

ガイド RNA 合成キット

***CUGA*[®] 7 gRNA Synthesis Kit**

マニュアル（第 4 版）

Code No. 314-08691

NIPPON GENE CO., LTD.

I 製品説明

CUGA[®]7 gRNA Synthesis Kit は、ゲノム編集に必要なガイド RNA (guide RNA, gRNA) 等の短鎖 RNA を合成・精製するためのキットです。

in vitro 転写反応に、株式会社ニッポンジーンテックが独自に開発した CUGA[®]7 RNA ポリメラーゼ (T7 RNA Polymerase の変異体) を用いることで、目的のガイド RNA を正確かつ大量に合成することができます。

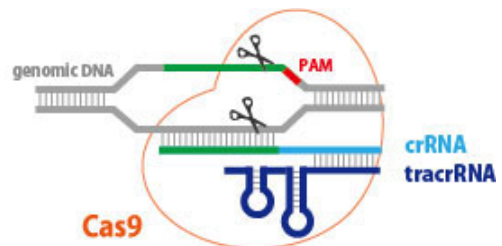
本キットには、*in vitro* 転写反应用試薬およびスピンカラムを用いたガイド RNA 精製用試薬が含まれています。

<ガイド RNA について>

ガイド RNA には、以下の 2 種類があります。

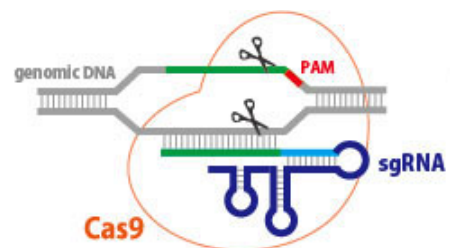
① crRNA、tracrRNA からなるガイド RNA

crRNA は、ゲノム DNA の PAM 配列 (5' -NGG) 上流に隣接した切断標的部に相同な配列と、tracrRNA の一部の配列を含みます。
tracrRNA は、crRNA と部分的に対形成し、足場として機能します。



② 一本鎖 RNA からなるガイド RNA (sgRNA)

sgRNA (single guide RNA) は、crRNA と tracrRNA の両機能を併せ持つよう設計された一本鎖のキメラ RNA です。



II キット内容

| 構成品 | 容量 (50 回用) | 保存 | 備考 |
|--------------------------|-------------------|---------|----|
| CUGA 7 Enzyme Solution | 50 μ l × 1 本 | - 20℃保存 | |
| 5 × Transcription Buffer | 200 μ l × 1 本 | - 20℃保存 | |
| 0.1 M DTT | 100 μ l × 1 本 | - 20℃保存 | |
| NTP mix | 300 μ l × 1 本 | - 20℃保存 | |
| DNase I (RNase free) | 100 μ l × 1 本 | - 20℃保存 | |
| ddWater (RNase free) | 1 ml × 5 本 | - 20℃保存 | |
| gRNA Binding Buffer | 30 ml × 1 本 | 室温保存 | |
| gRNA Wash Buffer | 40 ml × 1 本 | 室温保存 | |
| Spin Column | 50 本 × 1 袋 | 室温保存 | |

(注意)

- * -20℃保存の試薬は、-80℃など過度の冷却を避けて下さい。また、室温（15-25℃）あるいは4℃で長時間放置しないようご注意ください。
- * gRNA Binding Buffer と gRNA Wash Buffer はエタノールが含まれています。ご使用後は、蒸発を防ぐため速やかに蓋を閉めて下さい。

<キット以外に必要なもの>

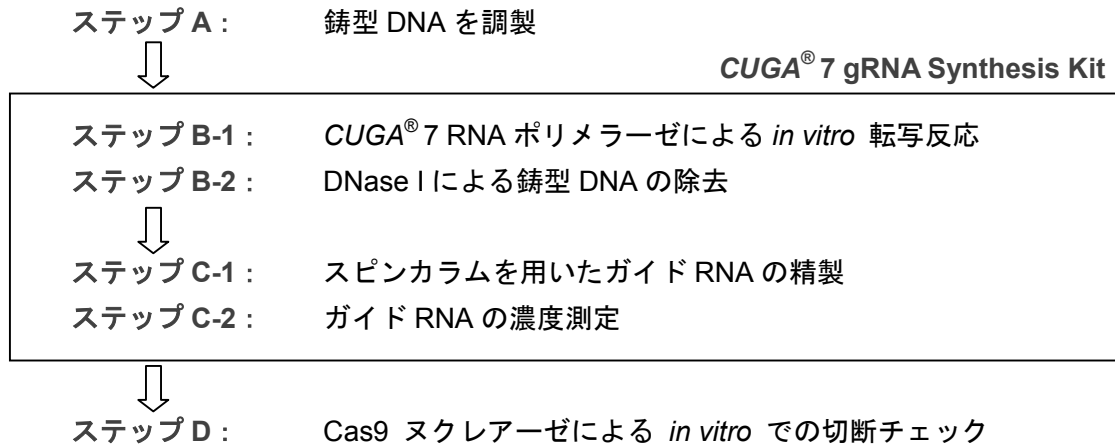
- ・ マイクロピペットおよびピペットチップ
- ・ 1.5 ml マイクロチューブ
- ・ PCR チューブ
- ・ 遠心分離機 (4℃)
- ・ インキュベーター (37℃) またはサーマルサイクラー
- ・ 分光光度計

III 使用上の注意

- ・ 本品は、試験研究用試薬ですので、医薬品、その他の目的にはご使用になれません。
- ・ 試薬についての基本的な知識のある方以外は取り扱わないで下さい。本品の取り扱いは、マニュアル記載内容通りに行ってください。

・ IV プロトコール

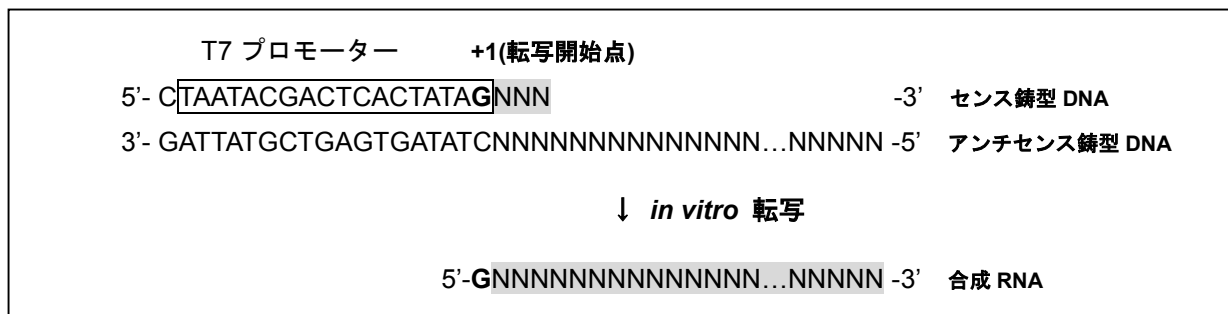
<実験の流れ>



本キットには、ステップ A とステップ D に必要な試薬は含まれておりませんので、別途ご用意いただく必要がございます。

ステップ A: 鋳型 DNA 調製

本キットでは T7 プロモーター配列依存的な RNA ポリメラーゼの *in vitro* 転写反応を利用しています。*in vitro* 転写反応では転写開始点(+1)から下流のアンチセンス鎖を鋳型 DNA として RNA を合成するため、グアノシン残基(+1)までの T7 プロモーター配列部分が完全に二本鎖を形成している鋳型 DNA を用意する必要があります。



ガイド RNA には、①「crRNA、tracrRNA からなるガイド RNA」と②「一本鎖 RNA からなるガイド RNA (sgRNA)」の 2 種類があります。①の場合、crRNA 用と、tracrRNA 用の鋳型 DNA がそれぞれ必要です。なお、tracrRNA は標的配列が異なる場合も共通で使用できます。

詳しくは、「(別冊) CUGA[®] 7 gRNA Synthesis Kit 参考資料」を WEB サイトよりご参照下さい。
<https://www.nippongene.com/siyaku/product/genome-editing/cuga7-grna/cuga7-grna-synthesis-kit.html>

ステップ B : ガイド RNA 合成

B-1. *in vitro* 転写反応

ステップ A に記載のとおり、T7 プロモーター配列を含む鋳型 DNA を用意します。

5× Transcription Buffer 内に白い沈澱物（スペルミジン）が見られる場合は、沈澱物が確認されなくなるまでチューブを室温に放置した後、バッファーの濃度が均一になるよう、ピペティングまたはタッピングにより攪拌して下さい。

- ① 新しいチューブに以下の試薬を上から順番に加え、室温で転写反応液を調製する。*

| | |
|-------------------------|------------|
| ddWater (RNase free) | X μ l |
| 5× Transcription Buffer | 4 μ l |
| 0.1 M DTT | 2 μ l |
| NTP mix | 6 μ l |
| CUGA7 Enzyme Solution | 1 μ l |
| 鋳型 DNA ** | 1~4 pmol |
| <hr/> | |
| Total | 20 μ l |

(注意)

* 5× Transcription Buffer に含まれるスペルミジンは、核酸と複合体を形成し、場合によっては不溶物質として沈澱する可能性があります。沈澱を形成した場合、転写反応の効率が著しく低下するため、鋳型 DNA は必ず最後に加えて下さい。また、均一な濃度になるよう、転写反応溶液の調製操作は必ず室温条件下で行って下さい。

** 1 反応あたり、終濃度 50~200 nM になるように鋳型 DNA を添加して下さい。
例) 120 bp の PCR 産物を鋳型にする場合、20 μ l 反応系に 100 ng 添加（終濃度 63 nM）。

- ② インキュベーターやサーマルサイクラーを用いて 37°C で 2 時間反応を行う。

B-2. 鋳型 DNA の除去

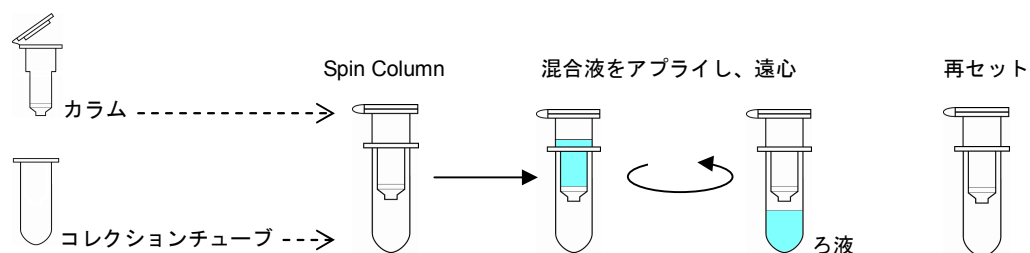
① 2 μ l の DNase I (RNase free) を B-1. の転写反応溶液に加え、ピペティングまたはタッピングにより混合する。

② インキュベーターやサーマルサイクラーを用いて 37°C で 15 分間消化反応を行う。反応終了後、スピнкаラムを用いて精製を行う。すぐに精製しない場合は、-80°C で保存する。

ステップ C : ガイド RNA の精製

C-1. スピんカラムを用いたガイド RNA の精製

- ① B-2.の反応液 (22 μ l) に 578 μ l の gRNA Binding Buffer を添加し、溶液が完全に混合するように転倒混和する。軽くスピндаウンする。
- ② 混合液 (600 μ l) を全量 Spin Column に添加する。
- ③ 遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。Spin Column のカラムを外し、Collection Tube 中のろ液を捨てた後、カラムを同じ Collection Tube の上に戻す。



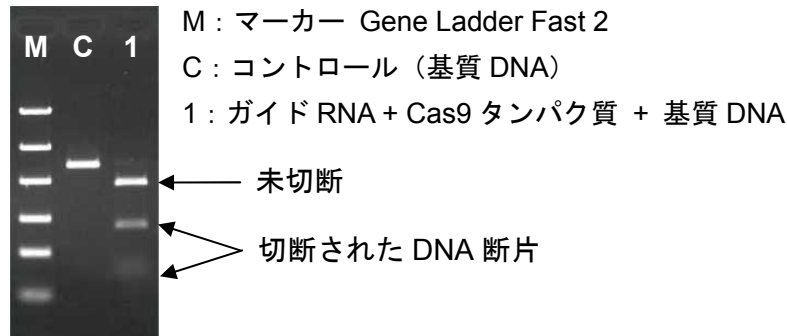
- ④ 750 μ l の gRNA Wash Buffer を Spin Column に添加する。
- ⑤ 遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。ろ液を捨て、カラムを Collection Tube に再度戻す。
- ⑥ gRNA Wash Buffer に含まれていたエタノール分を取り除くため、Spin Column を空の状態のまま遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。
- ⑦ Spin Column のカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブの上に重ねる。
- ⑧ 50 μ l の ddWater (RNase free) をメンブレン中央に滴下した後、3 分間室温で静置する。
- ⑨ 遠心 (13,000 \times g、1 分間、4 $^{\circ}$ C) する。
- ⑩ ガイド RNA が 1.5 ml マイクロチューブの中に回収される。

C-2. ガイド RNA の濃度測定

- ① 分光光度計で精製したガイド RNA の濃度を測定する。[予想収量 : 10~30 μ g]
回収したガイド RNA をすぐに使用しない場合、-80 $^{\circ}$ Cに保存して下さい。

ステップ D : *in vitro* での切断チェック

ステップ C で精製したガイド RNA と Cas9 タンパク質を用いて、標的配列を含む DNA 断片（基質 DNA）を *in vitro* で切断し、アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片が目的のサイズに切断されていることを確認します。



具体的な *in vitro* での切断チェック方法については、「(別冊) CUGA[®]7 gRNA Synthesis Kit 参考資料」を参照して下さい。 <https://www.nippongene.com/siyaku/product/genome-editing/cuga7-grna/cuga7-grna-synthesis-kit.html>

V トラブルシューティング

| トラブル | 予想される原因 | 対策 |
|---|---------------------------|--|
| 低収量 | ヌクレアーゼがコンタミしている。 | <ul style="list-style-type: none"> 使用する器具を洗浄する。 操作の際は、使い捨て手袋を着用する。 |
| | 転写反応時間が短い。 | <ul style="list-style-type: none"> <i>in vitro</i> 転写反応時間を 4 時間まで延ばす。 |
| | 転写開始点付近の配列が転写開始効率に影響している。 | <ul style="list-style-type: none"> 転写開始点直下にチミジン残基が連続していない鋳型 DNA を使用する。 |
| | 鋳型 DNA の精製度が悪い。 | <ul style="list-style-type: none"> 鋳型 DNA 調製の際に使用する合成オリゴヌクレオチドはカートリッジ精製または HPLC 精製を推奨する。 |
| 低濃度 | 溶出液量が多い。 | <ul style="list-style-type: none"> 20~50 μl の ddWater (RNase free) で溶出すると、ガイド RNA 濃度は高くなる。 |
| 標的 DNA が目的サイズに切断されない (<i>in vitro</i> 切断チェック) | ガイド RNA の配列が適していない。 | <ul style="list-style-type: none"> 標的配列を変えてガイド RNA を設計する。 |

VI ラベルライセンス Label License

TERMS OF USE

BEFORE PLACING AN ORDER OR USING THIS PRODUCT, PLEASE READ THE TERMS AND CONDITIONS SET FORTH BELOW. YOUR PURCHASE OF THIS PRODUCT SHALL CONSTITUTE ACKNOWLEDGMENT AND ACCEPTANCE OF THESE TERMS AND CONDITIONS.

Certain commercial entities and/or activities performed at commercial entities may require additional contract rights from ERS Genomics Limited which are not granted through the purchase of this product.

For additional information please see www.ersgenomics.com/research-products.php.

The purchaser receives a non-exclusive, non-transferable right to use the Product, Progeny (meaning any unmodified descendant form of the Product), Modifications (meaning any modifications of the Product) and Unmodified Derivatives (meaning any substances created by the purchaser which constitute an unmodified functional subunit or product expressed by the Product) for RESEARCH USE ONLY, which, subject to the exclusions below, includes use to discover and develop any product, including therapeutic products, which may then be sold to third parties, provided, however, that such products do not incorporate the Product, Progeny, Modifications, or Unmodified Derivatives.

No "Commercial Use" is allowed. Commercial Use means any and all uses of the Product, Progeny, Modifications or Unmodified Derivatives thereof, or any modified cells or organisms created through use of the foregoing, including but not limited to:

- (1) Sale, whether or not such sale is limited for use in research;
- (2) Provision of a service to a third party;
- (3) Use in any diagnostic, preventative, or therapeutic application;
- (4) Use in any veterinary, livestock or agricultural application;
- (5) Manufacturing of a product for sale.

For clarity, transfer of materials or provision of services by not for profit or academic core labs to their internal clients shall not constitute a Commercial Use.

Except for the rights granted herein, any and all rights to the Product, Progeny, Modifications or Unmodified Derivatives thereof, shall remain in NIPPON GENE. No ownership rights are transferred.

The purchaser shall have no right to assign the rights granted herein to third parties. The Product, Progeny, Modifications or Unmodified Derivatives thereof, must at all times remain in the possession of the purchaser, except for a transfer to a scientific collaborator or to a service provider, to perform services, solely on behalf of the purchaser.

ERS Genomics Limited is an intended third-party beneficiary under these Terms of Use.

マニュアル記載内容や製品仕様、価格に関しては予告なしに変更する場合があります。

「CUGA」は株式会社ニッポンジーンテックの日本における登録商標です。

お問い合わせ先

株式会社ニッポンジーン
研究試薬部 学術営業課

TEL 076 - 451 - 6548

URL <https://www.nippongene.com/siyaku/>

お問い合わせは、お電話もしくはWEB フォームより承っております。