



GenCrispr

基因编辑 完整解决方案

美国麻省理工学院Broad研究所张峰实验室及哈佛大学授权许可

 **GenScript**
Make Research Easy

CRISPR/Cas9技术已发展成为基因组编辑的热门工具，它能够完成RNA导向的DNA识别及编辑，为更高效的基因编辑技术提供了全新的平台。除用于基因组编辑，CRISPR技术也应用于众多其它研究中。作为合成生物学及基因组编辑的行业领先者，金斯瑞可为客户提供CRISPR服务及产品，此类服务及产品得到美国麻省理工学院Broad研究所张峰实验室及哈佛大学授权许可。

CRISPR/cas9系统基因编辑机制：

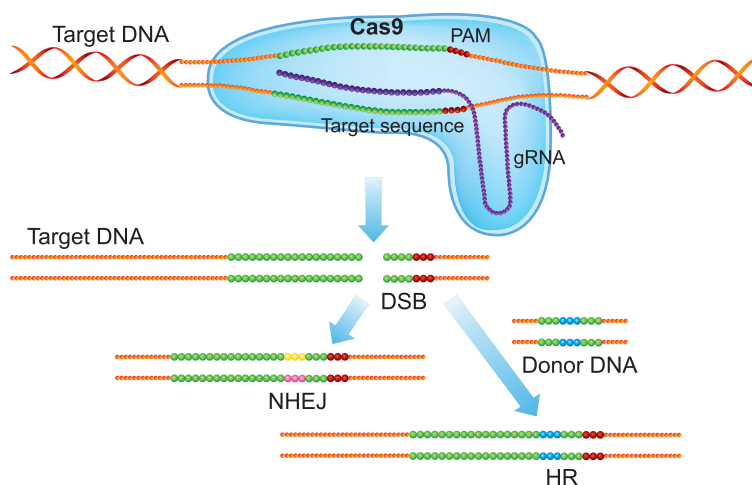


图1，应用CRISPR-Cas9系统定点编辑基因组：利用gRNA与DNA结合定位目标宿主基因。gRNA识别宿主DNA的特定区域并与Cas9复合。Cas9识别目标序列中的PAM并发挥其核酸内切酶的功能使DNA双链断裂。这一过程可以触发两种修复机制：一种是非同源末端连接（NHEJ），将突变引入双链断裂位点；另一种是同源重组修复（HR），将供体DNA信息插入到断裂位点中。



CRISPR/cas9系统的亮点：

- 不引入任何外源性DNA进入目标基因区域
- 与ZFNs和TALENs相比更加简单高效
- 可以用于建立基因插入和基因敲除的细胞系
- 被誉为2013年重大学术突破之一

实验流程



gRNA 设计合成

sgRNA 的设计

sgRNA 的设计可参考 <http://www.genscript.com/gRNA-design-tool.html> 在线设计工具。

sgRNA 的体外转录合成

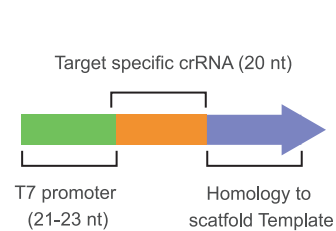
您可以使用金斯瑞的gRNA合成试剂盒(Cat#L00694)体外转录合成gRNA，合成完成后，使用gRNA筛选试剂盒(Cat#L00689)确认gRNA的剪切效率，除了委托体外转录外，您还可以委托金斯瑞来进行gRNA的合成服务。

gRNA合成试剂盒(Cat#L00694)

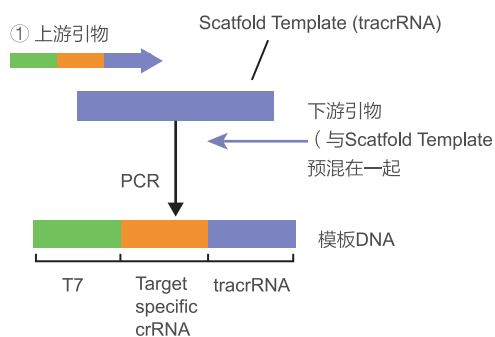
- 一次转录获得多达50ug sgRNA
- 内含sgRNA 转录模板和试剂，仅需1条因为就能完成sgRNA 体外转录
- 可以用于Cas9体外酶切实验、转染细胞等多种基因敲除实验

sgRNA体外转录合成

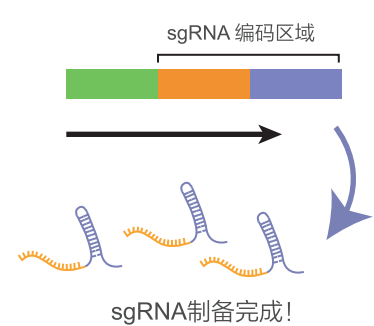
① 上游引物设计



② PCR扩散制备模板DNA



③ 体外转录RNA

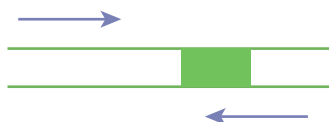


gRNA 筛选试剂盒(Cat#L00689)

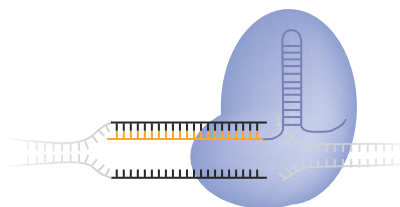
- 一次转录获得多达50ug sgRNA
- 内含sgRNA 转录模板和试剂，仅需1条因为就能完成sgRNA 体外转录
- 可以用于Cas9体外酶切实验、转染细胞等多种基因敲除实验

sgRNA效率确认

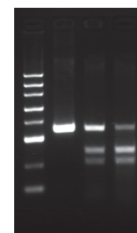
① PCR扩增制备用于剪切确认的目标DNA



② PCR扩散制备模板DNA



③ 琼脂糖电泳确认剪切结果



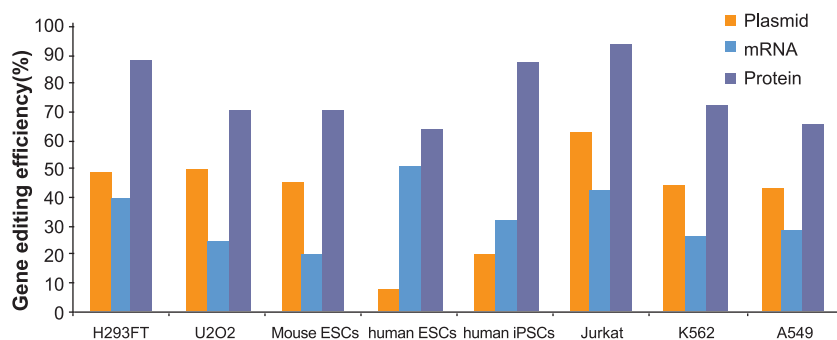
Cat.No.	Name	Size
L00694-20	GenCrispr sgRNA Synthesis Kit	20 reactions
L00694-50	GenCrispr sgRNA Synthesis Kit	50 reactions
L00689-30	GenCrispr sgRNA Synthesis Kit	30 reactions
L00689-100	GenCrispr sgRNA Synthesis Kit	100 reactions

金斯瑞Cas9产品的优越性

- 携带NLS（核定位信号），甘油浓度低
- 有效抑制Cas9持续表达造成的脱靶现象
- 无需考虑每个靶向生物的启动子和密码子
- 不经过蛋白质转录、翻译表达过程，快速导入突变
- 高纯度（>95% by SDS-PAGE）
- 低内毒素（<0.1 EU/ug）
- 美国麻省理工学院Broad研究所张峰实验室及哈佛大学授权许可



利用CRISPR/Cas9的高效编辑能力，可以实现在任何细胞系中，对任何靶基因进行特异性地敲除，插入，上调/下调以及突变。比质粒和mRNA具有更高的基因编辑效率。



X. Liang et al. Journal of Biotechnology 208 (2015) 44–53

- DNA-free：无需转染质粒载体，可以避免外源DNA随机插入基因组的风险。
- 低脱靶效应：蛋白进入细胞完成基因编辑之后即发生自身降解，降低了质粒Cas9稳定表达带来的脱靶风险。
- 高效的剪切效率：对于之前比较棘手的质粒转染效率较低的原代细胞，仍然可以达到有效的剪切。
- 节省时间成本：无需经过转录和翻译，导入到细胞中直接发挥作用。

比竞争产品有更高的基因组剪辑效率

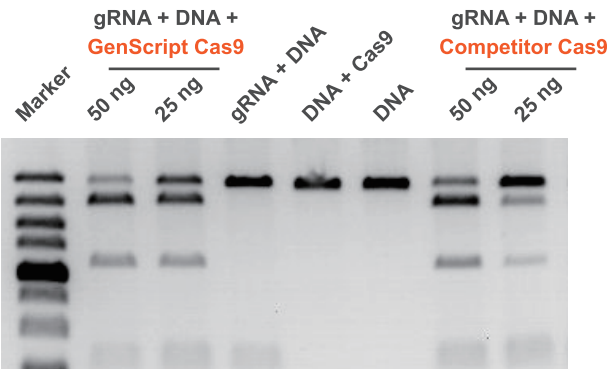


图1. 金斯瑞Cas9蛋白 (Z03386) 的DNA切割活性对比

带有酶切位点的DNA片段分别与不同公司的gRNA/Cas9 蛋白复合物孵育2小时后，通过琼脂糖凝胶电泳检测酶切效率。

比mRNA导入更为有效的胚胎基因组剪辑效率

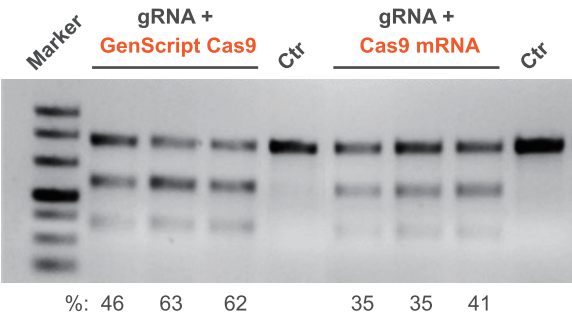


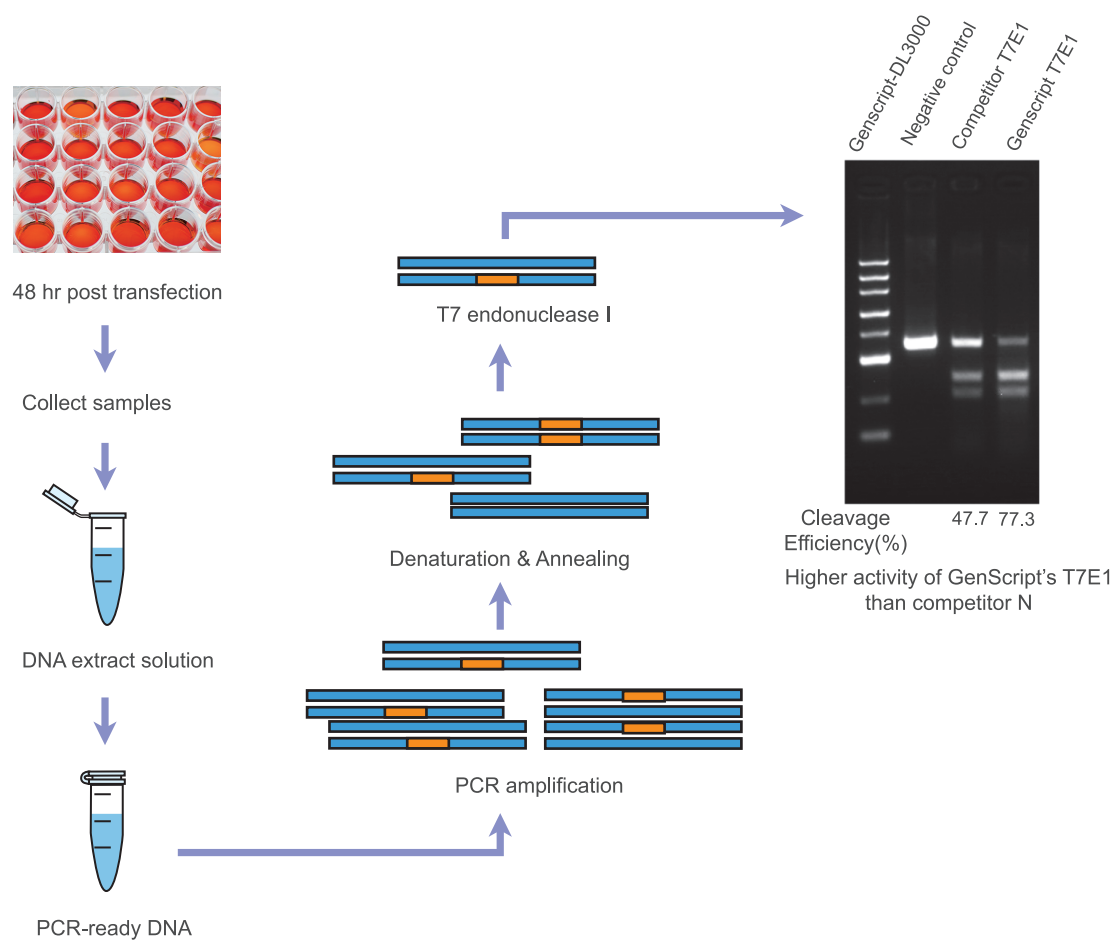
图2.金斯瑞 Cas9蛋白 (Z03386)在斑马鱼胚胎内的基因编辑效率对比

每组选取三个不同的斑马鱼胚胎通过显微注射导入相应的gRNA+金斯瑞Cas9蛋白复合物或者gRNA+Cas9 mRNA复合物，48小时后裂解胚胎进行T7E1检测。

Cat.No.	Name	Size	应用
Z03386-10	GenCrispr Cas9 Nuclease	10 µg (0.2 mg/ml)	体外检测gRNA 效率
Z03386-50	GenCrispr Cas9 Nuclease	50 µg (5×1 µg)	
Z03385-100	GenCrispr Cas9-C-NLS Nuclease	100 µg (4 mg/ml)	
Z03385-50	GenCrispr Cas9-C-NLS Nuclease	50 µg (4 mg/ml)	
Z03388-100	GenCrispr Cas9-N-NLS Nuclease	100 µg (4 mg/ml)	
Z03388-50	GenCrispr Cas9-N-NLS Nuclease	50 µg (4 mg/ml)	
Z03468-100	GenCrispr Cas9-N-NLS Nuclease	100 µg (10 mg/ml)	细胞内基因编辑 含NLS 核定位信号
Z03468-500	GenCrispr Cas9-N-NLS Nuclease	500 µg (10 mg/ml)	
Z03468-1	GenCrispr Cas9-N-NLS Nuclease	1 mg (10 mg/ml)	
Z03389-100	GenCrispr NLS-Cas9-NLS Nuclease	100 µg (4 mg/ml)	
Z03389-50	GenCrispr NLS-Cas9-NLS Nuclease	50 µg (4 mg/ml)	
Z03469-100	GenCrispr NLS-Cas9-NLS Nuclease	100 µg (10 mg/ml)	
Z03469-500	GenCrispr NLS-Cas9-NLS Nuclease	500 µg (10 mg/ml)	细胞内基因编辑 低脱靶效应
Z03469-1	GenCrispr NLS-Cas9-NLS Nuclease	1 mg (10 mg/ml)	
Z03390-10	GenCrispr NLS-Cas9-D10A Nickase	10 µg (1 mg/ml)	
Z03390-100	GenCrispr NLS-Cas9-D10A Nickase	100 µg (4 mg/ml)	
Z03390-50	GenCrispr NLS-Cas9-D10A Nickase	50 µg (4 mg/ml)	
Z03393-100	GenCrispr NLS-Cas9-EGFP Nuclease	100 µg (3 mg/ml)	细胞内基因编辑 荧光标记的Cas9酶
Z03393-50	GenCrispr NLS-Cas9-EGFP Nuclease	50 µg (4 mg/ml)	
Z03467-100	GenCrispr NLS-Cas9-EGFP Nuclease	100 µg (10 mg/ml)	
Z03467-500	GenCrispr NLS-Cas9-EGFP Nuclease	500 µg (10 mg/ml)	
Z03467-1	GenCrispr NLS-Cas9-EGFP Nuclease	1 mg (10 mg/ml)	

基因编辑高效检测分析

- 检测速度快：只需5~20 min，便可检测到各种类型的碱基突变，如：碱基替换、插入和缺失等；
- 检测方便：无需胶回收纯化，PCR产物直接进行酶切验证；
- 特异性高：精准切割突变位点，识别范围最小为1 bp的突变位点，最大可达上百bp的突变序列；
- 高通量筛选：更加轻松地大量样本中筛选阳性克隆。
- 阳性对照：内含阳性对照，增加了实验严谨性



Cat.No.	Name	Size
Z03396-1250	GenCrispr T7 Endonuclease I	1250 U (1 U/ml)
Z03396-250	GenCrispr T7 Endonuclease I	250 U (1 U/ml)
L00688-25	GenCrispr Mutation Detection Kit	5 reactions
L00688-100	GenCrispr Mutation Detection Kit	100 reactions

www.genscript.com.cn

南京市江宁高新园雍熙路28号

☎ 86-025-58897288 ext 5810

✉ product@genscript.com.cn