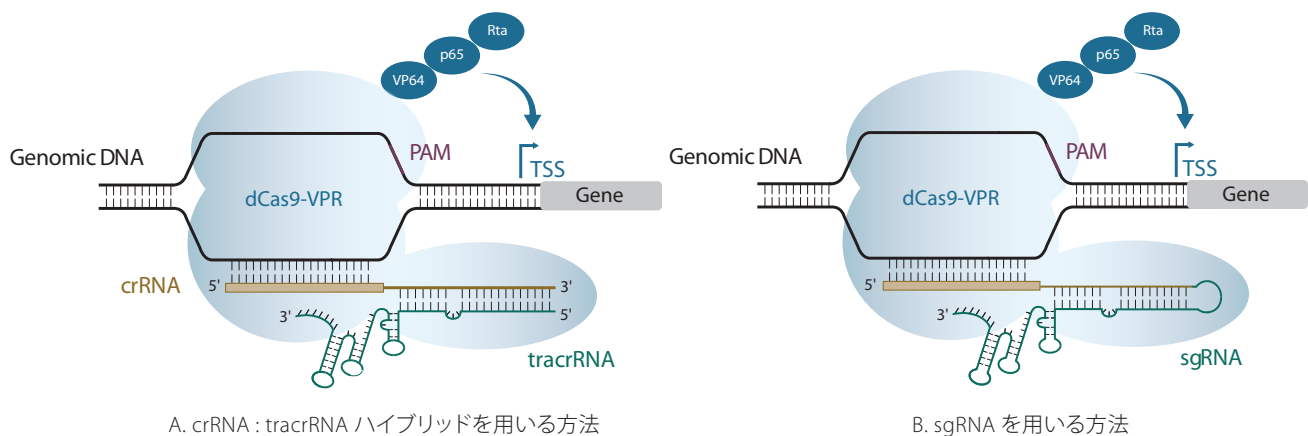
ターゲット遺伝子領域へ突然変異、もしくは外因性遺伝子を導入できます。疾患モデルを作る時や、プロモーター機能等の遺伝子発現制御機構の研究に有効です。

CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子ノックインのメカニズム

ガイドRNA・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNAを使用して、ゲノム上のターゲット部位に、タンパク質をコードする遺伝子を導入したり、塩基配列の挿入・欠失・置換を行う手法です。CRISPR-Cas9による二本鎖切断に続いて起こる相同組み換え修復 (homology-directed repair: HDR) は、特定のゲノム改変位置に隣接した配列に相同性を持つドナーDNA (donor DNA) を必要とする修復経路です。適切に設計されたドナーDNAを使用することで、遺伝子ノックインや塩基配列の挿入・欠失・置換を正確に行うことができます。

遺伝子の転写活性化

遺伝子過剰発現用プラスミドの使用を回避しつつ、内在性の遺伝子の転写活性化を実現します。RNA干渉による遺伝子ノックダウンや、遺伝子ノックアウトによる機能欠損では表現型の違いが検出されない遺伝子の機能研究に有効です。



CRISPR-Cas9 システムによる遺伝子転写活性化のメカニズム

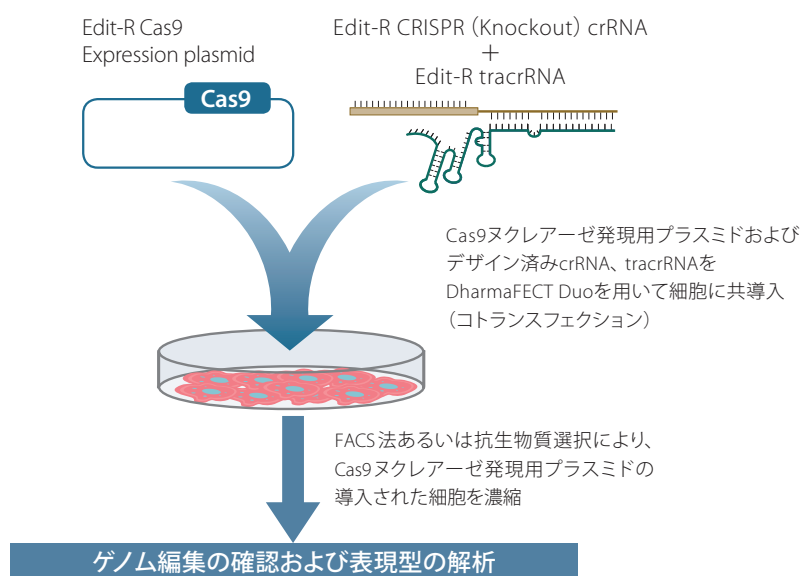
野生型のCas9ヌクレアーゼの持つDNA切断活性を欠失させたdead Cas9 (dCas9) に3種類の転写活性化因子 (VP64、p65、Rta) を融合させた改変Cas9ヌクレアーゼ (dCas9-VPR) と、ターゲット遺伝子のプロモーターあるいは転写開始点 (TSS) に近接した領域に配列設計したガイドRNA (guide RNA) を細胞内に導入し、ターゲット遺伝子の転写を活性化します。dCas9-VPRは、ターゲット配列に相補的なCRISPR RNA (crRNA) : trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) ハイブリッド、あるいはシングルガイドRNA (single guide RNA: sgRNA) と複合体を形成してゲノムDNAのターゲット配列に結合します。そして、ターゲット遺伝子の転写開始点に転写活性化因子が作用することで転写を活性化します。

遺伝子ノックアウト

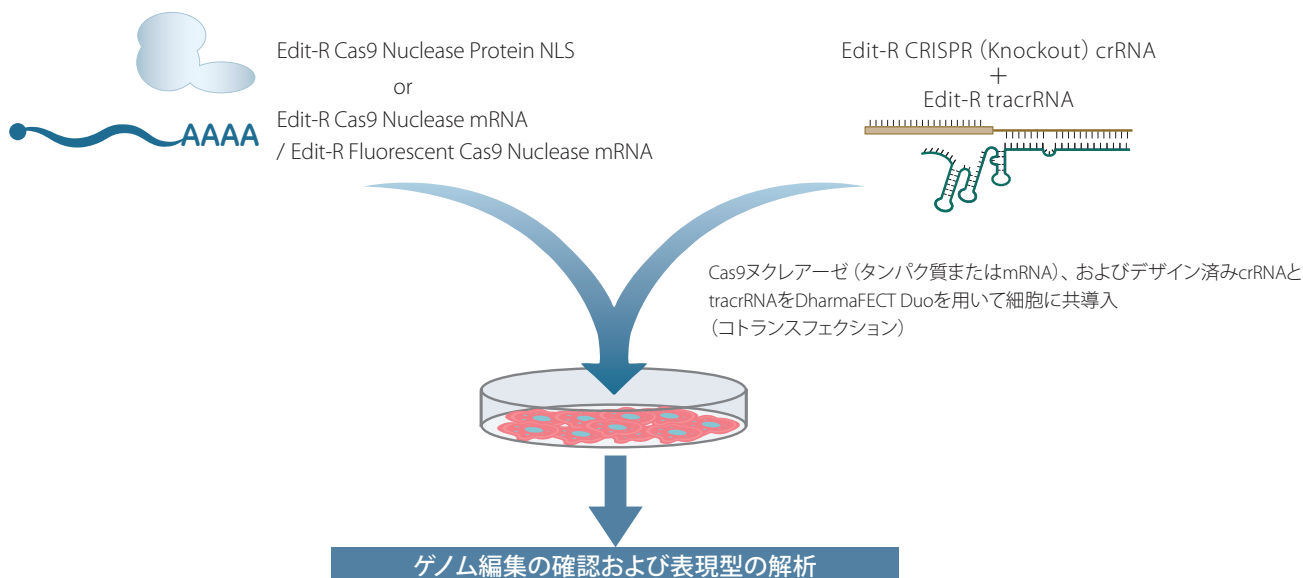
Edit-Rゲノム編集 遺伝子ノックアウト ワークフロー

Edit-R CRISPR-Cas9を使用した遺伝子ノックアウトは、ターゲット遺伝子ごとにベクターを作成する必要がなく、ガイドRNAの精製工程もないため簡便です。実験目的に合わせてガイドRNAとCas9ヌクレアーゼを選択してください。

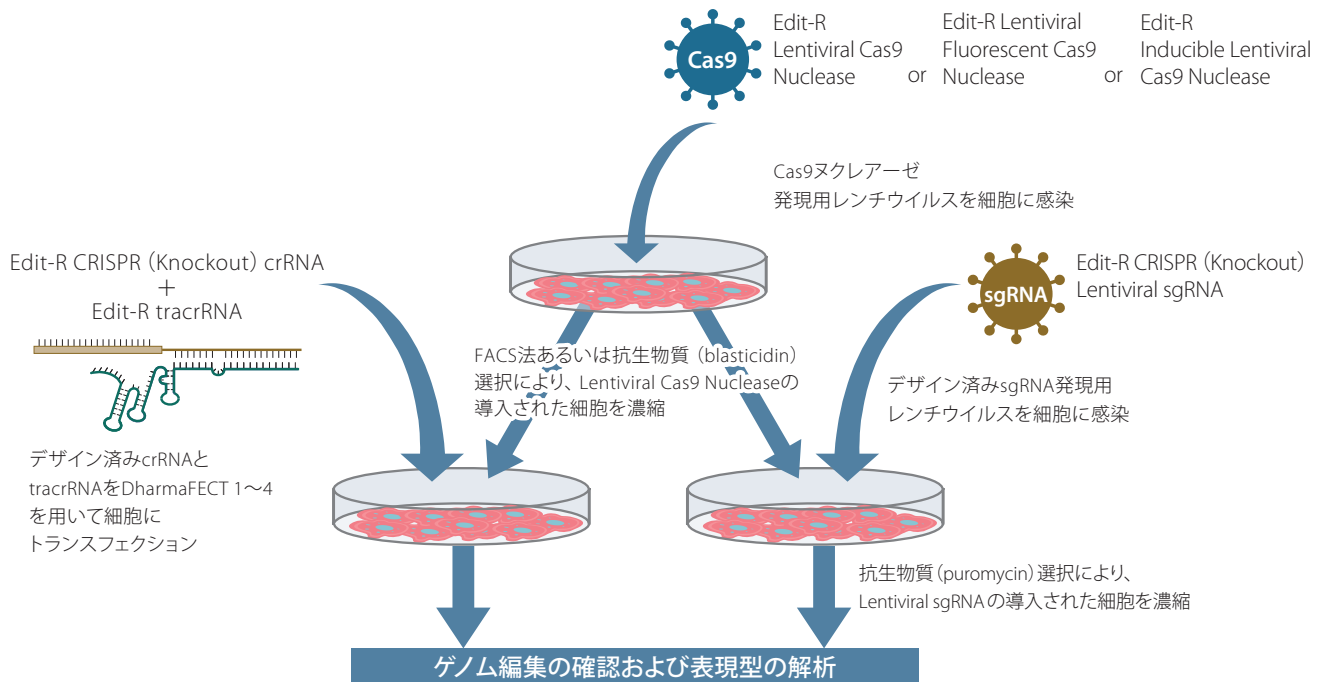
細胞に最適なCas9発現用プロモーター選択を優先させたい場合



DNA-freeの実験を行いたい場合



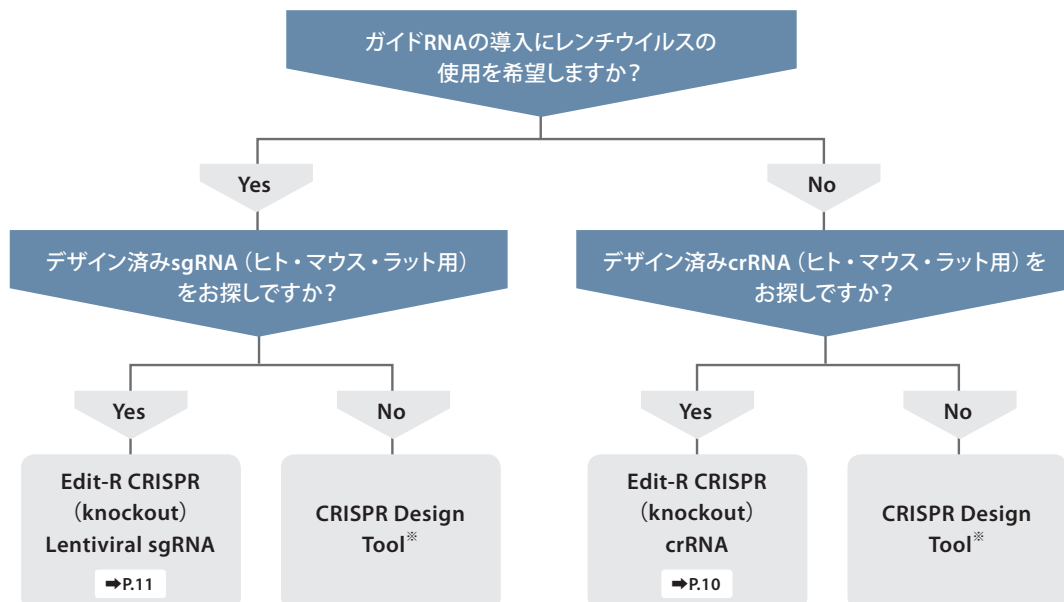
通常の方法では、トランスフェクションが難しい場合



遺伝子ノックアウト

ノックアウト用ガイドRNA

ノックアウト用ガイドRNA選択ガイド



※ CRISPR Design Tool

お客様自身でcrRNAあるいはsgRNAを設計・注文いただくWebツールです。目的のデザイン済みcrRNAもしくはsgRNA製品がない場合にご利用ください。本Webツールを使用せずにお客様自身で配列設計したcrRNAあるいはsgRNA製品をご注文いただくこともできます。詳しくはWebサイト (dharmacon.horizondiscovery.com) の dharmacon.horizondiscovery.com/gene-editing/crispr-cas9/crispr-design-tool/ にアクセスしてください。

ノックアウト用ガイドRNAの特徴と種類

Edit-R ノックアウト用ガイドRNAは、弊社独自の配列デザインアルゴリズム (Edit-R algorithm) により、遺伝子ノックアウト効率と特異性の高いガイドRNAがあらかじめデザインされた製品です。化学合成タイプのcrRNAとレンチウイルスベクタータイプのsgRNA製品をラインアップしています。

Edit-R CRISPR (knockout) crRNA

ヒト・マウス・ラット遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みcrRNA (化学合成品) です。弊社独自の配列デザインアルゴリズム^{*1}により、遺伝子ノックアウト効率と特異性の高いcrRNA配列が遺伝子ごとに最大5個デザインされています。ヌクレアーゼ耐性修飾が導入されています。製品形態は凍結乾燥品です。Edit-R tracrRNAと組み合わせて使用します。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号 ^{*2}
ターゲット遺伝子に対するcrRNA		
Edit-R Human/Mouse/Rat crRNA	2 nmol	CM-XXXXXX-XX-0002
	5 nmol	CM-XXXXXX-XX-0005
	10 nmol	CM-XXXXXX-XX-0010
	20 nmol	CM-XXXXXX-XX-0020
ポジティブコントロールcrRNA		
Edit-R PPIB Synthetic crRNA Control (Human)	5 nmol	U-007000-01-05
	20 nmol	U-007000-01-20
Edit-R Ppib Synthetic crRNA Control (Mouse)	5 nmol	U-007100-01-05
	20 nmol	U-007100-01-20
Edit-R Ppib Synthetic crRNA Control (Rat)	5 nmol	U-007200-01-05
	20 nmol	U-007200-01-20
Edit-R DNMT3B Synthetic crRNA Control (Human)	5 nmol	U-007010-01-05
	20 nmol	U-007010-01-20
Edit-R Dnmt3b Synthetic crRNA Control (Mouse)	5 nmol	U-007110-01-05
	20 nmol	U-007110-01-20
Edit-R Dnmt3b Synthetic crRNA Control (Rat)	5 nmol	U-007210-01-05
	20 nmol	U-007210-01-20

製品名	包装	コード番号 ^{*2}
ポジティブコントロール crRNA (PCRプライマー付き)		
Edit-R PPIB crRNA Control Kit (Human) ^{*3}	5 nmol	UK-007050-01-05
	20 nmol	UK-007050-01-20
Edit-R Ppib crRNA Control Kit (Mouse) ^{*3}	5 nmol	UK-007150-01-05
	20 nmol	UK-007150-01-20
Edit-R Ppib crRNA Control Kit (Rat) ^{*3}	5 nmol	UK-007250-01-05
	20 nmol	UK-007250-01-20
Edit-R DNMT3B crRNA Control Kit (Human) ^{*3}	5 nmol	UK-007060-01-05
	20 nmol	UK-007060-01-20
Edit-R Dnmt3b crRNA Control Kit (Mouse) ^{*3}	5 nmol	UK-007160-01-05
	20 nmol	UK-007160-01-20
Edit-R Dnmt3b crRNA Control Kit (Rat) ^{*3}	5 nmol	UK-007260-01-05
	20 nmol	UK-007260-01-20
ネガティブコントロールcrRNA		
Edit-R crRNA Non-targeting Control #1~5	5 nmol	U-00750X-05
	20 nmol	U-00750X-20

*1 本アルゴリズムは、単なる二本鎖DNA切断ではなく機能的な遺伝子ノックアウトを引き起こすガイドRNAを設計するために開発されました。また、本アルゴリズムのアラインメントツールはミスマッチやギャップを確実に検出・除去するため、オフターゲットを最少限に抑制します。

*2 Xには、製品ごとに特定の数字が入ります。

*3 各遺伝子をターゲットとするcrRNAと、DNA切断を確認するためのPCRプライマーをセットとした製品です。

Edit-R tracrRNA

公開されている *Streptococcus pyogenes* のtracrRNA配列^{*4}を元にした配列を合成後にHPLCで精製した化学合成品です。ヌクレアーゼ耐性修飾が導入されています。製品形態は凍結乾燥品です。Edit-R crRNAと組み合わせて使用します。複数の哺乳動物細胞において効率的なゲノム編集を実現することを確認しています。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R CRISPR-Cas9 Synthetic tracrRNA	5 nmol	U-002005-05
	20 nmol	U-002005-20
	50 nmol	U-002005-50

*4 Jinek M, et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. Science. 2012;337(6096):816-821.

■ Edit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNA

ヒト・マウス・ラット遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みsgRNA発現用レンチウイルスベクターです。弊社独自の配列デザインアルゴリズム^{*1}により、遺伝子ノックアウト効率と特異性の高いsgRNA配列が遺伝子ごとに最大10個デザインされています。初代培養細胞や神経細胞といったトランスフェクションの困難な細胞を用いてゲノム編集を行う場合に最適です。製品形態は、レンチウイルス粒子あるいは大腸菌グリセロールストックです。



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
U6	Human U6 promoter
sgRNA	single guide RNA
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
Puro ^R	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

ご注文情報

製品名	包装	コード番号 ^{*2}
ターゲット遺伝子に対するsgRNA		
Edit-R Human/Mouse/Rat Lentiviral sgRNA	100 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSG★1014X-XXXXXXXXXX
	200 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSG★1014X-XXXXXXXXXX
	glycerol stock ^{*4}	GSG★118XX-XXXXXXXXXX
Edit-R Human/Mouse/Rat Set of 3 Lentiviral sgRNA ^{*3}	100 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSG★101XX-EGXXXXXXXXXX
	200 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSG★101XX-EGXXXXXXXXXX
	glycerol stock ^{*4}	GSG★118XX-EGXXXXXXXXXX
ポジティブコントロールsgRNA		
Edit-R Human PPIB Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGH10231
	glycerol stock ^{*4}	GSGH11829
Edit-R Mouse Ppib Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGM10233
	glycerol stock ^{*4}	GSGM11833
Edit-R Rat Ppib Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGR10235
	glycerol stock ^{*4}	GSGR11837
Edit-R Human DNMT3B Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGH10230
	glycerol stock ^{*4}	GSGH11826
Edit-R Mouse Dnmt3b Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGM10232
	glycerol stock ^{*4}	GSGM11830
Edit-R Rat Dnmt3b Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGR10234
	glycerol stock ^{*4}	GSGR11834
ポジティブコントロール sgRNA (PCRプライマー付き)		
Edit-R Human PPIB Lentiviral sgRNA Positive Control Kit ^{*5}	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGH11204
	glycerol stock ^{*4}	GSGH11828
Edit-R Mouse Ppib Lentiviral sgRNA Positive Control Kit ^{*5}	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGM11206
	glycerol stock ^{*4}	GSGM11832
Edit-R Rat Ppib Lentiviral sgRNA Positive Control Kit ^{*5}	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGR11208
	glycerol stock ^{*4}	GSGR11836
Edit-R Human DNMT3B Lentiviral sgRNA Positive Control Kit ^{*5}	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGH11203
	glycerol stock ^{*4}	GSGH11827
Edit-R Mouse Dnmt3b Lentiviral sgRNA Positive Control Kit ^{*5}	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGM11205
	glycerol stock ^{*4}	GSGM11831
Edit-R Rat Dnmt3b Lentiviral sgRNA Positive Control Kit ^{*5}	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGR11207
	glycerol stock ^{*4}	GSGR11835
ネガティブコントロール sgRNA		
Edit-R Lentiviral sgRNA Non-targeting Control #1~10	2 x 25 μL, 10 ⁸ TU/mL	VSGC102XX
	glycerol stock ^{*4}	GSGC118XX

*1 本アルゴリズムは、単なる二本鎖DNA切断ではなく機能的な遺伝子ノックアウトを引き起こすガイドRNAを設計するために開発されました。また、本アルゴリズムのアラインメントツールはミスマッチやギャップを確実に検出・除去するため、オフターゲットを最少限に抑制します。

*2 Xには、製品ごとに特定の数字が入ります。★にはH、M、Rのいずれかの文字が入ります (Human=H、Mouse=M、Rat=R)。

*3 お好みのデザイン済みsgRNA発現用レンチウイルスを3つセットでご提供する製品です。

*4 sgRNAを発現するレンチウイルスベクターを導入した大腸菌の培養液にグリセロールを加えたものです。レンチウイルスベクターのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit [▶P.27](#) がおすすめです。

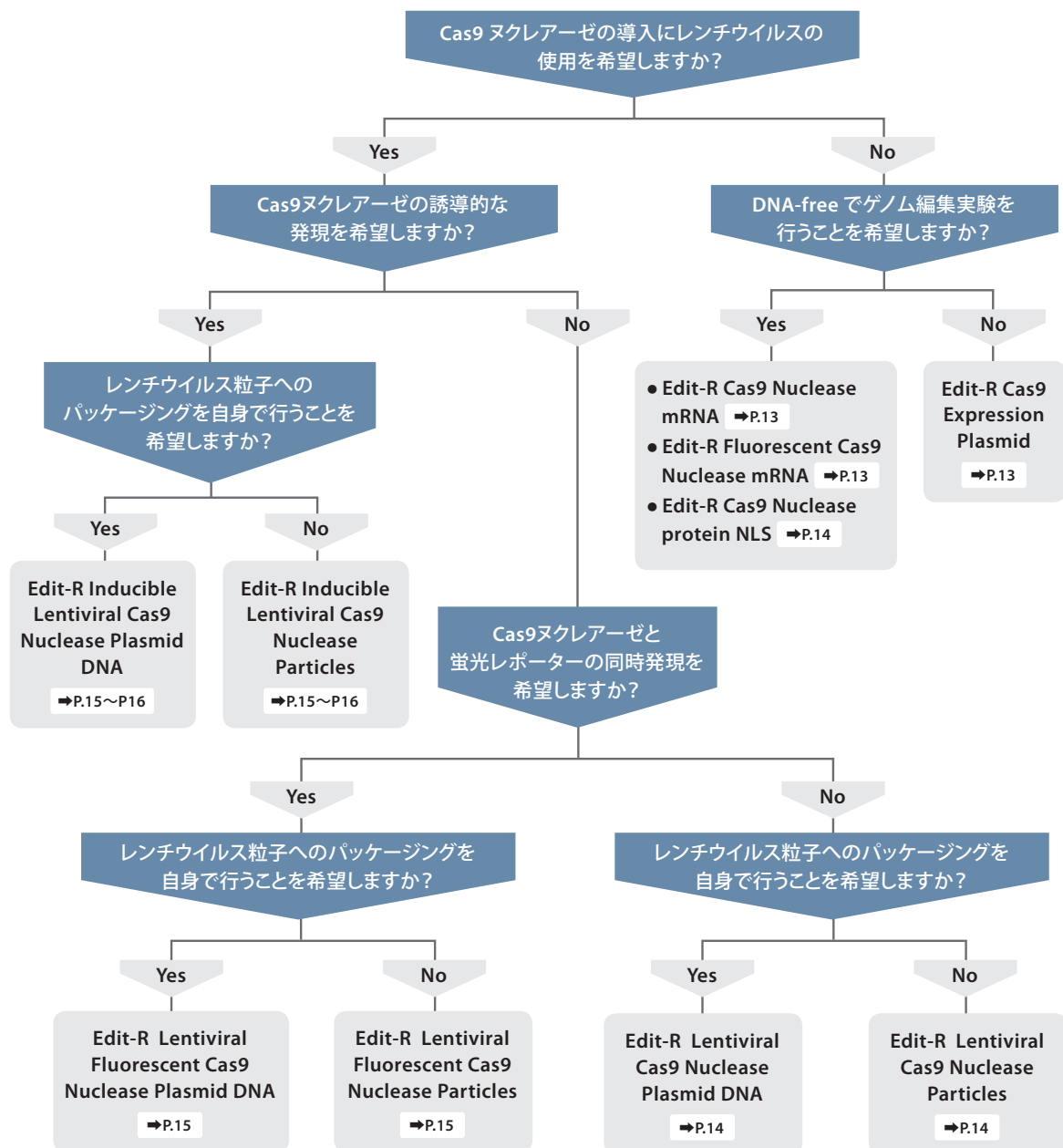
*5 各遺伝子をターゲットとするsgRNA発現用レンチウイルスと、DNA切断を確認するためのPCRプライマーをセットとした製品です。

Cas9ヌクレアーゼ

Cas9ヌクレアーゼの適切な発現は、CRISPR-Cas9ゲノム編集において重要なファクターです。Edit-R CRISPR-Cas9ゲノム編集試薬システムでは、実験目的に最適なCas9ヌクレアーゼを選択可能です。

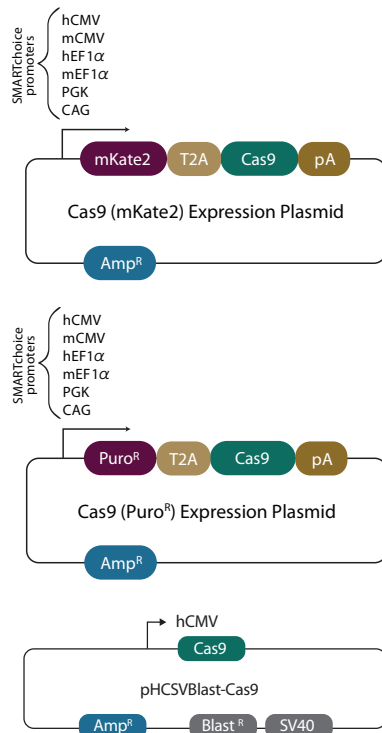
Cas9発現用プラスミドは、細胞ごとに最適なプロモーターを6種類から選択可能です。DNA-freeの実験をご希望の場合は、Cas9 mRNAおよびCas9 proteinをご選択いただけます。トランスフェクションが困難な細胞にはCas9発現用レンチウイルスベクターが対応可能です。Cas9発現用レンチウイルスベクターでは、必要なタイミングでCas9を発現できる誘導型、蛍光レポーターとの同時発現型もラインアップしています。

ノックアウト用Cas9ヌクレアーゼ選択ガイド



Edit-R Cas9 Expression Plasmid

Cas9ヌクレアーゼ発現用プラスミドです。蛍光レポーター（mKate2）搭載タイプおよびpuromycin耐性遺伝子搭載タイプをご用意しており、両者とも、Cas9ヌクレアーゼを発現駆動するプロモーターを、使用する細胞に合わせて6種類から選択可能です。Blasticidin耐性遺伝子搭載タイプのプラスミドもあります（ヒトCMVプロモーターがCas9ヌクレアーゼの発現を駆動）。製品形態は凍結乾燥品です。



ベクター中の要素	説明
hCMV	Human cytomegalovirus immediate early promoter
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
hEF1α	Human elongation factor 1 alpha promoter
mEF1α	Mouse elongation factor 1 alpha promoter
PGK	Mouse phosphoglycerate kinase promoter
CAG	Human cytomegalovirus, chicken β-actin hybrid promoter
mKate2	ベクター導入の視覚的な追跡およびセルソーティング用の赤色タンパク質mKate2をコード（単量体）。励起波長588 nm、蛍光波長633 nm。
Puro ^R	Puromycin耐性遺伝子（ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー）
T2A	2a self-cleaving peptide（自己切断活性を持つ短いペプチド。mKate2/Puromycin耐性遺伝子産物およびCas9ヌクレアーゼタンパク質の同時発現を実現）
Cas9	<i>S. pyogenes</i> Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子
pA	ウシ成長ホルモン（BGH）ポリアダニル化シグナル
Amp ^R	大腸菌内でのベクター増幅用のampicillin耐性遺伝子
Blast ^R	Blasticidin 耐性遺伝子（ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー）
SV40	Blasticidin 耐性遺伝子の定常発現のためのSimian Virus 40プロモーター

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R Cas9 Expression Plasmid - mKate2 蛍光マーカー搭載タイプ	120 µg	U-004X00-120*
Edit-R Cas9 Expression Plasmid - Puromycin 耐性遺伝子搭載タイプ	120 µg	U-005X00-120*
Edit-R CRISPR-Cas9 Nuclease Expression Plasmid - Blasticidin 耐性遺伝子搭載タイプ	120 µg	U-001000-120

* 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=1、mCMV=2、hEF1α=3、mEF1α=4、PGK=5、CAG=6のいずれかの数字が入ります。

Edit-R Cas9 Nuclease mRNA/Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNA DNA-free

ヒト用にコドンに至適化した *Streptococcus pyogenes* 由来Cas9ヌクレアーゼ遺伝子をコードするmRNAです。5'および3'の両方において核局在化シグナルをコードします。5'キャップおよび3'ポリA鎖を持つ安定なRNA分子です。Edit-R crRNAおよびEdit-R tracrRNAとともに使用すれば、完全なDNA-freeのゲノム編集実験が可能です（ゲノムへのプラスミドDNA挿入のリスクを回避）。Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNAを使用した場合、蛍光レポーター（mKate2あるいはEGFP）とCas9ヌクレアーゼの同時発現が可能です。製品形態は溶液です（1 µg/µL）。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R Cas9 Nuclease mRNA	20 µg	CAS11195
Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNA - EGFP	20 µg	CAS11860
Edit-R Fluorescent Cas9 Nuclease mRNA - mKate2	20 µg	CAS11859

■ Edit-R Cas9 Nuclease protein NLS DNA-free

Streptococcus pyogenes 由来Cas9ヌクレアーゼ遺伝子を発現する大腸菌より調製した遺伝子組み換えCas9ヌクレアーゼです。N末端に 6x Hisタグ、C末端にSimian virus 40 (SV40) の核局在化シグナルを持ちます。細胞に導入されると速やかにゲノム編集を行い、また、一過的な発現にとどまるためオフターゲット切断のリスクが少ないです。Edit-R crRNAおよびEdit-R tracrRNAとともに使用すれば、完全なDNA-freeのゲノム編集実験が可能です（ゲノムへのプラスミドDNA挿入のリスクを回避）。製品形態はグリセロールを含む溶液です。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R Cas9 Nuclease protein NLS 20 μM	250 pmol	CAS11728
	500 pmol	CAS11200
	2 x 500 pmol	CAS11201
Edit-R Cas9 Nuclease protein NLS 40 μM	500 pmol	CAS11729
	2 x 500 pmol	CAS11730

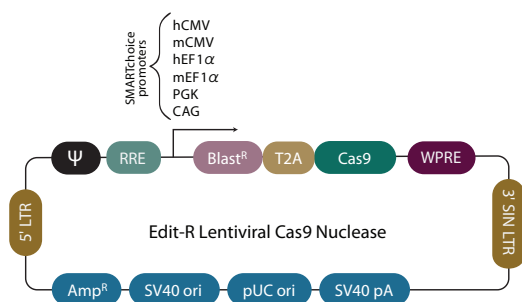
DNA-free

ゲノム編集のメリット

- ホスト細胞株ゲノムへのプラスミドDNA挿入のリスクを回避
- Cas9ヌクレアーゼ発現プラスミド使用時に必要な、プロモーターと細胞株の適合性の検討が不要
- Cas9ヌクレアーゼタンパク質は一過的な発現のため、オフターゲット効果を抑制

■ Edit-R Lentiviral Cas9 Nuclease Particles / Edit-R Lentiviral Cas9 Nuclease Plasmid DNA

Cas9ヌクレアーゼ発現用レンチウイルスベクターです。Cas9ヌクレアーゼを発現駆動するプロモーターを、使用する細胞に合わせて6種類から選択可能です。初代培養細胞や神経細胞といったトランスフェクションの困難な細胞を用いてゲノム編集を行う場合に最適です。製品形態は、レンチウイルス粒子あるいは凍結乾燥品です。



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
hCMV	Human cytomegalovirus immediate early promoter
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
hEF1α	Human elongation factor 1 alpha promoter
mEF1α	Mouse elongation factor 1 alpha promoter
PGK	Mouse phosphoglycerate kinase promoter
CAG	Human cytomegalovirus, chicken β-actin hybrid promoter
Blast ^R	Blasticidin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
T2A	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。Blasticidin耐性遺伝子産物およびCas9ヌクレアーゼタンパク質の同時発現を実現)
Cas9	<i>S. pyogenes</i> Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat
SV40 pA	Simian virus 40 ポリアデニル化シグナル
pUC ori	pUC 複製起点
SV40 ori	Simian virus 40 複製起点
Amp ^R	大腸菌内でのベクター増幅用のampicillin耐性遺伝子

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R Lentiviral Blast-Cas9 Nuclease Particles	50 μL, 10 ⁷ TU/mL	VCAS1012X ^{*1}
Edit-R Lentiviral Blast-Cas9 Nuclease Plasmid DNA ^{*2}	10 μg	CAS101XX ^{*3}

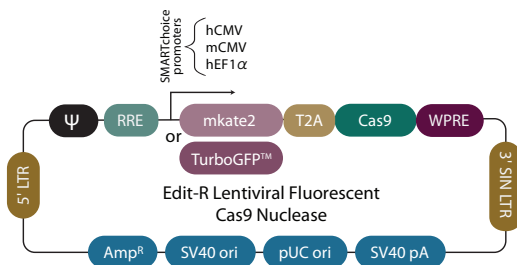
*1 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=4、mCMV=5、hEF1α=6、mEF1α=7、PGK=8、CAG=9のいずれかの数字が入ります。

*2 Edit-R Lentiviral Blast-Cas9 Nuclease Particlesの作製 (パッケージング) の元となるプラスミドDNAです。プラスミドDNAのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit (P27) がおすすめです。

*3 選択したプロモーターにより、XXには、hCMV=36、mCMV=37、hEF1α=38、mEF1α=39、PGK=40、CAG=41 のいずれかの数字が入ります。

Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Particles / Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Plasmid DNA

Cas9ヌクレアーゼおよび蛍光レポーター同時発現用レンチウイルスベクターです。Cas9ヌクレアーゼを発現駆動するプロモーターは、使用する細胞に合わせて3種類から、蛍光レポーターは2種類から選択可能です。初代培養細胞や神経細胞といったトランスフェクションの困難な細胞を用いてゲノム編集を行う場合に最適です。製品形態は、レンチウイルス粒子あるいは凍結乾燥品です。



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
hCMV	Human cytomegalovirus immediate early promoter
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
hEF1α	Human elongation factor 1 alpha promoter
mKate2	ベクター導入の視覚的な追跡およびセルソーティング用の赤色タンパク質mKate2をコード (単量体)。励起波長 588 nm、蛍光波長633 nm。
TurboGFP	ベクター導入の視覚的な追跡およびセルソーティング用の緑色タンパク質TurboGFPをコード (二量体)。励起波長 482 nm、蛍光波長502 nm。
T2A	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。mKate2/TurboGFPタンパク質およびCas9ヌクレアーゼタンパク質の同時発現を実現)
Cas9	<i>S. pyogenes</i> Cas9 ヌクレアーゼ遺伝子
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat
SV40 pA	Simian virus 40 ポリアデニル化シグナル
pUC ori	pUC 複製起点
SV40 ori	Simian virus 40 複製起点
Amp ^R	大腸菌内でのベクター増幅用のampicillin耐性遺伝子

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Particles - mKate2	50 μL、10 ⁷ TU/mL	VCAS1186X ^{*1}
Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Particles - TurboGFP	50 μL、10 ⁷ TU/mL	VCAS1186X ^{*2}
Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Plasmid DNA - mKate2 ^{*3}	10 μg	CAS1187X ^{*4}
Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Plasmid DNA - TurboGFP ^{*5}	10 μg	CAS1187X ^{*6}

*1 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=9、mCMV=3、hEF1α=5 のいずれかの数字が入ります。

*2 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=8、mCMV=2、hEF1α=4 のいずれかの数字が入ります。

*3 Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Particles - mKate2 の作製 (パッケージング) の元となるプラスミドDNAです。レンチウイルスベクターのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit [▶P.27](#) がおすすめです。

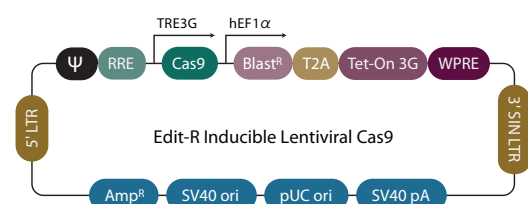
*4 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=7、mCMV=1、hEF1α=3 のいずれかの数字が入ります。

*5 Edit-R Lentiviral Fluorescent Cas9 Nuclease Particles - TurboGFP の作製 (パッケージング) の元となるプラスミドDNAです。レンチウイルスベクターのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit [▶P.27](#) がおすすめです。

*6 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=6、mCMV=0、hEF1α=2 のいずれかの数字が入ります。

Edit-R Inducible Lentiviral Cas9 Nuclease Particles / Edit-R Inducible Lentiviral Cas9 Nuclease Plasmid DNA

Cas9ヌクレアーゼ誘導発現用レンチウイルスベクターです。最新のテトラサイクリン誘導系であるTet-On 3Gシステムを採用しており、より厳密に制御された誘導的ゲノム編集が可能です。「任意の時期までゲノム編集を起こさせたくない」「必要な時だけCas9を発現させたい」「ゲノム編集後はCas9産生を抑制したい」という方におすすめです。製品形態は、レンチウイルス粒子あるいは凍結乾燥品です。



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
TRE3G	Doxycycline誘導性プロモーター
Cas9	<i>S. pyogenes</i> Cas9 スクレアーゼ遺伝子
hEF1α	Human elongation factor 1 alpha promoter
Blast ^R	Blasticidin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
T2A	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。Blasticidin耐性遺伝子産物およびCas9スクレアーゼタンパク質の同時発現を実現)

ベクター中の要素	説明
Tet-On 3G	Doxycyclineによって制御されるアクチベータータンパク質 (Doxycycline存在下でTRE3Gに結合)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat
SV40 pA	Simian virus 40 ポリアデニル化シグナル
pUC ori	pUC 複製起点
SV40 ori	Simian virus 40 複製起点
Amp ^R	大腸菌内でのベクター増幅用のampicillin耐性遺伝子

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R Inducible Lentiviral hEF1α-Blast-Cas9 Nuclease Particles	50 μL、10 ⁷ TU/mL	VCAS11227
Edit-R Inducible Lentiviral hEF1α-Blast-Cas9 Nuclease Plasmid DNA*	10 μg	CAS11229

* Edit-R Inducible Lentiviral hEF1α-Blast-Cas9 Nuclease Particles の作製 (パッケージング) の元となるプラスミドDNAです。レンチウイルスベクターのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit [▶P.27](#) がおすすめです。

ライブラリー製品

マルチウェルプレートの各ウェルに分注したアレイ化 (arrayed) タイプとプール化 (pooled) タイプがあります。アレイ化タイプには、化学合成タイプのcrRNAとレンチウイルスベクタータイプのsgRNA製品があります。プール化タイプは、多数のターゲット遺伝子に対応した多種類のsgRNA発現用レンチウイルス粒子をあらかじめ混合した製品です。

各ライブラリーはヒト・マウスに対応しています (Edit-R Arrayed lentiviral sgRNA Libraryを除く)。多数の遺伝子を同時にターゲットとしたノックアウトスクリーニングをしたい場合に便利な製品です。

CRISPR-Cas9 ガイドRNA (knockout用) ライブラリー選択ガイド

下記の選択ガイドをご参照いただき、研究目的に合ったライブラリー製品を選択してください。

	Edit-R CRISPR (knockout) crRNA Library ▶P.17 Cherry-Pick CRISPR (knockout) crRNA Library ▶P.17	Edit-R Pooled Lentiviral sgRNA Library ▶P.18~P.19
製品形態	マルチウェルプレートに分注された化学合成crRNA	マイクロチューブに分注したsgRNA発現用レンチウイルス粒子
細胞への導入方法	トランスフェクション試薬またはエレクトロポレーション法	レンチウイルスで導入 (トランスフェクションの困難な細胞に適用可能)
アッセイ方法	1遺伝子1ウェルのレイアウトのため、様々な表現型を測定可能 (表現型の観察に十分な ゲノム編集効率を得る必要あり) ● High Content Analysis、レポーター・酵素活性解析など	sgRNAを保有する細胞のポピュレーション変化を次世代シーケンサーで測定 ● 細胞死または生存率の評価 ● 蛍光または細胞表面マーカーの発現を利用したセルソーティング
スクリーニング実施時間	遺伝子の数が増えるにつれ時間と手間がかかる	相対的に短時間、少数の培養器で実験可能
データ解析	表現型は1遺伝子1ウェルベースで直接解析可能	次世代シーケンサーから出るデータの解析が必要

■ Edit-R CRISPR (knockout) crRNA Library

ヒト・マウス用のデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) crRNAを、遺伝子ファミリーやパスウェイごとに分類して96あるいは384ウェルプレートに分注した製品です。ハイスループットかつ迅速な遺伝子ノックアウトスクリーニング実験を実現します。遺伝子あたり4種類のデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) crRNAを混合したPoolフォーマットと、4種類をセットにしたSet of 4フォーマットをご用意しています。包装容量は0.1、0.25、0.5 nmolから選択可能です。製品形態は凍結乾燥品です。

ご注文情報

製品名	ヒト		マウス	
	遺伝子数 ^{*1}	コード番号 (Pool/Set of 4) ^{*2}	遺伝子数 ^{*1}	コード番号 (Pool/Set of 4) ^{*2}
Edit-R - Cell Cycle Regulation	169	GP/GC-003205-xx	105	GP/GC-013200-xx
Edit-R - Cytokine Receptors	110	GP/GC-004005-xx	139	GP/GC-014000-xx
Edit-R - Deubiquitinating Enzymes	94	GP/GC-004705-xx	100	GP/GC-014700-xx
Edit-R - DNA Damage Response	240	GP/GC-006005-xx	—	—
Edit-R - Drug Targets	3,686	GP/GC-004650-xx	—	—
Edit-R - Druggable Genome ^{*3}	8,422	GP/GC-004605-xx	—	—
Edit-R - Epigenetics	835	GP/GC-006105-xx	724	GP/GC-016100-xx
Edit-R - G Protein-coupled Receptors	390	GP/GC-003605-xx	515	GP/GC-013600-xx
Edit-R - Genome	19,127	GP/GC-005005-xx	—	—
Edit-R - Ion channels	417	GP/GC-003805-xx	340	GP/GC-013800-xx
Edit-R - Membrane Trafficking	140	GP/GC-005505-xx	113	GP/GC-015505-xx
Edit-R - Nuclear Receptors	52	GP/GC-003405-xx	46	GP/GC-013400-xx
Edit-R - Phosphatases	248	GP/GC-003705-xx	273	GP/GC-013700-xx
Edit-R - Proteases	527	GP/GC-005105-xx	599	GP/GC-015100-xx
Edit-R - Protein Kinases	746	GP/GC-003505-xx	774	GP/GC-013500-xx
Edit-R - Transcription Factors	1,580	GP/GC-005805-xx	1,419	GP/GC-015800-xx
Edit-R - Tyrosine Kinases	90	GP/GC-003105-xx	92	GP/GC-013105-xx
Edit-R - Ubiquitin Enzymes	738	GP/GC-006205-xx	752	GP/GC-016200-xx

*1 参照する遺伝子データベースにより予告なく変更になる場合があります。

*2 包装容量により、XXには、01、025、05、E2-01、E2-025、E2-05のいずれかの英数字が入ります。

*3 Proteases、Protein Kinases、Phosphatases、Transcription Factors、Ubiquitin Enzymes、GPCRs、Ion Channels、Drug Targets各ライブラリーをセットとした製品です。

■ Cherry-Pick CRISPR (knockout) crRNA Library

お客様が選択した遺伝子に対するデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) crRNAを、96あるいは384ウェルプレートに分注してお届けするカスタムサービスです。まとまった数の遺伝子や小規模な遺伝子グループに対する網羅的ノックアウト実験に最適です。ご注文はCherry-pick Library Loader[※] (次頁参照) をご使用ください。

仕様

製品タイプ	Edit-R CRISPR (knockout) crRNA
製品フォーマット	Pool (4配列の混合) あるいは Individual (1遺伝子つき1~5配列を選択)
ターゲット生物種	ヒトあるいはマウス
製品形態	凍結乾燥品
包装容量	0.1、0.25、0.5、1、2 nmolから選択
最低注文数	20ウェル分の製品 (96ウェルプレートの場合) 40ウェル分の製品 (384ウェルプレートの場合)

ご注文情報

製品名	包装
Pool: Edit-R CRISPR (knockout) crRNA (1 pool あたり)	0.1 nmol
	0.25 nmol
	0.5 nmol
	1.0 nmol
	2.0 nmol
Individual: Edit-R CRISPR (knockout) crRNA (1 配列あたり)	0.1 nmol
	0.25 nmol
	0.5 nmol
	1.0 nmol
	2.0 nmol

■ Edit-R Arrayed Lentiviral sgRNA Library

ヒト用のデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNAベクターを導入した大腸菌の培養液にグリセロールを加えた溶液を、遺伝子ファミリーやパスウェイごとに分類して96ウェルプレートに分注した製品です。遺伝子あたり4種類のデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNAをご用意しております。

ご注文情報

製品名	ヒト	
	遺伝子数*1	コード番号
Human Edit-R - Druggable Genome	7,826	GSGH11761
Human Edit-R - Drug Targets	3,737	GSGH11848
Human Edit-R - G Protein-coupled Receptors	381	GSGH11763
Human Edit-R - Ion channels	348	GSGH11764
Human Edit-R - Phosphatases	253	GSGH11767
Human Edit-R - Proteases	478	GSGH11768
Human Edit-R - Protein Kinases	698	GSGH11769
Human Edit-R - Transcription Factors	1,507	GSGH11855
Human Edit-R - Ubiquitin Conjugation	583	GSGH11772

*1 参照する遺伝子データベースにより、予告なく変更になる場合があります。

■ Cherry-Pick CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNA Clone Library

お客様が選択した遺伝子に対するデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNAベクターを導入した大腸菌の培養液にグリセロールを加えた溶液を、96ウェルプレートに分注してお届けするサービスです。ご注文はCherry-pick Library Loader[※] をご使用ください。

仕様

製品タイプ	Edit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNA
製品形態	大腸菌グリセロールストック
ターゲット生物種	ヒトあるいはマウス
最低注文数	20ウェル分の製品

ご注文情報

製品名	包装
Edit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNA	glycerol stock ^{*2}

*2 sgRNAを発現するレンチウイルスベクターを導入した大腸菌の培養液にグリセロールを加えたものです。

※ Cherry-pick Library Loader

お客様が選択した遺伝子に対するデザイン済みEdit-R CRISPR (knockout) crRNAを注文いただくWebツールです。詳しくはWebサイト (dharmacon.horizondiscovery.com) のdharmacon.horizondiscovery.com/libraryimport/にアクセスしてください。

■ Edit-R Pooled Lentiviral sgRNA Library

ヒト・マウス用のEdit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNAレンチウイルス粒子 [➡P.11](#) を、遺伝子ファミリーやパスウェイごとに分類してプールした製品です。本ライブラリーは、Illumina DNA シーケンサーにのみ対応した製品です。

特長

- 5×10^8 TU/mL 以上の高力価
- 遺伝子当たり5~10種類のsgRNA
- ヒット標準化用の100種類のネガティブコントロールsgRNA
- 最大340種類のポジティブコントロールsgRNA (ACTB、GAPDH等)

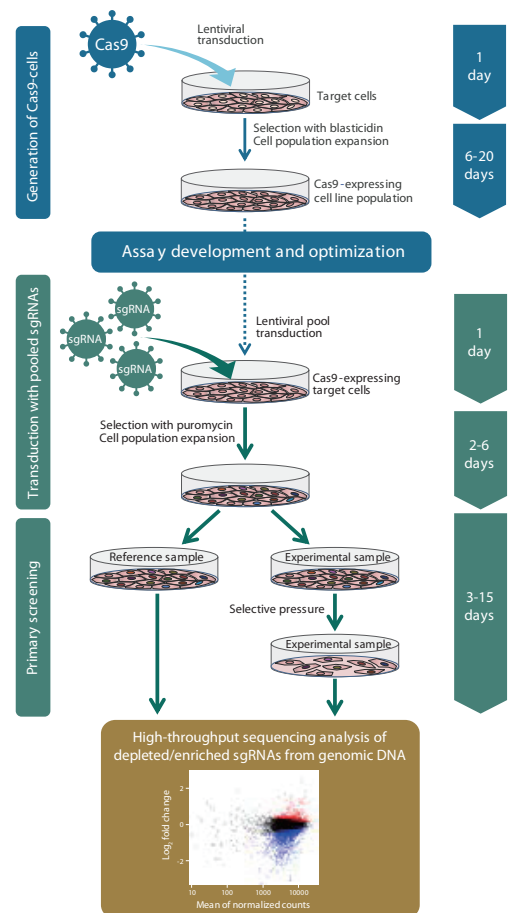
Edit-R Pooled Lentiviral sgRNA Libraryを用いた実験の流れ

Edit-R Lentiviral Cas9 Nucleaseを導入した細胞に本ライブラリーを感染させます。試験したい表現型への応答性をもとにスクリーニングを行います。

スクリーニング結果の読み出し方法としては、細胞死（致死性のノックアウトとなった細胞は細胞プール内で割合が減る）、薬剤耐性（添加薬剤に対して耐性のある細胞は薬剤処理後に細胞プール内で割合が増える）、レポーターアッセイ（GFPなどの蛍光レポーター強度の増減を評価し、細胞をソーティングする）などがあります。

結果の読み出しを行った後、細胞からゲノムDNAを抽出し、それを鋳型にしてsgRNA配列をPCR増幅します。そして、次世代シーケンシングを行い、細胞プール内で増減したsgRNA配列を同定します。

ゲノムDNAを鋳型としたsgRNA配列のPCR増幅および次世代DNAシーケンシング用プライマーは、Edit-R Pooled sgRNA Indexing PCR and Sequencing Primer Kit A/B*を別途ご用意ください。



スクリーニングワークフロー

ご注文情報

	ヒト	マウス
製品名	コード番号	
Apoptosis	VSGH11126	VSGM11148
Cell Cycle Regulation	VSGH11123	VSGM11145
Cytokine Receptors	VSGH11117	VSGM11139
Deubiquitinating Enzymes	VSGH11121	VSGM11143
DNA Damage Response	VSGH11114	VSGM11136
Druggable Genome	VSGH11112	VSGM11134
Epigenetics	VSGH11230	VSGM11137
GPCRs	VSGH11106	VSGM11128
Ion Channels	VSGH11108	VSGM11130
Membrane Trafficking	VSGH11119	VSGM11141
Nuclear Receptors	VSGH11125	VSGM11147
Phosphatases	VSGH11107	VSGM11129
Proteases	VSGH11109	VSGM11131
Protein Kinases	VSGH11105	VSGM11127
Serine Proteases	VSGH11120	VSGM11142
Tyrosine Kinases	VSGH11124	VSGM11146
Ubiquitin Conjugation	VSGH11110	VSGM11132
Whole Genome	VSGH11113	VSGM11135
* Edit-R Pooled sgRNA Indexing PCR and Sequencing Primer Kit A (内容物)		
● Edit-R Pooled sgRNA Forward PCR Primer		PRM10184
● Edit-R Pooled sgRNA Reverse Index PCR Primer (2、4-7、12-16、18-19)		
● Edit-R Pooled Read 1 Illumina Sequencing Primer		
● Edit-R Pooled Index Read Illumina Sequencing Primer		
* Edit-R Pooled sgRNA Indexing PCR and Sequencing Primer Kit B (内容物)		
● Edit-R Pooled sgRNA Forward PCR Primer		PRM10185
● Edit-R Pooled sgRNA Reverse Index PCR Primer (1、3、8-11、20-23、25、27)		
● Edit-R Pooled Read 1 Illumina Sequencing Primer		
● Edit-R Pooled Index Read Illumina Sequencing Primer		

遺伝子ノックイン & 塩基配列の挿入・欠失・置換

ガイドRNA・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNAを使用して、ゲノム上のターゲット部位に、タンパク質をコードする遺伝子を導入したり、塩基配列の挿入・欠失・置換を行います。

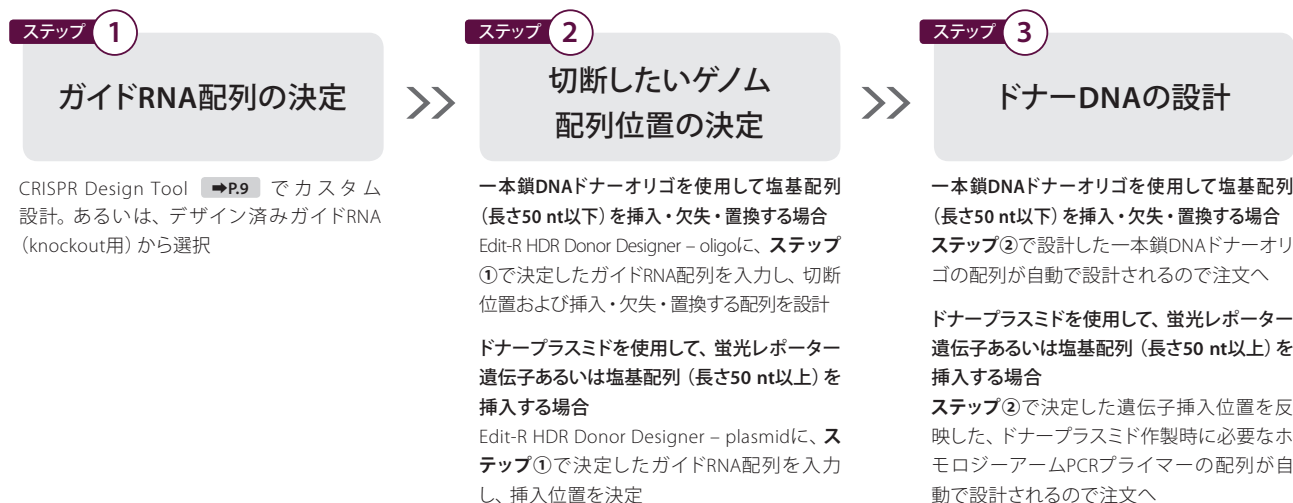
ガイドRNA・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNAの選択ガイド (遺伝子ノックイン & 塩基配列の挿入・欠失・置換用)

下表を参考にして実験目的に合ったガイドRNA・Cas9ヌクレアーゼ・ドナーDNAを選択してください。ドナーDNAの設計には、Webサイト (dharmacon.horizondiscovery.com) のEdit-R HDR Donor Designer (dharmacon.horizondiscovery.com/gene-editing/crispr-cas9/edit-r-hdr-donor-designer/) の使用により、ヒト・マウス・ラットの遺伝子について、ドナーDNAの設計を直感的で簡便に行うことができます (細胞への試薬の導入にトランスフェクション試薬を使用する場合は、[➡P.28～P.29](#) を参照してください)。

	一本鎖DNAドナーオリゴを使用して塩基配列 (長さ50 nt以下) を挿入・欠失・置換する場合	ドナープラスミドを使用して、蛍光レポーター遺伝子あるいは塩基配列 (長さ50 nt以上) を挿入する場合
ガイドRNA	以下から適切な製品を選択してください*。 ● CRISPR Design Tool でカスタム設計したcrRNA/sgRNA ● Edit-R tracrRNA (Edit-R crRNAと組み合わせて使用)	● Edit-R CRISPR (knockout) crRNA ● Edit-R CRISPR (knockout) Lentiviral sgRNA
Cas9 ヌクレアーゼ	以下から適切な製品を選択してください*。 ● 発現用プラスミド ● mRNA ● タンパク質 ● 発現用レンチウイルスベクター	
ドナーDNA	下図ワークフロー ステップ③ で作成した一本鎖DNAドナーオリゴ	● 下図ワークフロー ステップ③ で作成したホモロジーアームPCRプライマー ● Edit-R HDR Plasmid Donor Kit ➡P.21

* ガイドRNAおよびCas9ヌクレアーゼの組み合わせ選択は、[➡P.8～P.16](#) を参照してください。

ドナーDNA設計ワークフロー

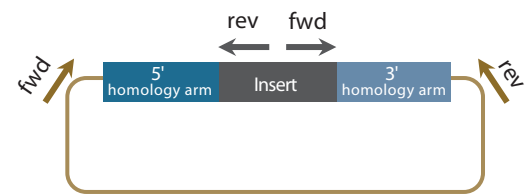


Edit-R HDR Plasmid Donor Kit

蛍光レポーター（EGFP、mKate2）遺伝子、あるいは、お客様の希望するカスタム配列*をゲノムのターゲット部位に導入するために用いるドナープラスミドを、迅速かつ高効率で構築するために必要な試薬をキット化した製品です。ドナープラスミドのバックボーン・蛍光レポーター配列（EGFPおよびmKate2キットの場合）・ドナープラスミド構築を確認するために用いるコロニーPCR用プライマーを含みます。製品形態は凍結乾燥品です。

ドナープラスミドの構築には、本キットの他に、カスタムホモロジーアームPCRプライマーや、DNA Assembly cloning Kit 等（例えばNEB社のGibson Assembly® Cloning Kit カタログ番号 E5510S）が別途必要です。詳しくは本キットのテクニカルマニュアルをご覧ください。

* カスタム配列はお客様自身で別途ご用意ください。



構築したドナープラスミドの構造模式図

ご注文情報

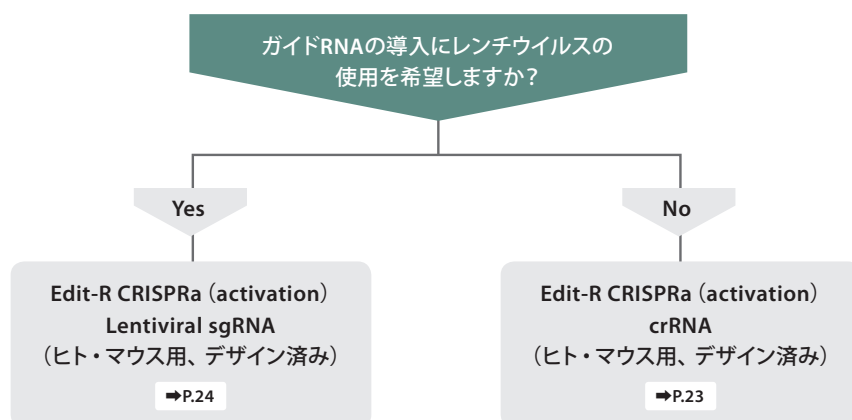
製品名	包装	Kitコード番号
Edit-R HDR Plasmid Donor Kit		
Edit-R HDR Plasmid Donor Kit - EGFP		UK-008100-01-10
Edit-R HDR Plasmid Donor Backbone	1,200 ng	
Edit-R HDR insert - EGFP	250 ng	
Edit-R Colony PCR Primer EGFP Forward	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer EGFP Reverse	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer Backbone Forward	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer Backbone Reverse	5 nmol	
Edit-R HDR Plasmid Donor Kit -mKate2		
Edit-R HDR Plasmid Donor Backbone	1,200 ng	UK-008200-03-10
Edit-R HDR insert - mKate2	250 ng	
Edit-R Colony PCR Primer mKate2 Forward	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer mKate2 Reverse	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer Backbone Forward	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer Backbone Reverse	5 nmol	
Edit-R HDR Plasmid Donor Kit - Universal		
Edit-R HDR Plasmid Donor Backbone	1,200 ng	UK-008300-01-10
Edit-R Colony PCR Primer Backbone Forward	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer Backbone Reverse	5 nmol	
Edit-R HDR Plasmid Donor Components		
Edit-R HDR Plasmid Donor & Insert - EGFP		UK-008100-02-10
Edit-R HDR Plasmid Donor Backbone	1,200 ng	
Edit-R HDR insert - EGFP	250 ng	
Edit-R HDR Plasmid Donor & Insert -mKate2		
Edit-R HDR Plasmid Donor Backbone	1,200 ng	UK-008200-04-10
Edit-R HDR insert - mKate2	250 ng	
Edit-R HDR Plasmid Donor Primers		
Edit-R HDR DNA Donor Plasmid Colony PCR Primer Pair - EGFP		UK-008100-PP-05
Edit-R Colony PCR Primer EGFP Forward	5 nmol	
Edit-R Colony PCR Primer EGFP Reverse	5 nmol	
Edit-R HDR DNA Donor Plasmid Colony PCR Primer Pair - mKate2		
Edit-R Colony PCR Primer mKate2 Forward	5 nmol	UK-008200-PP-05
Edit-R Colony PCR Primer mKate2 Reverse	5 nmol	

遺伝子の転写活性化

ガイドRNAと改変Cas9ヌクレアーゼ（dCas9-VPR）を使用して、ターゲット遺伝子の転写を活性化させます。dCas9-VPRは、ターゲット配列に相補的なガイドRNAと複合体を形成してゲノムDNAのターゲット配列に結合します。そして、ターゲット遺伝子の転写開始点に転写活性化因子が作用することで転写を活性化します。転写活性化因子を複数のベクターから発現させる必要のある他のCRISPRa (activation) システムとは異なり、VPRシステムは、dCas9-VPRとガイドRNAの2つのコンポーネントだけで十分であるため実験が簡便化されます。

ガイドRNA（遺伝子の転写活性化用）選択ガイド

下記の選択ガイドを参考にして、実験目的に最適なガイドRNAおよびdCas9-VPRをお選びください
(細胞への試薬の導入にトランスフェクション試薬を使用する場合は、[⇒P.28～P.29](#) を参照してください)。



■ Edit-R CRISPRa (activation) crRNA

ヒト・マウス遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みcrRNA（化学合成品）です。Horlbeck等の開発した配列デザインアルゴリズム^{*1}により、転写活性化能の高いcrRNA配列が遺伝子ごとに4個デザインされています。4個のcrRNAを混合して1本のチューブにまとめたpoolフォーマット、4個のcrRNAを4本のチューブに個別に入れてセットとしたSet of 4フォーマット、4個のcrRNAを個別としたindividual フォーマットをご用意しています。ヌクレアーゼ耐性修飾が導入されています。製品形態は凍結乾燥品です。Edit-R tracrRNA **→P.10** と組み合わせて使用します。

ご注文情報

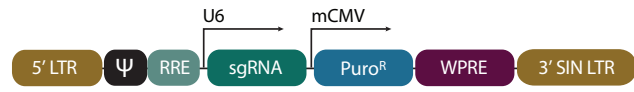
製品名	包装	コード番号 ^{*2}
ターゲット遺伝子に対するcrRNA		
Edit-R Human/Mouse CRISPRa crRNA pool	5 nmol	P-XXXXXX-XX-0005
	10 nmol	P-XXXXXX-XX-0010
	20 nmol	P-XXXXXX-XX-0020
Edit-R Human/Mouse CRISPRa Set of 4 crRNA	2 nmol	PQ-XXXXXX-XX-0002
	5 nmol	PQ-XXXXXX-XX-0005
	10 nmol	PQ-XXXXXX-XX-0010
	20 nmol	PQ-XXXXXX-XX-0020
Edit-R Human/Mouse CRISPRa crRNA	2 nmol	CA-XXXXXX-XX-0002
	5 nmol	CA-XXXXXX-XX-0005
	10 nmol	CA-XXXXXX-XX-0010
	20 nmol	CA-XXXXXX-XX-0020
ポジティブコントロールcrRNA		
Edit-R Human POU5F1 CRISPRa Individual crRNA control	5 nmol	U-009200-01-05
	20 nmol	U-009200-01-20
Edit-R Human POU5F1 CRISPRa Pool of 4 crRNA control	5 nmol	U-009200-10-05
	20 nmol	U-009200-10-20
Edit-R Human TTN CRISPRa Individual crRNA control	5 nmol	U-009100-01-05
	20 nmol	U-009100-01-20
Edit-R Human TTN CRISPRa Pool of 4 crRNA control	5 nmol	U-009100-10-05
	20 nmol	U-009100-10-20
Edit-R Mouse Pou5f1 CRISPRa Individual crRNA control	5 nmol	U-009200-02-05
	20 nmol	U-009200-02-20
Edit-R Mouse Pou5f1 CRISPRa Pool of 4 crRNA control	5 nmol	U-009200-20-05
	20 nmol	U-009200-20-20
Edit-R Mouse Ttn CRISPRa Individual crRNA control	5 nmol	U-009100-02-05
	20 nmol	U-009100-02-20
Edit-R Mouse Ttn CRISPRa Pool of 4 crRNA control	5 nmol	U-009100-20-05
	20 nmol	U-009100-20-20
ネガティブコントロールcrRNA		
Edit-R CRISPRa crRNA Non-targeting control	5 nmol	U-009500-01-05
	20 nmol	U-009500-01-20
Edit-R CRISPRa crRNA Non-targeting control pool	5 nmol	U-009500-10-05
	20 nmol	U-009500-10-20

*1 Horlbeck MA, et. al. Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. 2016 Sep 23;5. pii: e19760. doi: 10.7554/eLife.19760. PubMed 27661255

*2 Xには、製品ごとに特定の数字が入ります。

■ Edit-R CRISPRa (activation) Lentiviral sgRNA

ヒト・マウス遺伝子をほぼ完全に網羅したデザイン済みsgRNA発現用レンチウイルスベクターです。Horlbeck等の開発した配列デザインアルゴリズム^{*1}により、転写活性化能の高いsgRNA配列が遺伝子ごとに4個デザインされています。4個のsgRNAを4本のチューブに個別に入れてセットとしたSet of 4フォーマット、4個のsgRNAを個別としたindividual フォーマットをご用意しています。製品形態は、レンチウイルス粒子あるいは大腸菌グリセロールストックです。



Edit-R CRISPRa Lentiviral sgRNA

ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
U6	Human U6 promoter
sgRNA	single guide RNA
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
Puro ^R	Puromycin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat

ご注文情報

製品名	包装	コード番号 ^{*2}
ターゲット遺伝子に対するsgRNA		
Edit-R Human/Mouse CRISPRa Lentiviral sgRNA	100 μL、10 ⁸ TU/mL	VSG★118XX-XXXXXXXXXX
	200 μL、10 ⁸ TU/mL	VSG★118XX-XXXXXXXXXX
	glycerol stock ^{*4}	GSG★118XX-XXXXXXXXXX
Edit-R Human/Mouse CRISPRa Set of 4 Lentiviral sgRNA ^{*3}	100 μL、10 ⁸ TU/mL	VSG★118XX-EGXXXXXXXXXX
	200 μL、10 ⁸ TU/mL	VSG★118XX-EGXXXXXXXXXX
	glycerol stock ^{*4}	GSG★118XX-EGXXXXXXXXXX
ポジティブコントロールsgRNA		
Edit-R CRISPRa Human TTN Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL、10 ⁸ TU/mL	VSGH11899
	glycerol stock ^{*4}	GSGH11901
Edit-R CRISPRa Human POU5F1 Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL、10 ⁸ TU/mL	VSGH11902
	glycerol stock ^{*4}	GSGH11904
Edit-R CRISPRa Mouse Ttn Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL、10 ⁸ TU/mL	VSGM11905
	glycerol stock ^{*4}	GSGM11907
Edit-R CRISPRa Mouse Pou5f1 Lentiviral sgRNA Positive Control	2 x 25 μL、10 ⁸ TU/mL	VSGM11908
	glycerol stock ^{*4}	GSGM11910
ネガティブコントロールsgRNA		
Edit-R CRISPRa Lentiviral sgRNA Non-targeting Control	2 x 25 μL、10 ⁸ TU/mL	VSGC11911
	glycerol stock ^{*4}	GSGC11913

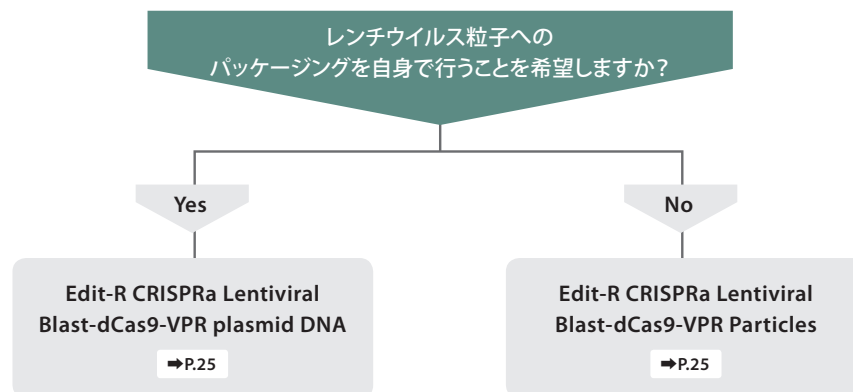
*1 Horlbeck MA, et. al. Compact and highly active next-generation libraries for CRISPR-mediated gene repression and activation. 2016 Sep 23;5. pii: e19760. doi: 10.7554/eLife.19760. PubMed 27661255

*2 Xには、製品ごとに特定の数字が入ります。★にはH、Mのいずれかの文字が入ります (Human=H、Mouse=M)。

*3 お好みのデザイン済みsgRNA発現用レンチウイルスを4つセットでご提供する製品です。

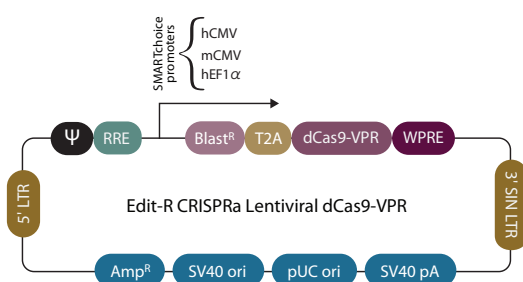
*4 sgRNAを発現するレンチウイルスベクターを導入した大腸菌の培養液にグリセロールを加えたものです。レンチウイルスベクターのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit ➡P.27 がおすすめです。

dCas9-VPR 選択ガイド



Edit-R CRISPRa Lentiviral Blast-dCas9-VPR Particles / Edit-R CRISPRa Lentiviral Blast-dCas9-VPR plasmid DNA

dCas9-VPRヌクレアーゼ発現用レンチウイルスベクターです。Cas9ヌクレアーゼを発現駆動するプロモーターを、使用する細胞に合わせて3種類から選択可能です。初代培養細胞や神経細胞といったトランスフェクションの困難な細胞を用いてターゲット遺伝子の転写活性化を行う場合に最適です。製品形態は、レンチウイルス粒子あるいは凍結乾燥品です。



ベクター中の要素	説明
5' LTR	5' long terminal repeat
Ψ	Psi パッケージングシグナル配列
RRE	Rev response element (完全長ウイルスゲノムのパッケージング効率を向上)
hCMV	Human cytomegalovirus immediate early promoter
mCMV	Mouse cytomegalovirus immediate early promoter
hEF1α	Human elongation factor 1 alpha promoter
Blast ^R	Blasticidin耐性遺伝子 (ベクターの導入された哺乳動物細胞の選別用マーカー)
T2A	2a self-cleaving peptide (自己切断活性を持つ短いペプチド。mKate2/TurboGFPタンパク質およびCas9ヌクレアーゼタンパク質の同時発現を実現)
dCas9-VPR	<i>S. pyogenes</i> dCas9-VPR ヌクレアーゼ遺伝子
WPRE	Woodchuck hepatitis posttranscriptional regulatory element (導入遺伝子の発現を促進)
3' SIN LTR	3' 末端の自己不活性化 (self inactivating) long terminal repeat
SV40 pA	Simian virus 40 ポリアデニル化シグナル
pUC ori	pUC 複製起点
SV40 ori	Simian virus 40 複製起点
Amp ^R	大腸菌内でのベクター増幅用のampicillin耐性遺伝子

遺伝子の転写活性化

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Edit-R CRISPRa Lentiviral dCas9-VPR Particles	50 μL, 10 ⁷ TU/mL	VCAS119XX ^{*1}
Edit-R CRISPRa Lentiviral dCas9-VPR Plasmid DNA ^{*2}	10 μg	CAS1191X ^{*3}

*1 選択したプロモーターにより、XXには、hCMV=18、mCMV=20、hEF1α=22のいずれかの数字が入ります。

*2 Edit-R CRISPRa Lentiviral dCas9-VPR Particlesの作製 (パッケージング) の元となるプラスミドDNAです。プラスミドDNAのパッケージングにはTrans-Lentiviral ORF Packaging Kit
⇒P.27 がおすすめです。

*3 選択したプロモーターにより、Xには、hCMV=4、mCMV=5、hEF1α=6のいずれかの数字が入ります。

遺伝子の転写活性化用ガイドRNAライブラリー

Edit-R CRISPRa (activation) crRNA Library

ヒト・マウス用のデザイン済みEdit-R CRISPRa (activation) crRNAを、遺伝子ファミリーやパスウェイごとに分類して96あるいは384ウェルプレートに分注した製品です。ハイスループットかつ迅速な遺伝子転写活性化スクリーニング実験を実現します。遺伝子あたり4種類のデザイン済みEdit-R CRISPRa (activation) crRNAを混合したPoolフォーマットと、4種類をセットにしたSet of 4フォーマットをご用意しております。包装容量は0.1、0.25、0.5 nmol から選択可能です。製品形態は凍結乾燥品です。

ご注文情報

製品名	ヒト		マウス	
	遺伝子数 ^{*1}	コード番号 (Pool/Set of 4) ^{*2}	遺伝子数 ^{*1}	コード番号 (Pool/Set of 4) ^{*2}
Edit-R - Cell Cycle Regulation	169	GP/GC-103205-xx	105	GP/GC-113200-xx
Edit-R - Cytokine Receptors	110	GP/GC-104005-xx	139	GP/GC-114000-xx
Edit-R - Deubiquitinating Enzymes	94	GP/GC-104705-xx	100	GP/GC-114700-xx
Edit-R - DNA Damage Response	240	GP/GC-106005-xx	—	—
Edit-R - Drug Targets	3,686	GP/GC-104650-xx	—	—
Edit-R - Druggable Genome ^{*3}	8,422	GP/GC-104605-xx	—	—
Edit-R - Epigenetics	835	GP/GC-106105-xx	724	GP/GC-116100-xx
Edit-R - G Protein-coupled Receptors	390	GP/GC-103605-xx	515	GP/GC-113600-xx
Edit-R - Genome	19,127	GP/GC-105005-xx	—	—
Edit-R - Ion channels	417	GP/GC-103805-xx	340	GP/GC-113800-xx
Edit-R - Membrane Trafficking	140	GP/GC-105505-xx	113	GP/GC-115505-xx
Edit-R - Nuclear Receptors	52	GP/GC-103405-xx	46	GP/GC-113400-xx
Edit-R - Phosphatases	254	GP/GC-103705-xx	273	GP/GC-113700-xx
Edit-R - Proteases	576	GP/GC-105105-xx	599	GP/GC-115100-xx
Edit-R - Protein Kinases	746	GP/GC-103505-xx	774	GP/GC-113500-xx
Edit-R - Transcription Factors	1,580	GP/GC-105805-xx	1,419	GP/GC-115800-xx
Edit-R - Tyrosine Kinases	90	GP/GC-103105-xx	92	GP/GC-113105-xx
Edit-R - Ubiquitin Enzymes	738	GP/GC-106205-xx	752	GP/GC-116200-xx

*1 参照する遺伝子データベースにより予告なく変更になる場合があります。

*2 包装容量により、XXには、01、025、05、E2-01、E2-025、E2-05のいずれかの英数字が入ります。

*3 Proteases、Protein Kinases、Phosphatases、Transcription Factors、Ubiquitin Enzymes、GPCRs、Ion Channels、Drug Target各ライブラリーをセットとした製品です。

Cherry-Pick CRISPRa (activation) crRNA Library

お客様が選択した遺伝子に対するデザイン済みEdit-R CRISPRa (activation) crRNAを、96あるいは384ウェルプレートに分注してお届けするサービスです。まとまった数の遺伝子や小規模な遺伝子グループに対する網羅的転写活性化実験に最適です。ご注文はCherry-pick Library Loader[※]をご使用ください。

仕様

製品タイプ	Edit-R CRISPRa (activation) crRNA
製品フォーマット	Pool (4配列の混合) あるいは Individual (1遺伝子につき1~4配列を選択)
ターゲット生物種	ヒトあるいはマウス
製品形態	凍結乾燥品
包装容量	0.1、0.25、0.5、1、2 nmolから選択
最低注文数	20ウェル分の製品 (96ウェルプレートの場合) 40ウェル分の製品 (384ウェルプレートの場合)

ご注文情報

製品名	包装
Pool: Edit-R CRISPRa (activation) crRNA (1pool あたり)	0.1 nmol
	0.25 nmol
	0.5 nmol
	1.0 nmol
	2.0 nmol
Individual: Edit-R CRISPRa (activation) crRNA (1配列あたり)	0.1 nmol
	0.25 nmol
	0.5 nmol
	1.0 nmol
	2.0 nmol

※ Cherry-pick Library Loader

お客様が選択した遺伝子に対するデザイン済みEdit-R CRISPRa (activation) crRNAを注文いただくWebツールです。詳しくはWebサイト (dharmacon.horizondiscovery.com) のdharmacon.horizondiscovery.com/libraryimport/にアクセスしてください。

関連試薬

弊社でご用意している、Edit-R CRISPR-Cas9試薬の各テクニカルマニュアルで使用されている関連試薬をご紹介します。

■ Trans-Lentiviral ORF Packaging Kit

ORF発現レンチウイルスベクター用の安全・高効率パッケージングシステムです。Packaging mixとレンチウイルスベクターをHEK293Tパッケージング細胞に共導入することによってパッケージングを行います。第2または第3世代のレンチウイルスベクターの効率的なパッケージングが可能です。ウイルスゲノムのパッケージングに必要なタンパク質をコードしている遺伝子を5つのプラスミドに分け、自己複製能を持つ組み換えウイルスの生じるリスクを低減しています。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
Trans-Lentiviral ORF Packaging Kit with Calcium Phosphate (内容物) <ul style="list-style-type: none">• Trans-Lentiviral Packaging Mix• CaCl₂ Reagent• 2X HBSS reagent• Precision LentiORF RFP control DNA	10反応分	TLP5916
Trans-Lentiviral ORF Packaging Kit with Calcium Phosphate and HEK293T (内容物) <ul style="list-style-type: none">• Trans-Lentiviral Packaging Mix• HEK293T Packaging Cell• CaCl₂ Reagent• 2X HBSS reagent• Precision LentiORF RFP control DNA	10反応分	TLP5918

■ 10 mM Tris-HCl Buffer pH 7.4

一本鎖RNA (crRNA、tracrRNAを含む) を再溶解するために使用するRNase-freeかつフィルター滅菌済みのバッファーです。再溶解した一本鎖RNAの長期保存に最適です。RNase-free水で希釈する必要のないready-to-useの製品です。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
10mM Tris-HCl Buffer pH 7.4	100 mL	B-006000-100

■ DharmaFECT™ 1～4 / DharmaFECT Duo / DharmaFECT kb

DharmaFECT 1～4は、細胞にあわせて最適条件で使い分ける4種類の低分子RNA（crRNA、tracrRNAを含む）用トランスフェクション試薬です。高い導入効率・低い細胞毒性・再現性のある結果を実現します。DharmaFECT 1が最も汎用性のある処方 of トランスフェクション試薬ですが、DharmaFECT 2～4の使用により、細胞株によっては最も高い導入効率を得ることができます（DharmaFECT トランスフェクション試薬による導入確認済み細胞リスト [→P.29](#) を参照ください）。DharmaFECT Duoは、低分子RNAとプラスミドDNAを同時に効率よく細胞へ共導入するためのトランスフェクション試薬です。DharmaFECT kbは、プラスミドDNAを効率よく細胞へ導入するためのトランスフェクション試薬です。

ご注文情報

製品名	包装	コード番号
DharmaFECT 1 siRNA Transfection Reagent	0.2 mL	T-2001-01
DharmaFECT 2 siRNA Transfection Reagent	0.2 mL	T-2002-01
DharmaFECT 3 siRNA Transfection Reagent	0.2 mL	T-2003-01
DharmaFECT 4 siRNA Transfection Reagent	0.2 mL	T-2004-01
DharmaFECT Set of 4 siRNA Transfection Reagents *	0.2 mL x 4	T-2005-01
DharmaFECT Duo Transfection Reagent	0.2 mL	T-2010-01
DharmaFECT kb DNA Transfection Reagent	1 mL	T-2006-01

* DharmaFECT 1～4をセットにした製品です。

細胞株	細胞名	推奨 Dharma FECT種類	GAPDHあるいは PPIB遺伝子 発現抑制 (%)	96ウェルプレートの ウェルあたり必要な DharmaFECT量 (μL)	96ウェル プレートのウェル あたりの細胞数	その他の 適用可能な DharmaFECT種類
ヒト						
786-0	Kidney adenocarcinoma	1	94	0.4	5.0 × 10 ³	2
A549	Lung carcinoma	1	92	0.2	1.0 × 10 ⁴	2、3、4
BxPC3	Pancreas adenocarcinoma	2	85	0.2	5.0 × 10 ³	1、3、4
DLD-1	Colorectal adenocarcinoma	2	85	0.4	5.0 × 10 ³	1、3
DU 145	Prostate carcinoma	1	94	0.2	1.0 × 10 ⁴	2、3、4
NCI-H1299	Lung carcinoma	2	93	0.2	1.0 × 10 ⁴	4
HCT-116	Colorectal carcinoma	2	83	0.1	5.0 × 10 ³	4
HEK293	Kidney transformed embryonic cells	1	92	0.2	1.0 × 10 ⁴	2、4
HeLa	Cervical epithelial adenocarcinoma	1	95	0.2	5.0 × 10 ³	2、3、4
HeLa S3	Cervical epithelial adenocarcinoma	4	97	0.4	5.0 × 10 ³	1、2、3
Hep G2	Hepatocellular carcinoma	4	91	0.4	1.0 × 10 ⁴	1、2
hMSC	Mesenchymal stem cell	1	94	0.4	5.0 × 10 ³	2、3、4
HT-1080	Fibrosarcoma	4	96	0.2	5.0 × 10 ³	1、2、3
HT-29	Colorectal carcinoma	1	99	0.2	5.0 × 10 ³	2、3、4
Huh-7	Hepatocarcinoma	4	76	0.05	5.0 × 10 ³	1、2
HUVEC	Umbilical vein endothelial cell	4	85	0.2	2.0 × 10 ⁴	1、2
LNCaP	Prostate carcinoma	3	80	0.2	1.0 × 10 ⁴	1
MCF-10a	Breast adenocarcinoma	1	93	0.2	1.0 × 10 ⁴	2
MDA-MB-231	Breast adenocarcinoma	4	87	0.1	5.0 × 10 ³	1
MDA-MB-453	Breast adenocarcinoma	2	91	0.2	1.0 × 10 ⁴	1、3、4
MCF7	Breast adenocarcinoma	1	90	0.2	1.0 × 10 ⁴	2、4
OVCAR-3	Ovarian adenocarcinoma	1	90	0.1	5.0 × 10 ³	2、3、4
PC-3	Prostate carcinoma	2	88	0.2	1.0 × 10 ⁴	3
SK-BR3	Breast adenocarcinoma	2	90	0.2	1.0 × 10 ⁴	1、3、4
SK-OV-3	Ovarian adenocarcinoma	3	90	0.4	1.0 × 10 ⁴	1、2、4
u87MG	Brain glioblastoma	1	87	0.1	5.0 × 10 ³	2、3、4
げっ歯類						
A7R5	Rat aortic smooth muscle	2	95	0.1	5.0 × 10 ³	1
C2C12	Mouse myoblast	1	87	0.2	5.0 × 10 ³	2、3、4
CHO K1	Chinese hamster ovary	4	92	0.8	1.0 × 10 ⁴	1、2
ES-D3	Mouse embryonic stem cell	1	94	0.2	2.0 × 10 ³	2
ES-E14TG2a	Mouse embryonic stem cell	1	93	0.2	2.0 × 10 ³	2
H9C2	Rat heart myoblast	1	96	0.2	1.0 × 10 ⁴	2、3、4
J774A.1	Mouse macrophage	4	90	0.2	1.0 × 10 ⁴	—
NIH/3T3	Mouse embryonic fibroblast	1	91	0.2	1.0 × 10 ⁴	3
NRK-49F	Rat kidney fibroblast	2	92	0.2	1.0 × 10 ⁴	1、4
RAT2	Rat fibroblast	1	75	0.2	2.0 × 10 ⁴	2
3T3-L1	Mouse embryonic fibroblast	1	80	0.2	5.0 × 10 ³	3
その他						
COS- 7	African green monkey kidney	2	94	0.4	5.0 × 10 ³	1、3、4

DharmaFECT トランスフェクション試薬による導入確認済み細胞

ハウスキーピング遺伝子GAPDHあるいはPPIBのノックダウン効果をトランスフェクション効率の指標として、siRNAの効率的な導入条件を検討しました。GAPDHあるいはPPIBをターゲットとするコントロールsiRNA（これらのsiRNAは、最適化されたトランスフェクション条件ではmRNA発現レベルで90%以上のノックダウン効果が確認されています）を終濃度25~100 nMで用い、各々の細胞株について、プレーティング細胞密度（ウェルあたり2 × 10³、5 × 10³、1 × 10⁴、2.5 × 10⁴個の細胞）、DharmaFECT の種類（4種類）、DharmaFECT の量（0.05~0.8 μL/ウェル）を試しました（トランスフェクション時間は24時間）。これら3つのパラメーターについて、最もsiRNAトランスフェクション効率の高かった組み合わせ（いずれもmRNA発現レベルで80%以上のノックダウン効果を確認）を示しています。多くの細胞株において、「推奨DharmaFECT種類」に示したDharmaFECT以外の種類のDharmaFECTを用いてもトランスフェクションが可能です。これらのデータは、細胞株ごとのトランスフェクション条件を最適化する際の、初期目安としてご使用ください。

参考

遺伝子ノックダウン用デザイン済みsiRNA

RNA干渉 (RNA interference) とは、siRNA (small interfering RNA) とよばれる短い (21~23塩基) 二本鎖RNAによって、配列特異的に遺伝子の発現が抑制される現象です。siRNAが細胞内に入ると、二本鎖のうち一本鎖 (アンチセンス鎖) がRISC (RNA induced silencing complex) とよばれる複合体に取り込まれます。RISCは取り込んだRNAと相補的な配列をもつmRNAを特異的に捕捉切断し、ターゲット遺伝子の発現抑制 (遺伝子サイレンシング) を引き起こします。siRNAによる遺伝子発現抑制技術は、その高い特異性と簡便性から、遺伝子機能解析の一般的な手法として広く使われています。

弊社は、独自のsiRNAデザインテクノロジー (SMARTselection) と高度なRNA合成技術により、高効率なsiRNA 製品を提供しています。あらかじめ配列がデザインされたDharmacon siRNAは、siGENOME、ON-TARGET^{plus}、Accell、Lincodeの4種類の製品タイプがあります。いずれの製品も、NCBI RefSeqデータベースに登録されているヒト・マウス・ラットの遺伝子をほぼ完全に網羅しています (Lincodeはヒト・マウスのみ)。使用する細胞のsiRNA導入効率やオフターゲット効果の影響など、実験目的・内容に合わせて製品をお選びください。

■ siGENOME™ siRNA

ノックダウン効果と特異性に優れたスタンダードタイプのsiRNAです。

■ ON-TARGET^{plus}™ siRNA

siGENOME siRNAのアップグレード版として、ON-TARGET^{plus} 修飾 (右枠内を参照) を導入することでオフターゲット効果をより抑え、ターゲット遺伝子に対する特異性を向上させています。

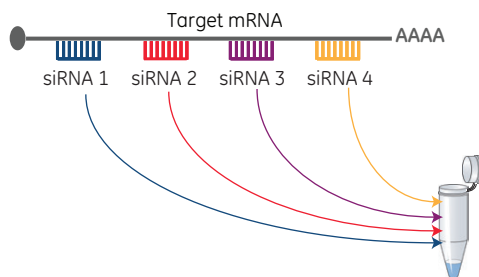
■ Accell™ siRNA

独自の化学修飾により、トランスフェクション試薬を使わずに細胞へ導入できるsiRNAです。細胞への導入は、Accell siRNAを専用培地 (Accell siRNA delivery media) と混ぜて細胞を培養するだけで、従来導入が難しかった細胞でもRNA干渉実験を可能としました。トランスフェクション試薬による細胞毒性を回避でき、配列デザインと化学修飾によりオフターゲット効果を最大限抑えているため、目的の遺伝子をより特異的にノックダウンします。ヌクレアーゼ耐性修飾が導入されているため、*in vivo* 実験にも有効です。

■ Lincode™ siRNA

Long non-coding RNAをターゲットとするsiRNAです。

siRNAフォーマット



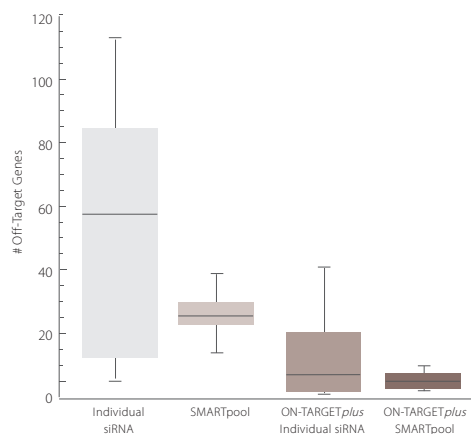
デザイン済みsiRNA製品は、遺伝子1種類に対して、ノックダウン効果と特異性の高い4種類のsiRNAをデザインしています。これらのsiRNAは、右記の3種類のフォーマットにより提供しています。

ON-TARGET^{plus}修飾

ON-TARGET^{plus}修飾は、センス鎖とアンチセンス鎖の両鎖に対する独自の化学修飾です。オフターゲット効果を抑えるとともに、ターゲット遺伝子に対する特異性を高めます。

ON-TARGET^{plus}修飾とSMARTpoolテクノロジーによるオフターゲット効果の抑制

各種siRNA (ヒト遺伝子20種類) を用いたときのオフターゲット効果をマイクロアレイにより解析しました。発現抑制 (2倍以上) の確認されたオフターゲット遺伝子数のボックスプロットです。ボックス中の横線は中央値を示しています。ON-TARGET^{plus} SMARTpoolでは、オフターゲット効果が最少となりました。



SMARTpool

1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAを、Pool (混合物) として1本のチューブに入れた製品です。ノックダウン効率の向上と、オフターゲット効果の低減に効果があります。



Set of 4

1つの遺伝子に対して配列デザインの異なる4種類のsiRNAをそれぞれ個別のチューブに入れ、チューブ4本で1セットとした製品です。



Individual

Set of 4 フォーマットの4種類のsiRNAを、1種類 (チューブ1本) ごとの個別とした製品です。

製品検索・注文のご案内

製品検索・注文はDharmacon専用Webサイト

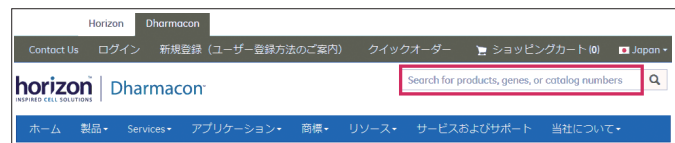
dharmacon.horizondiscovery.com にアクセスしてください。

※ ご注文には事前のユーザー登録が必要です。

Step 1

ターゲット遺伝子情報を入力してください。

ターゲット遺伝子のGenBank accession number、gene symbol、gene IDのいずれかを、Webページの上にある検索窓（赤枠）に入力して検索ボタンをクリックしてください。



Step 2

製品群ごとに検索結果をまとめてお知らせします。

画面は「BRCA1」と入力して検索した結果が表示された状態です。製品ならびに関連する技術情報が「遺伝子」のフィールドに表示されます。crRNA/sgRNAのリンク（赤枠）から各製品リストのページに移動してください。移動先ページで、各種デザイン済みcrRNA/sgRNAの+をクリックすると、さらに詳細な製品リストが表示されます。**製品のコード番号および価格は製品検索時に各Webページで表示されます。**ご希望の製品をカートに入れて注文してください。

製品 (7) 遺伝子 (107) 技術情報など (4)		
Your search term matched a large number of results, consider narrowing your search. The top 100 results have been provided below		
製品名	Description	Species
siRNA shRNA crRNA / sgRNA cDNA / ORF EST	BRCA1 BRCA1, DNA repair associated ID: 672 Alias: BRCA1, BRCC1, BROVCA1, FANCS, IRIS, PNCA4, PPP1R53, PSCP, RNF53	Human

dharmacon.horizondiscovery.com

ホライゾン・ディスカバリー株式会社

〒150-0036 東京都渋谷区南平台町16-28 グラスシテイ渋谷6F

Tel : 03-4360-5160

rnai.jp@horizondiscovery.com

www.horizondiscoverykk.com

B004-1809.20-v1

© Horizon Discovery Group Company

本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。お問い合わせに際してお客様よりいただいた情報は、お客様への回答、弊社サービスの向上、弊社からのご連絡のために利用させていただきます場合があります。

horizonTM
INSPIRED **CELL** SOLUTIONS