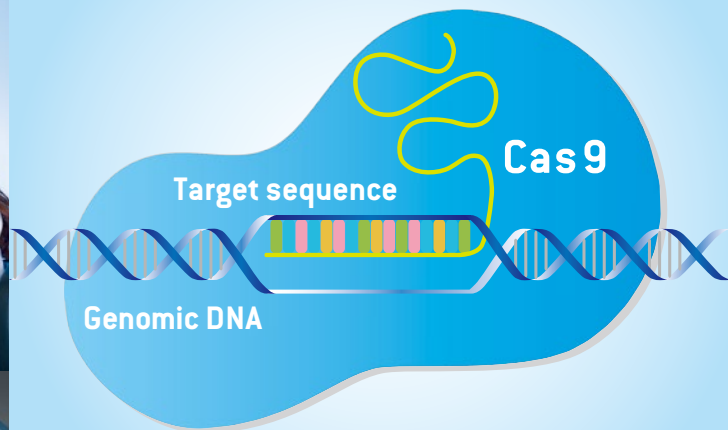


CRISPR/Cas システムを用いたゲノム編集に

## 遺伝子導入装置 Nucleofector™



- 核内への遺伝子導入能力→高効率のゲノム編集を実現
- 多様なドナー DNA (ssODN、dsDNA) によるゲノム編集事例
- Cas Nuclease を導入可能。オフターゲット効果を低減
- iPS 細胞や免疫細胞における多数の報告
- DNA、RNA、タンパク質、RNP 等多様な基質を共導入可能

# Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins

Sojung Kim,<sup>1,2</sup> Daesik Kim,<sup>1,2</sup> Seung Woo Cho,<sup>1,2</sup> Jungeun Kim,<sup>1,2</sup> and Jin-Soo Kim<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-747, South Korea; <sup>2</sup>Center for Genome Engineering, Institute for Basic Science, Seoul 151-747, South Korea

## 要約

Cas9 タンパク質を利用したゲノム編集の問題点として、標的遺伝子では無い遺伝子配列の改変（オフターゲット効果）や、プラスミドに起因する DNA 断片がランダムにゲノムに挿入されることがあげられる。この問題を解決するために、本研究では、従来プラスミド DNA の形で導入されていた Cas9 を、精製組換えタンパク質として導入した。

4D-Nucleofector により導入された組換え Cas9 タンパク質とガイド RNA は、種々のヒト細胞に高効率で導入された。導入された Cas9 タンパク質は、速やかにゲノム修復を行った後、細胞内で分解されることにより、従来法と比較してオフターゲット効果が減少し、高効率にゲノム修復を行うことが可能となった。

**【Nucleofection 条件】** 細胞数： $2 \times 10^5$  cells/ 20  $\mu$ L sample | Cas9 タンパク質：4.5 ~ 45  $\mu$ g または、Cas9 プラスミド（1  $\mu$ g または 2.4 $\mu$ g） | sgRNA:6-60  $\mu$ g

細胞種	K562	H9 (human ES 細胞)	BJ
導入試薬	SF Cell line nucleofector solution	P3 Primary cell nucleofector solution	
プログラム	FF-120	CB-150	DT-130

引用元：Genome Res 24:1012-1019 <http://genome.cshlp.org/content/24/6/1012.short>

## CRISPR/Cas によるゲノム編集文献一覧 \* 他も多数実績有り

Authors	Citation	Nucleofector™ Platform	Cell Type	Substrates
Byrne <i>et al.</i>	Curr Prot Stem Cell Biol 35:5A.8: -1-5A.8.22 [2015]	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Byrne <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 43(3): e21 [2015]	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Chan <i>et al.</i>	Biotechnol J 11(3):399-414 [2016]	4D-Nucleofector™ System	CHO suspension	plasmid
Chang <i>et al.</i>	Cell Reports 12(10):1668-1677 [2015]	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC	plasmid
Chavez <i>et al.</i>	Nat Meth 12(4): 326–328 [2015]	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Dalvai <i>et al.</i>	Cell Rep 13(3):621-633 [2015]	4D-Nucleofector™ System	K562	plasmid
Dever <i>et al.</i>	Nature 539(7629):384-389 [2016]	Nucleofector™ II/2b Device, 4D-Nucleofector™ System	Human CD34	protein [Cas9 RNP]
deWitt <i>et al.</i>	Sci Transl Med 8(360):360ra134 [2016]	4D-Nucleofector™ System	CD34, K562	protein [Cas9 RNP]
Firth <i>et al.</i>	Cell Reports 12(9):1385-390 [2015]	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC	plasmid
Fu Y <i>et al.</i>	Nat Biotech 32(3):279–284 [2014]	4D-Nucleofector™ System	U2OS	plasmid
Fu Y <i>et al.</i>	Nat Biotech 31(9):822–826 [2013]	4D-Nucleofector™ System	U2OS, K562	plasmid
Ghorbal <i>et al.</i>	Nat Biotechnol 32:819–821 [2014]	4D-Nucleofector™ System	Plasmodium falciparum	plasmid (linearized)
Grobarczyk <i>et al.</i>	Stem Cell Rev and Rep 11:774–787 [2015]	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Han <i>et al.</i>	Nat Chem Biol 12(7):511-515 [2016]	4D-Nucleofector™ System	HCT116, HeLa	plasmid
Hendel <i>et al.</i>	Nat Biotechnol 33:985–989 [2015]	Nucleofector™ II/2b Device, 4D-Nucleofector™ System	K562, human T cells, CD34	plasmid, mRNA, protein [Cas9 RNP]
Hill <i>et al.</i>	J Biol Chem 291(46):24280-24292 [2016]	4D-Nucleofector™ System	Plasmodium falciparum	plasmid
Hong <i>et al.</i>	Mol Ther 25(1):44-53 [2017]	4D-Nucleofector™ System	Rhesus iPSC	plasmid
Hultquist <i>et al.</i>	Cell Reports 17:1438–1452 [2016]	96-well Shuttle™ Add-on	Human T cells	protein [Cas9 RNP]
Kim S <i>et al.</i>	Genome Res 24:1012–1019 [2014]	4D-Nucleofector™ System	K562, BJ fibroblasts	ribonucleoprotein
Kleinstiver <i>et al.</i>	Nature 529(7587):490-495 [2016]	4D-Nucleofector™ System	U2OS	plasmid
Kouranova <i>et al.</i>	Hum Gene Ther 27(6):464-475 [2016]	96-well Shuttle™ Add-on	C6, Neuro2A	plasmid, mRNA
Lin S <i>et al.</i>	eLife 3:e04766 [2014]	96-well Shuttle™ Add-On	293T, NHDF, hESC	ribonucleoprotein
Liu <i>et al.</i>	Nat Prot 10(11):1842-1859 [2015]	4D-Nucleofector™ System	H9 hESC	protein [Cas9 RNP]
Maji <i>et al.</i>	Nat Chem Biol 2016 Oct 31 [Epub ahead of print]	4D-Nucleofector™ System	U2OS	plasmid
Mandal <i>et al.</i>	Cell Stem Cell 15:643–652 [2014]	Nucleofector™ II/2b Device	Human T cells, CD34	plasmid
Mandegar <i>et al.</i>	Cell Stem Cell 18(4):541-553 [2016]	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC	plasmid
Marthaler <i>et al.</i>	Stem Cell Res 16(1):180–183 [2016]	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Niu <i>et al.</i>	J Biol Chem 291(32):16576-16585 [2016]	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid, ssODN

# Optimization of scarless human stem cell

Luhan Yang<sup>1,2</sup>, Marc Guell<sup>1</sup>, Susan Byrne<sup>1</sup>, Joyce L. Yang<sup>1,2</sup>, Alejandro De Los Angeles<sup>3</sup>, Prashant Mali<sup>1</sup>, John Aach<sup>1</sup>, Caroline Kim-Kiselak<sup>2</sup>, Adrian W Briggs<sup>1</sup>, Xavier Rios<sup>1</sup>, Po-Yi Huang<sup>1,4</sup>, George Daley<sup>3</sup> and George Church<sup>1,5,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, Harvard Medical School, Boston, 02115 MA, USA, <sup>2</sup>Biological and Biomedical Sciences Program, Harvard Medical School, Boston, 02115 MA, USA, <sup>3</sup>Children's Hospital, Boston, 02115 MA, USA, <sup>4</sup>Chemistry and Chemical Biology program, Harvard, 02138 Cambridge, MA, USA and <sup>5</sup>Wyss Institute for Biologically Inspired Engineering, Harvard University, Cambridge, 02138 MA, USA

## 要約

ヒト iPS 細胞等の幹細胞を標的としたゲノム編集では、ゲノムに痕跡を残さずに高効率に行うことが重要である。本報告では、レンチウイルスでも使用可能な TALE (reTALEs) を作製し、Cas9-gRNA のそれぞれを 4D-Nucleofector™ によりヒト iPS 細胞に導入し、種々の比較を行った。reTALEs を用いたゲノム編集では、Cas9-gRNA では非相対的組換

えが reTALEs を使用した場合より 7-8 倍高くみられ、ssODN と共導入した相対的組換えによる修復効果は若干高い傾向がみられた。これらの系を使用することにより、ヒト iPS 細胞からおよそ 3 週間でゲノム編集により遺伝子改変を行った単一細胞からなるクローンを得ることが可能となった。

**【Nucleofection 条件】** PGP1 iPSC | 細胞数 :  $2 \times 10^6$  cells / 20  $\mu$ L | 導入試薬 : P3 Primary cell nucleofector solution | プログラム : CB-150  
| 基質 : ① Re-TALENs plasmid : 1  $\mu$ g、gRNA : 1  $\mu$ g、ssODN (100  $\mu$ M) : 2  $\mu$ L  
② Cas9: 1  $\mu$ g、gRNA : 1  $\mu$ g、ssODN (100  $\mu$ M) : 2  $\mu$ L

引用元 : Nucleic Acids Res 41:9049-9061 <http://oxfordjournals.org/our-journals/nar/top-articles-genomics.html>

Authors	Citation	Nucleofector™ Platform	Cell Type	Substrates
Park <i>et al.</i>	Nat Genet 49(2):193-203 (2017)	4D-Nucleofector™ System	Human T cells	protein (Cas9 RNP)
Petit CS <i>et al.</i>	J Cell Biol 202:1107-1122 (2013)	Nucleofector™ II/2b Device	HeLa	plasmid, ssODN
Pires <i>et al.</i>	Stem Cell Res 17(2):285-288 (2016)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid, ssODN
Pogson <i>et al.</i>	Nat Commun 7:12535 (2016)	4D-Nucleofector™ System	Hybridoma cell lines	plasmid
Poon <i>et al.</i>	Stem Cell Res 17(3):466-469 (2016)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Ran FA <i>et al.</i>	Cell 154:1380-1389 (2013)	4D-Nucleofector™ System	HUES62	plasmid, PCR cassette
Ran FA <i>et al.*</i>	Nat Prot 8(11):2281-2308 (2013)	4D-Nucleofector™ System	HUES9, HEK293	plasmid, PCR cassette
Richardson <i>et al.</i>	Nat Biotechnol 34(3):339-344 (2016)	4D-Nucleofector™ System	HEK293	protein (Cas9 RNP)
Ruan <i>et al.</i>	Mol Ther 25(2): 331-341 (2017)	4D-Nucleofector™ System	293FT	plasmid
Rupp <i>et al.</i>	Sci Reports 7(1):737 (2017)	4D-Nucleofector™ System	Human T cells	protein (Cas9 RNP)
Smith <i>et al.</i>	Stem Cells Int 2016:2574152 (Epub 2016 Apr 11)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Srikanth <i>et al.</i>	Cell Reports 12:1-16 (2015)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Su <i>et al.</i>	Sci Reports 6: 20070 (2016)	Nucleofector™ II/2b Device	Human T cells	plasmid
van Aagtmaal <i>et al.</i>	Mol Ther 25(1): 24-43 (2017)	4D-Nucleofector™ System	Human immortalized myoblasts	plasmid
van Overbeck <i>et al.</i>	Mol Cell 63:633-646 (2016)	4D-Nucleofector™ System	HEK293, HCT116, K562	protein (Cas9 RNP)
Walter <i>et al.</i>	eLife 5: e11418 (2016)	4D-Nucleofector™ System	J1 ES cells	plasmid
Wang J <i>et al.</i>	PNAS 111(36):13157-13162 (2014)	Nucleofector™ II/2b Device	Raji	plasmid
Wang <i>et al.</i>	Nat Protocols (1):88-103 (2017)	Nucleofector™ II/2b Device	Human iPSC	plasmid
Wu <i>et al.</i>	Cell Res 25(1):67-79 (2015)	Nucleofector™ II/2b Device	Mouse spermatogonial stem cells	plasmid
Xiang <i>et al.</i>	EMBO Mol Med 8(9):992-1004 (2016)	4D-Nucleofector™ System	Murine microglia cell line N9	plasmid
Yang <i>et al.</i>	Nat Commun 5:5507 (2014)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Yang L <i>et al.</i>	Nucleic Acids Res 41:9049-9061 (2013)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Young <i>et al.</i>	Cell Stem Cell 18:1-8 (2016)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Zah <i>et al.</i>	Cancer Immunol Res 4(6):498-508 (2016)	Nucleofector™ II/2b Device	Raji	plasmid
Zhang <i>et al.</i>	PLoS ONE 10(3): e0120396 (2015)	Nucleofector™ II/2b Device	Mouse ES	plasmid
Zhang <i>et al.</i>	Stem Cell Research 17:151-153 (2016)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid
Zhang <i>et al.</i>	Sci Adv 12;3(4): e1602814 (2017)	4D-Nucleofector™ System	Human iPSC	plasmid

## 4D-Nucleofector™ 各装置の特徴



①コアユニット ②Xユニット ③Yユニット ④LVユニット

## CRISPR/Cas9 について報告されている基質量の範囲

	基質	20 $\mu$ L Strip	100 $\mu$ L Cuvette
Cas9	Cas9プラスミド	0.4~1 $\mu$ g	2~5 $\mu$ g
	Cas9 Nuclease	10 $\mu$ g [60 pmol] *1	50 $\mu$ g [300 pmol]
ガイドRNA	ガイドRNA	120~180 pmol *1	600~900 pmol
	ガイドRNAプラスミド	0.4~1 $\mu$ g	2~5 $\mu$ g
ドナー	dsDNA(lin)	0.4~2 $\mu$ g	5~10 $\mu$ g
	ssODN	50 pmol *2	250 pmol
		12 $\mu$ g [100-mer] *3	60 $\mu$ g [100-mer]

\*1 J. Exp. Med. 2018 Vol. 215 No. 3 985–997

\*2 弊社技術資料より

\*3 SCIENTIFIC Reports [2018] 8:310 Ishida et al.

品番 (品名)	AAF - 1002B (4D-Nucleofector™ コアユニット)*①					
	AAF - 1002X (4D-Nucleofector™ X ユニット)*②		AAF - 1002Y (4D-Nucleofector™ Y ユニット)*③		AAF-1002L (4D-Nucleofector™ LV ユニット)*④	
定 価	2,800,000円		3,100,000円		お問い合わせください	
	構成	コアユニット : 1,200,000円 X ユニット : 1,600,000円	構成	コアユニット : 1,200,000円 Y ユニット : 1,900,000円	構成	コアユニット : 1,200,000円 LV ユニット : お問い合わせ
キューベット						
	100 $\mu$ L キューベット	16-wellストリップ	24ウェルプレート用電極		1 ml カートリッジ	LV カートリッジ
細胞数	$2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$	$2 \times 10^4 \sim 1 \times 10^6$	プロトコルに依存		$1 \times 10^8$	$1 \times 10^9$
サンプル数	1~2	1~16	1~24		1	
電極材	導電性ポリマー					
導入形態	浮遊		接着		浮遊	
用 途	高効率遺伝子導入		接着状態の遺伝子導入		同一バッチによる大量導入	
用 途	P3初代細胞キット (iPS細胞、免疫細胞) 20 $\mu$ L容量: V4XP-3032 100 $\mu$ L容量: V4XP-3012, 3024		基本神経細胞ADキット V4YP - 1A24		P3初代細胞キット (iPS細胞、免疫細胞) 1 mL容量: V4LP-3002 20 mL容量: V4LP-3020, 3520	

## Nucleofector™ 2b 装置の特徴

品番 (品名)	反応容量	電極材	細胞数	サンプル数	導入形態	定 価
AAB - 1001 (Nucleofector™ 2b デバイス)	100 $\mu$ L	アルミニウム	$2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^7$	1	浮遊	1,500,000円



## ロンザ株式会社

バイオサイエンス事業部

〒104-6591 東京都中央区明石町8-1 聖路加タワー 39階

受注・在庫照会 TEL: 03-6264-0620

セールス E-mail: bioscience.sales.jp@lonza.com

テクニカルサポート TEL: 03-6264-0663

E-mail: bioscience.technicalsupport.jp@lonza.com

<http://www.lonzabio.jp/>