

Sigma-Aldrich

ゲノム編集のプロフェッショナル
シグマ アルドリッチ
CRISPR/Cas9
製品・サービスカタログ

The life science business of Merck
operates as MilliporeSigma in the
U.S. and Canada

MERCK

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集

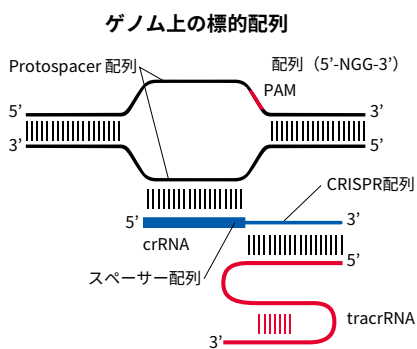
CRISPR とは？

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) システムは、原核生物の”獲得免疫系”様機構として知られています。とくに II 型 CRISPR/Cas9 系は、標的に相同な配列を持つ RNA のガイドを利用した部位特異的ゲノム編集ツールとして応用されています。

バクテリアにおいて見出される CRISPR 経路は、外来のウイルスやプラスミドに対抗するための免疫系様機構です。バクテリアゲノム上の CRISPR 遺伝子座のリピート配列間に、CRISPR 経路を介して取り込まれた外来性のウイルスあるいはプラスミド由来 DNA 配列(「スペーサー」と呼ばれます)は、感染に対する“記憶”として機能します。ウイルスやプラスミドの再感染が引き金となって転写される、成熟型 CRISPR RNA (crRNA: スペーサーと CRISPR の融合配列)は、CRISPR-associated (Cas) ヌクレアーゼと結合して CRISPR/Cas リボヌクレオタンパク質複合体 (RNP) となり、スペーサー配列依存的な部位特異的ヌクレアーゼとして標的部位に DNA 二本鎖切断を導入します。

Cas9 は crRNA と tracrRNA (trans-activating crRNA) という 2 種類の RNA 分子にガイドされて配列特異的に DNA 鎖を切断します (図 1A) ⁽¹⁾。crRNA 配列と tracrRNA 配列をヘアピンで人工的に連結した single-guide RNA (sgRNA あるいは gRNA) をデザインすると、この RNA 分子が crRNA:tracrRNA 複合体を模倣できることは広く知られています ⁽²⁾。Cas9 の配列特異性は gRNA と PAM (Protospacer Adjacent Motif) と呼ばれる標的 DNA 側の 5' -NGG-3' 配列に依存します ⁽³⁾。CRISPR/Cas9 系を利用した部位特異的ゲノム編集のためには Cas9 ヌクレアーゼと gRNA があれば十分です (図 1B)。

(A) 標準的な CRISPR/Cas9 の配列認識モデル



(B) gRNA による配列認識モデル

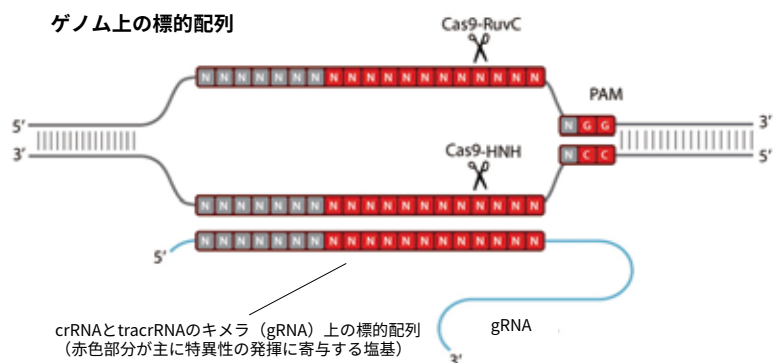


図 1 CRISPR/Cas9 とゲノム DNA の相互作用模式図

- (A) II 型 CRISPR/Cas9 系における標的 DNA 配列への CRISPR/Cas9 の局在モデル。Cas9 (灰色の楕円) と結合している crRNA (黒) および tracrRNA (赤) と、ゲノム DNA の相互作用が示されています。
- (B) gRNA とゲノム上の標的 DNA 配列との相互作用と PAM の配置を示すモデル。Cas9-RuvC と Cas9-HNH は Cas9 のヌクレアーゼドメイン名とそれらのヌクレアーゼによる DNA 切断位置を示します。RuvC^{D10A} または HNH^{H840A} 変異を持つ Cas9 は 2 つのうち一方のヌクレアーゼ活性を欠くため、二本鎖 DNA 切断酵素ではなく一本鎖 DNA 切断酵素 (Nicking 酵素) として機能します ^(4,5)。シグマ アルドリッチでは、RuvC^{D10A} 変異を持つ Cas9 と 2 種類の gRNA を組み合わせて二本鎖 DNA 切断の部位特異性を向上させた Cas9-C10A, Nickase (8 ページ) を提供しています。

ゲノム編集実験における CRISPR/Cas9 系の利点

CRISPR/Cas9 は、部位特異的ヌクレアーゼとして Cas9 と gRNA のみを必要とするシンプルなシステムです。原核生物の進化過程で出現した系であるにもかかわらず、実際の実験データは哺乳類ゲノムに対する高い切断活性を示しており ^(4,6)、同時に複数の標的配列が存在する場合において顕著です ⁽⁷⁾。標的配列デザインの制約が NGG 配列要求性のみであることは、ゲノムに対するオフターゲット効果の起こりにくい標的配列デザインをシンプルかつ容易にしています。CRISPR/Cas9 は、様々な生物種のゲノム改変に利用可能な、迅速かつ高コスト効率のゲノム編集ツールです。シグマ アルドリッチは、個別の標的遺伝子に対する CRISPR/Cas9 製品群とともに、大規模スクリーニング向け CRISPR ライブラリー、およびカスタム crRNA 合成サービスを提供しています。

参考文献

- (1) Deltcheva E. *et al.* (2011) CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, **471** (7340), 602-607. (PMID: 21455174)
- (2) Jinek M. *et al.* (2012) A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, **337** (6096), 816-821. (PMID: 22745249)
- (3) Marraffini L. A. & Sontheimer E. J. (2010) Self versus non-self discrimination during CRISPR RNA-directed immunity. *Nature*, **463** (7280), 568-571. (PMID: 20072129)
- (4) Cong L. *et al.* (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, **339** (6121), 819-823. (PMID: 23287718)
- (5) Chiang T. W. *et al.* (2016) CRISPR-Cas9 (D10A) nickase-based genotypic and phenotypic screening to enhance genome editing. *Sci. Rep.*, **6**, 24356. (PMID: 27079678)
- (6) Mali P. *et al.* (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, **339** (6121), 823-826. (PMID: 23287722)
- (7) Wang H. *et al.* (2013) One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, **153** (4), 910-918. (PMID: 23643243)

シグマ アルドリッチの CRISPR/Cas9 関連製品・サービス

CRISPR/Cas9 によるゲノム編集 ベクター選択ガイド

トランスフェクションが容易な細胞におけるゲノム編集

- ▶ プラスミド DNA ベクターのトランスフェクションまたは Nucleofection
- ▶ 細胞導入用精製 RNA のトランスフェクションまたは Nucleofection

トランスフェクションが困難な細胞におけるゲノム編集

- ▶ レンチウイルスベクターの感染による形質導入

受精卵、初期胚におけるゲノム編集

- ▶ 細胞導入用精製 RNA のマイクロインジェクション
- ▶ 細胞導入用精製 RNA のエレクトロポレーションまたは Nucleofection

ゲノム編集によるハイスループットスクリーニング

- ▶ アレイ型レンチウイルスベクターの感染による形質導入
- ▶ プール型レンチウイルスベクターの感染による形質導入

NEW SygRNA™ - カスタム crRNA 合成サービス P.4

細胞内に合成 crRNA、合成 tracrRNA と Cas9 タンパク質を導入することで、作業時間とコストを抑えながら効率よくゲノム編集実験が実施可能です。シグマ アルドリッチは、ご希望の配列を持つ crRNA のカスタム製造サービスの開始とともに、合成 tracrRNA および組み換え Cas9 タンパク質製品の販売を開始いたしました。

スクリーニング向け CRISPR ライブラリー .. P.6

今までの初期スクリーニング実験では、RNA 干渉 (RNAi) 法が常法でした。しかし、RNAi は遺伝子ノックダウン (発現抑制) であり、遺伝子をノックアウト (機能喪失) できません。そのため、機能の完全喪失を必要とする遺伝子スクリーニングでは、RNAi スクリーニングは重要な遺伝子のヒットを見逃す可能性があります。CRISPR/Cas9 を利用すると、哺乳類細胞において大規模かつ効率的な機能喪失スクリーニングを実施可能です。

シグマアルドリッチはアレイ型、プール型という2種類の CRISPR ライブラリーを提供しています。アレイ型は、個々の gRNA クローンが独立しているライブラリーで、細胞死を含むさまざまなスクリーニングに利用でき、ヒット遺伝子を選抜直後に確認可能です。プール型は混合型ライブラリーであり、形質導入後の細胞選抜に次いでシーケンシング等によるヒット遺伝子の同定が必要です。細胞の選抜が必要である特性上、プール型ライブラリーでは細胞死スクリーニングの実施は推奨されません。

アレイ型レンチウイルスライブラリー

Sanger Arrayed Lentiviral CRISPR Library

プール型レンチウイルスライブラリー

GeCKO Human and Mouse Whole Genome CRISPR Pooled Library

Sigma Whole Human Genome Lentiviral CRISPR Pooled Library

Human Kinase Lentiviral CRISPR Pool

細胞、胚への個別クローン導入用 CRISPR フォーマット P.8

配列特異性を向上させた Cas9-D10A と gRNA ペアによるゲノム編集、確実性を向上させた単一ベクターによる gRNA と Cas9 発現系、実験の柔軟性を確保する2ベクター系を提供しています。プラスミド DNA、精製 RNA またはレンチウイルスフォーマットから実験目的に合致したベクターフォーマットをお選びいただけます。

配列特異性向上型

CRISPR システム Cas9-D10A, Nickase & Paired gRNAs

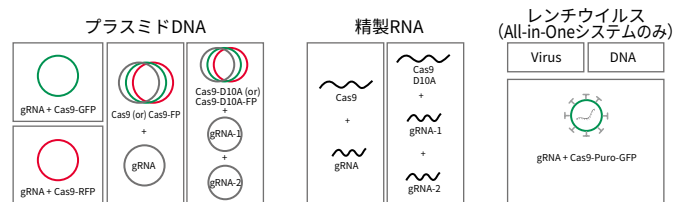
単一ベクター型

CRISPR システム All-in-One Sigma CRISPR

個別ベクター型

CRISPR システム Sigma CRISPR gRNA & Cas9 (WT)

提供フォーマット



CRISPR/Cas9 コントロール P.10

Sigma CRISPR Positive Controls

Sigma CRISPR Universal Negative Controls

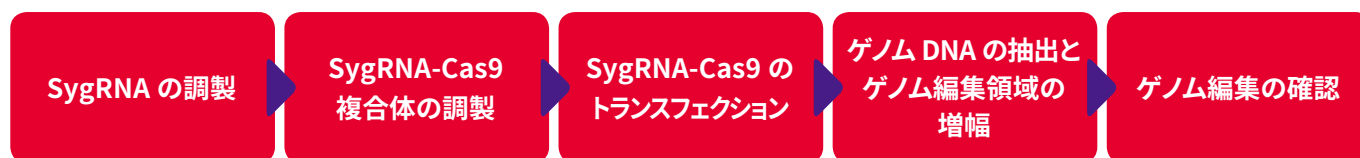
Sigma CRISPR-Lenti Controls

MISSION® TRC3 Human LentiORF Collection P.11

LentiORF は、RNAi や CRISPR/Cas9 による遺伝子ノックダウンあるいはノックアウト実験の検証に必要な遺伝子レスキュー実験において、タンパク質発現の理想的な手段を提供します。クローニングされた ORF による遺伝子の再発現は、ターゲットの妥当性を検証するために、ノックダウンやノックアウトによって確認された表現型が注目遺伝子に依存することを示す最良かつ最も許容可能な方法です。

SygRNA™ - カスタム crRNA 合成サービス

CRISPRによるゲノム編集の主流は、gRNA (crRNA と tracrRNA がヘアピンで結合された人工的な単一ガイド RNA 分子) と Cas9 ナックレアーゼを組み合わせる手法です。一方、CRISPR 技術の発展に伴い、crRNA と tracrRNA を Cas9 タンパク質とともに細胞内に直接導入する方法にも注目が集まっています。SygRNA は合成 crRNA と合成 tracrRNA の複合体 (crRNA:tracrRNA) を利用したゲノム編集を意味するシグマアルドリッチの登録商標です。



特長

- カスタム配列合成だけでなく 18,000 以上のヒト遺伝子や、マウス、ラットゲノムに対するデザイン済 crRNA 情報を利用可能*
- プラスミドベクターの調製やウイルスベクターのパッケージング等の煩雑な操作が不要
- crRNA:tracrRNA:Cas9 複合体の標的細胞への直接導入により、コストと時間を節約

※ Target ID 確認方法の詳細は下記ご注文サイトをご確認ください。デザイン済 crRNA の配列は、弊社ウェブサイト上では公開しておりませんが、製品納入時に製品添付情報としてお届けいたします。

推奨使用条件

- ・ SygRNA:Cas9 複合体は使用直前に氷上で調製してください。
- ・ crRNA:tracrRNA の推奨モル混合比は 1:1 です。
- ・ トランスフェクション試薬による SygRNA:Cas9 RNP 導入時の crRNA:tracrRNA:Cas9 の推奨モル混合比は 1:1:1 から 5:5:1 です。
- ・ Nucleofection を使用した SygRNA:Cas9 RNP 導入時の crRNA:tracrRNA:Cas9 の推奨モル混合比は 1:1:1 から 5:5:2 です。

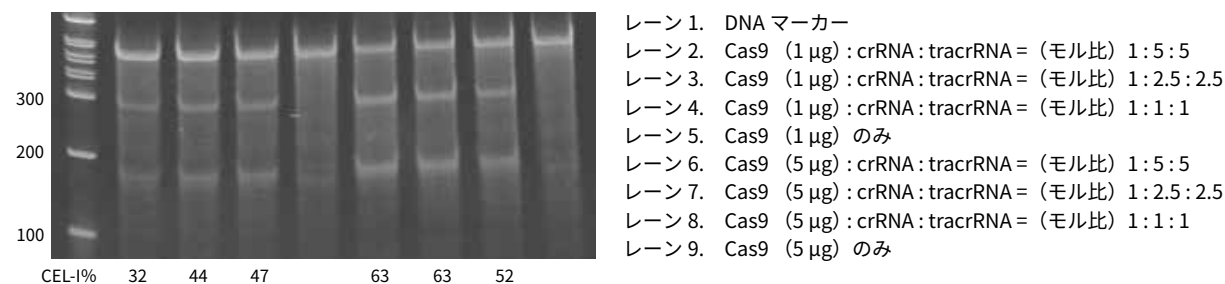


図 2 合成 crRNA、tracrRNA および Cas9 タンパク質から構成される RNP の導入量に依存したゲノム切断効率比較

Nucleofection により、tracrRNA、AAVS1 crRNA (モル比 1:1) と Cas9 タンパク質 (1 μg あるいは 5 μg) を K562 細胞に導入しました。CRISPR/Cas9 導入 48 時間後のゲノムに対する Cel-1 アッセイにより、CRISPR/Cas9 による切断後に生じた挿入、欠失および点突然変異を検出しました。各レーンの下に記載されている数字は、Cel-1 アッセイにより切断された DNA フラグメントの割合です。

sygRNA 製品のご注文はこちらから sigma-aldrich.com/crrna-jp

ご注文情報

製品 / サービス	製品名	製品仕様またはカタログ番号	包装単位	希望販売価格	
カスタム crRNA 合成	SygRNA - Synthetic crRNA	脱塩精製フォーマット (標準納期: 15 営業日以内)	2 nmol	¥9,500	
			5 nmol	¥11,000	
		HPLC 精製フォーマット (標準納期: 15 営業日以内)	2 nmol × 5	¥13,000	
			2 nmol	¥13,500	
			5 nmol	¥15,000	
2 nmol × 5	¥17,000				
tracrRNA	SygRNA - Synthetic tracrRNA	TRACRRNA05N-5NMOL	5 nmol	¥10,000	
Cas9 タンパク質	spCas9	CAS9PROT-50UG	50 μg	¥20,000	
		CAS9PROT-250UG	250 μg	¥40,000	
		espCas9 (特異性向上型 spCas9)	ESPCAS9PRO-50UG	50 μg	¥30,000
			ESPCAS9PRO-250UG	250 μg	¥60,000

SygRNA は合成 crRNA と合成 tracrRNA の複合体 (crRNA:tracrRNA) を利用したゲノム編集を意味する Sigma-Aldrich Co. LLC. の商標です。

crRNA:tracrRNA:Cas9 による ゲノム編集実験プロトコル

※ 下記は一般的なプロトコルです。お客様の目的に応じて条件最適化が必要な場合があります。

1. SygRNA (crRNA および tracrRNA) ストック溶液の調製

- 1 crRNA と tracrRNA を 10 mM Tris バッファー (pH 7 ~ 8)^{*1} でそれぞれ 20 μM (20 pmol/μL) に調製してください。
- 2 SygRNA ストック溶液は 1 回の実験ごとの必要量に分注^{*2} し、複数の凍結融解を避けて -20°C (長期間の場合は -70°C) で保存してください。

試料	量	20 μM の SygRNA ストック溶液の調製に必要な Tris バッファー容量
crRNA または	2 nmol	100 μL
tracrRNA	5 nmol	250 μL

※ 1 10 mM Tris バッファー (pH 7-8) 調製例: 99 mL のヌクレアーゼフリー水 (製品番号 W4502) に 1 mL の 1 M Trizma 塩酸塩 (製品番号 T2663) を混合します。
※ 2 SygRNA は使用前に希釈し、等量混合してください。

2. Cas9 タンパク質ストック溶液の調製

- 1 凍結乾燥状態の Cas9 タンパク質を 50% グリセロール溶液で 5 mg/mL (30 pmol/μL) に調製してください。
- 2 Cas9 ストック溶液は 1 回の実験ごとの必要量に分注^{*3} し、複数の凍結融解を避けて -20°C (1 ヶ月以上の長期保存の場合は -70°C) で保存してください。

試料	量	5 mg/mL の Cas9 ストック溶液の調製に必要な 50% グリセロール溶液量
Cas9 または	50 μg	10 μL
Cas9-D10A	250 μg	50 μL
Nickase	500 μg	100 μL

※ 3 Cas9 タンパク質は、使用前に製品付属の希釈バッファー (Dilution Buffer) で希釈してください。希釈後の Cas9 は氷上で 6 時間安定です。

3. 導入細胞の準備

トランスフェクション時に 50 ~ 80% コンフルエントになるよう、実験前日に完全培地で細胞を継代してください。推奨培地量は 6 ウェルプレートで 2.5 mL です。

4. SygRNA-Cas9 複合体 (crRNA:tracrRNA:Cas9 RNP) の調製

※ SygRNA-Cas9 複合体の調製はトランスフェクション直前に実施してください。

- 1 等量 (1.5 μL (30 pmol) ~ 15 μL (300 pmol)) の crRNA ストック溶液と tracrRNA ストック溶液をチューブ内で混合し、氷上に静置します (SygRNA 溶液)。
- 2 1 μL ~ 2 μL の Cas9 ストック溶液 (30 pmol ~ 60 pmol) を SygRNA 溶液に添加し、穏やかにピペティングして十分に混和します。
- 3 氷上で 30 分静置し、SygRNA-Cas9 RNP を形成させます。
- 4 SygRNA-Cas9 RNP 溶液に 250 μL の無血清あるいは低血清培地を加えます。

5. 対象細胞への SygRNA-Cas9 複合体の導入 (6 ウェルプレート、TransIT® 試薬使用時の例)

※ 使用する細胞とトランスフェクション方法の組み合わせにより、実験条件の最適化が必要になる場合があります。

- 1 あらかじめ室温と平衡化した TransIT 溶液 1 μL ~ 6.25 μL を SygRNA-Cas9 RNP 溶液に添加 (U2OS 細胞の場合) し、穏やかにピペティングして十分に混和します。
- 2 室温で 15 分 ~ 30 分インキュベートし、トランスフェクション複合体を形成させます。
- 3 SygRNA-Cas9-TransIT 溶液をウェルに均一に滴下します。
- 4 ディッシュを前後左右に振とうし、十分均一になるよう攪拌後、細胞のインキュベーションを開始してください。トランスフェクション直後の培地交換は不要です。

6. 細胞培養および表現型試験

細胞はトランスフェクション後 24 時間 ~ 72 時間培養し、ゲノム編集の検出や表現型の確認を実施してください。



Customer Feedback

CRISPR/Cas9 システムを使った遺伝子改変マウスの作製

ご寄稿 大阪大学 微生物病研究所 野田 大地 助教、伊川 正人 教授

▶ 遺伝子改変マウスの作製

CRISPR/Cas9 システムでは、Cas9 結合性 RNA として知られる guide RNA (gRNA) が Cas9 ヌクレアーゼを標的部位ヘリクルートして、Cas9 が protospacer adjacent motif (PAM) と呼ばれる 3 塩基 (NGG) を認識すると、その上流 3 塩基目と 4 塩基目の間で 2 本鎖切断する。gRNA としては、2 つの小分子 RNA [CRISPR RNA (crRNA) と trans-activating crRNA (tracrRNA)]、もしくは、その 2 つの RNA を人工的に 1 本鎖にしたキメラ RNA が使われる。

我々は、pX330 などの gRNA/Cas9 発現プラスミドを受精卵に注入することで遺伝子破壊マウスが効率良く作れることを報告しているが、プラスミドは安定で再現性良く実験できる反面、DNA 断片がゲノムに組み込まれるリスクや、発現に時間がかかるためにモザイクマウスになるリスクが多いとされる。一方、最近では、高純度で安定した Cas9 酵素や gRNA が安価に市販されつつある。今回私たちは、マウス受精卵に Cas9 酵素と gRNA を導入して、変異マウスが得られる効率を調べた。

表 1. ゲノム編集効率

方法	遺伝子数	処理した 卵子数	2 細胞期胚の数 (発生率)	産子数 (産子数 / 2 細胞期胚の数)	解析した 産子数	Indel (indel / 解析した産子数)
プラスミド ⁽¹⁾	32	2397	1403	196	196	100 (53%)
タンパク (インジェクション法)	1	96	77 (80%)	26 (34%)	7	5 (71%)
タンパク (エレクトロポレーション法)	1	60	58 (97%)	16 (28%)	8	5 (63%)

(1) Mashiko et al. (2014) Dev. Growth Differ., 56 (1), 122-129.

▶ 考察

Cas9 タンパク質と gRNA の複合体を用いる方法では、プラスミドを構築する必要がない。crRNA、tracrRNA、Cas9 タンパク質のいずれも、高純度で安定な試薬として市販されている。さらに、EP 法では、マイクロマニピュレーター等の専門的な設備や技術が不要になった。私たちの経験上、インジェクション法と EP 法では、ゲノム編集効率には差が認められないものの、胚操作による生存率で EP 法が優れていた (EP 法はほぼすべての胚が生存するのに対し、インジェクション法では 1 割程度の胚が死滅もしくは発生停止する)。トータルでのゲノム編集マウス作製の効率化を考えると、EP 法による優れた生存率が利点となることは言うまでもない。今後は、精製 Cas9/gRNA と EP 法による複雑型ゲノム編集 (長領域欠損や染色体転座、レポーターノックインなど) マウス作製の効率改善が期待される。

▶ 方法

コントロールとして、midiprep kit (NucleoBond Xtra Midi, cat# 740410, Macherey-Nagel) で精製した 5 ng/μL pX330 プラスミド in T10E0.1 [10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.1 mM EDTA in ultrapure distilled water] を 0.2 μm フィルター濾過し、環状のまま受精卵前核にマニピュレーターで注入した。試験群では、crRNA (Sigma) と tracrRNA (cat# TRACRRNA05N-5NMOL, Sigma) の複合体を gRNA として、Cas9 タンパク質 (cat# B25640, Thermo Fisher Scientific) とともに受精卵前核にインジェクションあるいはエレクトロポレーション (EP) で導入した [インジェクション法: 19.4 ng/μL gRNA, 27.0 ng/μL Cas9 in T10E0.1, EP 法: 18.3 ng/μL gRNA, 47.1 ng/μL Cas9 in Opti-MEM]。

▶ 結果

Cas9 タンパク質と gRNA の複合体を用いた場合、プラスミドをインジェクションした場合とほぼ同等の効率で Indel 変異マウスを得た (表 1)。また、インジェクション法と EP 法の間でゲノム編集効率に大きな差はなかった。

スクリーニング向け CRISPR ライブラリー

アレイ型ライブラリー Sanger Arrayed Lentiviral CRISPR Libraries

ゲノム編集における先駆的な企業ならびに公益団体、メルクと The Wellcome Trust Sanger Institute (Sanger 研究所) の共同により、ヒト及びマウスゲノム用の初のアレイ型レンチウイルス CRISPR ノックアウトライブラリーが開発されました。

プール型 CRISPR ライブラリーの出現は、効率的なゲノムワイドのノックアウトスクリーニングを実現させたものの、標的の正確な特定には適切な細胞選抜とディープシーケンシングによる追加遺伝子解析 (デコンボリューション) が必要です。アレイ型スクリーニングには、デコンボリューションを実施せずにヒットを簡単に特定できるという利点があり、細胞死アッセイ、細胞イメージング、蛍光測定、化学発光測定、比色定量実験などのハイコンテンツスクリーニングも適合します。

ゲノムワイドのノックアウトスクリーニングは、注目している生物学的プロセスに関与する遺伝子やシグナル経路を発見するための効果的なアプローチです。シグマ アルドリッチのゲノムワイド Sanger CRISPR ライブラリーは、タンパク質をコードする 1 遺伝子あたり 2 種類の最適化 gRNA を採用し、特異的スクリーニングの確実性を最大限に高めつつ、作業時間とコストを低減した完璧なノックアウトスクリーニングを実現し、ハイスループットスクリーニングの可能性を大きく拡張しています。



アレイ型 Sanger CRISPR レンチウイルスライブラリーが 2016 年 R&D 100 賞を受賞しました

特長

- 原理的に分裂細胞、非分裂細胞を問わずあらゆる細胞に導入可能
- 細胞集団の濃縮が容易 (ピューロマイシン耐性および BFP 陽性細胞による選抜)
- 大腸菌グリセロールストックまたはレンチウイルス粒子から製品フォーマットを選択可能

製品仕様

ベクターマップ

(U6-gRNA:PGK-puro-2A-tagBFP)

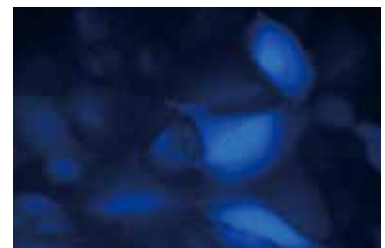
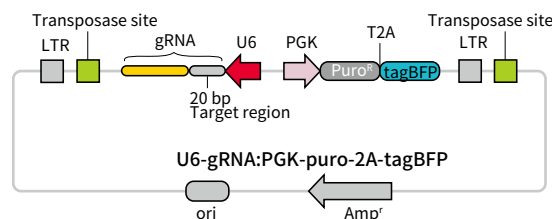


図 3 アレイ型 Sanger CRISPR レンチウイルスライブラリーによる形質導入例

アレイ型 CRISPR Lenti-gRNA ウイルスに感染した A549-Cas9-Blast 安定細胞における BFP の発現を観察しました。細胞は感染後 7 日目、撮影倍率は 20 倍です。

グリセロールフォーマット

- ・ 96-well プレート
- ・ 1 遺伝子あたり 2 個の gRNA
- ・ 1 クローンあたり 50 μ L 大腸菌グリセロールストック

レンチウイルスフォーマット

- ・ 1 遺伝子あたり 2 個の gRNA
- ・ アルミニウムシール付き 384-well バースコードラベル Costar プレート
- ・ 1 クローンあたり 20 μ L のウイルス粒子 ($\geq 1 \times 10^6$ TU/mL、p24 アッセイ)

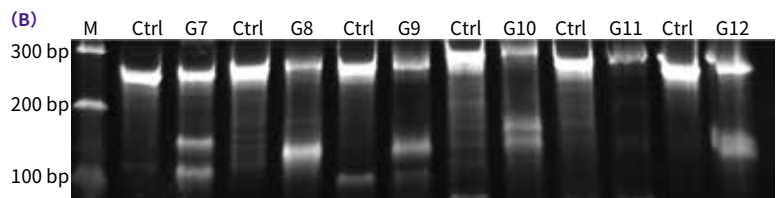
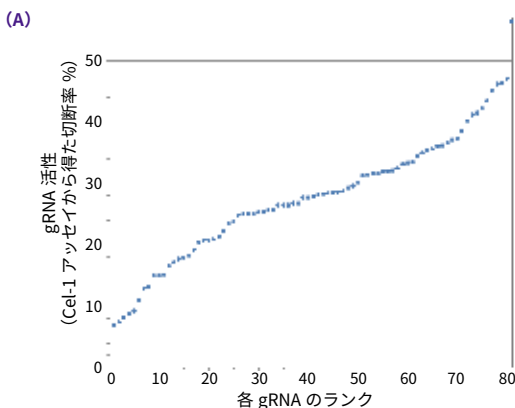


図 4 Sanger CRISPR ライブラリーのゲノム切断効率確認データ

A549-Cas9-Blast 細胞を代表的な 96-well プレートを用いて Sanger ベクターに感染させ、ピューロマイシンで選抜後、Cel-1 アッセイを実施しました。

(A) 平均ゲノム切断効率 (縦軸) とゲノム全体に対する活性保持 gRNA クローンの相関 (横軸、ランク) を示すグラフです。各点は単一のクローンを示しています。

(B) Cel-1 アッセイの代表的なゲル画像です。M: サイズマーカー、Ctrl: 野生型遺伝子座、G7~G12: ウェル番号。

ご注文情報

製品名	対象	プレート×枚数	フォーマット	カタログ番号	希望販売価格
Sanger Arrayed Whole Human Genome Lentiviral CRISPR Library	ヒトゲノム	96 × 383	大腸菌グリセロールストック	HSANGERG	お問い合わせください
		384 × 102	レンチウイルス粒子	HSANGERV	お問い合わせください
Sanger Arrayed Whole Mouse Genome Lentiviral CRISPR Library	マウスゲノム	96 × 450	大腸菌グリセロールストック	MSANGERG	お問い合わせください
		384 × 約 120	レンチウイルス粒子	MSANGERV	お問い合わせください

プール型ライブラリー

GeCKO2 Human and Mouse Whole Genome CRISPR Pooled Library

MIT とハーバード大学の協力体制が発展して設立された研究施設 Broad Institute のメンバー Feng Zhang 博士は、最初期のプール型ノックアウトスクリーニング法のひとつとして、Genome-scale CRISPR-Cas9 Knockout (GeCKO) ライブラリーによるゲノムノックアウトスクリーニングを 2014 年に発表しました⁽¹⁾。

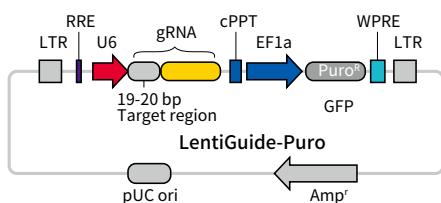
シグマ アルドリッチは Broad Institute との提携により、GeCKO に改良を加えた GeCKO v2 ライブラリー⁽²⁾ をゲノムスクリーニングツールとして提供しています。ベクターバックボーンは lentiGuide-Puro は、ほとんどの Cas9 発現細胞での使用に適合する gRNA 発現ベクターです。ライブラリーは A、B の 2 種類のサブプールに分割されており、サブプールごとに遺伝子あたり 3 種類の gRNA クローンをカバーしています。また、A ライブラリーは miRNA も標的にしています。

特長

- 19,000 以上のヒト又はマウス遺伝子に対して全ゲノムスクリーニングを実施可能
- サブプールあたり約 62,000 クローンからなる 2 サブプールから構成
- コントロールクロンの標準添付によって、プール型スクリーニング実験の成否を推定可能

製品仕様

ベクターマップ
(lentiGuide-Puro)



製品形態

- Broad Institute がデザインした 1 遺伝子あたり平均 6 種類の gRNA (miRNA は 1 遺伝子あたり 4 種類の gRNA)
- 2 ベクターシステム
- 2 種類のサブプールから構成：各プール 200 μ L (8 \times 25 μ L)
- 最小濃度はウイルス粒子数 5×10^8 TU/mL (p24 アッセイ)

参考文献

- (1) Shalem O. et al. (2014) Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, **343** (6166), 84-87. (PMID: 24336571)
- (2) Sanjana N. E. et al. (2014) Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat. Methods.*, **11** (8), 783-784. (PMID: 25075903)

ご注文情報

製品名	対象	フォーマット	薬剤選択	カタログ番号	弊社希望販売価格
GeCKO2 Human Whole Genome CRISPR Pool, All-in-one Lenti Particles (GeCKO2 Vector)	ヒトゲノム	レンチウイルス粒子	ピューロマイシン	HGECKO2A-1EA	お問い合わせください
GeCKO2 Human Whole Genome CRISPR Pool, gRNA Only Lenti Particles (GeCKO2 Vector)	ヒトゲノム	レンチウイルス粒子	ピューロマイシン	HGECKO2G-1EA	お問い合わせください
GeCKO2 Mouse Whole Genome CRISPR Pool, All-in-one Lenti Particles (GeCKO2 Vector)	マウスゲノム	レンチウイルス粒子	ピューロマイシン	MGECKO2A-1EA	お問い合わせください
GeCKO2 Mouse Whole Genome CRISPR Pool, gRNA Only Lenti Particles (GeCKO2 Vector)	マウスゲノム	レンチウイルス粒子	ピューロマイシン	MGECKO2G-1EA	お問い合わせください
Sigma Whole Human Genome Lentiviral CRISPR Pool	ヒトゲノム	レンチウイルス粒子	ピューロマイシン	HWGCRISPR-1EA	お問い合わせください
Human Kinase Lentiviral CRISPR Pool	ヒトキナーゼ	レンチウイルス粒子	ピューロマイシン	HKCRISPR-1EA	お問い合わせください

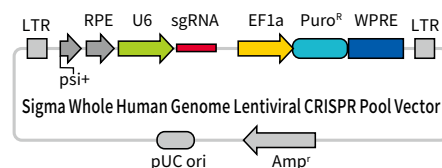
Sigma Whole Human Genome Lentiviral CRISPR Pooled Library

特長

- GeCKO v2 ライブラリーと同じバックボーンを使用
- 18,000 以上のヒト遺伝子に対して全ゲノムスクリーニングを実施可能
- サブプールあたり約 23,000 クローンからなる 8 サブプールから構成
- 多数の組み込みコントロールクロンによって、プール型スクリーニング実験の成否を推定可能

製品仕様

ベクターマップ
(lentiGuide-Puro)



製品形態

- シグマ アルドリッチがデザインした 1 遺伝子あたり平均 10 個の gRNA
- 2 ベクターシステム
- 8 種類のサブプールから構成：各プール 200 μ L (8 \times 25 μ L)
- 最小濃度はウイルス粒子数 5×10^8 TU/mL (p24 アッセイ)

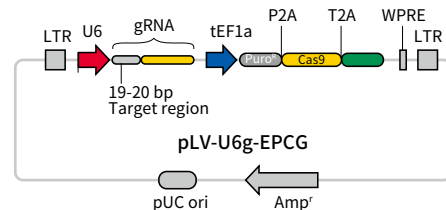
Human Kinase Lentiviral CRISPR Pool

特長

- 約 700 のヒトキナーゼ遺伝子に対してノックアウトスクリーニングを実施可能
- シグマ アルドリッチがデザインした約 6,000 クローン、遺伝子あたり 8.6 個の gRNA が高カバー率を実現
- 多数の組み込みコントロールクロンによって、プール型スクリーニング実験の成否を推定可能

製品仕様

ベクターマップ
(pLV-U6g-EPCG)



製品形態

- gRNA と Cas9 を発現するシグマ アルドリッチの単一ベクターシステム
- 単一プールから構成：200 μ L (8 \times 25 μ L)
- 最小濃度はウイルス粒子数 5×10^8 TU/mL (p24 アッセイにより測定)

細胞、胚への個別クローン導入用 CRISPR フォーマット

配列特異性向上型 CRISPR システム Cas9-D10A, Nickase & Paired gRNAs

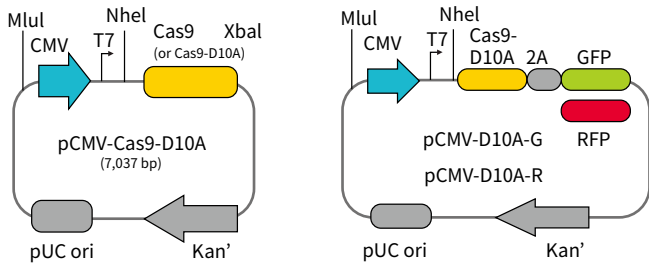
特長

- RuvC I ドメイン変異 Cas9-D10A の 1 本鎖 DNA 切断酵素 (Nickase) 活性を 1 組の gRNA と組み合わせ DNA 切断の特異性を向上
- ZFN (Zinc Finger Nuclease) と同程度に延長された認識鎖長
- ヒト、マウス、ラットゲノムの遺伝子領域に対するデザイン済み gRNA 製品* (Cas9-D10A 発現ベクターと 2 種類の gRNA 発現ベクターによる 3 ベクター系です)

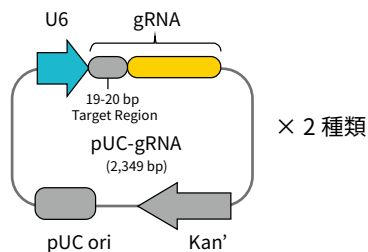
* gRNA の配列は、弊社ウェブサイト上では公開しておりませんが、製品納入時に製品添付情報としてお届けいたします。

製品仕様

Cas9-D10A ベクターマップ (pCMV-Cas9-D10A または pCMV-D10A-G/-R)



Paired gRNA ベクターマップ (pU6-gRNA × 2 種類)



製品形態

- プラスミドまたは細胞導入グレード RNA
- 3 ベクターシステム (Cas9-D10A 発現ベクター 1 種類、gRNA 発現ベクター 2 種類)

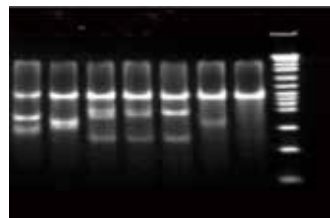


図 5 Cas9-D10A と一組の gRNA を利用したゲノム DNA 切断における一対の PAM 配列幅依存性

AAVS1 遺伝子座に対応したそれぞれ異なる PAM 配列間隔 (図 6, PAM spacing) を持つ 1 組の gRNA 発現プラスミドと Cas9-D10A 発現プラスミドを Nucleofection で K562 細胞に導入し、Cel-1 アッセイにより切断活性を調べました。各レーン下部に記載されている数値が、各 gRNA ペアの PAM 配列間隔長です。

AAVS1 遺伝子座に対応したそれぞれ異なる PAM 配列間隔 (図 6, PAM spacing) を持つ 1 組の gRNA 発現プラスミドと Cas9-D10A 発現プラスミドを Nucleofection で K562 細胞に導入し、Cel-1 アッセイにより切断活性を調べました。各レーン下部に記載されている数値が、各 gRNA ペアの PAM 配列間隔長です。



図 6 Cas9-D10A Nickase に適合する gRNA デザイン例

ニック切断効率を保つためには PAM 配列の間隔が 30 bp から 150 bp になるように gRNA をデザインする必要があります。

単一ベクター型 CRISPR システム All-in-One Sigma CRISPR

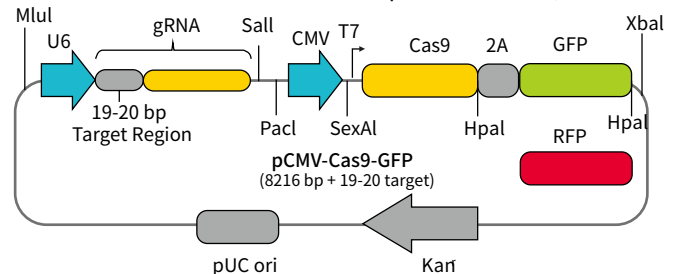
特長

- Cas9 と gRNA を効率よく同時発現できる単一ベクターフォーマット
- ベクター導入細胞を FACS 選抜可能
- ヒト、マウス、ラットゲノムの遺伝子領域に対するデザイン済み gRNA 製品*

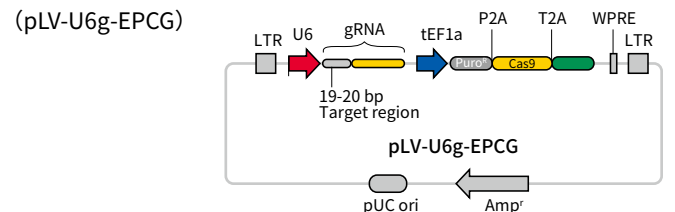
* gRNA の配列は、弊社ウェブサイト上では公開しておりませんが、製品納入時に製品添付情報としてお届けいたします。

製品仕様

細胞導入用プラスミドベクターマップ (pCMV-Cas9-GFP/-RFP)



レンチウイルス型ベクターマップ (pLV-U6g-EPCG)



製品形態

- U6-gRNA/CMV (または tEF1 α) -Cas9 ユニットの導入が可能な単一ベクターシステム
- プラスミド、細胞導入グレード RNA またはレンチウイルス粒子
- GFP タグは TagGFP2 (ex/em 483/506 nm)、RFP タグはモノマー型 RFP (ex/em 555/584 nm)

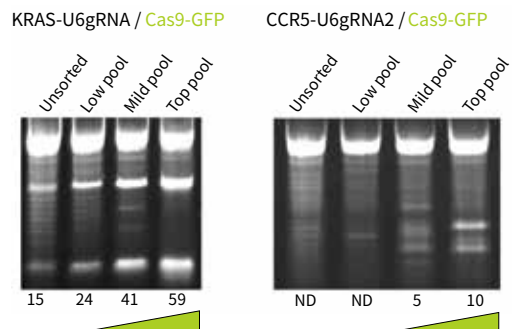


図 7 蛍光タンパク質マーカーを利用した All-in-One Sigma CRISPR 形質転換細胞の FACS による濃縮

GFP 蛍光シグナル量を基準に All-in-One ベクター導入細胞を Low Pool、Mid Pool、Top Pool にソーティング後、Cel-1 アッセイによりそれぞれの細胞集団における indels (挿入欠失変異) の発生頻度を測定しました。KRAS 遺伝子座に対するアッセイ (左) では Top プールはソーティングなし集団 (コントロール) の約 4 倍の濃縮が、CCR5 遺伝子座に対するアッセイ (右) ではコントロールではゲノム編集活性が確認できなかったものの、Top プールでは濃縮によって 10% の活性が確認されました。

個別ベクター型 CRISPR システム

Sigma CRISPR gRNA & Cas9 (WT)

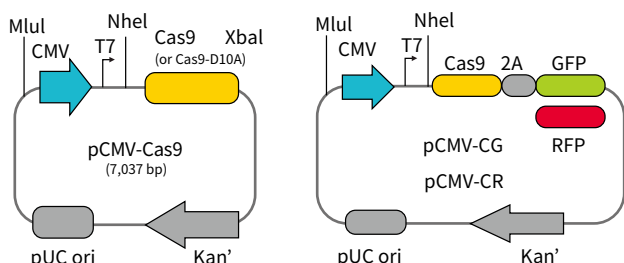
特長

- 実験デザインの自由度を向上させる 2 ベクターシステム
- オフターゲット効果低減のために導入 gRNA ベクター量を調節可能
- ヒト、マウス、ラットゲノムの遺伝子領域に対するデザイン済み gRNA 製品*

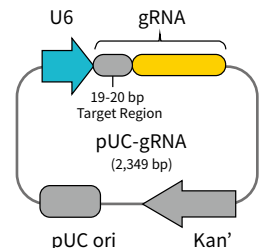
* gRNA の配列は、弊社ウェブサイト上では公開しておりませんが、製品納入時に製品添付情報としてお届けいたします。

製品仕様

Cas9 ベクターマップ (pCMV-Cas9 または pCMV-CG/-CR)



gRNA ベクターマップ (pU6-gRNA)



製品形態

- ・ プラスミドまたは細胞導入グレード RNA
- ・ 2 ベクターシステム (Cas9 発現ベクター、gRNA 発現ベクター 各 1 種類)

ご注文情報

製品名	形態	状態	入数	カタログ番号 またはご注文方法	希望販売価格
Cas9-D10A, Nickase	pCMV-Cas9-D10A プラスミド	20 ng/μL	1 μg	CAS9D10AP-1EA	¥59,000
	pCMV-D10A-G プラスミド	20 ng/μL	1 μg	CAS9D10AGFPP-1EA	¥59,000
	pCMV-D10A-R プラスミド	20 ng/μL	1 μg	CAS9D10ARFPP-1EA	¥59,000
	精製 mRNA	500 ng/μL	25 μg	CAS9D10AMRNA-1EA	¥100,000
Paired gRNAs	pU6-gRNA (プレデザイン) プラスミド	20 ng/μL	2 × 1 μg		¥127,500
	精製 gRNA (プレデザイン)	200 ng/μL	2 × 4 μg		¥127,500
All-in-One Sigma CRISPR	プラスミド (プレデザイン) プラスミド	20 ng/μL	1 μg		¥85,000
	精製 RNA (プレデザイン)	200 ng/μL	4 μg		¥85,000
	レンチウイルス粒子 (プレデザイン)	≥ 1x10 ⁶ TU/ml (p24 アッセイ)	1EA		¥85,000
Cas9	pCMV-Cas9 プラスミド	20 ng/μL	1 μg	CAS9P-1EA	¥39,000
	pCMV-CG プラスミド	20 ng/μL	1 μg	CAS9GFPP-1EA	¥59,000
	pCMV-CR プラスミド	20 ng/μL	1 μg	CAS9RFPP-1EA	¥59,000
	精製 mRNA	500 ng/μL	25 μg	CAS9MRNA-1EA	¥100,000
gRNA	pU6-gRNA (プレデザイン) プラスミド	20 ng/μL	1 μg		¥85,000
	精製 gRNA (プレデザイン)	200 ng/μL	4 μg		¥85,000

ゲノム編集用ベクターのカスタム製造も承ります。お申し込み手順等の詳細は、弊社テクニカルサービス (TEL : 03-6756-8245) へお問い合わせください。

CRISPR プレデザイン検索方法

- ① CRISPRs 検索エンジン*にアクセス
- ② 標的遺伝子の選択
("Gene Symbol", "RefSeq", "Gene ID" いずれかで入力)
- ③ "CRISPR/CRISPR Paired Nickase タブ" の選択
- ④ 生物種を選択 (ヒト / マウス / ラット)
- ⑤ 製品フォーマットの選択 (プラスミド、RNA など)
- ⑥ ターゲットの選択
("RefSeq" ならびに "Earliest Target Exon" の情報を元に Target を選択)

* 詳細はこちら

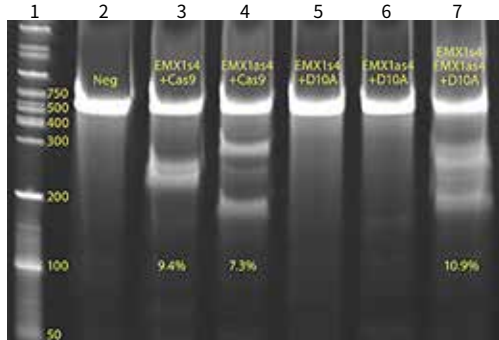
sigma-aldrich.com/crisprsearch-jp

実験の適切性の確認やトラブルシュートに CRISPR/Cas9 コントロール

Sigma CRISPR Positive Controls

特長

- ヒト *EMX1* 遺伝子へのゲノム編集を確認済みのポジティブコントロール gRNA
- 野生型 Cas9 用 gRNA と Cas9-D10A 用 gRNA から選択可能
- Cas9 あるいは Cas9-D10A 発現プラスミド添付



レーン 1. DNA マーカー (bp) レーン 2. ネガティブコントロール レーン 3. Cas9 + gRNA #1
レーン 4. Cas9 + gRNA #2 レーン 5. Cas9-D10A + gRNA #1 レーン 6. Cas9-D10A + gRNA #2
レーン 7. Cas9-D10A + gRNA #1 + gRNA #2

図 8 CRISPR 陽性コントロール使用例

ヒト *EMX1* を標的にした CRISPR/Cas9 ポジティブコントロールキット (レーン 3: CRISPR01-1SET、レーン 7: CRISPR02-1SET) の使用実績です。gRNA #1 は CRISPR01 および CRISPR02 に同梱されている *EMX1* gRNA クローン s4 (5' -GAGTCCGAGCAGAAGAAGGG-3')、gRNA #2 は CRISPR02 に同梱されている *EMX1* gRNA クローン as4 (5' GCCGTTTGTACTTTGCTCCCGG-3') です。

Sigma CRISPR Universal Negative Controls

特長

- バイオインフォマティクスにより設計された、ヒト、マウス、ならびにラットゲノムに相補配列を持たないユニバーサルネガティブコントロール
- All-in-One Sigma CRISPR フォーマットに添付されてくるネガティブコントロールのプラスミド版 (pLV-U6g-EPCG バックボーン)

ご注文情報

製品名	形態	状態	入数	カタログ番号	希望販売価格
CRISPR Human <i>EMX1</i> Positive Control	pCMV-Cas9 プラスミド + pU6-gRNA (<i>EMX1</i> -s4) プラスミド	20 ng/ μ	各 1 μ g	CRISPR01-1SET	¥59,000
CRISPR Nickase Human <i>EMX1</i> Positive Control	pCMV-D10A プラスミド + pU6-gRNA (<i>EMX1</i> -s4) プラスミド + pU6-gRNA (<i>EMX1</i> -as4) プラスミド	20 ng/ μ L	各 1 μ g	CRISPR02-1SET	¥59,000
CRISPR Universal Negative Control 1	pU6-gRNA/CMV-Cas9-GFP プラスミド	20 ng/ μ L	1 μ g	CRISPR06-1EA	¥50,000
CRISPR Universal Negative Control 2	pU6-gRNA/CMV-Cas9-GFP プラスミド	20 ng/ μ L	1 μ g	CRISPR07-1EA	¥50,000
CRISPR Universal Negative Control 3	pU6-gRNA/CMV-Cas9-GFP プラスミド	20 ng/ μ L	1 μ g	CRISPR08-1EA	¥50,000
CRISPR-Lenti Human <i>EMX1</i> Positive Control DNA	pLV-U6g (<i>EMX1</i>)-EPCG プラスミド	20 ng/ μ L	1 μ g	CRISPR11-1EA	¥59,000
CRISPR-Lenti Human <i>EMX1</i> Positive Control Transduction Particles	pLV-U6g (<i>EMX1</i>)-EPCG レンチウイルス	10^6 TU/mL	200 μ L	CRISPR11V-1EA	¥59,000
CRISPR-Lenti Human <i>HPRT1</i> Positive Control DNA	pLV-U6g (<i>HPRT1</i>)-EPCG プラスミド	20 ng/ μ L	1 μ g	CRISPR13-1EA	¥59,000
CRISPR-Lenti Human <i>HPRT1</i> Positive Control Transduction Particles	pLV-U6g (<i>HPRT1</i>)-EPCG レンチウイルス	10^6 TU/mL	200 μ L	CRISPR13V-1EA	¥59,000
CRISPR-Lenti Human <i>HPRT1</i> Positive Control High Titer Transduction Particles	pLV-U6g (<i>HPRT1</i>)-EPCG レンチウイルス	$\geq 1 \times 10^8$ TU/mL (p24 アッセイ)	200 μ L	CRISPR13H-1EA	¥199,000
CRISPR-Lenti Non-Targeting Control Plasmid	pLV-U6g-EPCG プラスミド	20 ng/ μ L	1 μ g	CRISPR12-1EA	¥59,000
CRISPR-Lenti Non-Targeting Control Transduction Particles	pLV-U6g-EPCG レンチウイルス	10^6 TU/mL	200 μ L	CRISPR12V-1EA	¥59,000
MISSION Lentiviral Packaging Mix	—	—	0.25 mL	SHP001-0.25ML	¥50,000
	—	—	1.7 mL	SHP001-1.7ML	¥175,000

Sigma CRISPR-Lenti Controls

特長

- ウイルス調製用プラスミドまたはウイルス粒子の形態から選択可能 (pLV-U6g-EPCG バックボーン)
- 陽性コントロール (ヒト *EMX1* またはヒト *HPRT1*) と陰性コントロールを提供

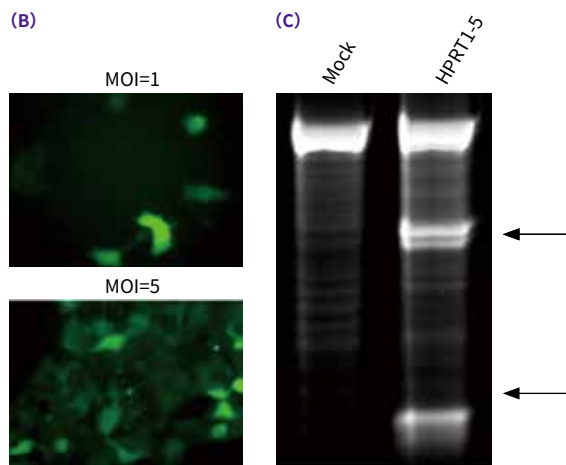
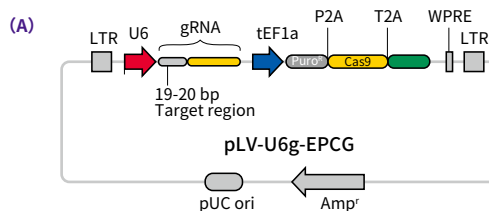


図 9 CRISPR-Lenti 陽性コントロール使用例

ヒト *HPRT1* を標的にしたレンチウイルス型ポジティブコントロールによる実験例を示します。

- (A) バックボーンベクター (pLV-U6g-EPCG) のプラスミドマップです。
 (B) 形質導入後の HEK293 細胞における GFP シグナル検出結果です。(上) MOI=1、MOI=5。
 (C) ヒト *HPRT1* を標的にした gRNA と Cas9 をコードする pLV-U6g-EPCG レンチウイルスによる形質導入後、ピュロマイシンと 6-TG による選抜を受けた HeLa 細胞集団 (HPRT1-5) の indels を Cel-1 アッセイによって検出 (矢印部分) した結果です。

ORF レスキュー実験によるノックアウト検証なら

MISSION® TRC3 Human LentiORF Collection

cDNA 合成はきわめて一般的な技術ですが、適切な cDNA クローンの取得には多くの時間とコストが費やされる可能性があります。バイアスの発生につながりやすい複数のステップが必要になる可能性が高く、クローニングされた配列の検証も必要です。また、突然変異が導入される可能性もあるため、望ましい転写産物を得るためにクローニング実験を繰り返さなくてはならない場合もあります。

シグマアルドリッチは、全配列決定済みかつクローニング済みのヒトオープンリーディングフレーム (ORF) に関し、現時点で最大のコレクションを提供しています。The RNAi Consortium (TRC) による ORF ライブラリーを含む MISSION TRC3 Human LentiORF Collection は、14,000 を超えるヒト遺伝子を網羅する、50,000 を超えるクローニング済み ORF から構成されています。シグマ アルドリッチの持つ最高クラスのレンチウイルスベクター製造技術によって、トランスフェクションが難しい細胞株に対しても、安定した組込み、細胞の濃縮、長期遺伝子発現が実現します。

MISSION TRC3 ヒト LentiORF コレクションは、エントリーベクター、プラスタイン選択用ベクター、ピューロマイシン選択用ベクターという 3 種類の Gateway 適合ベクターにパッケージングされた全配列決定済み ORF の包括的コレクションです。すべてのクローンは大腸菌グリセロールストックフォーマット、DNA フォーマット、ウイルス粒子フォーマット (エントリーライブラリーを除く) で提供されています。

MISSION TRC3 ヒト LentiORF コレクションを活用し、配列の検証、PCR、ライゲーションをはじめとする時間のかかるクローニングステップを省いてください。クローニング済みの MISSION TRC3 LentiORF が、新規 cDNA クローニングにおける不確実性を排除し、迅速な実験の実行を可能にします。弊社オンラインツールから ORF クローンを検索し、関心をお持ちの遺伝子に最も適したクローンを選択いただけます。シグマアルドリッチの全配列決定済み LentiORF クローンは、タンパク質発現に理想的な近道であり、研究に必要なツールの作製ではなく、研究者の皆様が研究テーマの遂行そのものに集中することを可能にします。

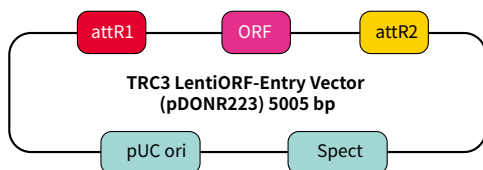
LentiORF エントリーベクターライブラリー

特長

- hORFeome v8.1 ライブラリー由来の拡充された遺伝子及びクローンが含まれ、カバーする合計ヒト遺伝子数は最大 14,000 超 (クローンは 16,000 超)
- 天然の終止コドンが除去されている「オープンな」ORF
- Gateway システムにおける発現ベクターへの組み換え用ベクター (エントリーベクター) ライブラリーで、異なるプロモーター、選択マーカー、発色団、テトラサイクリン発現調節系などを含む様々な Gateway 適合発現ベクターに簡単かつ効率的に転移可能

製品仕様

ベクターマップ (pDONR223)



ご注文情報

製品名	対象	フォーマット	薬剤選択 ^{※2}	ご注文方法	希望販売価格
MISSION® TRC3 Human LentiORF Collection	レンチウイルスを感染可能な細胞	グリセロールストック プラスミド DNA レンチウイルス粒子 ^{※1} から選択可能	プラスタイン またはピューロマイシン	お問い合わせください	お問い合わせください

※1 LentiORF エントリーベクターライブラリーは、大腸菌グリセロールストックあるいはプラスミド DNA フォーマットでの提供となります。

※2 発現用ベクター (プラスタイン選択用ベクターならびにピューロマイシン選択用ベクター) のもつ哺乳類細胞選択用薬剤体制遺伝子です。

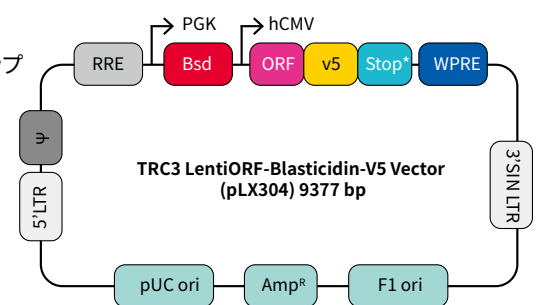
LentiORF プラスタイン選択用ベクターライブラリー

特長

- MISSION TRC3 Blastidicin Library は、CCSB-Broad ライブラリー由来の遺伝子及び拡張クローンからなる、合計 14,000 を超えるヒト遺伝子と 16,000 を超えるクローンを含有
- ベクターはプラスタイン耐性遺伝子 (Bsd) を持ち、ORF の C 末端側は特異抗体を用いてウェスタンブロットティング、免疫蛍光検出及び免疫沈降実験に利用できる V5-エピトープタグをコード
- ほぼすべての哺乳類細胞に適用可能な CMV プロモーターベースの ORF 過剰発現用コンストラクト

製品仕様

ベクターマップ (pLX304)



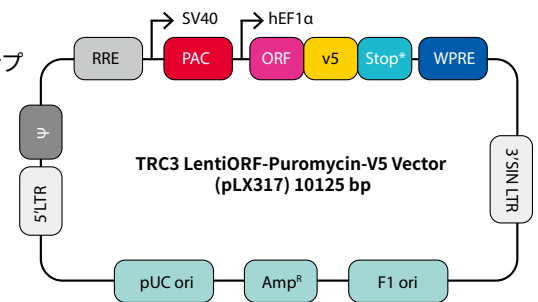
LentiORF ピューロマイシン選択用ライブラリー

特長

- 17,000 を超えるヒト ORF のコレクション
- ピューロマイシン耐性遺伝子 (Pac) を持ち、CMV プロモーターが DNA メチル化によりサイレンシングされる一部の細胞での使用にも最適な、EF1- α プロモーターを持つ哺乳類細胞過剰発現用ベクター
- プール型スクリーニングのアプリケーションに適合: V5 タグの下流には 24 塩基のクローン固有バーコード配列と転写終止コドンが配置されており、ヒット遺伝子の容易な同定のためにライブラリー目録ファイルにバーコード配列を記載

製品仕様

ベクターマップ (pLX317)



大幅
値下げ

MISSION® shRNA 個別クローン&プール型ライブラリー

最大 **65% OFF**

RNAi が使用される研究領域の拡大および技術の一般化に伴い、トランスフェクションが困難な細胞や、非分裂細胞のノックダウンでご愛顧いただいた MISSION shRNA を 2017 年 5 月から **大幅に値下げいたしました。**

お求めになりやすくなった MISSION shRNA を、皆様の研究の推進にぜひご活用ください。

	MISSION shRNA Library		TRC1 Library	
	総数	検証済数	総数	検証済数
遺伝子数				
ヒト	20,018	8,897	16,019	7,405
マウス	21,171	8,345	15,960	6,506
合計	41,189	17,242	31,979	13,911
クローン数				
ヒトクローン	129,695	43,470	82,017	24,550
マウスクローン	118,062	36,654	77,819	20,564
合計	247,757	80,124	159,836	45,114

MISSION shRNA 個別クローン

最大級の検証済 shRNA コレクションに由来する個別クローンです。

ご注文情報

フォーマット	対象	標準納期	製品番号	1 クローンセット		5 クローンセット	
				旧希望販売価格	新希望販売価格	旧希望販売価格	新希望販売価格
大腸菌グリセロールストック	ヒトゲノム、マウスゲノム	2-3 週間	SHCLNG	¥72,500	¥25,000	¥145,000	¥50,000
精製プラスミド DNA	ヒトゲノム、マウスゲノム	3-4 週間	SHCLND	¥90,000	¥60,000	¥180,000	¥115,000
レンチウイルス粒子	ヒトゲノム、マウスゲノム	4-6 週間	SHCLNV	¥105,000	¥70,000	¥210,000	¥125,005

MISSION LentiPlex shRNA プール型ライブラリー

The RNAi Consortium (TRC) コレクションならびにシグマアルドリッチ設計のクローンからなるスクリーニング用プール型ライブラリーです。

ご注文情報

製品名	対象	ライブラリータイプ	カタログ番号	旧希望販売価格	新希望販売価格
MISSION LentiPlex Pooled Whole Genome Libraries	ヒト全ゲノム	プール型 (TRC 1)	SHPH01-1SET	¥2,200,000	¥1,500,000
		プール型 (TRC 1.5)	SHPH15-1SET	¥1,200,000	¥960,000
		プール型 (TRC 2)	SHPH2-1SET	¥1,000,000	¥800,000
		プール型 (完全ライブラリー)	SHPHLIBR-1SET	¥3,600,000	¥2,300,000
	マウス全ゲノム	プール型 (TRC 1)	SHPM01-1SET	¥2,200,000	¥1,400,000
		プール型 (TRC 1.5)	SHPM15-1SET	¥447,500	¥447,500
		プール型 (TRC 2)	SHPM2-1SET	¥1,000,000	¥800,000
		プール型 (完全ライブラリー)	SHPMLIBR-1SET	¥3,200,000	¥2,000,000

CRISPR 実験の豆知識

ノックアウトされた遺伝子のレスキュー実験を簡便にする gRNA デザイン方法

出典 Incontro S. et al. (2014) Efficient, complete deletion of synaptic proteins using CRISPR. *Neuron*, **83** (5), 1051-1057. (PMID: 25155957)

「CRISPR/Cas9 は急性の作用を起こすため、遺伝子の機能欠損に起因する遺伝子機能補償が他の方法に比較して起こりにくい実験手法です。そして、観察された表現型の原因としてのオフターゲット効果の可能性を完全に排除するためには、レスキュー実験が不可欠です。レスキュー実験の際は、レスキューコンストラクト自体が CRISPR の標的にならないことが重要です。これは、gRNA (及び/又は PAM) によって認識される領域に同義変異が導入されている cDNA か、配列に十分な多様性があるときは様々な種由来の cDNA を用いることで実現可能ですが、本研究では、より単純な別のアプローチ法を用いてレスキュー実験を行いました。実際には、切断部位はエクソン内にあるが、gRNA 配列の大部分はイントロン内にあるような、イントロン-エクソン接合部における特異的 gRNA 配列を検索し、ノックアウト実験を実施しました。この極めて単純な方法を用いることによって、未修飾の cDNA^{*} を用いたレスキュー実験の実施が可能となり、表現型の検証を非常に簡単かつ迅速に行えるようになりました。」

* シグマアルドリッチのパリデーショ済み cDNA コレクションは 11 ページをご覧ください。

本紙記載の製品は試験・研究用です。ヒト、動物への治療、もしくは診断目的として使用しないようご注意ください。本紙記載の製品構成は諸般の事情により予告なく変更となる場合がありますのでご了承ください。記載価格に消費税は含まれておりません。本文中のすべてのブランド名または製品名は特記なき場合、Merck KGaA の登録商標もしくは商標です。TransIT is a registered trademark of Mirus Bio. 本紙記載の内容は 2017 年 7 月時点の情報です。© 2017 Merck KGaA, Darmstadt, Germany. All rights reserved.

メルク株式会社

ライフサイエンス リサーチ & バイオロジー

〒153-8927 東京都目黒区下目黒 1-8-1 アルコタワー 5F

製品の最新情報はこちら www.merckmillipore.jp/bio

お問合せ ▶ E-mail: bioinfo@merckgroup.com Tel: 03-4531-1140 Fax: 03-5434-4859