

ゲノム編集ベクターミックス調製サービス

VIKING kit

RCKT002 ノックアウトエディション

RCKT003 ノックアウトエディション (G/RFP-)

VIKING kit は、培養細胞ゲノム編集法「VIKING 法」で使用する 3 つのベクター(ドナーベクター、ドナー切断ベクター、ターゲット配列切断ベクター)の混合液を、セミオーダーメイドで調製する受託サービスです。VIKING ベクター混合液と、付属するオリジナルのクローニングリングを使用することで、接着細胞のゲノム編集からクローン樹立まで実施可能です。

〈内容物〉

名称	個数
VIKING ベクター混合液 (ドナーベクター・ドナー切断ベクター・ターゲット配列切断ベクター: 30 μ g / TE Buffer 30 μ L) ※推奨プロトコルにおける 6 ウェルプレートの 1 ウェル x10 回分相当	1 本
クローニングリング	5 個
取扱説明書	1 式
合成報告書	1 式

〈仕様〉

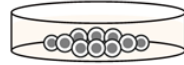
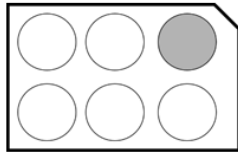
- ユーザーに指定いただいたターゲット配列(配列情報もしくは NCBI の GeneID)に対して gRNA を設計し、ターゲット配列切断ベクターを構築します。合成後のベクター配列を確認し、合成報告書を作成します。
- ユーザーは、細胞選別用のマーカー遺伝子を選択します。
- ユーザーに選択いただいたマーカー遺伝子を含むドナーベクターおよびドナー切断ベクター、ターゲット配列切断ベクターの 3 つの VIKING ベクターの混合液(30 μ g/TE Buffer 30 μ L) を調製します。
- VIKING kit 内容物として、オリジナルのクローニングリング 5 個が付属します。
- トランスフェクション試薬は、細胞により適切なものをユーザー側で選択・ご使用ください。

〈留意事項〉

- VIKING kit はゲノム編集細胞作製の成否を保証するものではありません。またご使用の細胞やゲノム編集に関する技術的なお問い合わせには基本的に応じかねます。

〈VIKING kit 簡易プロトコル〉

細胞の準備



トランスフェクション前日に 6ウェルプレートに細胞をまき、40~50%コンフルエント程度まで培養する。

ゲノム編集



VIKING
ベクター
混合液

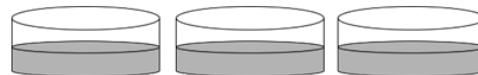
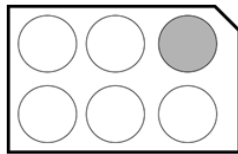
培地を交換し、ウェルにトランスフェクション試薬、VIKINGベクター混合液を添加し、穏やかに混和する。

Opti-MEM(1X)	200 μ L
VIKINGベクター混合液	2 μ L
トランスフェクション試薬	各試薬のプロトコル通り ※弊社プロトコルで推奨するトランスフェクション試薬の場合は 5 μ L

36~48時間培養

ゲノム編集細胞の選別

※細胞選別用薬剤入り培地を用意する。

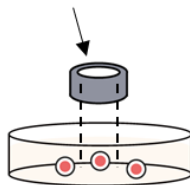


6ウェルプレートから3枚の10cmディッシュへ細胞数1/10、3/10、6/10の割合にて継代を行う。以降、細胞選別用薬剤入り培地で、培養を行う。

コロニー形成まで培養

クローン化

0.25% Trypsin/EDTA
20 μ L



RCKT002の場合

- ① コロニーが形成されたら、蛍光顕微鏡で観察し、EGFP(-)、TurboRFP(+)のコロニーを探す。
- ② 形成されたコロニーの位置に合わせて、滅菌済みクローニングリングを配置し、トリプシン処理を行い、コロニーをピックアップする。

RCKT003の場合

形成されたコロニーの位置に合わせて、滅菌済みクローニングリングを配置し、トリプシン処理を行い、コロニーをピックアップする。

培養、観察を継続して、順次、拡大培養を行う。

培養した細胞の一部を用いてDNAを抽出し、これを鋳型としてPCRを行い、電気泳動パターンよりゲノム編集がされていることを確認する。

※シーケンス解析による塩基配列の確認を推奨