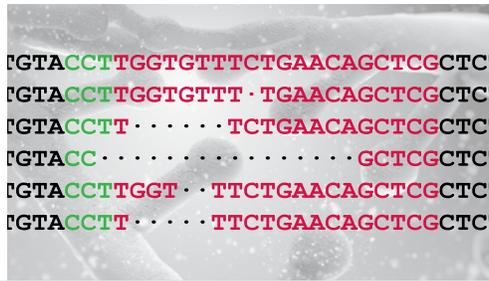
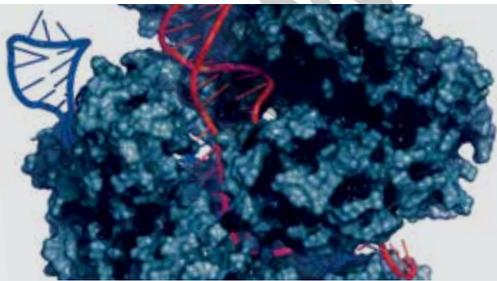


CRISPR/Cas9

CRISPR/Cas9

基因工程
——推动变革的力量



SYSTEMBIO.COM



咨询热线：400-6800-868



基因组工程的明智之选

如今，CRISPR/Cas9 似乎无处不在。作为一种简单而强大的技术，CRISPR/Cas9 已经在改变研究人员进行生物学研究的方式，而这项工作才刚刚开始。但是，随着如此多的公司涌入市场提供产品和服务，您如何知道哪一家适合您？因为经验至关重要，我们认为您的最佳选择是 System Biosciences (SBI)。我们销售 CRISPR/Cas9 系统的时间比市场上任何其他商业供应商都长，这让我们在直接接触这项变革性技术方面具有优势。我们专注于提供尽可能靶向的易用系统，自 2013 年 4 月首次销售以来，一直在帮助研究人员成功地进行基因组工程。

04

学习

了解使用 CRISPR/Cas9 系统进行基因组工程

06

使用

使用 CRISPR/Cas9 进行高效、靶向基因组工程所需的一切

PrecisionX™ Cas9
SmartNuclease™,
SmartNickase™

- 质粒
- 注射级 mRNA
- 多重 gRNA
- 慢病毒载体和 AAV
- spCas9 蛋白

HR 供体介导

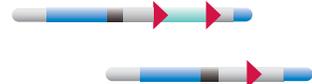
- 基因敲除
- 基因敲入
- 基因编辑
- 基因标记
- AAVS1 位点的基因敲入

14

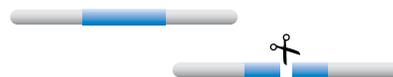
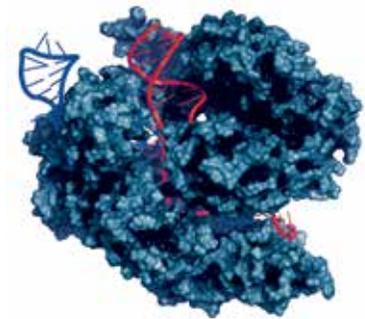
外包

通过创造我们高质量产品的专家提供的基因组服务，节省时间和资源。

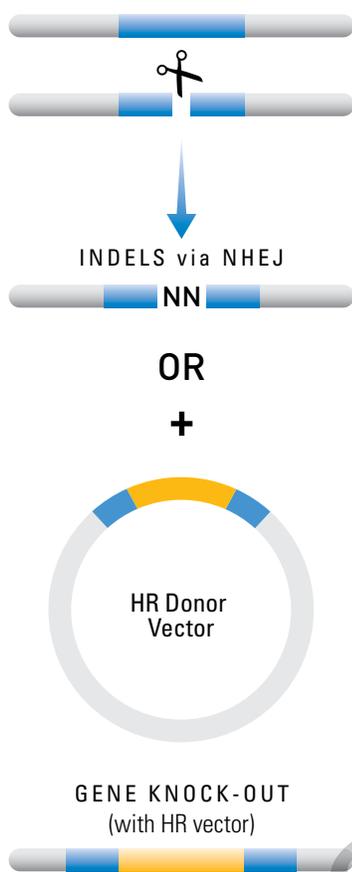
- 定制 gRNA 设计和克隆
- 定制同源重组 (HR) 供体设计和克隆
- 定制细胞系工程—基因敲除、突变校正或添加等



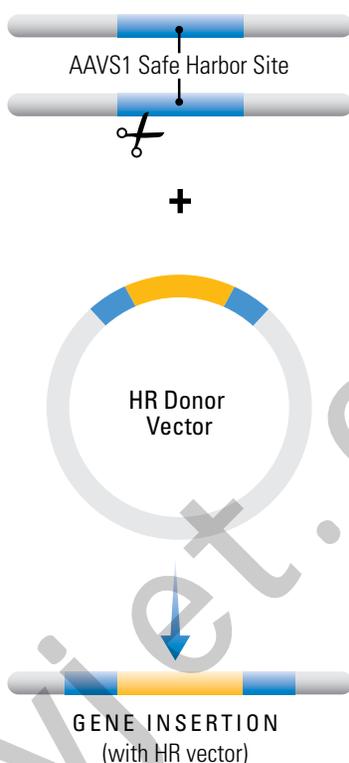
高效且成功——美国国立卫生研究院 (NIH) 最近使用 SBI 的 Cas9 SmartNuclease 系统在小鼠受精卵中进行直接基因组编辑，实现了高达 75% 的突变率，其中 90% 为双等位基因突变。



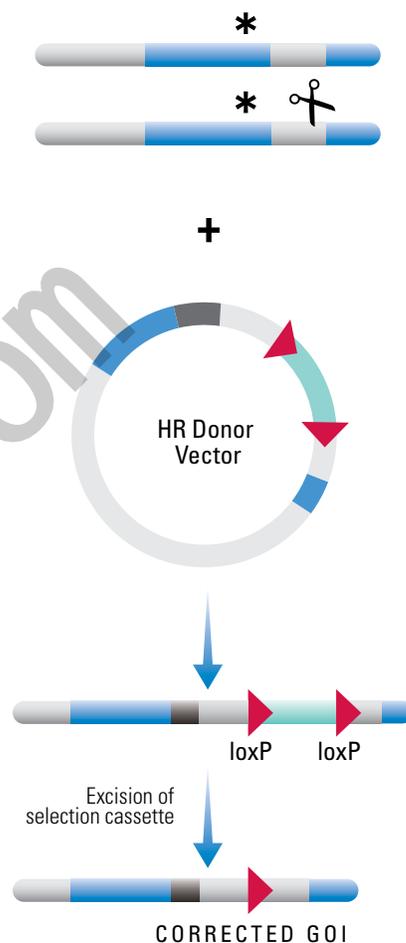
基因敲除 Gene Knock-out



基因敲入 Gene Knock-in



基因编辑 Gene Edit

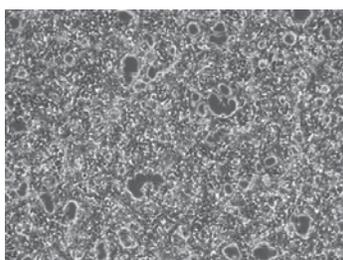


在 AAVS1 安全港位点的 HR 整合

EF 1-hspCas9-H1-AAVS1-gRNA

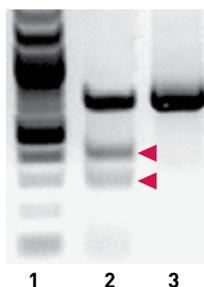


GFP Fluorescence



Bright Field Phase

Surveyor Nuclease Assays



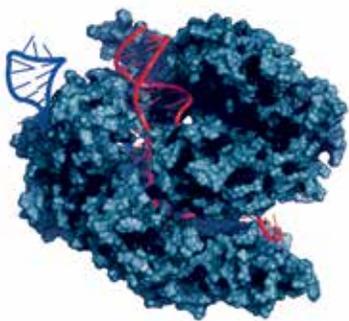
1. DNA marker
2. EF 1-hspCas9-H1-AAVS1-gRNA
3. Negative control

⚡ 使用表达 GFP 的 HR 供体在 293T 细胞的腺相关病毒 (AAV) 安全港位点进行基因敲入。GFP 表达 (左图) 和 Surveyor 核酸酶检测 (右图) 显示高效的敲入和靶位点切割。

高效、易用的 CRISPR/Cas9 系统

使用我们任何 CRISPR/Cas9 系统进行任何基因组工程应用：

- Gene knock-outs
- Gene knock-ins
- Gene editing
- Gene tagging



购买任何 PrecisionX 产品可获得免费电话咨询。

访问网站查看最新的 Cas9 SmartNuclease、SmartNickase 和无效 SmartNuclease 质粒选择——访问：systembio.com/cas9-plasmids

SBI 团队专注于简化基因组工程，创造了多种递送 Cas9 蛋白和 gRNA 的选项。采用人源密码子优化，您可以选择不同的哺乳动物启动子，以质粒、mRNA、慢病毒载体和腺相关病毒 (AAV) 载体的形式递送野生型或突变型 Cas9 以及定制 gRNA。

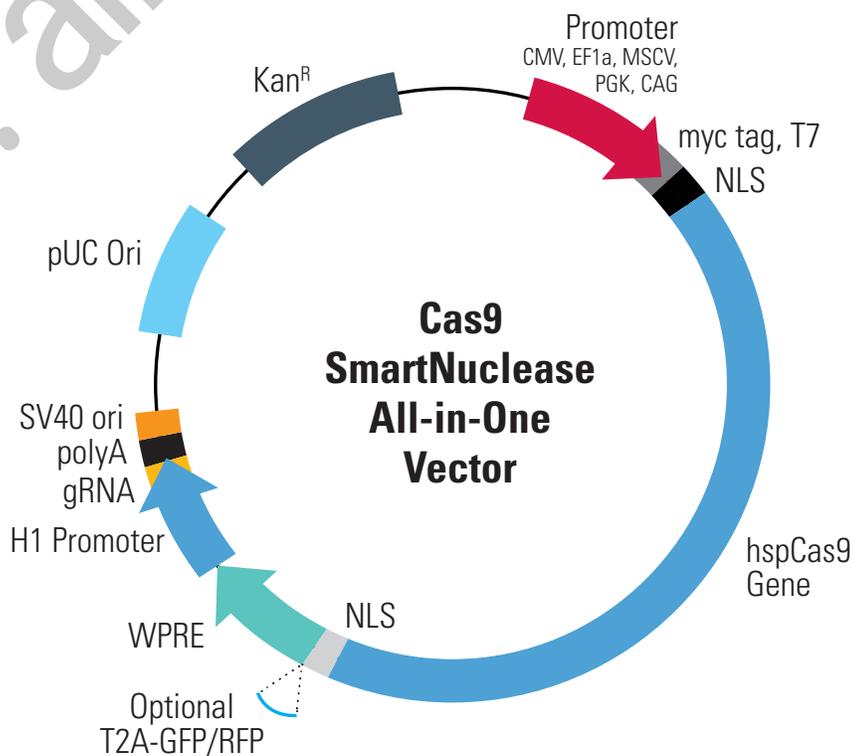
野生型还是突变型——哪种 Cas9 适合您？

野生型 PrecisionX Cas9 SmartNuclease 产生双链断裂 (DSBs)，可与 HR 供体质粒一起用于高效、靶向的基因组工程。

突变型 PrecisionX Cas9 SmartNickase (D10A 突变) 在基因组 DNA 中产生切口 (nicks) 而不是 DSBs。产生切口有利于更高保真度的同源重组过程，而不是非同源末端连接 (NHEJ)，配对切口已被证明在细胞系中将脱靶活性降低 50 至 1500 倍，并且在损失靶向切割效率的情况下促进小鼠基因敲除。

了解更多关于 SBI 基因组工程的信息——发送邮件至 tech@systembio.com

质粒载体



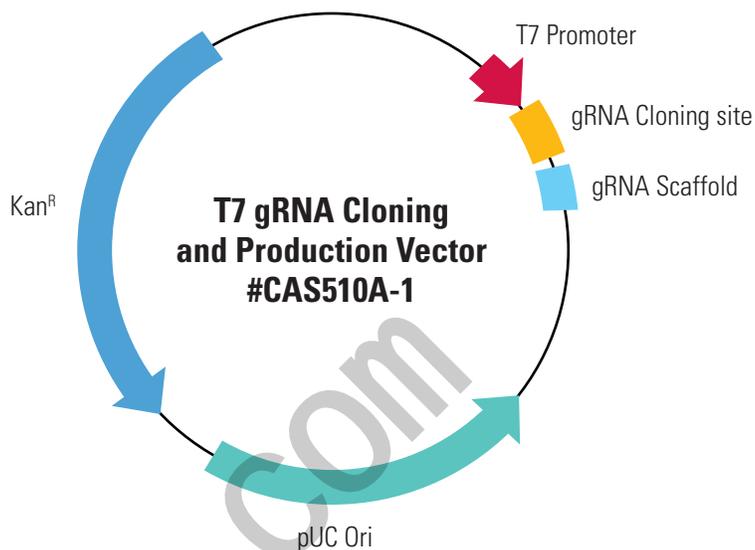
用于此应用		使用这些产品
修饰生物体 <ul style="list-style-type: none"> ■ 基因标记 ■ 转基因生物生成 ■ 模式生物工程 	用于创建转基因动物	可注射 Cas9 mRNA & gRNA 合成试剂盒-Injectable Cas9 mRNA & gRNA synthesis kits Page 8
修饰细胞系 <ul style="list-style-type: none"> ■ 体细胞的稳定 KO、KI 和基因组编辑 ■ 转基因细胞系生成 ■ 基于细胞的疾病模型 	可转染的细胞	Cas9 质粒-Cas9 plasmids Page 6
筛选 <ul style="list-style-type: none"> ■ 全基因组调查 ■ gRNA 文库筛选 ■ 功能筛选 	难以转染的细胞系 <ul style="list-style-type: none"> ■ 原代细胞 ■ 造血细胞 ■ 干细胞 	AAV-Cas9 载体 Page 8 Lenti-Cas9 系统 Page 9
临床前应用 <ul style="list-style-type: none"> ■ 脱靶事件是最高关注点 	所有需要稳定过表达 Cas9 的应用	Lenti-Cas9 系统 Page 9 AAVS1 安全港 Cas9 敲入系统 Page 11
同时工程化多个突变	所有应用	Cas9 切口酶 (Cas9 Nickase), 所有递送形式均可用 Page 6 多重 gRNA 克隆试剂盒, 与所有 Cas9 递送选项兼容 Page 10

可显微注射的 mRNA

为了使 RNA 引导的 spCas9 系统在体内应用中更高效、更方便，SBI 开发了即用型 CRISPR/Cas9 mRNA 系统：

- 功能验证的 Cas9 mRNA — 即用型
- T7 gRNA 克隆载体
- T7 gRNA 生产试剂盒

想要更快地获得 Cas9 活性来创建转基因生物和细胞系？试试我们新型的、可转染的 Cas9 蛋白——了解更多请访问 systembio.com/cas9-protein



了解加州大学戴维斯分校的科学家 [Angus Lee](#) 如何使用 SBI 的即用型 Cas9 mRNA 系统为加州大学戴维斯分校的小鼠生物学项目生成小鼠模型——阅读案例研究 systembio.com/angus-lee-case-study

Lee, AY and Lloyd, KC. Conditional Targeting of Ispd Using Paired Cas9 Nickase and a Single DNA Template in Mice. *FEBS Open Bio.* 2014; 4:637–642. PMID: PMC4141200.

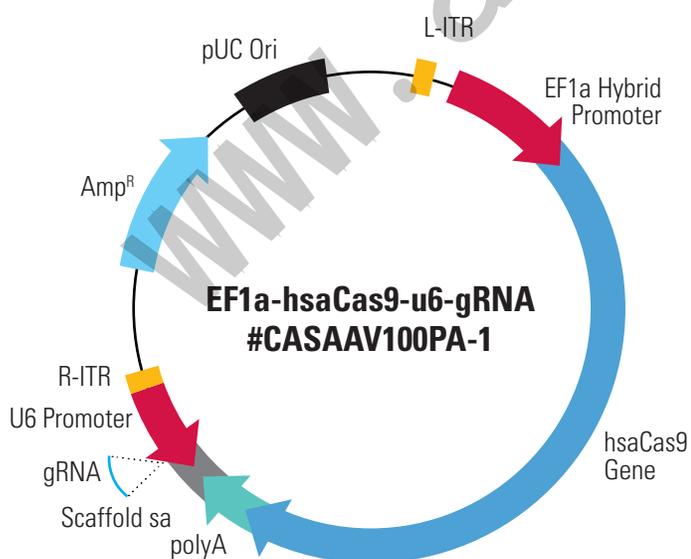
Cas9 AAV 载体

为了将 Cas9 非整合性地引入细胞，SBI 提供 Cas9 AAV 载体。与慢病毒载体相比，Cas9 AAV 具有更高的滴度和更高的感染复数 (MOI)，扩展了您进行细胞系工程的选择。

- 非整合性 Cas9 递送
- 高滴度 AAV 系统
- 非常适合体内使用——转基因动物、动物模型

请注意，为了满足 AAV 载体的小插入片段要求，我们的 Cas9 AAV 载体采用了来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的人源密码子优化的 Cas9 基因。

SBI 通过我们的 [Advanced Concentration Reagent](#) 简化了 AAV 递送系统的使用，这是一种一步式、无需裂解的 AAV 病毒浓缩方法。了解更多请访问 systembio.com/AAVanced

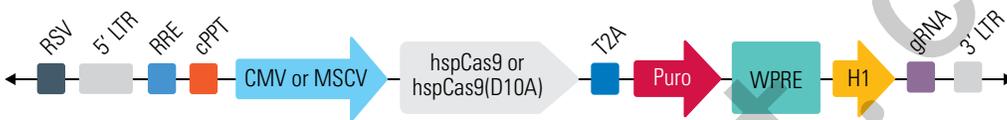


Cas9 慢病毒载体

使用 SBI 的 Lenti-Cas9 SmartNuclease 系统，您可以更轻松地为各种应用执行基因组工程。

- 用于难以转染的细胞系
- 创建稳定表达 Cas9 的细胞系
- 进行全基因组 gRNA 文库筛选

多合一系统 (all-in-one systems) 从同一载体表达 Cas9 和 gRNA，简化了您的工作流程。这些载体经过预线性化处理，可随时克隆您选择的 gRNA 序列，并提供两种不同的启动子选项——CMV 或 MSCV——以及两种不同的 Cas9 变体选项——野生型 Cas9 或 Cas9 切口酶 (nickase)。



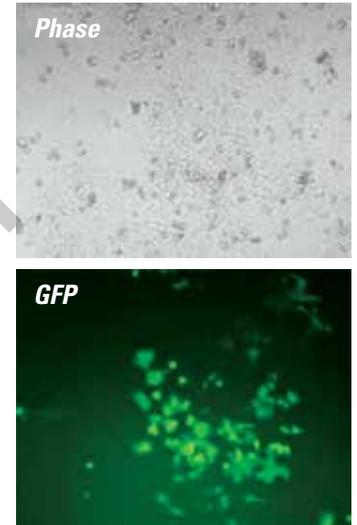
我们独立的双载体系统 (two-vector systems) 在不同的载体上表达 Cas9 和 gRNA，其中表达 Cas9 的载体可以作为质粒或预包装、即用型转导慢病毒提供。除了 CMV 或 MSCV 启动子选项以及带有 T2A-Puro 选择的 Cas9 变体选项外，我们还提供包含由 EF1 启动子驱动的组成型 GFP 表达的载体，以便更容易识别转导细胞。



双载体系统中的 gRNA 载体经过预线性化处理，可随时克隆您选择的 gRNA 序列。选项包括两种不同的启动子——H1 或 U6——以及阳性选择标记的选择——杀稻瘟菌素 (blasticidin)、GFP 或 RFP。



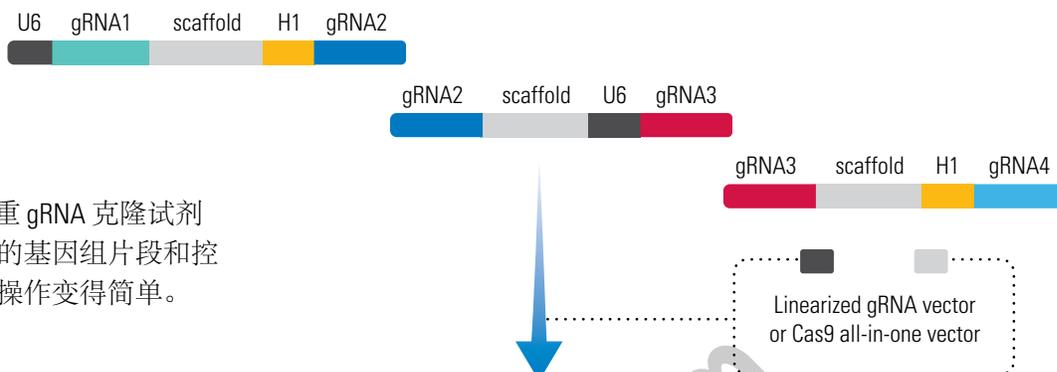
Lenti-Cas9 数据示例—用 Lenti-Cas9 转导干细胞



*MSCV-hspCas9-EF1-copGFP
Cat #CASLV125VA-1*

用 *MSCV-hspCas9-EF1-copGFP* (货号 #CASLV125VA-1) 假病毒颗粒 (MOI = 60) 感染的人 iPSC 细胞系的荧光图像。图像拍摄于病毒转导后 6 天。

立即在线查找最新的 *Lenti-Cas9 SmartNuclease* 载体列表: systembio.com/cas9-lentivirus



多重 gRNA 克隆

使用 SBI 的 PrecisionX 多重 gRNA 克隆试剂盒，实现精确删除定义的基因组片段和控制多个基因——基因组操作变得简单。

- 一次编辑多个位点，节省时间和试剂
- 轻松生成多顺反子 gRNA 表达构建体
- 非常适合 Cas9 切口酶应用
- 非常适合研究信号通路

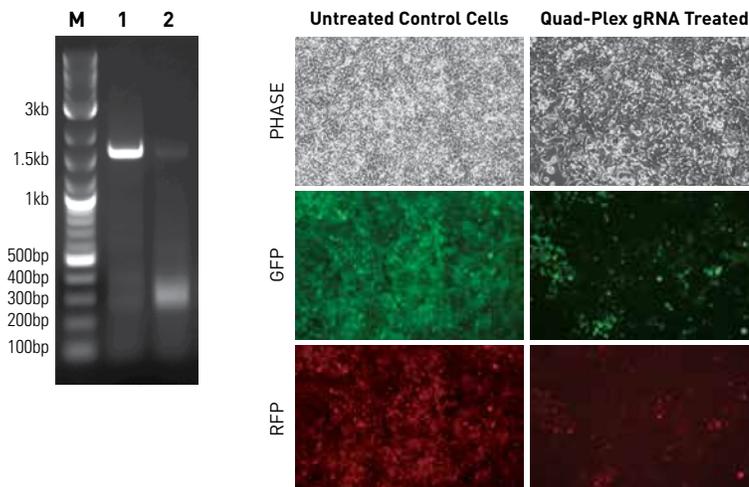
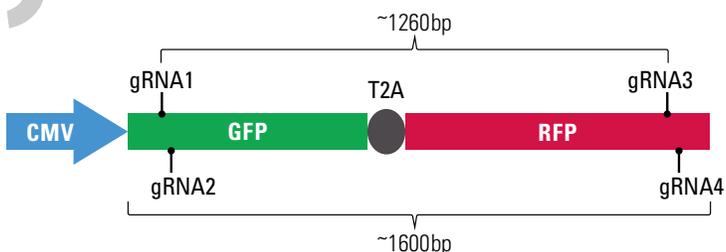


- Single tube reaction
- Fusion mastermix
- 5 min. room temperature
- 10 min. on ice
- Transform to clone



四联 gRNA 靶向数据示例

SBI 的多重 gRNA 克隆试剂盒能够高效地从具有稳定整合的 *CMV-GFP-T2A-RFP* 表达盒的细胞系中移除 1260 bp 的 *GFP-T2A-RFP* 片段。我们将四个 gRNA 克隆到 *Cas9 SmartNickase* 载体 (*EF1Nickase-H1-gRNA*) 中，以引导两个双切口事件——一个在 *GFP* 的 5' 端，另一个在 *RFP* 基因的 3' 端。（左图）使用位于 *GFP* 和 *RFP* 基因外侧的引物进行的 PCR 检测，在没有 *SmartNickase* 载体时产生 1600 bp 片段（泳道 1），而在存在 *Cas9 SmartNickase-4 gRNA* 构建体时产生 340 bp 片段（泳道 2），证明了 *SmartNickase* 介导的配对双切口和 *GFP-T2A-RFP* 基因组缺失的效率。（右图）在功能检测中也可以看到 *GFP* 和 *RFP* 活性的缺失，通过 *GFP* 和 *RFP* 荧光的减弱来体现。



了解更多关于我们的多重 Cas9 系统，
请访问 systembio.com/multiplex-grna

利用 AAVS1 安全港位点的力量

AAVS1 安全港位点 (AAVS1 safe harbor site) 可提供一致、强大的转基因表达，是基因敲入的首选靶点。已证明在该位点的插入是安全的，没有表型效应的报道，并且周围的 DNA 似乎保持开放构象，能够稳定表达各种转基因。

使用 SBI 的 AAVS1 安全港位点产品，您将获得：

- 轻松敲入任何基因
- 精确、位点特异性的基因整合
 - 一致、强大的转基因表达
 - 简化同基因细胞系的构建——通过消除不同整合位点引起的变异，便于比较
- 最小的脱靶整合
- 简化的 gRNA 文库筛选



⚡ Use Cat # GE622A-1 to constitutively express any gene of interest at the AAVS1 site.



⚡ Use Cat # GE624A-1 for reporter construction, such as for tissue-specific expression.

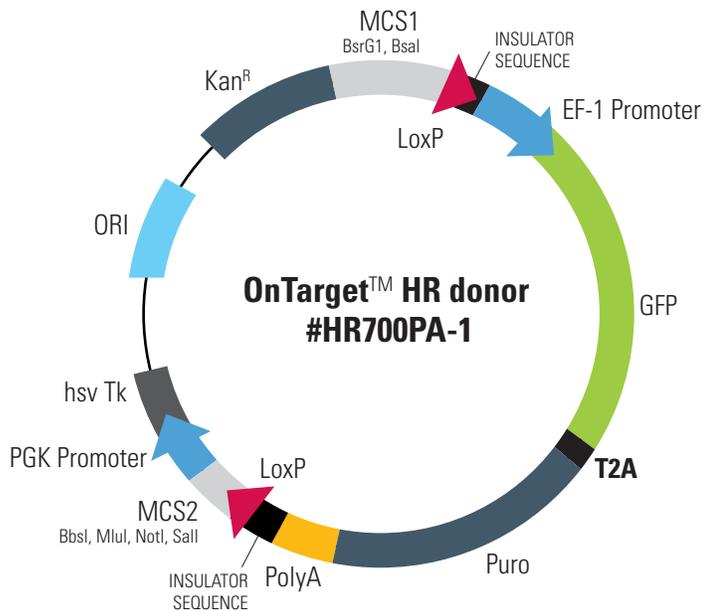


⚡ 使用货号 # CAS620A-1 从 AAVS1 位点稳定表达 Cas9。

我们的 AAVS1 安全港位点产品包括 HR 供体载体，设计用于与我们的 AAVS1 gRNA/Cas9 表达载体（货号 #CAS601A-1）协同工作。AAVS1 gRNA/Cas9 表达载体编码一个预先验证的、针对 AAVS1 特异性的 gRNA 和 PrecisionX™ Cas9 SmartNuclease®——只需将 AAVS1 gRNA/Cas9 表达载体与您选择的 AAVS1 供体构建体共转染细胞，即可实现靶向整合。

购买单个 AAVS1 供体载体或 AAVS1 Cas9 介导的整合试剂盒（货号 # GE620A-KIT, GE622A-KIT 或 GE624A-KIT），该试剂盒包含我们三种 AAVS1 供体载体中的任何一种、AAVS1 gRNA/Cas9 表达构建体以及用于确认正确整合位点的连接 PCR 引物（货号 # GE640PR-1）。

AAVS1 供体载体的巧妙设计限制了脱靶整合，实现了对 AAVS1 位点的高度特异性靶向。利用 AAVS1 位于内含子内的位置，嘌呤霉素 (puromycin) 标记仅包含一个剪接受体位点 (splice acceptor site) 而没有启动子。只有当构建体整合到内含子内时，嘌呤霉素才能表达，从而降低了在嘌呤霉素选择存在下回收脱靶整合体的概率。



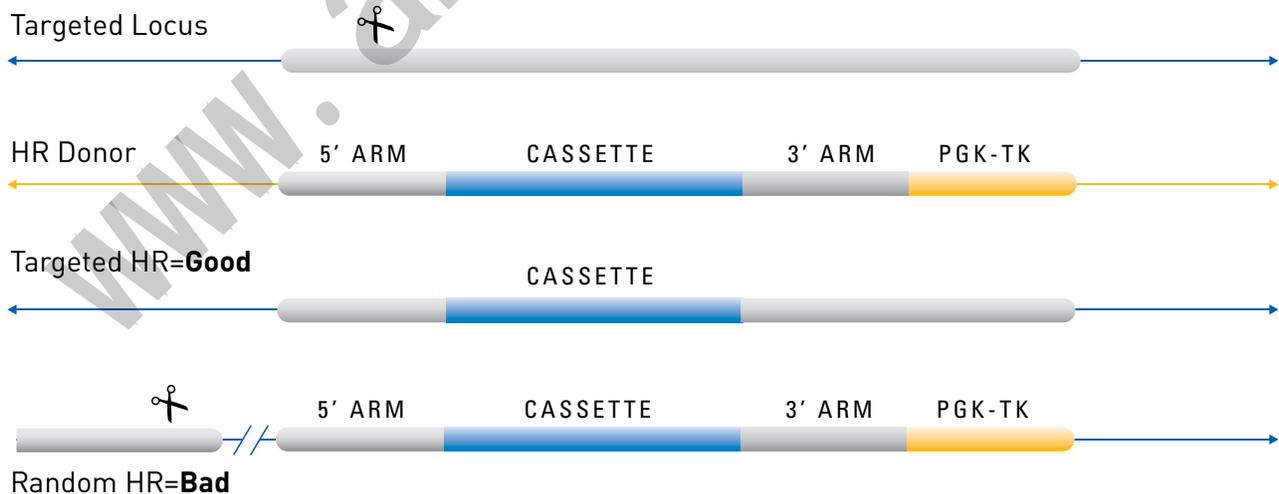
HR 供体

尽管仅由 Cas9 引起的双链断裂 (DSBs) 可以导致基因敲除，但 SBI 建议使用 HR 供体质粒来实现更高效和精确的突变。HR 供体可以提供用于阳性或阴性选择的元件，确保更容易识别成功的突变事件。此外，HR 供体可以包含长达 6-8 kb 的开放阅读框用于基因敲入或标记，并且当在 5' 或 3' 同源臂中包含小突变时，可以指导特定的、靶向的基因编辑。

Ho, TT, *et al.* Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res.* 2015 February 18; **43**(3): e17. PMID: PMC4330338.

SBI 的大多数 HR 供体质粒都带有两个多克隆位点 (MCS) 用于插入 5' 和 3' 同源臂、loxP 位点用于整合后切除选择标记盒、绝缘子序列 (insulator sequences) 以实现最大表达，以及一系列启动子、GFP 或 RFP 选项以及阳性和/或阴性选择元件。

我们最新的 HR 供体——**OnTarget™ HR 供体 (OnTarget™ HR Donors)**——在同源臂外包含一个 **PGK-hsvTk** 盒 (**PGK-hsvTk cassette**)，可用作强大的选择标记来对抗不需要的随机整合事件。



使用内置的 PGK-TK 阴性选择标记筛选掉发生随机 HR 的细胞。最大限度地降低不需要的整合事件的风险。

访问 systembio.com/hr-donors 查看最新的可用 HR 供体列表

基因敲除

选择靠近起始密码子的靶位点，以实现最大的编码序列破坏。

KO HR 供体:

HR110PA, HR210PA, HR410PA, HR510PA,
HR700PA, HR710PA, HR720PA

基因敲入

选择基因组中的特定位置，例如“安全港”位点 (safe harbor locus)，以实现稳定表达且受上下文依赖性影响最小。

KI HR 供体:

HR100PA, GE602A, GE603A (positive control for
GE602A), GE620A, GE622A, GE624A

基因编辑

选择与所需单核苷酸编辑相邻的内含子内的靶位点。确保不要破坏剪接受体或剪接供体位点。编辑将包含在 HR 供体的 5' 或 3' 同源臂中。

基因编辑 HR 供体:

PBHR100A, HR110PA, HR210PA, HR410PA,
HR510PA, HR700PA, HR710PA, HR720PA

基因标记

选择一个在编码区末端产生框内插入 (in-frame insertion) 的靶位点以创建蛋白质融合，或者使用 T2A 或 IRES 元件在内源启动子控制下共表达标记物。

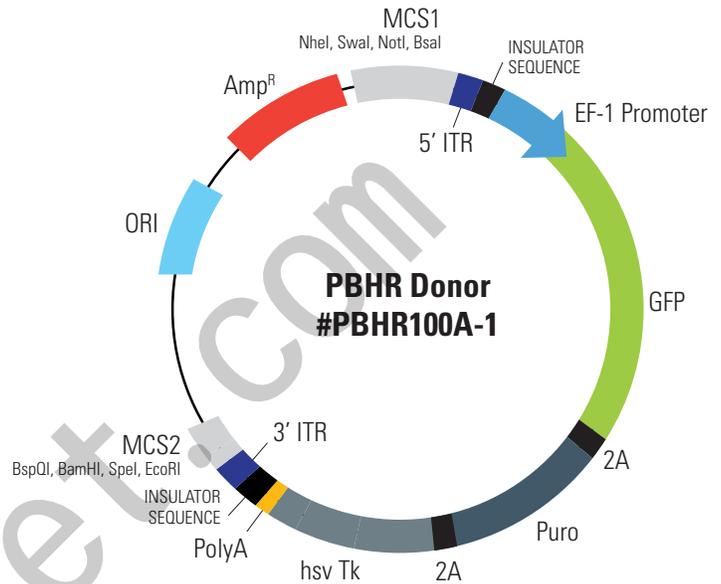
基因标记 HR 供体:

HR120PA, HR130PA, HR150PA, HR180PA, HR220PA

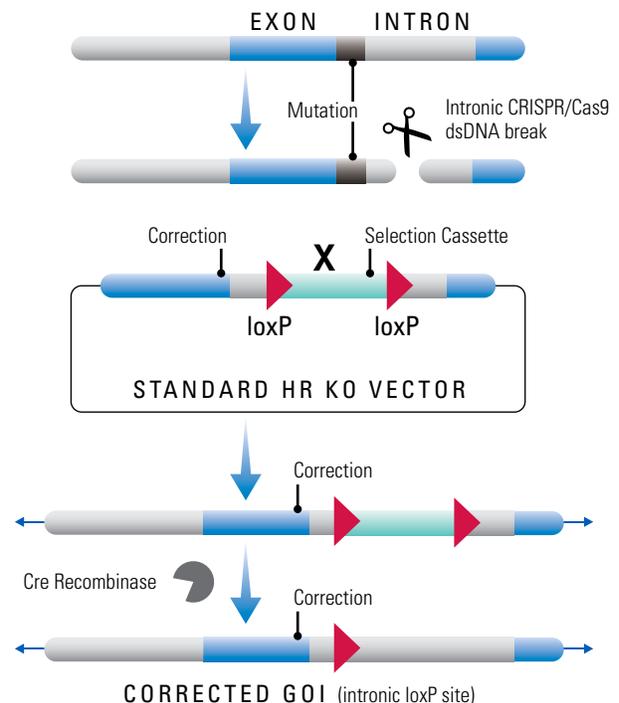
对 HR 供体技术有疑问? 从方案到故障排除, 我们的技术支持科学家随时准备提供帮助, 请联系info@systembio.com.

无痕基因编辑

PBHR100A 可实现无缝基因编辑, 无残留足迹。



应用——基因编辑



基因组工程服务

当您需要专注于研究，而没有时间花费在设计基因组工程策略和载体、或克隆和细胞系工程上时，SBI 提供一系列由创造我们产品的同一专家执行的服务。

经验丰富的团队，已完成数十个成功的基因组工程项目

- 精用于高效 CRISPR/Cas9 基因组工程的最新技巧
- 配备 SBI 高质量的基因组工程产品

位于加利福尼亚州帕洛阿尔托 (Palo Alto, CA) 的最先进设施

- 所有服务均在现场完成
- 确保一致的质量、保密性和交付的及时性

在最近的一项内部实
验中，我们使用

PrecisionX Cas9

SmartNuclease 和 HR

供体在 HCT116 细胞

中敲除 miR-21，获得

了高比例 (7/34) 的

纯合修饰，证明了

Cas9 SmartNuclease

系统与 HR 供体结合

时的强大功能。

从开始到结束，我们提供覆盖您整个基因组工程工作流程的服务。我们经验丰富的工作人员了解使用 Cas9 的复杂性，并知道如何克服许多可能使 Cas9 具有挑战性的常见陷阱。因为每个项目都是不同的，我们可以定制我们的服务以满足您的特定项目需求。

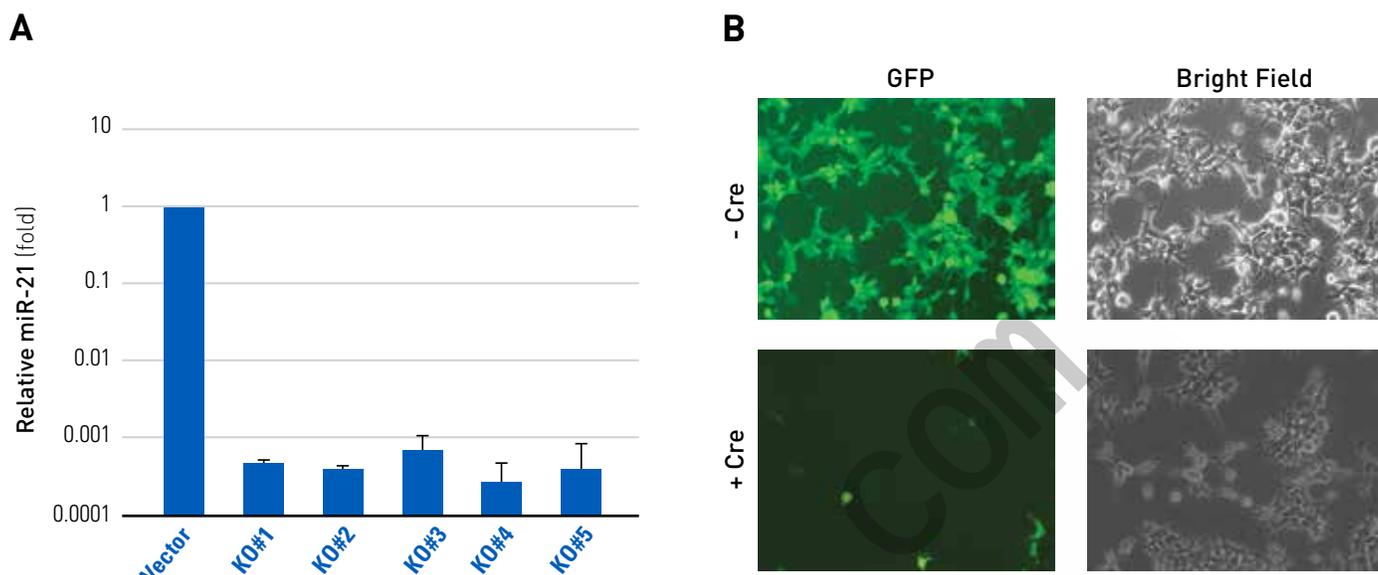
层级 1：定制 gRNA 和 HR 供体的设计和克隆

SBI 将设计和克隆定制的 gRNA 和/或 HR 供体载体。对于 gRNA，SBI 将针对靶位点设计并克隆单个 gRNA (货号# CS700A-1) 或多个 gRNA (货号# CS705A-1) 到任何 SBI SmartNuclease 或 SmartNickase 载体 (或客户提供的 gRNA 克隆载体) 中。对于 HR 供体 (货号# CS600HR-1)，SBI 将为基因敲除、敲入、标记或单核苷酸修饰基因组工程项目设计并将同源臂克隆到任何 SBI HR 供体质粒中。当定制 HR 供体质粒与定制 gRNA 设计和克隆一起订购时，供体载体在同源臂中将不包含完整的 gRNA 序列，以确保与 gRNA 完全兼容。

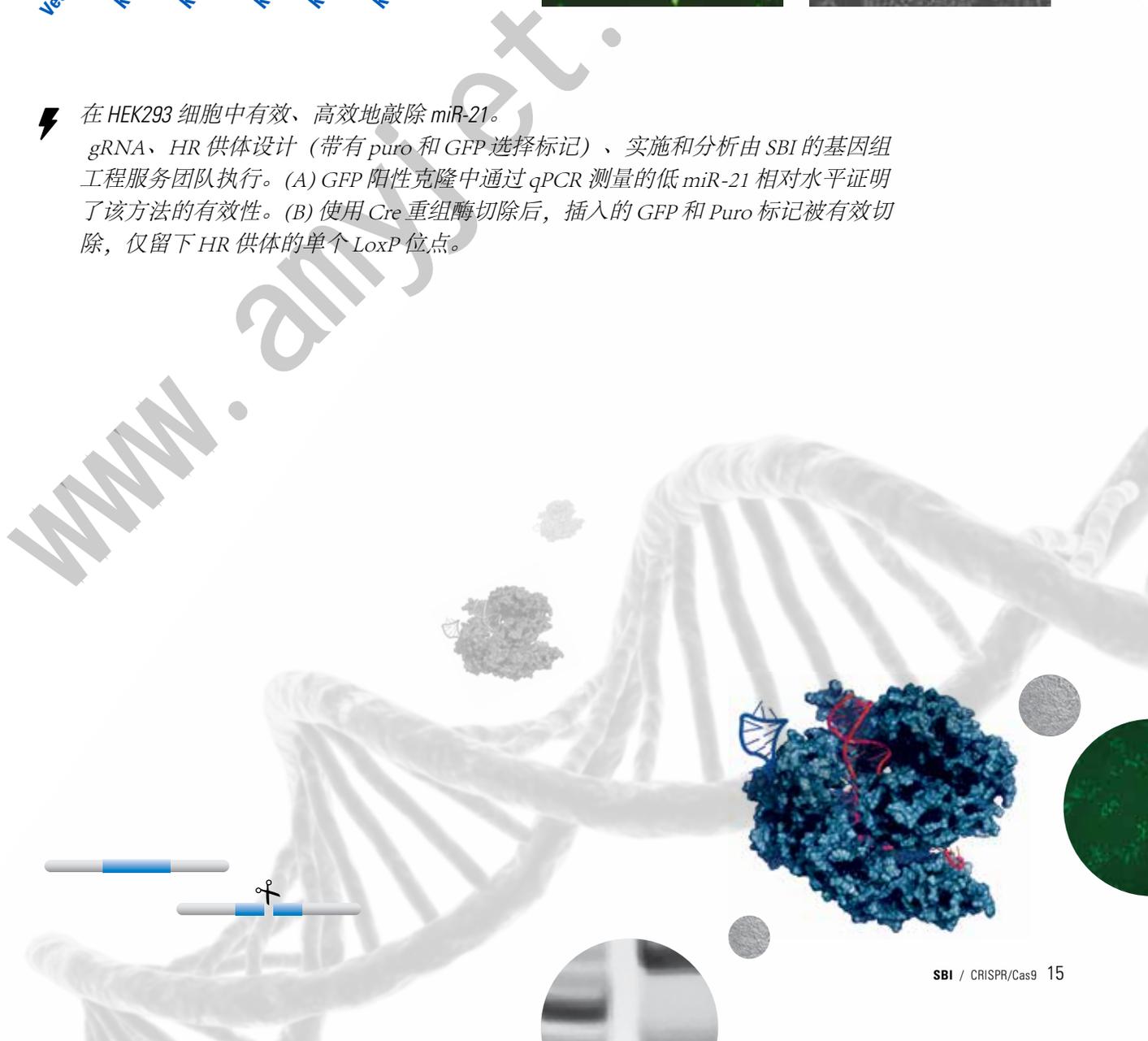
层级 2：全服务定制细胞系工程

SBI 将使用定制的 Cas9 和 HR 供体构建体来工程化靶细胞系，用于基因敲除、敲入、标记或单核苷酸修饰应用。通常需要使用 HR 供体，并且通常与两个 gRNA 构建体一起作为套餐订购。SBI 可以筛选耐药细胞以鉴定具有所需修饰的克隆细胞系 (货号# CS715B-1)，或提供混合的耐药细胞群以供进一步表征 (货号# CS715A-1)。

[了解更多关于我们的定制基因组工程服务的信息——请联系
services@systembio.com](mailto:services@systembio.com)



⚡ 在 HEK293 细胞中有效、高效地敲除 miR-21。
 gRNA、HR 供体设计 (带有 puro 和 GFP 选择标记)、实施和分析由 SBI 的基因组工程服务团队执行。(A) GFP 阳性克隆中通过 qPCR 测量的低 miR-21 相对水平证明了该方法的有效性。(B) 使用 Cre 重组酶切除后, 插入的 GFP 和 Puro 标记被有效切除, 仅留下 HR 供体的单个 LoxP 位点。



参考文献

01. Jinek, M, *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012 Aug 17; **337**(6096):816-21.
02. Cong, L, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*. 2013 Feb 15; **339**(6121):819-23.
03. Ran, FA. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013 Oct 24; **8**:2281-2308.
04. Ho, TT, *et al.* Targeting non-coding RNAs with the CRISPR/Cas9 system in human cell lines. *Nucleic Acids Res*. 2015 Feb **18**; 43(3):e17.
05. Sadelain, M, *et al.* Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec 1; **12**(1):51-8.

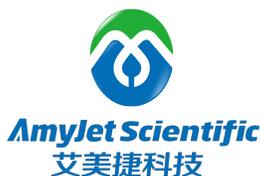
关于 System Biosciences

SBI 团队积极寻找新颖技术和明日热门的新研究领域，致力于成为第一家开发和商业化新发明的公司，从而加速研究进程。从新型基因组编辑工具到外泌体研究、表达和成像载体、RNAi 文库以及干细胞工具，SBI 驾驭当今的创新，驱动明日的发现。

2438 Embarcadero Way, Palo Alto, CA 94303

Toll Free: 888-266-5066 www.systembio.com

© 2016 ALL RIGHTS RESERVED. SYSTEM BIOSCIENCES



咨询热线：400-6800-868

