

Alt-R™ CRISPR-Cas9 System

sgRNA (シングルガイドRNA) はこれまで、その長さのために一度に合成することが出来ませんでした。Alt-R™ CRISPR-Cas9 Systemは、sgRNAを元のcrRNA (シーアールRNA) とtracrRNA (トレイサーRNA) の2種に分けることで、gRNAを2本の化学合成RNAで納品するサービスです。sgRNA complexの作製も5分95℃インキュベートを行うだけ、と非常に簡単に効率の良いゲノム編集を行えます。

原理と特徴

図1 Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex 模式図

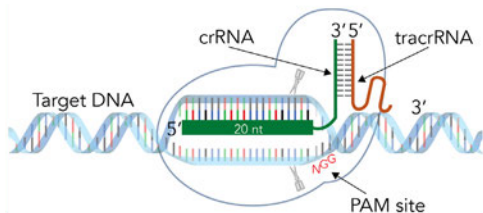


表 元のgRNAとAlt-R™ gRNAの塩基長の比較

	S. pyogenes (bases)	Alt-R™ CRISPR-Cas9 System (bases)
crRNA	42	36
tracrRNA	89	67
Total	131	103

Cas9タンパク質を誘導するsgRNAは、約100塩基のRNAから成ります。長鎖RNA合成について、お客様より多数ご質問を頂きましたが、弊社でも最大90塩基のRNAしか合成できません。また合成が出来たとしても非常に高価で、純度の低い物しか提供出来ません。そのため、sgRNAはこれまで、プラスミドへの導入や二本鎖DNAをテンプレートにした転写産物RNAが使用されてきました。

このAlt-R™ CRISPR-Cas9 Systemは、sgRNAをcrRNAとtracrRNAの2種の機能的コンポーネントに分け、さらに、それぞれをできるだけ短くしたものです。元のcrRNA (native crRNA) は42塩基、tracrRNA (native tracrRNA) は89塩基でしたが、Alt-R™ CRISPR-Cas9 Systemでは、Alt-R™ crRNAが36塩基、Alt-R™ tracrRNAが67塩基と大幅に短くする事が出来ました。少し短くなっただけと思われるかもしれませんが、多くの点が改善されました。

1) 合成が容易に

RNAはDNAと比較し合成が難しく、native tracrRNAの様に、89塩基ともなると、取得できる収量や純度も非常に小さくなります。しかし、Alt-R™ tracrRNAの67塩基であれば、短いため比較的容易に合成できます。

2) 安価に提供が可能に

RNAはDNAと比べ非常に高価です。native crRNA:tracrRNA complexは計131塩基で、Alt-R™ crRNA:tracrRNA complexは103塩基と、合計で28塩基短くなりました。またAlt-R™ tracrRNAは、合成の難易度も軽減したため一度に大量に合成する事ができ、大変安価に提供できるようになりました。

3) 修飾の付加が可能に

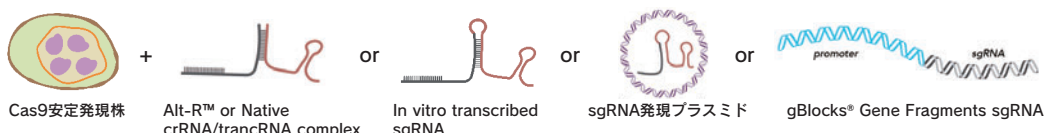
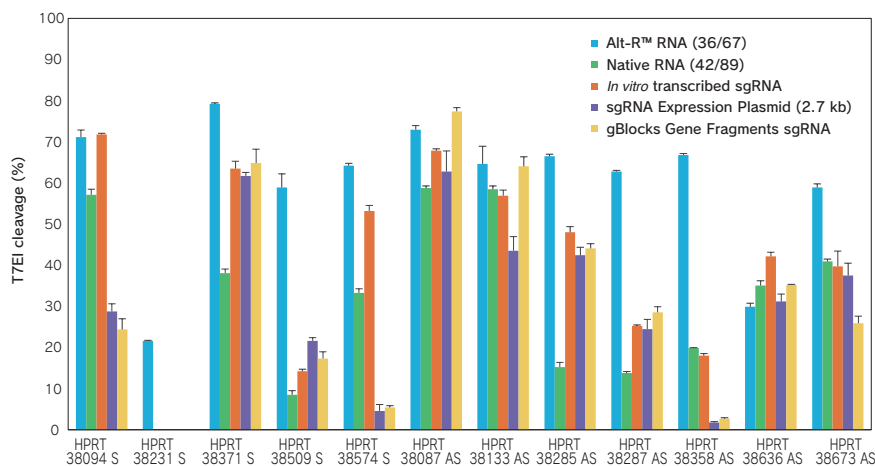
Alt-R™ tracrRNAは67塩基と短くなった事によって、ヌクレース耐性の修飾ができるようになりました。これにより、細胞内でより長くAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexが機能するようになります。

4) ゲノム編集がより高効率に

Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex、S.pyogenes の計131塩基の元のRNA complex (native crRNA:tracrRNA complex)、シングルガイドRNAであるIn Vitro Transcribed sgRNA (IVT)、二本鎖DNAであるgBlocks®、そしてgRNAとして2.7 KbのgRNA発現プラスミドを用いて、Cas9安定発現株にリバーストランスフェクションによりgRNAを導入しました。合計12ヶ所でゲノム編集の効率を測定したところ、9ヶ所でAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexの切断効率が最も高く、Alt-R™は全体的に高い効率でゲノム編集を行う事ができる事が分かりました。

なお、効率の測定には、T7E1を用いています。T7E1は1塩基以上のミスマッチを切断する酵素で、ゲノム編集の効率測定に優れています。1塩基置換は認識できませんが、約半数の非同相末端結合が1塩基置換であることから、T7E1の切断効率からゲノム編集で起こった非同相末端結合の割合を推定できます。

図2 gRNAの種類による効率の比較 (gRNAs Targeting HPRT)



CRISPR crRNA

	価格
Alt-R™ CRISPR crRNA, 2 nmol, Plate	¥8,300
Alt-R™ CRISPR crRNA, 2 nmol	¥9,800
Alt-R™ CRISPR crRNA, 10 nmol	¥13,000

※24本以上をご注文の場合、プレートをご利用頂けます。

CRISPR tracrRNA

	価格
5 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA	¥12,000
20 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA	¥25,000
100 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA	¥64,000

※Nuclease-Free Duplex Bufferが同梱されます。

CRISPR-Cas9 control kits

	価格
2 nmol Alt-R™ CRISPR Control Kit Human	¥19,500
2 nmol Alt-R™ CRISPR Control Kit Rat	¥19,500
2 nmol Alt-R™ CRISPR Control Kit Mouse	¥19,500

< Kit 内容品 >

- ・ 5 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA
- ・ Alt-R™ CRISPR HPRT Positive Control crRNA
- ・ Alt-R™ CRISPR Negative Control crRNA #1
- ・ Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix
- ・ Nuclease-Free Duplexing buffer

CRISPR Controls (kit内容の各 crRNA の単品販売です)

	価格
2 nmol Alt-R™ CRISPR Human HPRT Pos Ctrl crRNA	¥12,300
2 nmol Alt-R™ CRISPR Rat HPRT Pos Ctrl crRNA	¥12,300
2 nmol Alt-R™ CRISPR Mouse HPRT Pos Ctrl crRNA	¥12,300
2 nmol Alt-R™ CRISPR Negative Control crRNA #3	¥12,300
2 nmol Alt-R™ CRISPR Negative Control crRNA #2	¥12,300
2 nmol Alt-R™ CRISPR Negative Control crRNA #1	¥12,300

Control PCR primer mixes (kit内容の各 crRNA の単品販売です)

	価格
2 nmol (ea.) Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix Human	¥5,800
2 nmol (ea.) Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix Rat	¥5,800
2 nmol (ea.) Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix Mouse	¥5,800

Cas9 expression plasmid

	価格
Alt-R™ S.p. Cas9 Expression Plasmid	¥12,800

Nuclease-Free Duplex Buffer

	価格
10 x 2 mL Nuclease Free Duplex Buffer	¥3,000
300 mL Nuclease Free Duplex Buffer	¥3,000

納期

約5 ~ 10 営業日

Alt-R™ crRNA:tracrRNA complexの調製法

Alt-R™ tracrRNAに同梱されるDuplex BufferにAlt-R™ crRNAとAlt-R™ tracrRNAを溶解し、95℃ 5分インキュベーションを行うことで、Alt-R™ crRNA:tracrRNA complexを作成できます。complex作成後は、-20℃保存で最大4週間程度はgRNAとして使用できます。

詳細はAlt-R™ CRISPR-Cas9 System user guideをご参照ください。

<https://www.idtdna.com/pages/docs/default-source/CRISPR/alt-r-crispr-cas9-system-user-guide.pdf>

Alt-R IDT

検索

ゲノム編集コラム1 導入プラスミドのサイズと導入効率

S. pyogenes Cas9は1,368 aa (4,104 bp)と、とても大きなタンパク質です。そのため、このCas9発現系を含むプラスミドは、通常7-10 kb程度と大きなサイズのプラスミドになります。しかし、図1のように9.2 kbと大きなプラスミドを細胞に導入した場合、その導入効率が低く、4.7 kbのプラスミドと比べるとその差は歴然です。IDTで販売しているAlt-R™ S.p. Cas9 Expression Plasmidは7.3 kbのため、9.2 kbのプラスミドと比較すると容易に細胞に導入されます。

Alt-R™ CRISPR-Cas9 Systemでは、Alt-R™ crRNA:tracrRNA complexを導入する24時間前にCas9 プラスミドを導入するプロトコルを勧めております。これはプラスミドとcomplexを同時に導入した場合、Cas9が発現される前にEndogenous NucleasesによりAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexの分解が始まり、質が落ちてしまうためです。

図1 プラスミドのサイズとその導入効率

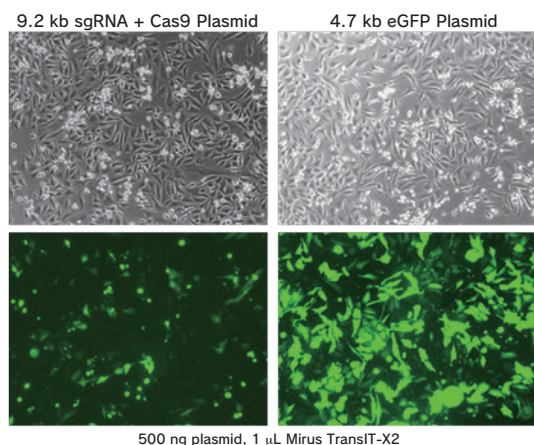
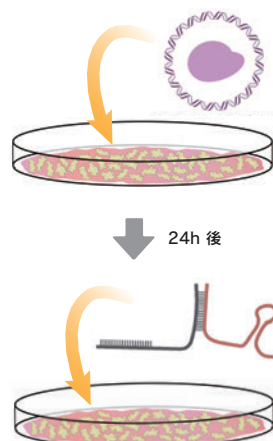


図2 Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex 導入のタイミング



ゲノム編集コラム2 crRNAとtracrRNAの最適な長さの追求

元のtracrRNAは89塩基と長いので、合成するのが難しく非常に高価でした。そこでIDTは、このtracrRNAを短く出来ないかと考え、crRNAを含めて、様々な長さのtracrRNAでその効率を測定しました。その結果、36塩基と67塩基を組み合わせた場合に最も良い効率であることを発見しました。また、67塩基であれば89塩基と比較して容易に大量合成できることから安価で提供ができるようになりました。さらに、化学修飾によってヌクレース耐性も付加させています。

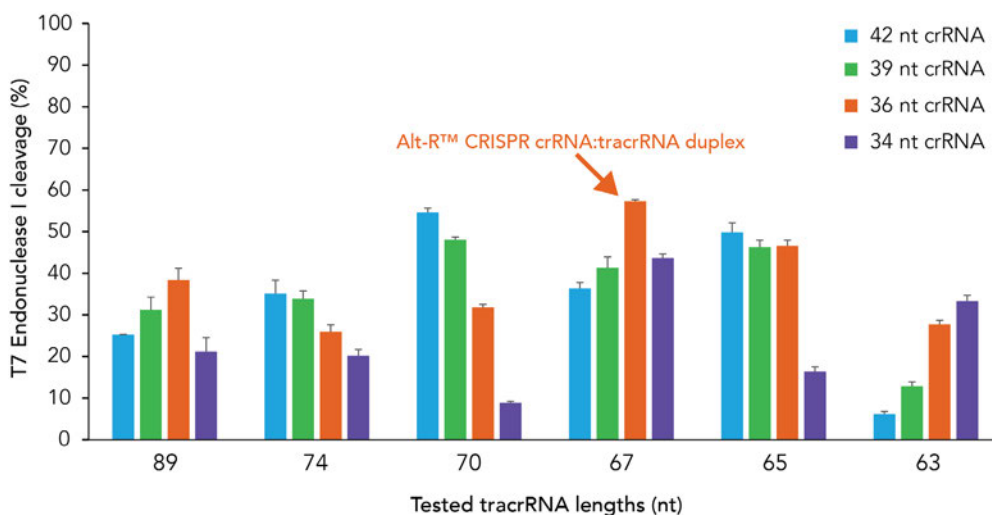


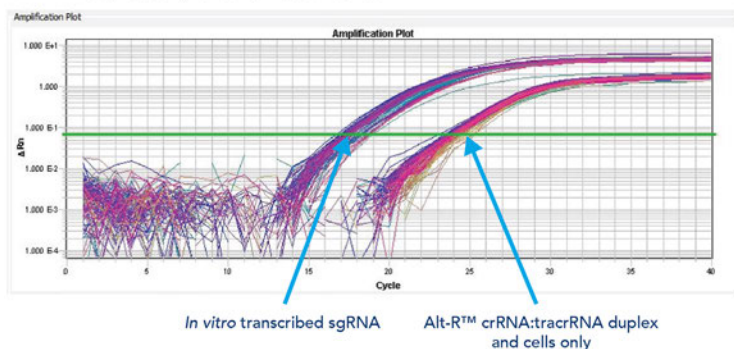
図3 crRNA、tracrRNA鎖長とゲノム編集の効率

様々な長さのcrRNA:tracrRNA complexをHPRT-38285-ASサイトで試し、その導入効率を測定しました。crRNA:tracrRNA complexは、Lipofectamin® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher)を用いてリバーストランスフェクションによってHEK293-Cas9安定発現株に導入しました。ゲノム編集の効率は、1) ターゲット部位をPCRで増幅させ、2) T7E1 mismatch endonuclease (New England Biolabs)を用いて増幅断片を切断し、3) Fragment Analyzer™ (Advanced Analytical)を用いて測定しました。

ゲノム編集コラム3 自然免疫による細胞死とAlt-R™ CRISPR-Cas9 System

社内で行った実験では、*In Vitro* Transcribed sgRNA (IVT)を細胞に導入した際、自然免疫機構により多くの細胞が細胞毒性により死んでいました。そこで、HEK293-Cas9安定発現株を用いて、IVTとAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexの免疫活性の比較実験を行いました。実験の結果、IVTではストレス反応遺伝子である*IFIT1*(P56)と*OAS2*が顕著に活性化されているのが観察されました。しかしAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexでは、これらの活性は見られませんでした。他のストレス反応遺伝子*IFITM1*、*RIGI*、*OAS1*でも、同様の結果が見られました。

A. *IFIT1* expression qPCR amplification curves



B. *OAS2* qPCR expression data

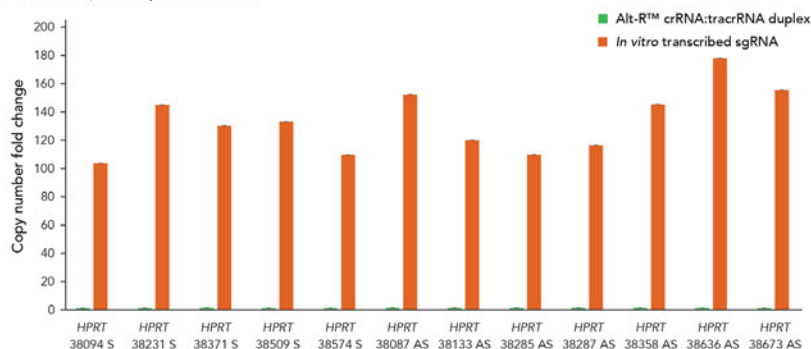


図4 Alt-R™ CRISPR-Cas9 Systemは自然免疫機構を刺激しない

Alt-R™ crRNA:tracrRNA complexおよびIVTを、HPRT1の12遺伝子に対して設計しました。IVTおよびAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexは、Lipofectamin® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher)を用いてリバーストランスフェクションによりHEK293-Cas9安定発現株に導入しました。一般的なストレス反応遺伝子である*IFIT1*(A)と*OAS2*(B)の発現レベルをそれぞれの導入24時間後に測定しました。

(A)IVTによる顕著な*IFIT1*の増幅が見られました。

(B)IVTによる顕著な*OAS2*の増幅が見られました。

(A)(B)ともにAlt-R™ crRNA:tracrRNA complexでは、活性は見られませんでした。*IFITM1*、*RIGI*、*OAS1*でも、同様の結果が得られました。

ゲノム編集コラム4 ゲノム編集とノックイン

ノックインの効率、一本鎖オリゴ(single-strand DNA, ssDNA)が最も良いとされています^{1,2)}。しかし、ホモロジーアームとして切断箇所の上流下流それぞれに40塩基ずつが必要とされ、最短でも80塩基のssDNAが必要です。IDTが提供するUltramer® DNA合成というサービスは、ssDNAを脱塩グレードでも200塩基まで合成できます。

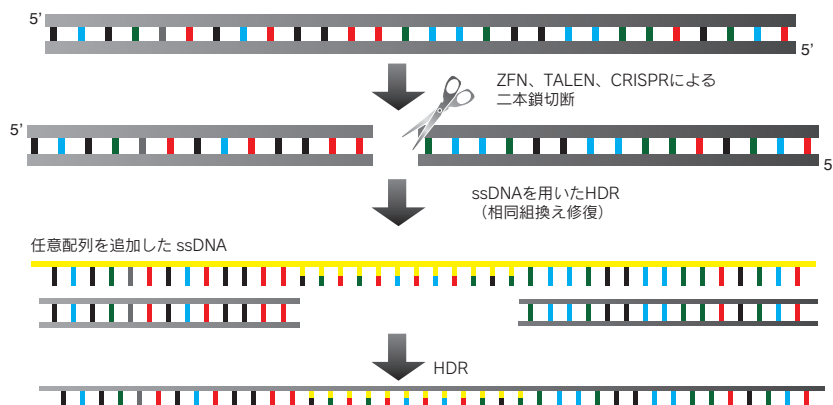
培養細胞への導入は脱塩グレード、受精卵への導入はPAGE精製品をお勧めしておりますが、脱塩かPAGE精製どちらの精製グレードが良いのか実験してみたいという場合は、お得なご案内がございますので、お気軽にお問い合わせ下さい。また、GFPやBAC等の大きな遺伝子を導入する方法をウェブサイトのテクニカルレポートvol.2にてご案内しております。遺伝子導入にお悩みの方は、是非そちらも併せてご覧ください。

<参考文献>

1) Chen F et al. Nat Methods. 8, 753-5 (2011)

2) Ran FA et al. Nat Protoc. 8, 2281-308 (2013)

図5 ゲノム編集とHDR



遺伝子 / DNAの変異 / 多型検出キット： Surveyor[®] Mutation Detection Kits

Surveyor[®] Mutation Detection Kitsは、遺伝子やDNAの変異や多型を検出するキットです。変異箇所を特異的に切断するセロリ由来のヌクレアーゼ（CELファミリータンパク質）、Surveyor Nucleaseの特徴的な活性を利用するキットで、主要な変異解析法として、多くの研究者に広く使用されています。

主な用途

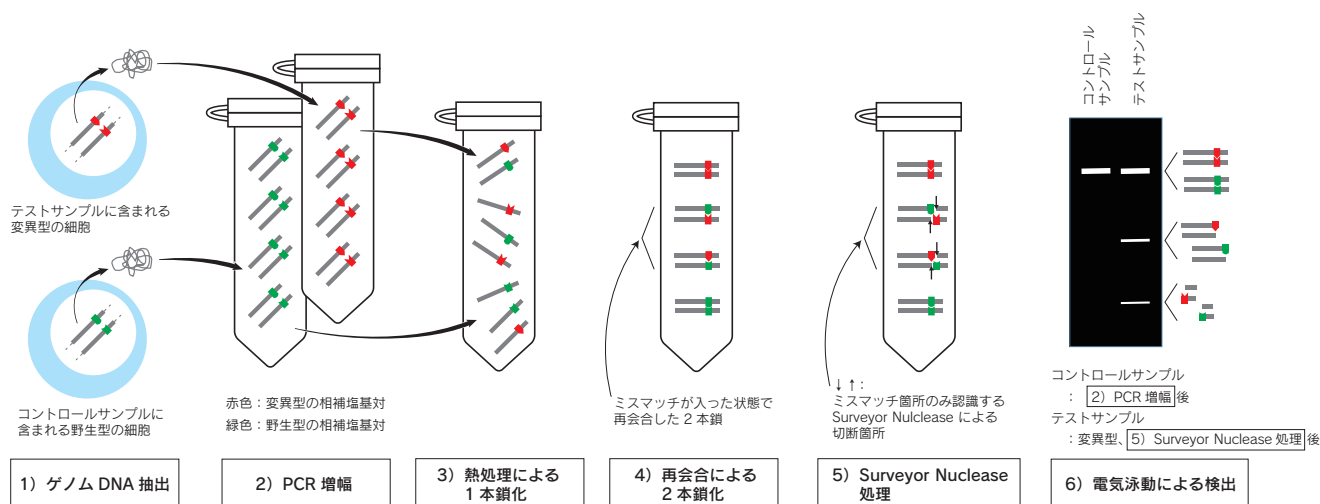
- がん遺伝子の変異解析
- SNP の検出
- ゲノム編集実験（TALE Nuclease、CRISPR/Cas9 等）での変異導入有無の確認

Surveyor Nucleaseの作用

2本鎖DNA内のミスマッチ箇所特異的なエンドヌクレアーゼです。ミスマッチ箇所の3'側を切断します。



キットの原理と実験の流れ



1) ゲノムDNA抽出：

解析対象のテストサンプル（上の図では変異型と想定）、及び野生型のコントロールサンプルから、ゲノムDNAを抽出する。

2) PCR増幅：

変異が入っていると想定される箇所を増幅するプライマーセットによるPCRを行う。

3) 熱処理による1本鎖化：

2つのサンプル由来のPCR増幅断片を1本のチューブの中に入れ、熱処理により2本鎖を乖離させ、1本鎖にする。

4) 再会合による2本鎖化：

クールダウンを行い再会合させる。コントロールサンプル由来（野生型）の1本鎖と、テストサンプル由来（変異型）の1本鎖が会合した際に、ミスマッチが起こる。

5) Surveyor Nuclease処理：

Surveyor Nucleaseが、2本鎖の中のミスマッチ箇所を切断する。

6) 電気泳動による検出：

サンプル内のDNAを電気泳動で分離し、Surveyor Nuclease処理による2本鎖の切断が起こったかどうかを確認する。複数のバンドが観察されれば、変異型の細胞がテストサンプルに含まれていることが分かる（電気泳動像の右側レーン）。さらに、切断されたバンドの長さを確認することによりその変異の具体的な場所を、及びバンドの濃さからテストサンプル中に含まれる変異型の割合を、おおよそ同定することができる。

検出方法と製品設定

電気泳動で検出：Surveyor® Mutation Detection Kits（Sシリーズ）

Surveyor Nucleaseにより切断されたDNA断片を、電気泳動により検出します。

WAVEシステムで検出：Surveyor® PLUS Mutation Detection Kits（Wシリーズ）

Surveyor Nucleaseにより切断されたDNA断片を、Transgenomic社のWAVEあるいはWAVE HSシステム（ion-pairing reverse-phase HPLC）により検出します。

価格・納期予定

用法	製品名	容量	Code No.	価格	納期予定
電気泳動で検出 (Sシリーズ)	Surveyor® Mutation Detection Kit – S25	25 反応	IDT-706025	¥16,800	1～2 営業日
	Surveyor® Mutation Detection Kit – S100	100 反応	IDT-706020	¥56,000	
	Surveyor® Mutation Detection Kit – S1000	1000 反応	IDT-706021	¥480,000	1～2 週間
WAVE システムで検出 (Wシリーズ)	Surveyor® PLUS Mutation Detection Kit – W25	25 反応	IDT-706035	¥16,800	1～2 週間
	Surveyor® PLUS Mutation Detection Kit – W100	100 反応	IDT-706030	¥56,000	1～2 週間
	Surveyor® PLUS Mutation Detection Kit – W1000	1000 反応	IDT-706031	¥480,000	1～2 週間

発注方法・納品方法

MBLに在庫がございます。Code No.、製品名、数量をご指定のうえ、代理店様へ発注してください。冷凍品のため、代理店様に納品いたします。

保存方法

-20℃にて保管してください。

ユーザーガイド、使用文献リストなどのダウンロード

本キットの詳細なプロトコール、トラブルシューティングは、MBLのWebサイトにあるプロトコール（Users Guides）でご確認いただけます。そのほか、製品概要（Product Sheets）、使用文献リスト、MSDS（Material Safety Data Sheets）もダウンロードできます。

<http://ruo.mbl.co.jp/bio/idt/surveyor.html>

Surveyor IDT

検索

本キットの日本における販売について

IDTのSurveyor® Mutation Detection Kits（本キット）は、米国Transgenomic社の同名キットと同一の製品です。米国Transgenomic社が2014年7月に本キットの事業をIDTへ売却した為、本キットはIDT製品サービスのラインナップに加わり、日本総代理店のMBLから販売されることになりました。

