

ガイドRNA^{※1}

CRISPR/Cas9 システムの利用には、ターゲット配列ごとにガイドRNAが必要です。
GENOME CRAFT RNA なら、わずらわしい発現ベクター構築や気を遣うRNA調製作業は要りません。

Genome Craft Type CT

■化学合成による crRNA および tracrRNA の作製

化学合成したcrRNAとtracrRNAを用いることでsgRNAと同様に使用できます。
一本の長いsgRNAを二つに分割することで、化学合成が可能となりました。より簡単により多くのターゲットに。

●crRNA (商品コード: GE-001)^{※2} ご指定のターゲット配列に合わせた配列を合成します。逆相カラム精製品。

価格	10,000円(税別)
納期	1週間～
納品物	カスタムcrRNA1種40μg以上

●tracrRNA (商品コード: GE-002) カスタム合成したcrRNA、お手持ちのCas9と合わせてお使いください。HPLC精製品。

価格	25,000円(税別)
納期	1週間～
納品物	カスタムcrRNA1種40μg以上

●tracrRNA-FAM (商品コード: GE-002F)

tracrRNAの3'末端に蛍光色素FAMをラベルしています。細胞へのトランスフェクションコントロールとしてお使いください。
通常のtracrRNAと同様に、Cas9蛋白質、crRNAとコンプレックスを形成し、ターゲットDNAを切断します。

価格	30,000円(税別)
納期	1週間～
納品物	tracrRNA-FAM 40μg以上

●CRISPR/Cas RNA セット (商品コード: GE-003)

crRNAとtracrRNAがセットになったお得なスターターキットです。
RNAセットの精製方法…crRNA(逆相カラム精製)^{※2} / tracrRNA(HPLC精製)

価格	30,000円(税別)
納期	1週間～
納品物	カスタムcrRNA 1種 40μg以上 / tracrRNA 40μg以上

Genome Craft Type SG

■酵素合成による sgRNA の作製^{※3}

in vitro 転写反応にて sgRNA を合成いたします。鋳型DNA^{※4}を化学合成して転写反応に用いますので、
標的配列をご連絡いただくだけで実績あるsgRNAがお手元に。

●sgRNA (商品コード: GE-004)

価格	■1種…30,000円(税別) ■3種…70,000円(税別)
納期	1週間～
納品量	sgRNA 20μg以上

ターゲット配列

ガイドRNAのデザインにはCRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) が便利です。

切断したい配列内でCRISPR/Cas9システムのターゲット候補サイトの検索ができ、
対象の生物種でoff-target効果が出にくいターゲットサイトも分かります。

(参考文献) Naito Y, Hino K, Bono H, Ui-Tei K. (2014)
CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with
reduced off-target sites. Bioinformatics.
<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btu743>



ご注文方法

発注書をホームページ (http://www.fasmac.co.jp/genome_editing/index.html) より
ダウンロードしていただき、必要事項をご記入の上、
E-mail (dnacraft@fasmac.co.jp) にてお送りください。

※1 本製品はStreptococcus pyogenesのCRISPR/Casシステムに対応しています。
※2 tracrRNAはHPLC精製、crRNAは逆相カラム精製を行っております。
より高い精製度のcrRNAをご希望の場合はHPLC精製(+4,000円)をご指定ください。
※3 MS2ループ等のご指定の配列を付加することも可能です。お問い合わせください。
※4 鋳型DNAはクローニングを行いませんので微量の変異DNA分子を含む可能性があります。
※ご希望の配列を作成いたしますが必ずしもその機能を保証するものではありません。

Recombinant Cas9

製品概要

細胞に導入して遺伝子改変生物の作成や、in vitro digestion assayによるガイドRNAの活性確認にご利用いただけます。
またGenome CraftのガイドRNAと組み合わせることでより簡単にReady to useでご利用いただけます。

●Cas9タンパク質 CRISPR/Casによるゲノム編集で最も良く使用されている2本鎖切断型です。

製品コード	容量 (5μg/μl)	価格 (税別)
GE-005-S	100μg	22,000円
GE-005-L	100μg x3	55,000円

●Cas9 D10Aニッケース ターゲット配列のアンチセンス鎖(PAM nGGの相補鎖)のみを切断する1本鎖切断型です。

製品コード	容量 (5μg/μl)	価格 (税別)
GE-006-S	100μg	22,000円
GE-006-L	100μg x3	55,000円

保存温度：-20℃以下(長期保管は-80℃推奨)
保存バッファー：10mM Tris-HCl, 200mM KCl, 1mM DTT, 20%Glycerol(PH7.5)
タンパク質由来：Recombinant E. coli

付属バッファー
Dilution buffer ①：10mM Tris-HCl, 200mM KCl, 1mM DTT, 20%Glycerol(PH7.5)
Dilution buffer ②：10mM Tris-HCl, 200mM KCl, 1mM DTT, 80%Glycerol(PH7.5)
10x in vitro buffer：1,000 mM NaCl, 500 mM Tris-HCl(PH 7.9), 100 mM MgCl₂, 10 mM DTT

ご注文方法

ご希望の製品、数量を下記アドレスまでご連絡ください。
株式会社ファスマック ゲノム編集サービス担当
E-Mail:dnacraft@fasmac.co.jp

※使用は研究目的に限定し、診断・臨床用試薬としては使用しないで下さい。
※組換え大腸菌を用いて製造しております。使用にあたりご留意下さい。
※必ずしも実験結果を保証するものではありません。

ドナーDNA

製品概要

■ ssODN (一本鎖オリゴドナーDNA) 合成

塩基置換やloxPサイト等、数十塩基までの配列をノックインするドナーDNAとしてご利用いただけます。
導入したいノックイン配列の両端にCRISPR/Casターゲット領域と相同な各40~80塩基程度を付加することで、相同組換のドナーDNAとして機能します^{※5}。

【価格例】^{※6} 150塩基のssODNの合成 (PAGE精製/ヌクレアーゼ耐性を付与するため両末端に3ヶ所ずつS化修飾)
¥220(塩基単価)×150塩基+¥1,000(基本料金)+¥5,000(PAGE精製料金)+¥3,000 = ¥40,500

■ ssDNA (一本鎖DNA) 作製^{※7,※8}

200~2500ntのオリゴDNA合成では対応できない長さの一本鎖DNAを作製いたします。ゲノム編集のノックイン実験ではプラスミドのターゲティングベクターに比べて、相同組換アームの長さを数十~300塩基程度と短くすることができ、比較的簡単に効率良くノックイン実験が行なえることが報告されています。GFP等のマーカー遺伝子の導入やfloXアレルの作製にお使いください。

参考文献:Miura H et al., Sci Rep. 2015 Aug 5;5:12799. /Yoshimi K et al., Nat Commun. 2016 Jan 20;7:10431.

長さ	価格 (税別)	納期
201~500nt	¥50,000	20営業日
501~1000nt	¥100,000	
1001~1500nt	¥150,000	25営業日
1501~2000nt	¥200,000	
2001~2500nt	¥250,000	30営業日

保証収量:2μg

■ ターゲティングベクター作製^{※8,※9}

遺伝子ノックアウトやノックイン等、遺伝子ターゲティング用のドナーDNAを作製いたします。レポーター遺伝子導入による可視化や遺伝子カセットの導入によるコンディショナル発現制御等が可能になります。ゲノムDNAやBACクローン等をテンプレートにしたPCRクローニングや、人工DNA合成を組み合わせることでベクター構築を行いますので、通常の人工遺伝子作製では対応が難しい繰り返しを含む配列にも対応可能です。

参考文献:Aida T et al., Genome Biol. 2015 Apr 29;16:87 / Nakade S et al., Nat Commun. 2014 Nov 20;5:5560

【価格例】^{※6} アーム各1.5kb + 導入配列0.5kb 計3.5kb 20万円 アーム各1.8kb + 導入配列1.8kb 計5.4kb 27万円

ご注文方法

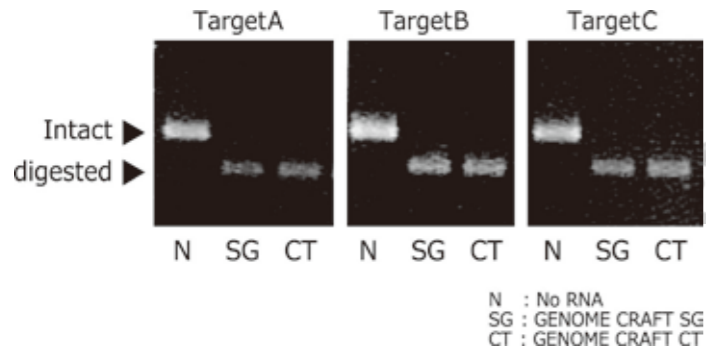
ご希望の配列を下記アドレスまでメールでお送りください。
株式会社ファスマック ゲノム編集サービス担当 E-Mail:dnacraft@fasmac.co.jp

※5 精製度の高いPAGE精製の利用をお奨めしております。
※6 価格や納期は配列によって変わります。メールまたはお電話でご相談ください。
※7 配列によっては価格納期が変更になることがあります。
※8 受注後であっても予期せず合成が困難な場合には弊社都合で注文をキャンセルさせていただくことがあります。その際には製品代金はいただきません。
※9 必要に応じてテンプレートDNAの提供をお願いいたします。

使用例

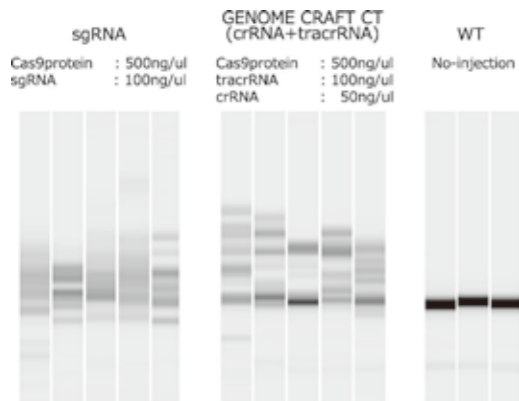
1 In vitro digestion assay

Cas9 proteinとGenome Craft Type SG(sgRNA)又はGenome Craft Type CT(crRNA+tracrRNA)、基質DNA断片を混合し、DNA切断実験を行った。37°Cにて1時間インキュベート後、アガロースゲル電気泳動を行った。バンドのシフトが確認されたことから、sgRNA、crRNA+tracrRNAとも良好なDNA切断活性が確認された。



2 In vivo Genome Editing

Cas9蛋白質とsgRNA又はGenome Craft Type CT(crRNA+tracrRNA)を混合し、メダカ胚にインジェクションした。4日胚まで発生させた各個体のゲノムDNAからターゲット領域をPCR増幅してheteroduplex mobility assaysにて変異の検出を行った。下図の各レーンに1個体分の結果を示している。

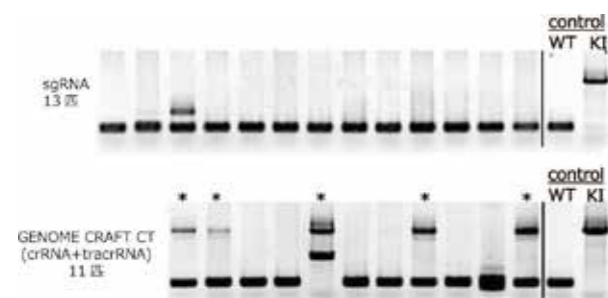


sgRNA、Genome Craft Type CT共に変異の存在を示す複数のバンドが観察され、高効率な変異導入ツールであることが確認された。

データ提供 京都大学農学研究科 応用生物科学専攻 海洋生物機能学分野 木下政人様

3 遺伝子ノックイン(マウス)

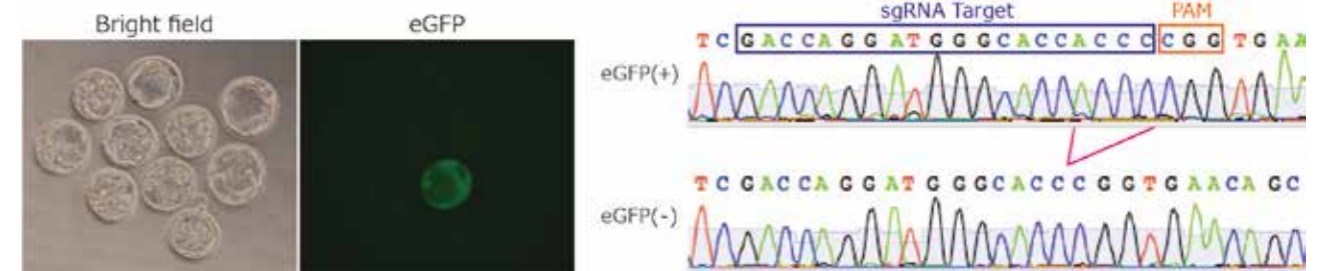
Cas9蛋白質とActb遺伝子に対するsgRNA又はGenome Craft Type CT (crRNA+tracrRNA)、ターゲティングドナーベクターを混合し、マウス受精卵に注入してノックインマウス(約2.5kbの遺伝子カセット導入)の作成を試みた。注入された受精卵から生まれた仔マウスに対して、PCRでWTアリル、ノックイン(KI)アリルの有無調べた。sgRNAを用いた場合には仔マウス13匹中にKIマウスは得られなかったがGenome Craft Type CTを用いた場合には11匹中にKIマウス5匹(*)を得ることができ、ゲノムの意図した場所へ、正確で高率に遺伝子挿入できることが確認された。



データ提供 東京医科歯科大学 難治疾患研究所 分子神経科学分野 相田知海 様, 田中光一 様
*下記文献より改変
Aida, Tomomi et al. "Cloning-Free CRISPR/ Cas System Facilitates Functional Cassette Knock-in in Mice." Genome Biology 16.1 (2015): 87.

4 Cas9 protein (マウス)

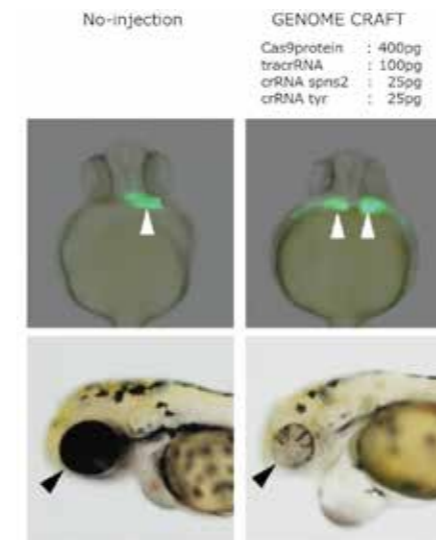
Genome Craft Cas9 protein(50ng/ul)とeGFPに対するsgRNA(5ng/ul)を混合してeGFPを発現するマウス1細胞期胚にインジェクションし、発生4日目にその発現を観察した。またeGFP遺伝子配列の解析を行った。観察した10個の受精卵のうち9個で蛍光の消失が確認された。また、eGFPの蛍光が消失した細胞のターゲット領域のシーケンス解析で変異導入が確認された。



データ提供 東海大学医学部医学科基礎医学系分子生命科学 大塚正人 様

5 ダブルノックアウト(ゼブラフィッシュ)

2つの遺伝子(sps2:心臓形成に関与、tyr:色素形成に関与)に対するGenome Craft Cas9 protein、Genome Craft Type CT(crRNA+tracrRNA)を混合してゼブラフィッシュ胚(1-2細胞期)にインジェクションし、発生の様子を観察した。



受精1日後(上段)にGFPで染色された心臓の形成異常(白矢印)が、2日後(下段)には目の色素形成異常(黒矢印)が観察された。これらはそれぞれsps2欠損、tyr欠損の表現型と同一である。

データ提供 山梨大学大学院 総合研究部 発生生物学 川原敦雄 様