

CompoZr™ Knockout ZFN System に関する よくあるご質問集 (FAQ)

ZFNに関して	Zinc Finger Nuclease(ZFN)ってなんですか？	ZFNはZinc-Fingerと呼ばれるDNAを結合するタンパク質と制限酵素FokIのヌクレアーゼドメインを結合したハイブリッド分子です。DNA結合ドメインであるZinc-Finger部分がゲノム上の特異的な遺伝子座を認識し、DNA切断ドメインであるFokI部分が切断します。
	ZFNを「ZFNペア」と呼ぶ場合がありますが、それはなぜですか？	CompoZr製品では、FokIヌクレアーゼドメインが二量体化して初めて切断活性を持つよう設計されております。DNAに二本鎖切断 (DSB) を引き起こすためには、二分子のZFNがダイマーを形成する必要があります。お届けする製品は検証用の細胞株で標的遺伝子座を切断することが確認されたZFNペアとして御提供します。
	ZFNにはどんな特異性が期待できますか？	FokIが活性化するためには二量体化が必須であり、そのためにZFNがペアである必要があります。そのため二つの異なるZFNが標的サイトに結合しなければなりません。各ZFNは異なる12-18塩基対の標的配列を認識し、さらにFokIがダイマーを形成するためにそれぞれの標的配列の間隔が5-7bpである必要があります。このことから、ZFNは非常に高い特異性を示します。
	ZFNの結合特異性はどの様にテストしていますか？	Sangamo社が所有するZinc Fingerモジュールの結合特異性はこれまで多くの方法で確認されています。
	ZFNの切断能力はどの様にテストされるのですか？	ZFNの切断能力をテストするために、シグマではミスマッチ特異的ヌクレアーゼ分析を用います。この分析では、PCRプライマーを用いて、ZFN処理された細胞から抽出されたゲノムDNAのZFN切断部位を増幅します。結果として得られる、PCR産物（野生型と変異を持つアンブリコンの混合物）を熱変性し、再アニールします。野生型と変異アリルのPCR産物が再アニールした場合、ミスマッチが生じます。再アニール断片をミスマッチ特異的ヌクレアーゼで処理します。反応物はミスマッチ部分が切断されたことを示す分子量の小さい断片を検出するために、ゲル電気泳動します。小さい断片は変異アリルの頻度を反映しており、 <i>in vivo</i> でのZFN効率の尺度と成ります。切断された断片を定量することで集団中の変異アリルの割合を計算することが出来ます。
価格／納期	価格は？	本製品は基本的にカスタム品ですので、定価を設定しておりません。詳しくは こちら (TEL: 03-5796-7330) までお問い合わせ下さい。
	納期は？	カスタム製品ですので、実際にお見積もりから納品までの時間はお客様の御希望の遺伝子によりますが、標準納期は4ヶ月程度です。詳しくは「御注文から納品まで」をご覧ください。
	カスタム品以外のZFNはありますか？	現在、ヒト遺伝子ノックアウト用として CompoZr Knockout ZFN Kits ならびにヒトAAVS1領域への遺伝子導入用 CompoZr® Targeted Integration Kit もご提供しております。各カタログ品に関しましては製品名をクリックしてください。

原 理

ZFNで細胞株への遺伝子のノックインが出来ますか？

はい。ZFNと修復用の鋳型を共トランスフェクション (co-transfect) することで遺伝子のノックインが可能です。修復用の鋳型は、組み込みたい遺伝子とその両端にZFN切断位置近傍のゲノムとマッチする配列 (つまり相同な配列) が必要です。ZFNが特異的な位置においてゲノムを切断した後、homology dependent repair (HDR) という自然な修復機構が働きます。細胞は修復用鋳型の相同配列部分を認識し、ZFN切断部位にその外来遺伝子を組み込みます。

ZFNは細胞株で遺伝子のノックアウトが出来ますか？

はい。遺伝子ノックアウト用のZFNは通常exonのORF内を標的とします。遺伝子ノックアウト用に納品されたZFNは細胞のゲノム標的部位でDSBを引き起こします。ZFNによる切断の後、細胞はNon-homologous end joining (NHEJ) という自然なプロセスで切断部位を修復します。これは不完全な修復プロセスであり、結果として切断部位に塩基の欠失又は追加 (一般的には数十塩基対) が生じます。ZFNが引き起こすNHEJによるこれらの変異により、1-20%のクローンで両アリルでの標的遺伝子ノックアウトが期待されます。

細胞へ導入する時に mRNA形状でZFNを導入する利点はなんですか？

mRNAを用いた場合多数の利点が考えられますが、私どもの細胞を用いた研究の中では以下の利点を確認されています。

- 発現プラスミドDNAのランダムなゲノムへの挿入リスクを排除する
- ZFNの発現が一過性であるため、オフターゲットが起こり得るリスクが低い
- 細胞毒性が低い (RNA > DNA)
- 試験された幾つかのケースの多くではプラスミドよりも切断効率が高い
- 幾つかの細胞タイプはDNAの導入を許容しないので、適用範囲が広い
- プラスミドの場合、特定の細胞タイプではZFN発現のために別のプロモーターが必要な場合があるが、RNAは全ての細胞で汎用である
- 導入に色々な種類のトランスフェクション試薬を用いることが出来る

ZFNのオフターゲット効果を気にすべきですか？

私たちが提供するZFNが顕著なオフターゲット効果を引き起こすことはあまりなさそうです。ZFN候補を設計するためにシグマが用いる独自のアルゴリズムはゲノム中の特異的な配列のみを標的とします。さらに、特別に構築されたヘテロダイマー化が必須なFokI切断ドメイン (miller et al., Nature Biotechnology, July 25, 2007) を有するためにお客様が受け取るZFNはオフターゲット効果から保護されています。

アプリケーション

ZFNと修復用鋳型を細胞に導入する最もいい方法を教えてください。

ZFNはプラスミドまたはそこから転写されるmRNAの形で導入が可能です。プラスミドとmRNAのどちらが効果的かは細胞のタイプに依存するためにシグマではプラスミドとmRNAの両方をお客様に提供いたします。修復用鋳型は一般的に直鎖状DNAとして細胞に導入されます。形状（mRNA、DNAあるいはプラスミド）に関わらず、ヌクレオフェクションあるいはエレクトロポレーションを用いた場合、最も高いDNA切断効率が見られることが分かっています。そのため可能であれば、導入方法としてエレクトロポレーションもしくはヌクレオフェクションをお勧めしています。Lipidタイプのトランスフェクションも多くの場合は上手く行きませんが、しかし結果としての効率は低下する可能性があります。

ZFNはどんな細胞株/生物種で作用しますか？

シグマでは標準仕様として、ヒト、マウス、ラット、ハムスター用のZFNを提供いたします。私たちはほとんどの生物種でZFNが作用するだろうと考えています。例えば最近の報告でZFNによりゼブラフィッシュで部位特異的に遺伝子ノックアウトが可能であることが示されました。（Dyyon et al. Nature Biotechnology, May 25, 2008）。このアプリケーション用のZFNはヒト、マウス、ラット以外の多くの細胞でZFN活性を予測できる酵母システムでテストされました。

ZFNを用いて遺伝子をノックアウトした細胞株を持っています。この細胞株で2つ目の遺伝子をノックアウトしたいのですが可能でしょうか？

はい、勿論可能です。同じ細胞株のゲノムで、少なくとも3つ異なる遺伝子の連続的なノックアウトが可能であることが示されています。

全ての遺伝子がZFNの標的となりえますか？

はい。私たちの2-finger zincfinger モジュールライブラリーを用いることで、平均でゲノム上の200bp毎にZFNが作成できることが出来ると考えます。私たちはゲノム上のカバー率を上げるために、Zinc fingerモジュールライブラリーの継続的なアップデートを計画しています。

私の細胞株はトランスフェクトとが難しいのですが、それでもZFNを使用することが出来ますか？

導入の効率は非常に重要です。私たちはAdV, AAV, レンチウィルスを含むウィルス介したZFNの導入で成功を収めています。もしウィルスを用いた導入システムが利用可能であれば、ZFNの導入にどの様に应用するかを御提供いたします。

意図した変異を起こした後も、ZFNは細胞に残りますか？

遺伝的な改変は恒常的ですが、ZFNの発現は一過性です。またZFNの発現が一過性であることは、オフターゲット効果の可能性を低減します。

	<p>もっと詳しい情報が知りたいのですが・・・</p>	<p>こちらのフォームにてお問い合わせ下さい</p>
	<p>ZFNを使用した論文などがあれば教えてください</p>	<p>論文情報はこちらからご覧下さい</p>
<p>製品内容</p>	<p>構成製品は何ですか？</p>	<p>お届けするセットは以下になります。 いずれの場合もValidationの結果Best performanceのものをお届けします。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. mRNA：10回分(導入した細胞内でZinc finger nucleaseを合成するmRNA) 2. Vector：mRNA作製用。提供したmRNAがなくなった場合に、このVectorを細胞内に導入してmRNAを作る事が可能です。 3. プライマー：ミスマッチassay用のポジコン。遺伝子配列確認用。標的遺伝子の中簡にはさむプライマーで、発現が停止した細胞を特定するために使用できます。 4. プロトコール
<p>保証</p>	<p>確認試験とはどんな細胞で行っていますか？</p>	<p>ヒト、マウス、ラット、ハムスターの遺伝子に対するZFNは当該生物種の細胞で標的遺伝子の検証実験を行い、実際に対象遺伝子に変異を導入できることを確認しております。それ以外の生物種は、酵母のモデル系を用いて検証を行っております。</p>
	<p>効果を確認するためにどのようなテストを行っていますか？</p>	<p>シグマではお客様に効果の確認されたZFNをお届けするために以下のステップを踏んでいます。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 独自のアルゴリズムを用いin-silicoで幾つかのZFN分子候補を設計する 2) テストのためにZFN候補を作成する 3) 実際に細胞を用いた試験(前述のミスマッチ分析など)で、ZFN候補のDNA結合の特異性と染色体上の標的部位での切断能力をテストする 4) 最も効率の良かったZFNペアを選択し、お客様にお届けする
<p>ライセンス</p>	<p>ZNFを使用する際のライセンス条件は？</p>	<p>ライセンスに関しましてはこちらをご覧下さい</p>