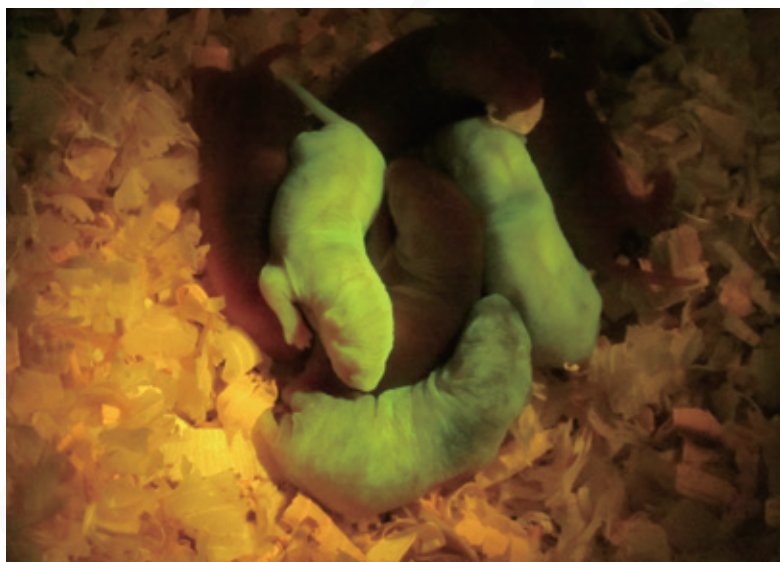


vol.2

CRISPR/Cas9を用いた 効率的なノックインラット・マウスの作製 ～塩基置換やGFP等の導入～

国立遺伝学研究所 系統生物研究センター マウス開発研究室 助教
吉見 一人

大阪大学大学院 医学系研究科 附属動物実験施設 准教授
真下 知士

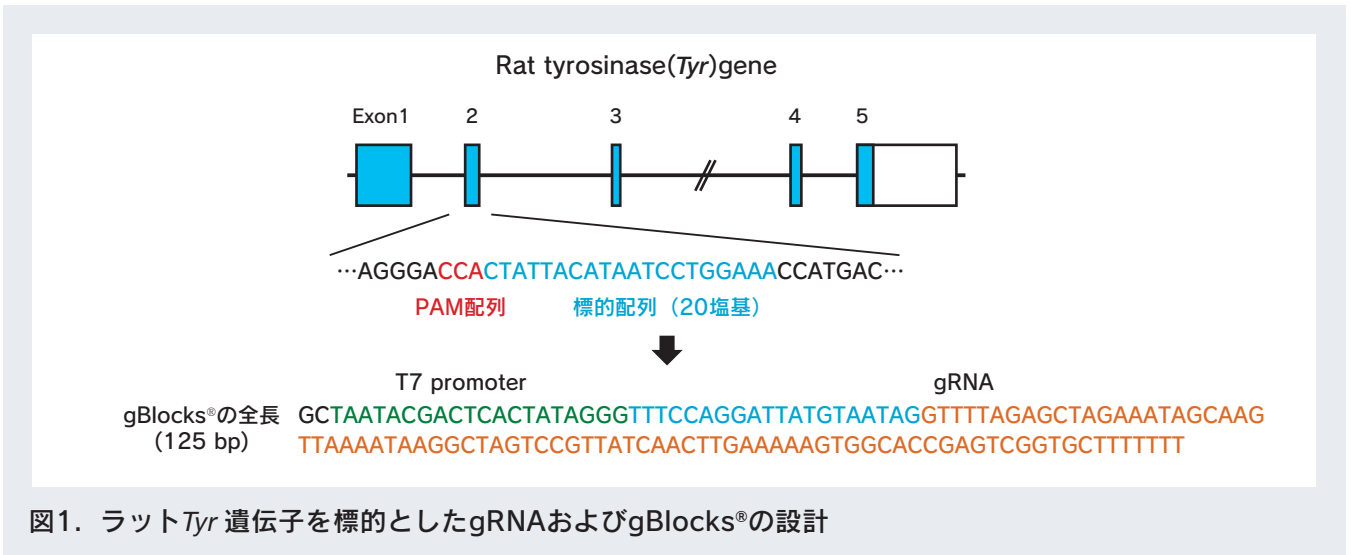


はじめに

ゲノム編集技術は、様々な生物種において自由な遺伝子操作を可能にし、基礎から応用まで多岐にわたる医療的、ライフサイエンス研究に影響をもたらしている。マウス・ラットを含む様々な実験動物においても、従来のES細胞を用いた遺伝子改変に比べ、より簡単、効率的かつ短期間で遺伝子改変動物を作製できるようになった。特に2012年に報告されたCRISPR/Cas9システムは、変異導入効率の高さに加えて低コストかつ簡単に利用できることから、現在ではゲノム編集ツールの中心となっている。

CRISPR/Cas9を用いた遺伝子改変マウス・ラットの作製法は極めてシンプルである。受精卵にCas9 mRNAおよびgRNAをマイクロインジェクションにより導入し移植をして得られた産子から変異個体を選抜する。標的領域と相同配列を持つドナーDNAを同時に導入することで、ノックイン個体も作製できる。

ここでは、筆者らが新たに開発した効率的なプラスミドノックイン法を紹介するとともに、gBlocks®、Ultramer®を用いたクローニングを必要としない簡便な遺伝子改変動物の作製方法について解説する。



gBlocks® によるクローニング フリー gRNA 作製

はじめに標的遺伝子、標的領域の DNA 配列情報を Ensembl や UCSC 等から入手し、それらを認識する gRNA を設計する。筆者らは、主に CRISPR Design Tool (<http://www.genome-engineering.org/crispr>) を用いて gRNA を設計している。現在では様々な gRNA 設計ツールが充実しており、複数のツールを利用することで、オフターゲットへの影響を十分に考慮した標的配列を決定できる。

その後、T7 プロモーターおよび標的を認識する gRNA をコードした全長 125 塩基の二本鎖 DNA を IDT 社の gBlocks® で注文する (図 1)。この際、合成できない配列を含む場合はその配列を示してくれるため、その場で標的配列を設計し直すことができる。gBlocks® は 1 週間程度で納品され、クローニングの必要がなく、すぐに *in vitro* 転写に利用できる。筆者らは届いた gBlocks® を 10 μL の Nuclease Free water で希釈後、4 回に分けて転写の鋳型に利用しているが、インジェクションに十分量の gRNA を合成できている。一方 Cas9 についても、T7 プロモーター下 Cas9 発現プラスミドを用いて Cas9 mRNA を合成する。筆者らは addgene 社より入手した Cas9 発現プラスミドを改良して高効率に変異を導入できるものを使用している。

ノックイン動物の作製では、Cas9 mRNA および gRNA に加えて、標的領域と相同配列を持つドナー DNA を同時に導入する。詳細は後述するが、ドナー DNA には、一本鎖オリゴヌクレオチド (ssDNA) もしくは DNA プラスミドが用いられる。ssDNA を用いる場合は、gBlocks® と同様、設計したものを IDT 社の Ultramer® で発注するだけで、納品されたものを希釈後、すぐに使用できる。

インジェクション溶液は、状況に応じて、50-100 μg/mL Cas9 mRNA、25-50 μg/mL gRNA、25-50 μg/mL ssDNA、3-5 μg/mL プラスミド DNA になるよう RNase free water で調製する。マウスもしくはラット受精卵に対し、混合溶液を顕微注入する。一晚培養後、2 細胞期胚を偽妊娠メスに卵管移植し、3 週間程度で、産子を得ることができる。

3 週齢程度の得られた産子から採血、あるいは尾切り等により組

織を採取し、DNA を抽出する。この DNA を用いて標的領域の PCR を行い、電気泳動にて DNA 増幅を確認する。さらに、PCR 産物のダイレクトシーケンス解析を行い、遺伝子改変個体 (ファウンダー) を選抜する。モザイクやヘテロに変異が入り、波形が重なる場合、PCR 産物を TA クローニングし、複数の配列を解読する。

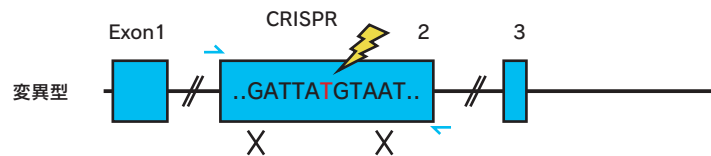
一本鎖オリゴヌクレオチド Ultramer® による効率的ノックイン

ドナー DNA として用いる ssDNA の配列には、導入、改変したい配列に加えて、前後に相同配列を設計する必要がある。相同配列の最適な長さについては議論の余地があるが、筆者らは通常ノックイン領域の前後各 40 塩基の相同配列を設計、注文している。ssDNA は逆相カラム精製程度の純度であれば、ドナー DNA として利用できる実績があるが、IDT 社の高純度 ssDNA である Ultramer® を用いた場合、脱塩グレードでも効率よくノックイン個体を作製できている。

例えば、アルビノラットである F344 系統は、毛色遺伝子である *Tyr* 遺伝子に一塩基変異を有している。筆者らはこの変異を修復するため、野生型 SNP および両側各 40 塩基の相同配列を持つ ssDNA を設計した。また gRNA の標的配列を、アルビノ型 SNP 上に設計しておくことで、ノックイン導入後に再度二本鎖切断を引き起こすことを防いだ。これら gRNA、ssDNA を Cas9 mRNA と共に受精卵に顕微注入することで、一塩基置換された *Tyr* 遺伝子ノックインラットが作製でき、実際に表現型も修復できた (図 2)。この他に、ssDNA を用いて、*Asip* 遺伝子の 19 塩基挿入、*Kit* 遺伝子のレトロトランスポゾン除去といった複数のノックインラットを作製することに成功している¹¹⁾。

ssDNA は後述のプラスミド DNA を用いたノックインに比べてクローニングの必要がなく調製が簡単であるうえ、ノックイン効率も高い。そのため短い配列の挿入・置換には有用である一方、長鎖の ssDNA は合成が難しく、Ultramer® でも最大 200 塩基である。今後、ssDNA の合成技術の発展に伴い、カセット遺伝子の挿入や GFP による遺伝子タグ化など長鎖の ssDNA を用いたノックインも可能になるだろう。

Tyr遺伝子の1塩基置換によるアルビノの修復



GAGCCTGGGGGTTTTGGCTTTGTCATGGTTCCAGGATTACGTAATAGTGGTCCCTCAGGTGTTCCATCACATAAAACCT

ssDNA:Tyr^c (80塩基)



変異型 -TGGTTTCCAGGATTATGTAATAGTGGTCC-
ノックイン -TGGTTTCCAGGATTACGTAATAGTGGTCC-

図2. ssDNAを用いたTyr遺伝子ノックインラットの作製

Tyr遺伝子エクソン2のSNP（赤色）を置換するために、80塩基のssDNAを設計した。ssDNAはSNPから上流39塩基、下流40塩基にそれぞれホモロジーアームを持つ。マイクロインジェクションの結果、ノックイン個体が得られ、毛色の発現がアルビノから修復した。青色：gRNAの認識配列。緑色：PAM配列。

ホモロジーアームフリーのプラスミド DNA ノックイン (2H2OP 法)

これまでに CRISPR/Cas9 を用いたプラスミドノックインマウス、ラットは複数報告されている^{[2]-[4]}。しかし、その効率は研究室間でばらつきがあり、ノックインしたい配列に加えて、約 500 bp~数 kb のホモロジーアームをプラスミド DNA に導入する必要がある。筆者らは、こうした問題を克服するため、ホモロジーアームを持たないプラスミド DNA の効率的なノックイン法を開発した。

この方法では、Cas9 mRNA に加え、ゲノム DNA およびプラスミド DNA をそれぞれ認識する 2 種類の gRNA、2 種類の ssDNA、プラスミド DNA を一緒に受精卵に導入する (図 3A)。その際、CRISPR/Cas9 が「はさみ」としてゲノム上とプラスミド上の標的配列を切断し、二本の ssDNA が「のり」としてゲノムとプラスミドを上流と下流をそれぞれ結合修復することで、プラスミド DNA を特定のゲノム上に正確かつ効率的にノックインできる。筆者らはこの、2 つの gRNA で DNA を切断し、2 つのオリゴ DNA でプラスミドをノックインする方法を 2 ヒット 2 オリゴ法 (2H2OP 法) と呼んでいる。実際に、2H2OP 法を用いて導入遺伝子を安定発現する *Rosa26* 遺伝子領域に CAG-GFP プラスミドを導入したノックインラットを作製することを試みた。その結果、17.6 % の効率で CAG-GFP プラスミドをラット *Rosa26* 遺伝子内にノックインすることができた (未発表、図 3B)。得られたノックインラットは 1 コピーだけの導入にも関わらず非常に強い GFP 発現を示しており、子孫へも安定的に伝達されている。マウスでも同様の実験を行い、GFP ノックインマウスの作製に成功している。

2H2OP 法は、既存のプラスミドにホモロジーアームを付加することなくそのまま利用することができるため、煩雑なクローニング等の作業が必要ない。すなわち、遺伝子改変動物作製の計画を立ててから、パソコン上で設計、発注後、届いたものを転写し、インジェクションを行うだけであり、非常に迅速かつ効率的に遺伝子改変動物を作

製できる。また、これまでの ES 細胞等による遺伝子改変技術では困難であった 200 Kb 以上の長い BAC プラスミドを用いたノックインにも成功している (未発表)。さらに、標的とするゲノム配列の上流と下流 2 箇所、プラスミド 1 箇所の合計 3 箇所を切断する 3H2OP 法に適用も可能で、長鎖の遺伝子クラスターをプラスミドに置換するなど、応用性は極めて高い。一方で、2H2OP 法はゲノムとプラスミドの結合部位に変異が入りやすく、想定した配列通りにノックインする正確性には改善の余地がある。今後、こうした正確性や効率性を改良することで、汎用性の極めて高いノックイン作製法になると期待している。

IDT's comment

一本鎖オリゴヌクレオチド Ultramer®

Ultramer® とは、200 塩基まで合成できる一本鎖 DNA オリゴヌクレオチドです。弊社の通常の DNA 合成でも、業界標準よりも良い品質であると自信を持っておりませんが、Ultramer® はさらに良い品質が期待出来ます。P.6 に詳細を記載致しましたので、是非ご覧ください。

人工遺伝子合成受託サービス gBlocks® Gene Fragments

直鎖上 2 本鎖 DNA 合成 gBlocks® Gene Fragments はプラスミドに入っていない二本鎖 DNA を合成するサービスです。CRISPR/Cas9 システムにも多く利用されて参りました。2015 年 10 月にさらに CRISPR/Cas に特化した Alt-R™ CRISPR-Cas9 System の販売も開始しました。Alt-R™ CRISPR-Cas9 System を用いれば、さらに簡単に、効率良くゲノム編集を行えます。詳しくは P.6 をご参照下さい。

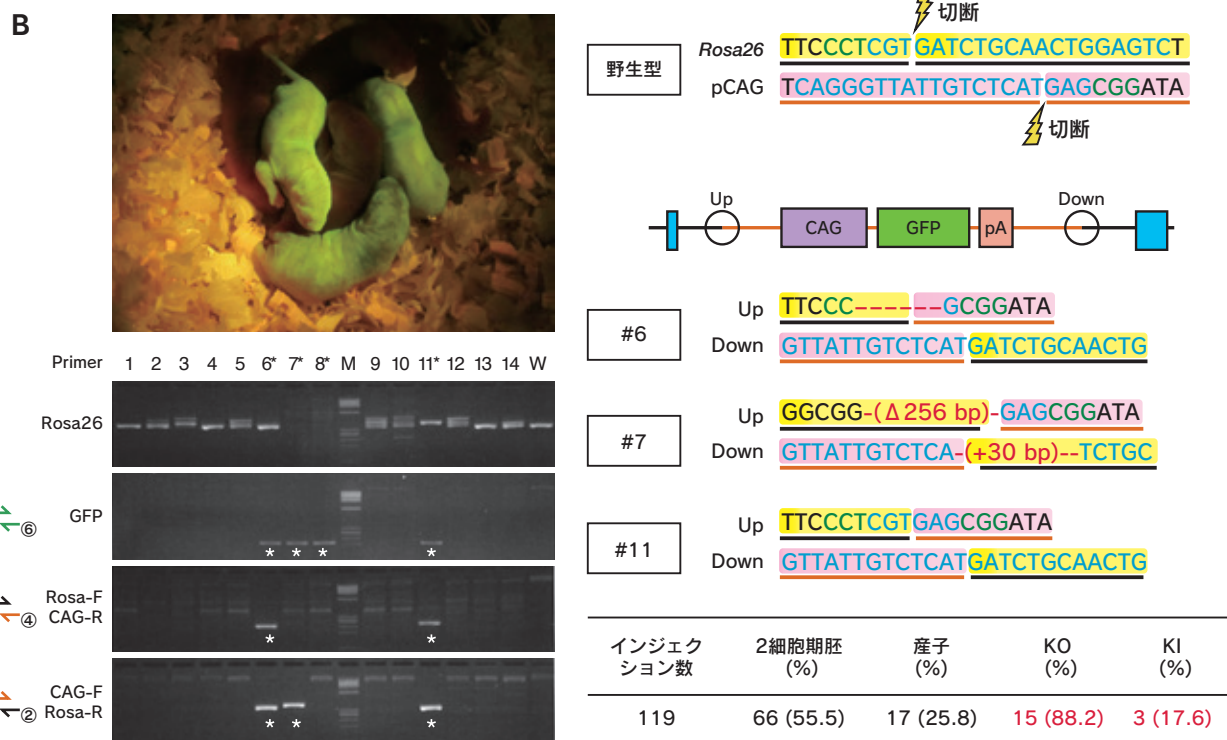
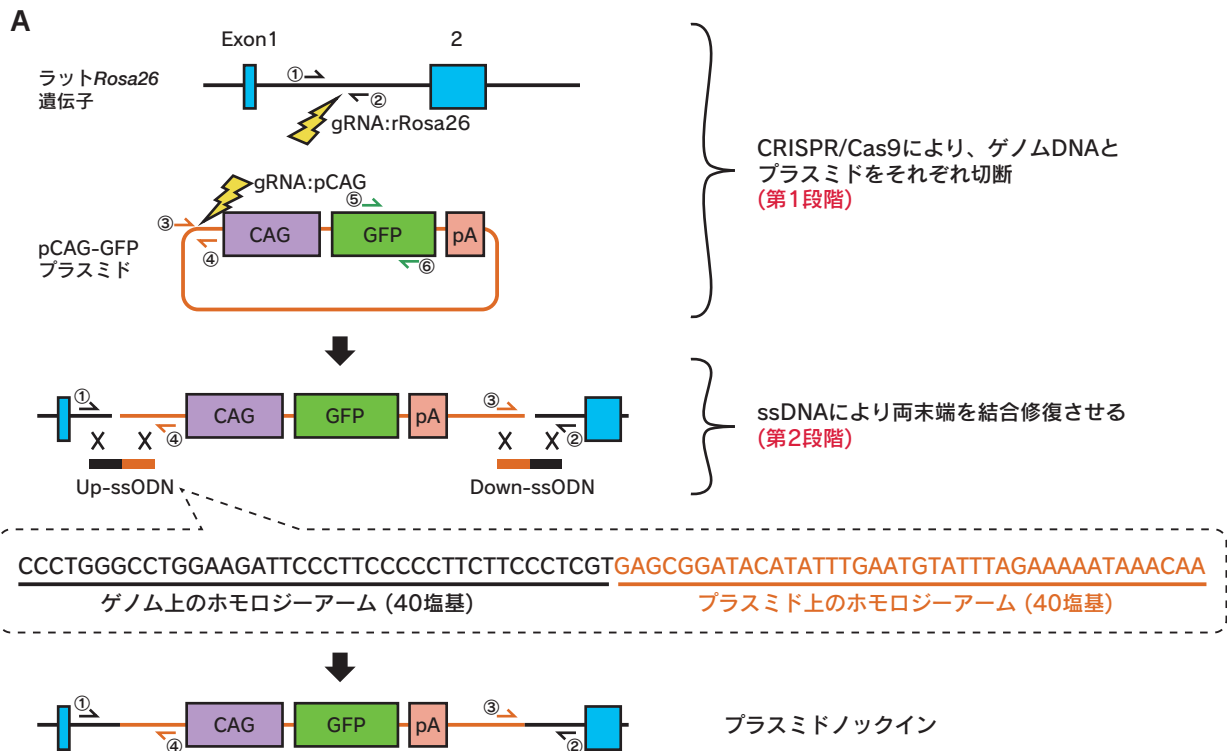


図3. 2H2OP法を用いたGFPノックインラットの作製

- A. 2ヒット2オリゴ法 (2H2OP法) の概要。ゲノム上およびプラスミド上にそれぞれgRNAを設計することで、ゲノムおよびプラスミドの切断末端が生じる。それぞれの末端部分を、ホモロジーアームを持つssDNAにより結合修復することで、プラスミドが標的部位へ導入されたノックインを得る。
- B. 得られたGFPノックインラットとその遺伝子配列。#6、7、8、11のGFP陽性の4個体のうち、#11はssDNAの設計通りの配列でCAG-GFPプラスミドが *Rosa26* 領域にノックインされている。#6は上流、#7は上流、下流ともに欠失や挿入が見られるもの、CAG-GFPプラスミドが *Rosa26* 領域にノックインされている。
- #8は標的領域部位にプラスミドの挿入が見られず、他の部位にランダム挿入されたと考えられる。

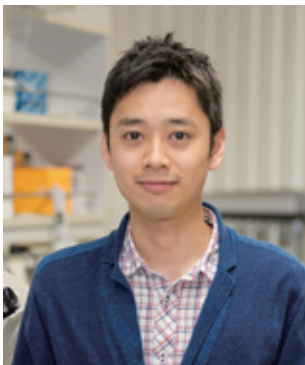
まとめ

2本鎖DNAであるgBlocks®を用いることでgRNA発現プラスミドのクローニング作業が必要なく、任意のgRNAを合成できる。同時にUltramer®で一本鎖オリゴDNAを設計・注文することで、ドナーDNAとして、もしくは今回紹介した2H2OP法のプラスミド挿入用としてすぐに利用できる。このようにCRISPR/Cas9を用いた正確かつ効率的なノックイン技術にgBlocks®やUltramer®を組み合わせることで、より簡便にノックイン動物を作製でき、遺伝子の生理的機能をより詳細に解析するための強力なツールとなるだろう。

参考文献

- [1] K. Yoshimi *et al.* : Nat. Commun., 5:4240, 2014
- [2] H. Yang *et al.* : Cell, 154 : 1370-1379, 2013
- [3] Y. Ma *et al.* : FEBS J. 281(17) : 3779-3790, 2014
- [4] T. Aida *et al.* : Genome Biol., 16(1) : 87, 2015

著者紹介



吉見 一人 (よしみ かずと)

国立遺伝学研究所 系統生物研究センター マウス開発研究室 助教

- 【経歴】2008年 京都大学農学部応用生命科学科・卒業
2013年 京都大学大学院医学研究科・博士課程修了（医科学博士）
2013年 京都大学医学研究科・特定研究員
2015年 国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・マウス開発研究室・助教
- 【抱負】ゲノムヒト化動物の作製手法を開発し、ヒトの知性・進化について解き明かしたい。
- 【趣味】バドミントン、釣り



真下 知士 (ましも ともじ)

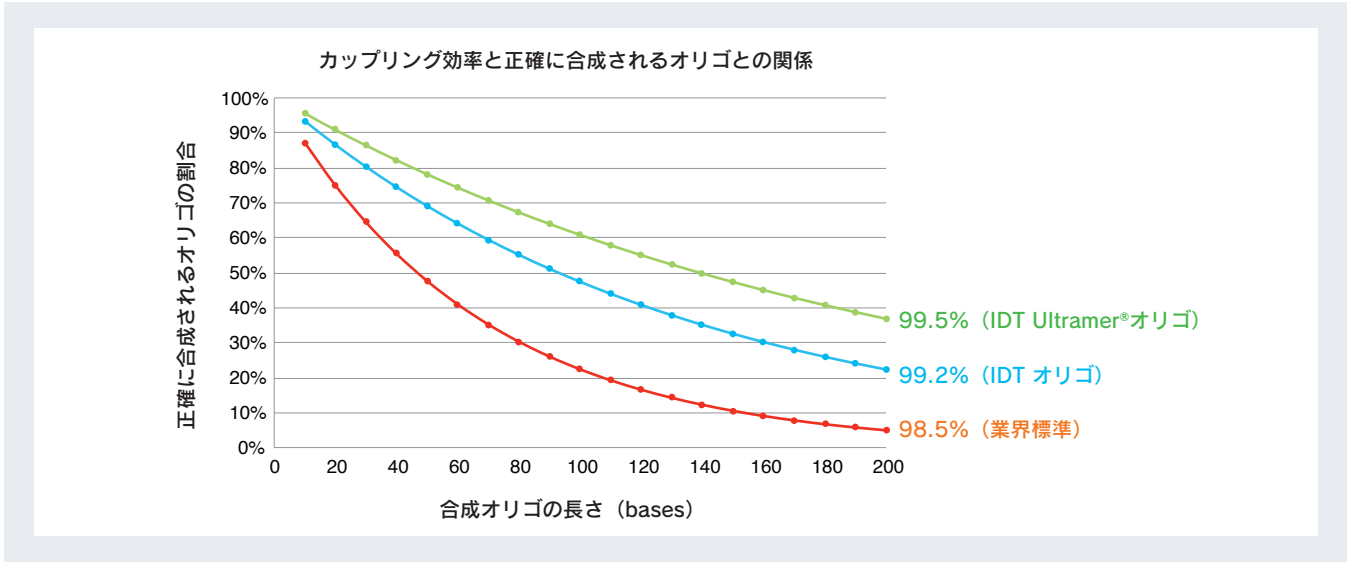
大阪大学大学院 医学系研究科 附属動物実験施設 准教授

- 【経歴】1994年 京都大学農学部畜産学科・卒業
1999年 京都大学大学院人間環境学研究科・博士課程修了（博士（人間環境学））
2000年 フランス・パスツール研究所免疫学講座に留学
2003年 京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設・特任准教授
2015年 大阪大学大学院医学系研究科附属動物実験施設・准教授
- 【抱負】ゲノム編集やヒト化動物の開発を研究しています。
ご興味の方はホームページ（www.iexas-osaka-u.jp/lab）からどうぞ。
- 【趣味】旅行、水泳、ゴルフ

Ultramer® DNA 合成

Ultramer® DNA 合成とは、200 塩基まで合成できる 1 本鎖 DNA オリゴヌクレオチド合成サービスです。100 塩基まで合成できる通常の DNA 合成と比較し、カップリング効率がさらに向上しています。カップリング効率とは、DNA オリゴヌクレオチドが 1 塩基伸長する際の効率で、業界の水準は、約 98.5% です。（※ IDT 調べ） 一見非常に高い様に見えますが、この 98.5% で 60 塩基の合成を行った場合、正しく合成できているのは、約 40% です（下図）。一方、IDT のカップリング効率は通常 DNA 合成で 99.2%、Ultramer® DNA 合成では、99.5% にもなります。Ultramer® DNA 合成で 60 塩基の合成を行った場合、約 75% が正しく合成されている事になります。

ゲノム編集を行う場合、培養細胞には、脱塩グレードの Ultramer® を、受精卵に導入を行う際は PAGE 精製をお勧めしております。



精製	合成可能塩基数	納品量	価格 (/base)	精製 (1 本あたり)	納品形態	納期
脱塩	45 - 200	4 nmole	¥ 120	-	空気乾燥品	5 ~ 10 営業日
		20 nmole	¥ 240	-		5 ~ 10 営業日
PAGE	60 - 200	ウェブサイト*	¥ 120	¥ 15,200		約 10 営業日

*ウェブサイトにて配列をご入力頂ければ、すぐに納品量を算出できます。

人工遺伝子合成

大きなサイズのノックインを行うのに大変有用なのが、人工遺伝子合成サービスです。人工遺伝子合成サービスとは任意の遺伝子や塩基配列を合成するサービスです。2 本鎖 DNA をプラスミドに入れて納品する Genes というサービスと、テクニカルレポートでお使い頂いている 2 本鎖 DNA を合成・精製し、納品する gBlocks® の 2 種類のサービスがございます。

Genes (ジーンズ)

クローニングにより、ご希望の配列と 100% 一致した配列をプラスミドに挿入した形で納品します。

また、プラスミドマップ及び波形データも提供致します。

サービス名	対応配列長	価格 (税別)	納品量	配列最適化・ご相談
miniGene	25 ~ 500 bp	一律 ¥22,000	4 µg (5 kb 以上は 1 µg)	無償
Gene	501 bp ~	¥55/bp ~		

塩基長 (約)	~ 500 bp	~ 1,000 bp	~ 1,500 bp	~ 2,000 bp	~ 2,500 bp	~ 4,000 bp	4,001 bp ~
予定納期	約 2 週間	2 ~ 3 週間	3 ~ 4 週間	4 ~ 5 週間	5 ~ 6 週間	6 ~ 8 週間	お問い合わせ

gBlocks® (ジープロックス) Gene Fragments

クローニングを行わないため、早く、安く納品できます。しかし合成・精製・確認を念入りに行うため、非常に高い純度の直鎖状 2 本鎖 DNA プールを提供しています。テクニカルレポート内でお使い頂いた様な 500 bp の gBlocks® であれば、約 90% がご依頼通りの正しい配列です。

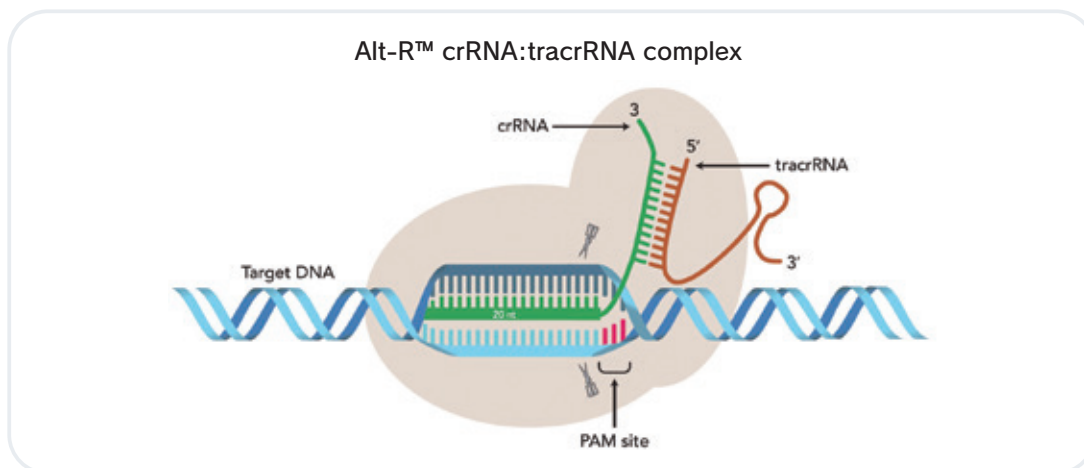
詳しくはウェブサイトをご参照下さい。 **gBlocks® 3 周年サンクスキャンペーン実施中!** ※ 2016 年 1 月末受注分まで。以降の価格はウェブサイトをご参照下さい。

塩基長 (bp)	価格 (税別)	納期	納品量	5' 末端のリン酸化	配列最適化・ご相談
125 ~ 250	¥11,800	1 ~ 2 週間	250 ng	可 (無償)	無償
251 ~ 500			500 ng		
501 ~ 750	¥15,000	1 ~ 3 週間	1,000 ng		
751 ~ 1,000	¥18,000				

2,000 bp まで合成可能です。詳細は MBL ライフサイエンスサイトをご覧ください。

gBlocks® 使用論文 (Cas9, gRNA 発現系構築に): 「Mali P, et al.: Science, 15: 339(6121):823-6, 2013 Feb」

sgRNA を合成 RNA で安価にご提供致します！ Alt-R™ CRISPR-Cas9 System



原理と特徴

Cas9 タンパク質を誘導する sgRNA (シングルガイド RNA) は、約 100 塩基の RNA から成ります。

長鎖 RNA 合成について、お客様よりお問い合わせを多数頂きますが、弊社でも最大 90 塩基まで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、純度の低い物となってしまいます。そのため弊社でも、sgRNA は *in vitro* 転写系で得たものを導入することをお勧めしてまいりました。

この Alt-R™ CRISPR-Cas9 System は、sgRNA を元来の細菌に備わっている 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。元来の crRNA (native crRNA) は 42 塩基、tracrRNA (native tracrRNA) は 89 塩基でしたが、Alt-R™ CRISPR-Cas9 System 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、これにより多くの点が改善されました。

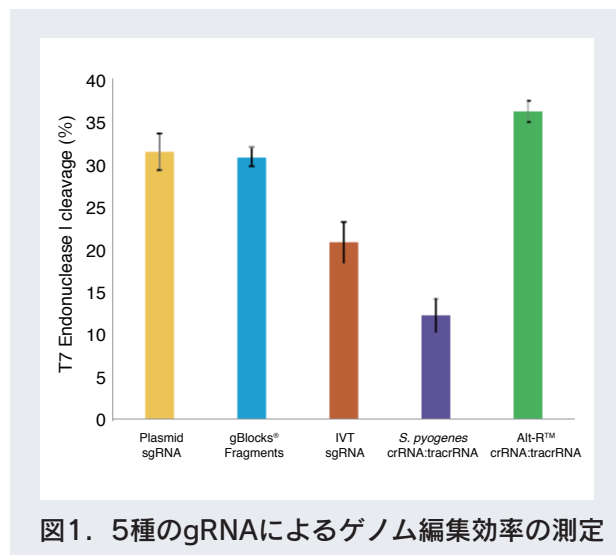


図 1. 5種のgRNAによるゲノム編集効率の測定

1) 合成が容易に

RNA は DNA と比べて合成が難しいため、89 塩基の native tracrRNA は弊社でも十分な純度と量で合成できませんでした。ところが、Alt-R™ tracrRNA は 67 塩基と短くなったため、十分な量と純度でのご提供が可能になりました。

2) 安価に提供出来る様に

native crRNA:tracrRNA complex が合計 131 塩基であるのに対し、Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex は合計 103 塩基と、合成する塩基数が 28 塩基も短縮されます。合成 1 塩基当りが高価な RNA では、塩基数短縮で大きく価格を下げる事ができます。

3) 修飾を付加出来るように

Alt-R™ tracrRNA は 67 塩基と短くなった事によって、ヌクレース耐性修飾が可能となりました。これにより細胞内で Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex がより長時間機能します。

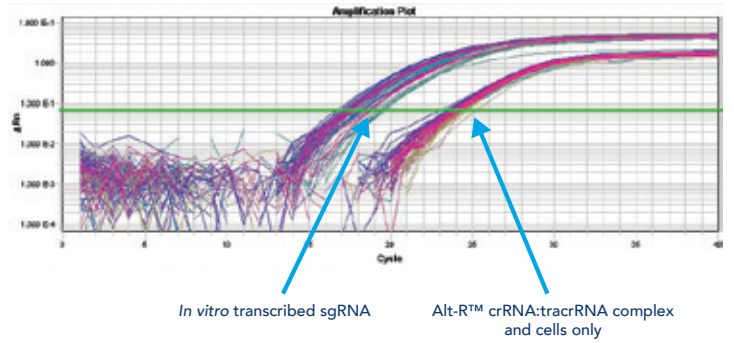
4) ゲノム編集がより高効率に

gRNA として 2.7 kb のプラスミド (Plasmid sgRNA)、2 本鎖 DNA である gBlocks® (gBlocks® Fragments)、*in vitro* transcribed single guide RNA (IVT)、*S. pyogenes* の計 131 base の crRNA:tracrRNA complex (*S. pyogenes* crRNA:tracrRNA)、そして Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex を用いて、ゲノム編集の切断効率を比較しました。合計 12 ヶ所で切断効率を測定したところ、9 ヶ所で Alt-R™ RNAs 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ました (図 1)。

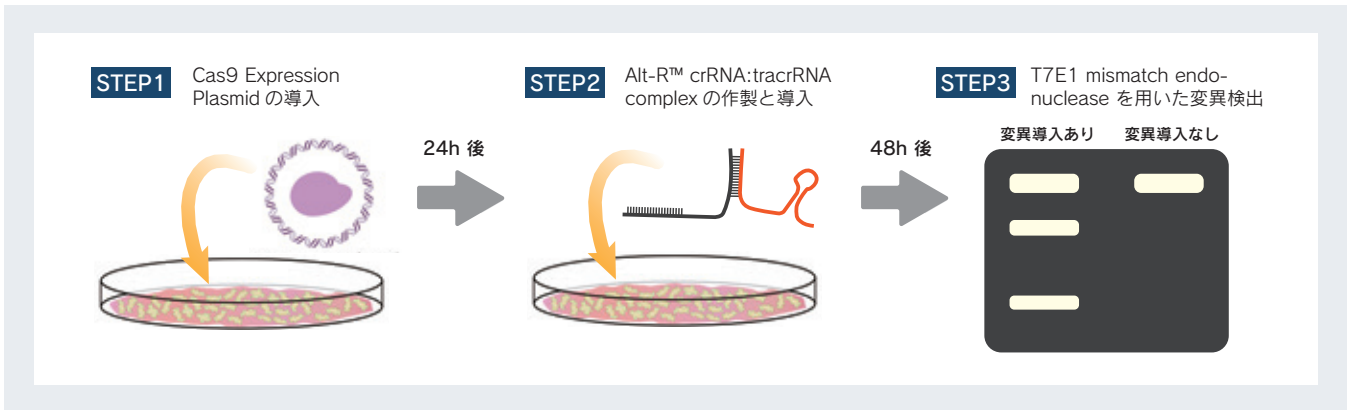
5) 細胞への毒性を軽減出来ます

In vitro Transcribed single guide RNA (IVT) を HEK293-Cas9 安定発現株にリバーストランスフェクションによって導入したところ、免疫応答による細胞死が見られました。実際に、IVTを導入した細胞では、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 (右図)。しかし Alt-R™ では、これらの活性は見られませんでした。ストレス反応遺伝子である *IFITM1*、*RIGI*、*OAS1* でも同様の結果が得られました。

IFIT1 expression qPCR amplification curves



Alt-R™ CRISPR-Cas9 System と 実験ワークフローと特徴



STEP1 Cas9 Expression Plasmid の導入

Alt-R™ CRISPR-Cas9 System では、Cas9 タンパク質の発現に Cas9 plasmid をお勧めしています。Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex 導入の 24 時間前に Cas9 Expression Plasmid を導入することで、十分量の Cas9 を発現させることが出来ます。弊社で扱っている Cas9 Expression Plasmid は、7.3 kb と通常の Cas9 発現プラスミド (9.2 kb) と比較すると少し小さく設計されています。これは、プラスミドサイズと細胞への導入効率が反比例するため (右図)、プラスミドサイズの最小化を図ったためです。

STEP2 Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex の調製と導入 (例) 96-well プレート

Cas9 プラスミド導入の 24 時間後、Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex を調製・導入します。crRNA:tracrRNA complex の調製方法は非常に簡便です。

1) 100 μ M crRNA と 100 μ M tracrRNA を duplex buffer に 3 μ L ずつ加え、計 100 μ L にします。95°C で 5 分インキュベート後、室温に戻します。

※調製した Alt-R™ crRNA:tracrRNA complex は、-20°C で約 4 週程度保存できます。

2) 1) により 3 μ M となった crRNA:tracrRNA complex 1.5 μ L を、トランスフェクション用試薬に加え、50 μ L とします。

3) 2) で調製したトランスフェクション溶液に Cas9 発現細胞の懸濁液を 100 μ L 加え、48 時間培養します。

(crRNA:tracrRNA complex の終濃度 : 30 nM)

STEP3 T7E1 mismatch endonuclease を用いた変異検出

弊社では、T7E1 mismatch endonuclease (NEB) を用いて、変異の検出を行っております。T7E1 を用いれば、PCR と電気泳動で簡単に変異を検出できます。T7E1 は 2 塩基以上の変異の検出に優れており、ゲノム編集による遺伝子改変の検出に最適です。

なお、各 STEP の詳細は Protocol (Alt-R™ CRISPR-Cas9 System User Guide) をご参照ください。

▶ <https://sg.idtdna.com/pages/products/genome-editing/crispr-cas9/>

導入するプラスミドサイズと、導入効率の比較

9.2 kb の sgRNA + Cas9 plasmid と比較し、4.7 kb の eGFP Plasmid の方がより細胞に導入されているのが分かります。

CRISPR crRNA

製品名	価格 (税別)
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

製品名	価格 (税別)
5 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA	¥12,000
20 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA	¥25,000
100 nmol Alt-R™ CRISPR tracrRNA	¥64,000

Duplex Buffer が同梱されています。

CRISPR-Cas9 control kits

製品名	価格 (税別)
2 nmol Alt-R™ CRISPR Control Kit Rat	¥19,500
2 nmol Alt-R™ CRISPR Control Kit Mouse	¥19,500
2 nmol Alt-R™ CRISPR Control Kit Human	¥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 内容品に含まれる各 crRNA の単品販売です)

製品名	価格 (税別)
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 内容品に含まれる各 crRNA の単品販売です)

製品名	価格 (税別)
2 nmol (ea.) Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix (H)	¥5,800
2 nmol (ea.) Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix (R)	¥5,800
2 nmol (ea.) Alt-R™ HPRT PCR Primer Mix (M)	¥5,800

Cas9 expression plasmid

製品名	価格 (税別)
Alt-R™ S.p. Cas9 Expression Plasmid	¥12,800

Nuclease-Free Duplex Buffer

製品名	価格 (税別)
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

注文方法：ウェブサイトからご注文下さい。(次ページのご注文方法をご覧ください。)

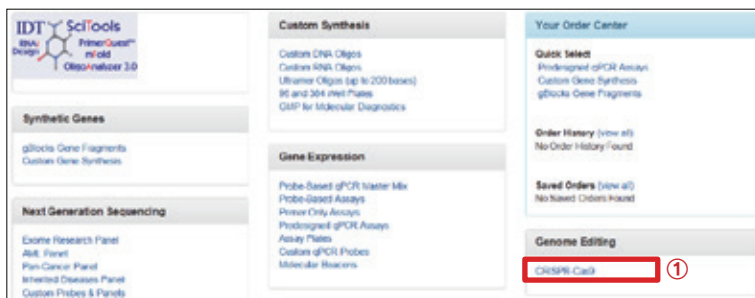
新規登録 or ログイン

1. IDT ウェブサイト (<http://www.idtdna.com/site>) にアクセスし、新規登録 or ログインします。
2. ログインできていることを確認後 (①)、FlagをJapanにして (②)、[Order Menu] タブをクリック (③) して下さい。

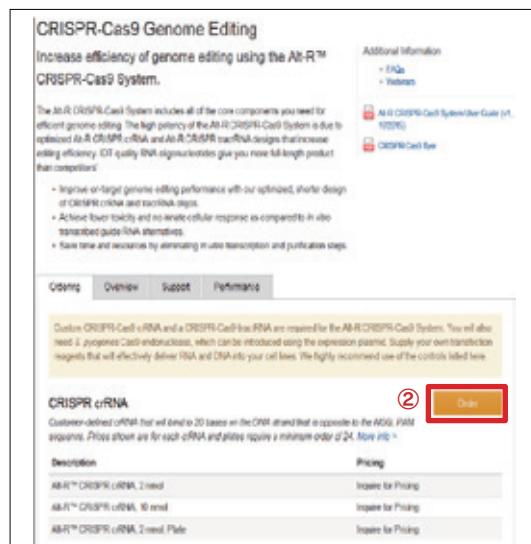


ご注文

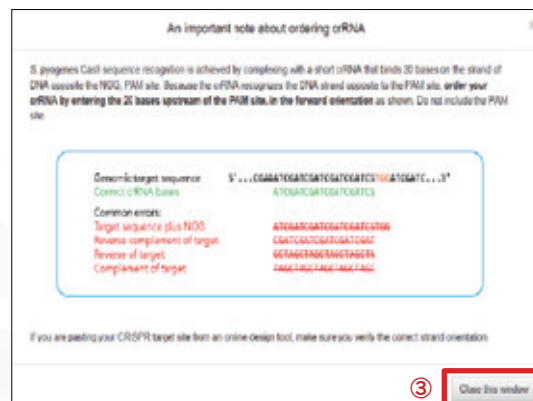
1. Order Menu ページの [CRISPR-Cas9] をクリック (①) して下さい。



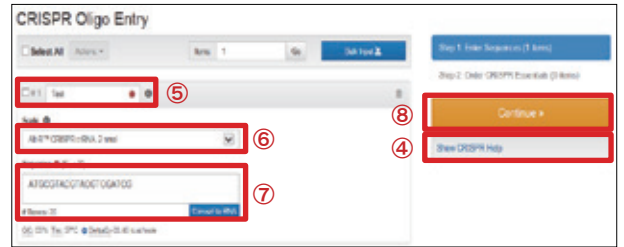
2. 認識部位を含むcrRNAを購入する場合、Orderをクリック (②) して下さい。crRNAが必要な場合は、このページを下へスクロールして頂き、右ページ頂6を参考にご注文下さい。



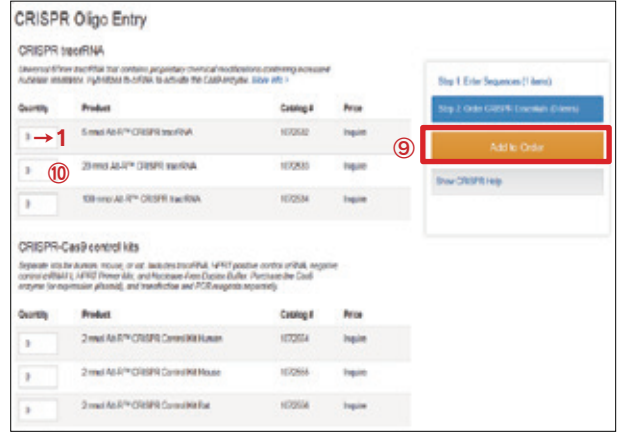
3. 入力方法が表示されるので、こちらをお読み頂き、[Close this window] (③) をクリックして下さい。簡潔に内容を記述しますと、「下記の様にPAMサイトから上流20basesを入力して下さい。」と書かれています。もう一度表示させる場合は、次ページの [Show CRISPR Help] (④) をクリックします。



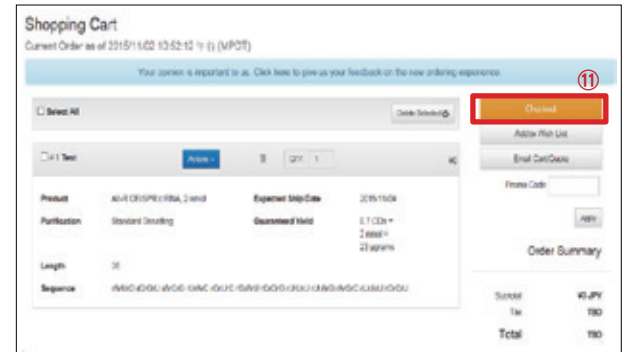
5. 配列名を入力 (5)、スケールを選択 (6)、20baseのDNA配列を入力して [convert to RNA] (7) をクリックします。最後に [Continue] (8) をクリックします。



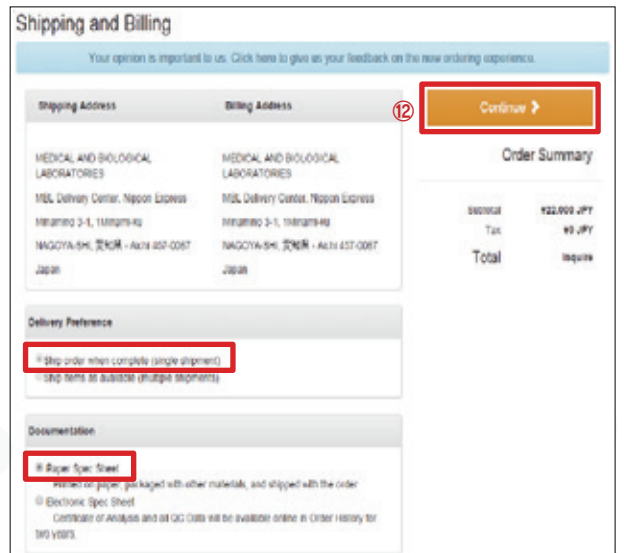
6. その他Alt-R製品の注文も行えます。すでに手元にtracrRNA等をお持ちの場合は、[Add to Order]をクリック (9) して下さい。必要な場合は、必要な製品の個数を入力し (10)、Add to Order をクリックします。



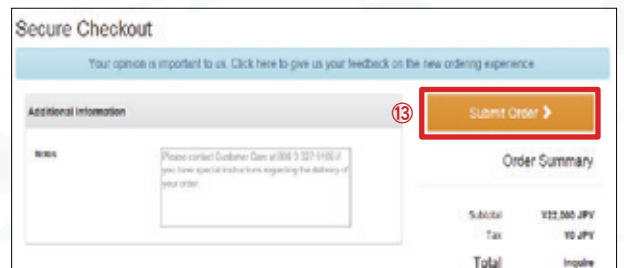
7. 内容に間違いがないか確認後、Checkoutをクリック (11) します。
8. ライセンスに関わる記述が出てまいりますので、お読みの上、ページ最下部の Accept をクリックして下さい。



9. 発送先住所が表示されます。[Single Shipment]、[Paper Spec Sheet] を選択して下さい。確認後、[Continue]をクリック (12) して下さい。

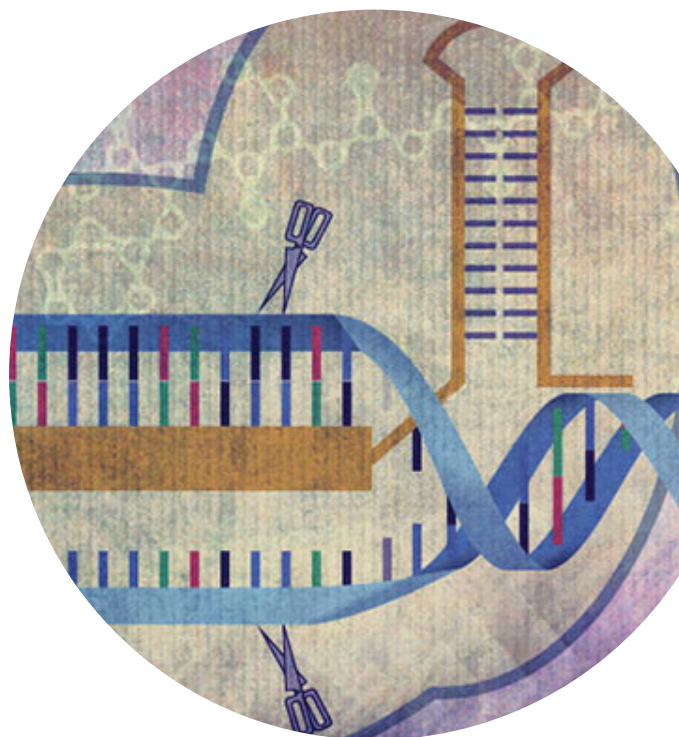


10. [Submit Order] をクリック (13) すると注文完了です。
※ 事前に書面にて見積が必要な場合は、Note欄に「Request Quote」とご記入下さい。合成開始前にメールにてお見積りをお送りさせて頂き、承認頂いてから合成を開始致します。



custom oligos • next generation sequencing • synthetic biology • qPCR • RNAi • CRISPR genome editing

See what more we can do for you
at www.idtdna.com/MORE.




INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

2015.11
947187-15111060N

代理店

お問い合わせ 営業・販売

Integrated DNA Technologies, Inc. 日本総代理店

MBL 株式会社 医学生物学研究所

〒460-0008 名古屋市中区栄4丁目5番3号 KDX名古屋栄ビル10階

TEL : (052) 238-1904 FAX : (052) 238-1441 URL : <http://ruo.mbl.co.jp>

技術サポート

Integrated DNA Technologies MBL 株式会社

TEL : (03) 6865-1217 URL : <http://sg.idtdna.com>