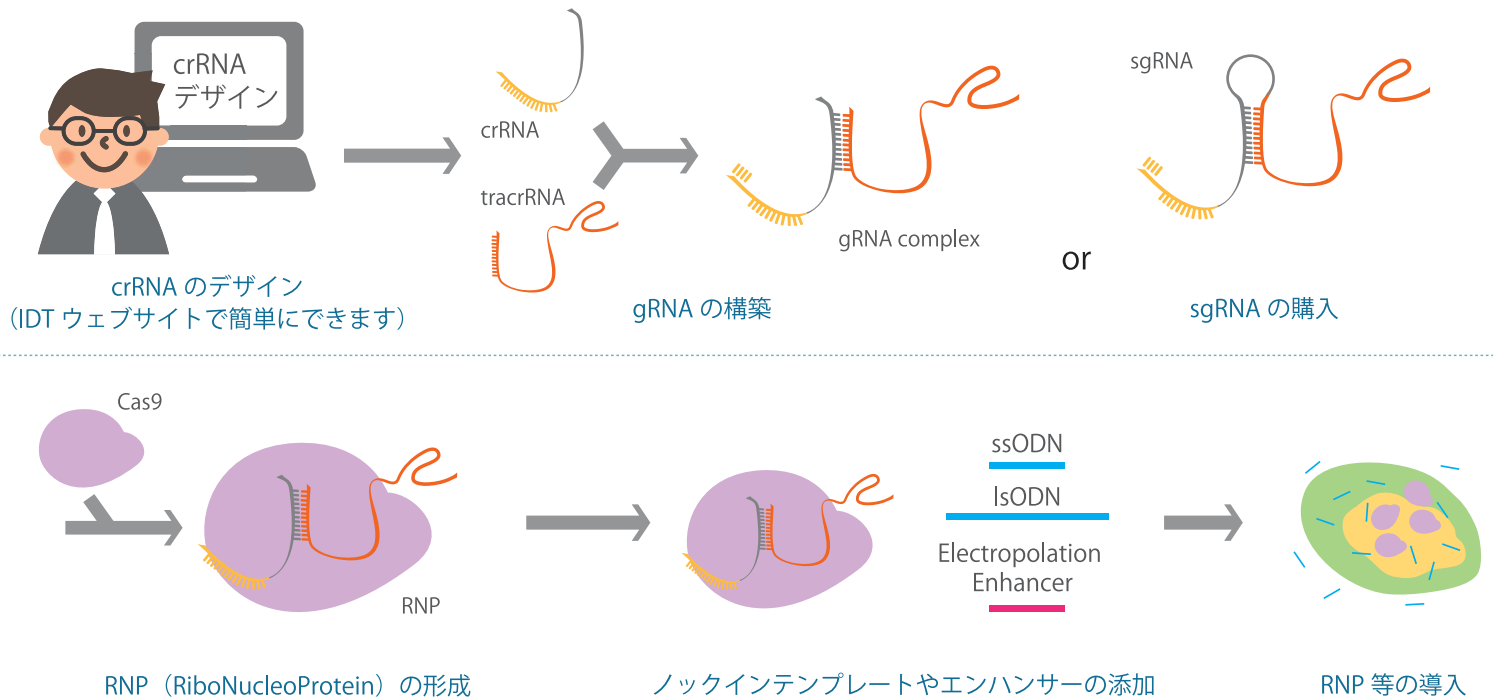


CRISPR Genome Editing

IDT のゲノム編集用製品 Alt-R シリーズは、IDT 独自の発想や膨大な実験に裏打ちされた製品群です。効率的に切断するための gRNA のデザインや、簡便な RNP の構築や導入、HDR の促進など、より効率的なゲノム編集体験を提供します。

ゲノム編集ワークフロー



CRISPR-Cas9 gRNA

Alt-R® CRISPR-Cas9 System では、gRNA は crRNA(シーアール RNA) と tracrRNA(トレイサー RNA) の 2 種の機能的コンポーネントに分割して合成・納品しております。crRNA は認識配列を含む gRNA complex の前半部分で、異なるターゲットに対して合成が必要です。tracrRNA は、crRNA とハイブリダイズさせて gRNA complex を作製します。ヌクレース耐性修飾が施されているため、細胞内でより長く機能します。tracrRNA は共通であるため、crRNA を別途購入すれば、異なる部位のゲノム編集が行えます。ヒト、マウス、ラットに対するコントロールキットも併せて販売しております。

Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA

gRNA の前半部分 (35-36 塩基) です。エキソヌクレース耐性修飾を crRNA の両末端に付加しています。

Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA XT

crRNA と比較して、2-O-Methyl 塩基など、より強い RNase 耐性力を持つ修飾塩基を利用した crRNA です。

Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA

gRNA の後半部分 (67 塩基) です。エンドヌクレース及びエキソヌクレース耐性修飾を付加、さらに HPLC 精製を行っており、非常に高い品質を誇ります。

Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA, ATTO™ 550

ATTO550 色素を付加した tracrRNA です。

Alt-R® CRISPR-Cas9 sgRNA

99-100 塩基の sgRNA(シングルガイド RNA) です。1 分子内に認識配列を含む crRNA 領域と、Cas9 タンパク質を呼びこむ tracrRNA 領域を含みます。

サービス名	納品量	価格	カタログ番号	納期
Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA	2 nmol	¥ 9,800	-	5 ~ 10 営業日
	10 nmol	¥ 13,000	-	
Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA XT	2 nmol	¥ 16,300	-	3 ~ 5 営業日
	10 nmol	¥ 21,300	-	
Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA	5 nmol	¥ 12,000	1072532	3 ~ 5 営業日
	20 nmol	¥ 25,000	1072533	
	100 nmol	¥ 64,000	1072534	
Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA, ATTO™ 550	5 nmol	¥ 17,000	1075927	約2週間
	20 nmol	¥ 34,700	1075928	
Alt-R® CRISPR-Cas9 sgRNA	2 nmol	¥ 38,800	-	約2週間
	10 nmol	¥ 50,000	-	

輸送：常温・保管：-20°C

簡単に crRNA の設計ができるプレデザインツールを提供しています。対応宿主は、ヒト、マウス、ラット、ゼブラフィッシュ、線虫です。カスタムデザインにも対応しております。使用方法等詳しくはウェブサイトをご参照下さい。

Alt-R® CRISPR-Cas9 gRNA フォーマット (crRNA、crRNA XT、sgRNA) による切断効率

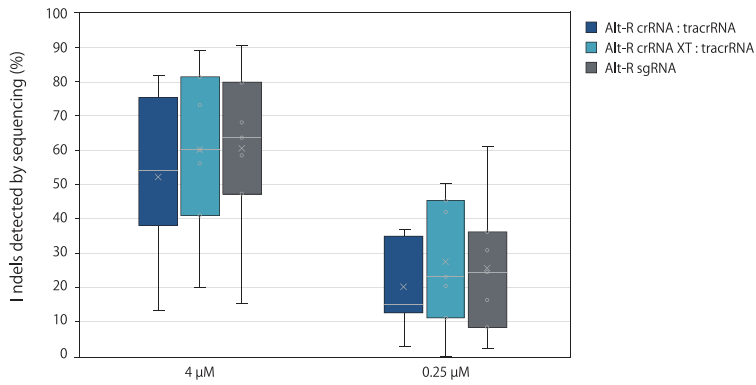


図 1. RNP として導入を行った場合、各 gRNA フォーマットによる切断効率の大きな変化は見られなかった。

3 種の gRNA フォーマットを用いて、12 種の HPRT のターゲットサイトに対する RNP を形成した。RNP のタンパク質には、Alt-R Cas9 Nuclease を用いた。4 μM もしくは 0.25 μM の RNP(Cas9 Nuclease:gRNA, 1:1.2) を調整し、2 μM の Alt-R Cas9 Enhancer とともにエレクトロポレーションで HEK-293 細胞に導入した。ゲノム DNA は 48 時間後に抽出し、切断効率は NGS で測定した。

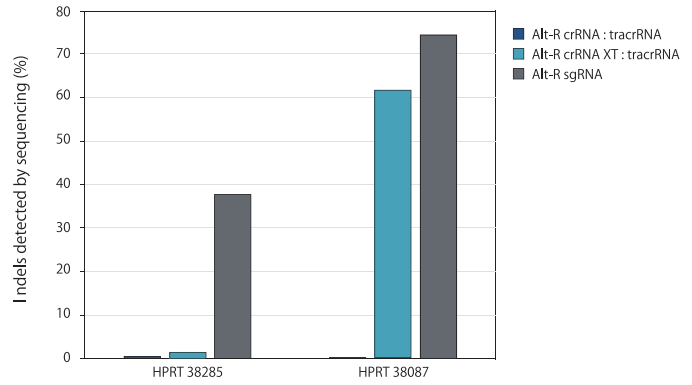


図 2. mRNA とともに gRNA を導入する場合、ターゲットサイトの中には、gRNA への強固な修飾が必要な場合もある。

2 ヶ所の HPRT のターゲットサイトに対する gRNA フォーマット (4 μM) を、1 μg の Cas9 mRNA とともに HEK-293 細胞に導入した。ゲノム DNA は 48 時間後に抽出し、切断効率は NGS で測定した。

Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA 比較表

	crRNA	crRNA XT	sgRNA
修飾	RNase 耐性力を持つ簡易な修飾	より強い RNase 耐性力を持つ修飾	より強い RNase 耐性力を持つ修飾
価格 (2 nmol)	¥ 9,800	¥ 16,300	¥ 38,800
どの gRNA を選択するか	通常はこの crRNA を利用する。通常の培養細胞や受精卵への、RNP での導入に。スクリーニングも安価で実施できる。	mRNA やプラスミドなど、gRNA を RNP 以外の形態で細胞に導入する場合。スクリーニングにおいて、効率 UP と価格のバランスが良い。	crRNA ではなく crRNA XT を利用したが、ゲノム編集効率が改善できず、より強い RNase 耐性力を持つ gRNA で試してみたい場合。
試行優先度	最初の選択肢	2 番目の選択肢	3 番目の選択肢

CRISPR-Cas9 Proteins

Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3

S.pyogenes 由来の Cas9 endonuclease で、PAM として「NGG」を認識します。sgRNA や crRNA : tracrRNA gRNA complex と複合体を形成し、ターゲット特異的に二本鎖 DNA を切断します。

Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3

IDTが開発したオフターゲット作用を軽減させる高性能な Cas9 タンパク質です。野生型 Cas9 と同等の切断活性を維持しています。

Alt-R® S.p. Cas9 Nickase V3 (D10A、H840A)

Alt-R® S.p. Cas9 D10A Nickase V3 は、DNA の target Strand のみ、Alt-R S.p. Cas9 H840A Nickase V3 は、non-target strand のみ (PAM 配列の 3 塩基上流) を切断します。

Alt-R® S.p. dCas9 Protein V3

S. pyogenes dCas9 のリコンビナントタンパク質です。

製品名	容量	価格	濃度	カタログ番号	納期
Alt-R® S.p. Cas9 Nuclease V3	100 μg	¥ 23,400	10 μg/μL	1081058	1~2 営業日
	500 μg	¥ 83,400		1081059	
Alt-R® S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3	100 μg	¥ 28,000		1081060	
	500 μg	¥ 99,000		1081061	
Alt-R® S.p. Cas9 D10A Nickase V3	100 μg	¥ 23,400		1081062	約 1 週間
	500 μg	¥ 83,400		1081063	
Alt-R® S.p. Cas9 H840A Nickase V3	100 μg	¥ 23,400		1081064	
	500 μg	¥ 83,400		1081065	
Alt-R® S.p. dCas9 Protein V3	100 μg	¥ 23,400		1081066	
	500 μg	¥ 83,400		1081067	

輸送・保管：-20℃

※ RNP 複合体形成後の保存と切断活性の経時変化データをウェブサイト (特集記事) にて公開しています。

RNP の切断効率について

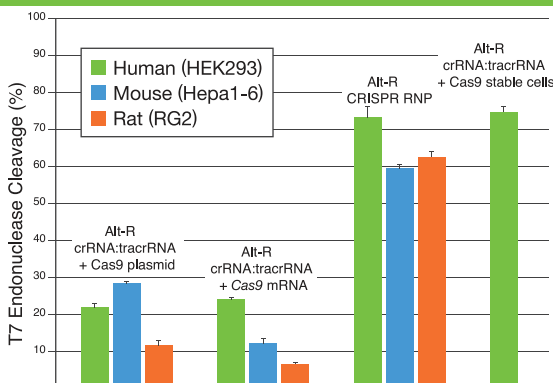


図 3. Alt-R CRISPR - Cas9 システムを使用した切断活性は RNP の状態が最も効率が良い。

Alt-R CRISPR HPRT コントロール crRNA と tracrRNA の複合体 (gRNA complex) を、Cas9 発現プラスミド、Cas9 mRNA、Cas9 タンパク質 (RNP として) とともに HEK293 (ヒト)、Hepa1-6 (マウス)、RG2 (ラット) にそれぞれトランスフェクションした。いずれの種でも RNP の導入は、mRNA、プラスミド導入によりも切断効率が高かった。また、HEK293 に RNP を導入した場合の効率は、これまで高い効率が得られていた HEK293-Cas9 安定発現株と同様であった。トランスフェクション試薬は RNAiMAX (Thermo Fisher) を使用。ノックアウト効率は T7E1 アッセイにより評価した。

HiFiCas9 Nuclease のオフターゲット抑制について

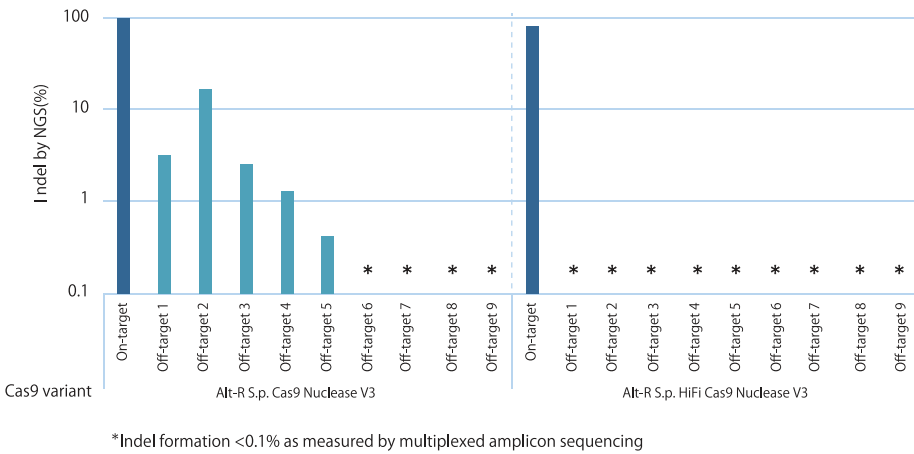


図 4. Alt-R s.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 は、WT の Cas9 に近い切断活性を持つが、オフターゲットを顕著に抑制する。

Alt-R S.p. Cas9 Nuclease V3 及び Alt-R S.p. HiFi Cas9 Nuclease V3 を用いて RNP 複合体を形成した。gRNA には EMX1 遺伝子に対する Alt-R crRNA:tracrRNA 複合体を用いた。RNP 複合体 (4 μM) は、HEK-293 細胞に nucleofection にて導入した。オンターゲット及び 9ヶ所のオフターゲット部位の Indel の形成を NGS によって測定した。

Knock IN

Ultramer® DNA Oligos

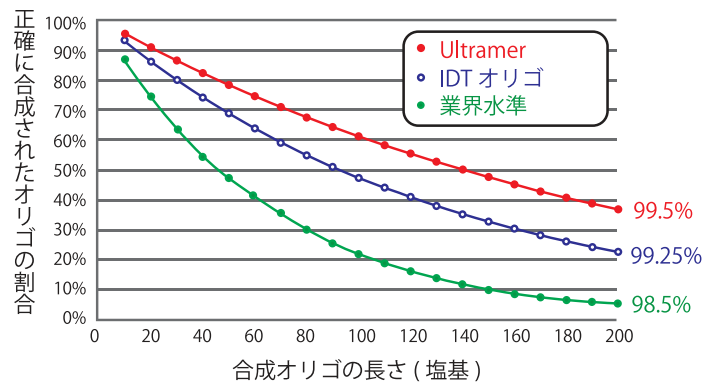
Ultramer® (ウルトラマー) とは、45 ~ 200 塩基の 1 本鎖 DNA を合成出来る DNA 合成サービスです。IDT では、通常の DNA 合成でも 99.25% というカップリング効率を誇りますが、Ultramer は同効率 99.5% で DNA を合成します。そのため、通常より純度の高い DNA を提供出来るだけでなく、長鎖の DNA 合成も容易に行えます。

サービス名	合成可能塩基数	精製	価格/塩基	精製費用	納品量	納期
Ultramer® DNA Oligos	45 ~ 200	脱塩	¥ 120/塩基	-	4 nmole	5 ~ 10 営業日
			¥ 240/塩基		20 nmole	
	60 ~ 200	PAGE	¥ 120/塩基	¥ 15,200	お問合せ	約10営業日

輸送：常温・保管：-20°C

<価格例：200mer 合成時> 200 塩基 x 120 円 / 塩基 = 24,000 円

図 5. カップリング効率と正確に合成されたオリゴの関係



Megamer™ Single-Stranded DNA Fragments

Megamer™ (メガマー) は、201 ~ 2,000 塩基の 1 本鎖 DNA を合成するサービスです。「Paired」は、Sense 鎖と Antisense 鎖 両方を納品し、「Individual」は、Sense 鎖のみを納品します。クローン化し、次世代シーケンサーで配列を確認しているため、極めて高い純度を誇ります。

サービス名	合成可能塩基数	納品タイプ	鎖長と価格	納品量	納期
Megamer	201 ~ 2000	paired	(201-500 bases) ¥ 85,000	3 μg	約1ヶ月
			(>500 bases) ¥ 170 / 塩基		
		Individual	(201 - 500 bases) ¥ 65,000		
			(>500 bases) ¥ 130 / 塩基		

輸送：常温・保管：-20°C

Alt-R® HDR Enhancer

Alt-R® HDR Enhancer (エンハンサー) とは、ノックイン効率を改善するための低分子化合物です。Jurkat、HEK293、Hela、K562 など、様々な細胞に対して HDR 効率の向上が期待できます。

製品名	容量	価格	濃度	カタログ番号	納期
Alt-R® HDR Enhancer	100 μL	¥ 10,500	3mM in DMSO	1081072	約1週間
	500 μL	¥ 32,500		1081073	

輸送：常温・保管：-20°C

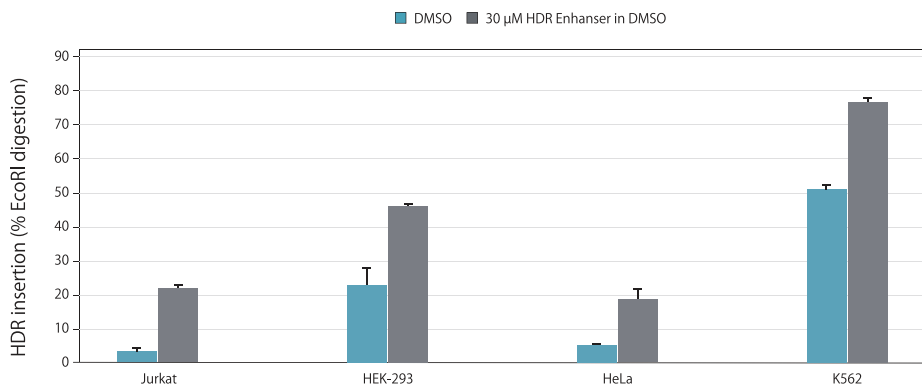


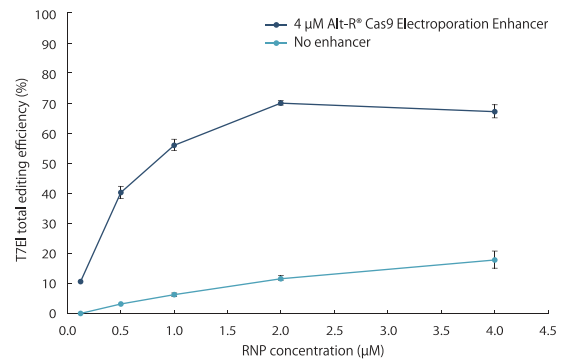
図 6. Alt-R HDR エンハンサーは、複数種の細胞に対して HDR 効率を改善する。

4μM の RNP 複合体 (IDT Alt-R) と 3μM の一本鎖 DNA (Ultramer) を、複数のセルラインの human HPRT に対して Amaxa Nucleofector System (Lonza) を用いて導入した。導入後、30μM の HDR エンハンサーもしくは DMSO を含む溶液で培養した。HEK293、HeLa 細胞は 48 時間、Jurkat、K562 細胞は 72 時間後に単離し、HDR 効率を測定した。HDR で EcoRI 配列を付加し、制限酵素による切断で効率を測定した。

Alt-R® Electroporation Enhancer

エレクトロポレーションでゲノム編集の効率を高める 1 本鎖 DNA です。RNP の導入が難しい宿主や、効率が充分でない時に本製品を用いるとゲノム編集の効率が改善する場合があります。本製品は Cas9 用にデザインされており、Cpf1 用の Electroporation Enhancer とは互換性がありません。なお本配列はヒト、マウス、ラットの配列を避けてデザインしております。

右図は、K562 細胞に Amaxa® System (Lonza) を用いて、0.125-4 μ M RNP を導入した際のゲノム編集効率を示します。4 μ M の Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer を加えた場合を「Dark Blue」で、加えていない場合を「Light Blue」で示しています。



製品名	納品量	価格	カタログ番号	納期
Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer	2 nmol	¥ 5,900	1075915	約1週間
	10 nmol	¥ 17,600	1075916	

輸送：常温・保管：-20℃

Controls

CRISPR-Cas9 gRNA のコントロールキットです。ヒト、マウス、ラットに対応しており、タンパク質を別途ご購入頂ければ、すぐにお使い頂けます。キット内容品の単品販売も可能です。詳細はウェブサイトをご覧ください。

製品名	宿主	価格	カタログ番号	納期
2 nmol Alt-R® CRISPR-Cas9 Control Kit	Human	¥ 19,500	1072554	3~5 営業日
	Mouse	¥ 19,500	1072555	
	Rat	¥ 19,500	1072556	

輸送：常温・保管：-20℃

- <Kit 内容品>
- 5 nmol Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA
 - Alt-R® CRISPR-Cas9 HPRT Positive Control crRNA
 - Alt-R® CRISPR-Cas9 Negative Control crRNA #1
 - Alt-R® HPRT PCR Primer Mix
 - Nuclease-Free Duplexing buffer

CRISPR-Cas12a (Cpf1) System

Cas12a(Cpf1) system

「TTTV」という PAM 配列を用います。AT リッチな調節領域やイントロン領域でもゲノム編集を行いやすくなります。

Alt-R® CRISPR-Cas12a (Cpf1) crRNA

A.s. Cas12a(Cpf1) Nuclease V3 用の化学合成ガイド RNA です。Cas12a(Cpf1) は crRNA だけで gRNA として働きます。

Alt-R® A.s. Cas12a (Cpf1) Nuclease V3

Alt-R® S.p. Cas12a(Cpf1) Nuclease V3 は、高純度なりコンビナントの Cas12a(Cpf1) タンパク質です。ガイド RNA と複合体を形成してゲノム編集を行います。

Alt-R® Cas12a (Cpf1) Electroporation Enhancer

Cas12a(Cpf1) Electroporation Enhancer は、エレクトロポレーションでの Cas12a(Cpf1) RNP の導入効率を改善するキャリア DNA です。

製品名	納品量・容量	価格	濃度	カタログ番号	納期
Alt-R® CRISPR-Cas12a(Cpf1) crRNA	2 nmol	¥ 9,800	-	-	5~10 営業日
	10 nmol	¥ 13,000	-	-	
Alt-R® A.s. Cas12a(Cpf1) Nuclease V3	100 μ g	¥ 23,400	10 μ g/ μ L	1081068	1~2 営業日
	500 μ g	¥ 83,400		1081069	約1週間
Alt-R® Cas12a(Cpf1) Electroporation Enhancer	2 nmol	¥ 5,900	-	1076300	2~4 営業日
	10 nmol	¥ 17,600	-	1076301	

crRNA、Enhancer 輸送：常温・保管：-20℃

Nuclease 輸送・保管：-20℃

Cas12a(Cpf1)コントロールについては、コントロールキットとしての販売は行っておりませんが、ヒト、マウス、ラットについては、ウェブページにポジティブコントロール配列、検出用プライマー、ネガティブコントロールを公開しております。

ゲノム編集 Cas12a

検索

※V: A, C, G

Detection Kit

ゲノム編集やその効率を簡便に検証するためのキットです。ヘテロ二本鎖を切断する酵素 (T7E1) で切断された断片を電気泳動で評価します。CRISPR だけでなく、ゲノム編集全般に使用出来ます。

製品名	反応回数	価格	カタログ番号	納期
Alt-R® Genome Editing Detection Kit	25 rxn	¥ 16,800	1075931	1~2 営業日
	100 rxn	¥ 56,000	1075932	
	1000 rxn	¥ 480,000	1075933	

輸送・保管：-20℃

ご注文の流れ



代理店

お問い合わせ先

2018.11

お問い合わせ先

2018.11

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES 株式会社

http://sg.idtdna.com/jp/site

検索

genom@idtdna.com

〒108-0073 東京都港区三田一丁目4番28号 三田国際ビル24階

TEL 03-6865-1217 FAX 03-6865-1218

※本製品は研究用試薬です。それ以外の目的では使用できません。※価格は全て税別です。