



Guide-it™ CRISPR/Cas9

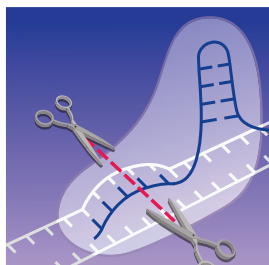
基因编辑 完整解决方案

that's
GOOD
science!™

Clontech **Takara** cellartis

Guide-it™ CRISPR/Cas9系统

一款可以实现DIY(Do-It-Yourself)操作的基因编辑系统



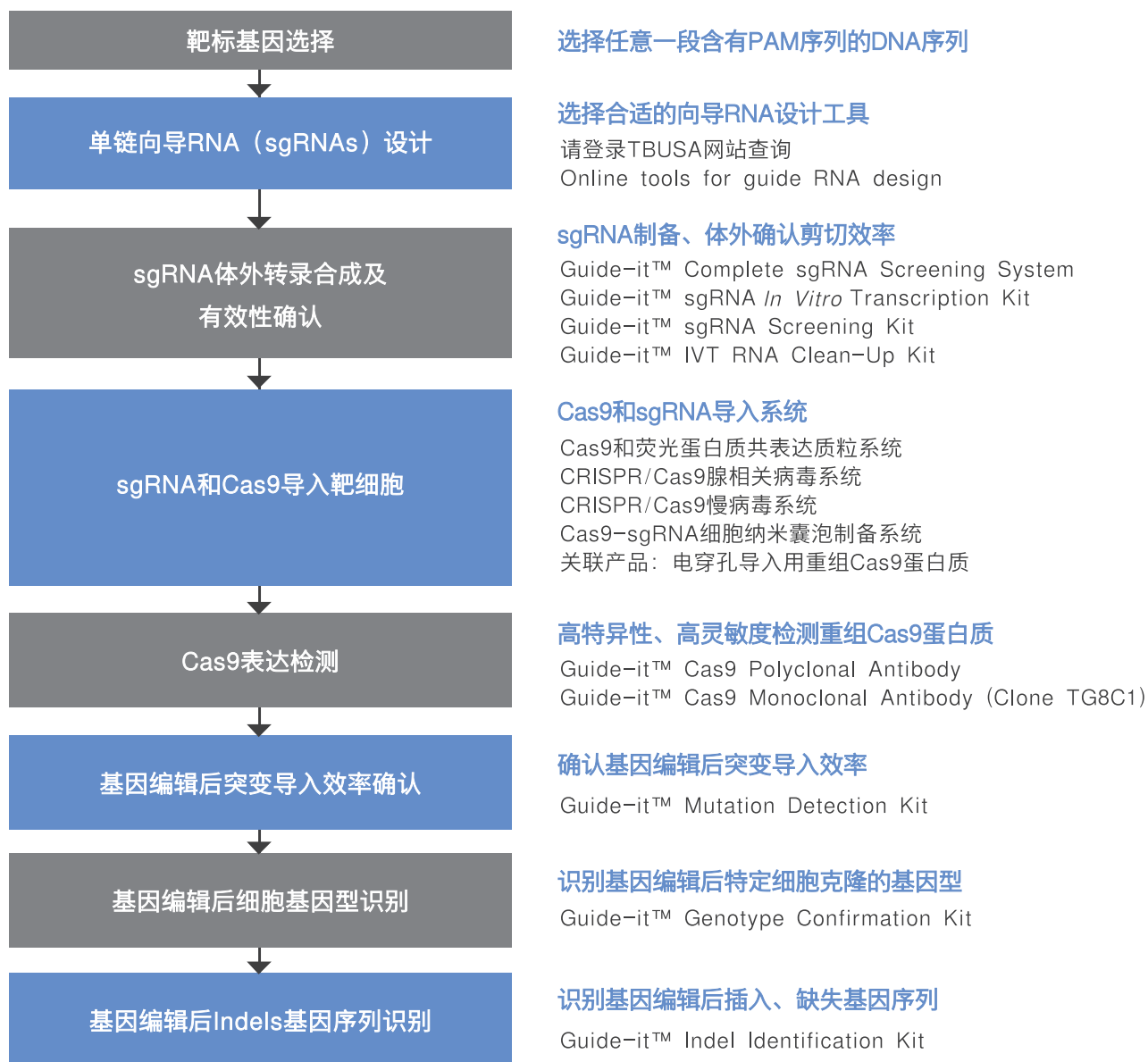
研究人员都可以应用的基因编辑技术

CRISPR/Cas9技术使基因编辑应用变得广泛起来，现在可以实现在大多数细胞类型的基因组中的任意位点实现靶向性基因编辑。这项强大的技术使研究者可以探索以前所不能探索的领域，开拓基础生物学进程和创新型疾病治疗手段新视野。

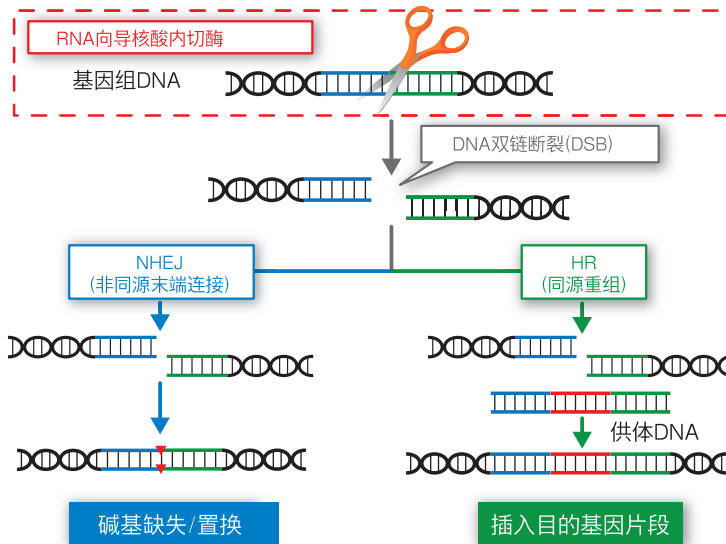
基因编辑完整解决方案 —— 从开始到结束，任您DIY

Guide-it™系统可以为基因编辑实验每一环节提供新型简便的方法，从而进一步提升CRISPR/Cas9技术的可用性，打造CRISPR/Cas9基因编辑完整解决方案。

▶ CRISPR/Cas9基因编辑实验流程



■ 基因编辑是利用DNA双链断裂和修复机制来改变生物体内基因组特定序列的技术。



RNA向导的核酸内切酶剪切生物体内基因组DNA上的靶位点，产生双链DNA断裂(DNA double-strand break: DSB)

细胞内修复机制修复基因组双链DNA断裂(DSB)。

利用下面的细胞内修复途径来改变基因组DNA序列。

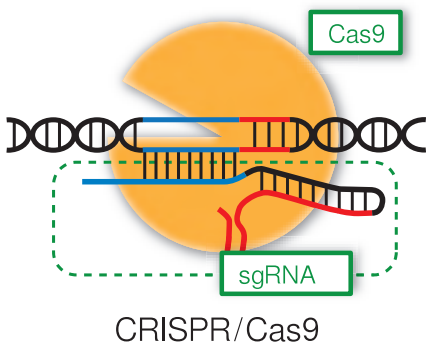
◆NHEJ(非同源末端连接)修复:

当发生碱基缺失/置换时，阅读框移码及碱基改变会干扰正确的转录和翻译，使之不能形成正确的mRNA及蛋白质。

◆HR(同源重组)修复:

通过导入两端含有与DSB两侧基因序列相同的供体DNA(相同序列间含有目的基因片段)，在基因组DNA的切口位点插入目的基因片段。

■ 选择CRISPR/Cas9进行基因编辑的理由



CRISPR/Cas9的优势

✂可以实现多个基因同时敲除

Cas9为通用元件，只需要针对靶基因设计特异sgRNA即可。

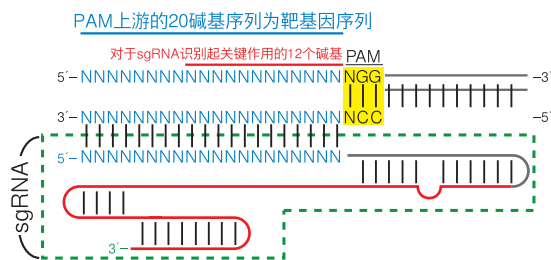
✂构建系统简单、快速、成本低廉

sgRNA和Cas9除了以DNA形式导入外，也可根据实验目的体外合成sgRNA和Cas9蛋白质等多种形式进行导入。

✂多种sgRNA及Cas9导入方式选择

■ 确保CRISPR/Cas9基因编辑实验成功的2个要点

PAM序列上游10-12碱基对于sgRNA序列识别很重要!



使用合适的实验体系节约实验时间和成本!



Cas9核酸酶可识别靶基因PAM序列NGG(N : A、T、C、G)并在PAM序列上游3-4个碱基处进行剪切，因此单向导RNA(single guide RNA:sgRNA)是以PAM序列NGG上游的20个碱基为模板进行设计的，而PAM序列上游的10-12个碱基被认为是降低脱靶风险的重要区域。

sgRNA的设计可登录TBUSA网站查询sgRNA在线设计工具。

无论通过NHEJ途径实现基因敲除或者通过HR途径实现基因敲入，想要最终获得目的克隆，就需要获取CRISPR/Cas9基因编辑后的细胞克隆并对突变后的基因序列进行测序确认，其所需要的时间和成本在很大程度上依赖于基因编辑效率。而基因编辑效率因不同的sgRNA获得DSB的效率以及Cas9/sgrNA导入靶细胞的效率不同而不同。因此，选择高效的获得DSB的sgRNA和高效的Cas9/sgrNA导入方法，确保更高的基因编辑效率，就可以大大节约后期筛选确认所需要的时间和成本。

体外合成sgRNA及其有效性确认，降低了应用无效或者低效率sgRNA的风险

Guide-it™ Complete sgRNA Screening System

(Code No. 632636)

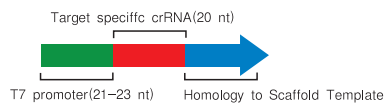
无需借助细胞或者动物个体，通过体外转录的方式制备并筛选有效sgRNA

- ◆ 包含体外转录合成sgRNA、重组Cas9核酸酶筛选确认的完整试剂盒
- ◆ 体外转录制备sgRNA所需的模板DNA可通过PCR反应简便合成
- ◆ sgRNA制备试剂盒(Code No. 632635)、sgRNA效率确认试剂盒(Code No. 632639)可单独订购

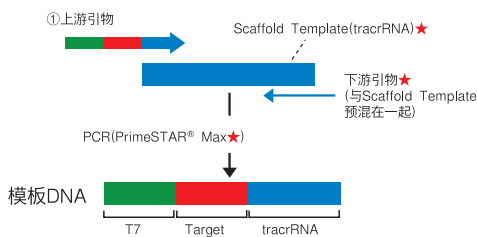
Guide-it Complete sgRNA Screening System操作流程

1. sgRNA体外转录合成

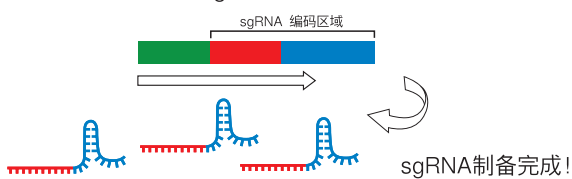
① 上游引物设计



② PCR扩增制备模板DNA



③ 体外转录合成sgRNA



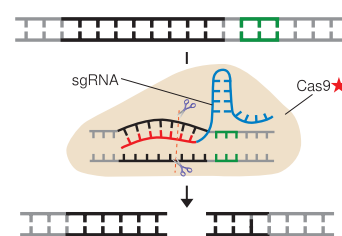
Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kit
(Code No. 632635)

2. sgRNA效率确认

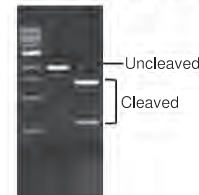
④ PCR(Terra™ PCR Mix★)扩增制备用于剪切确认的目标DNA



⑤ sgRNA与Cas9剪切目标DNA



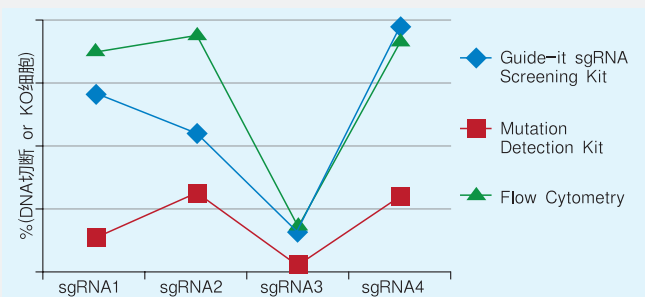
⑥ 琼脂糖电泳确认剪切结果



Guide-it™ sgRNA Screening Kit
(Code No. 632639)

(★所标记组分已包含在本产品中。)

实验例：Guide-it Complete sgRNA Screening System与基因编辑效率的相关性

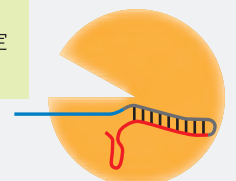


以下情况推荐使用！

- 从大量sgRNA样品中筛选有效sgRNA
- 采用CRISPR/Cas9对基因编辑实验进行疑难解答
- 合成大量sgRNA用于直接导入靶细胞进行基因编辑

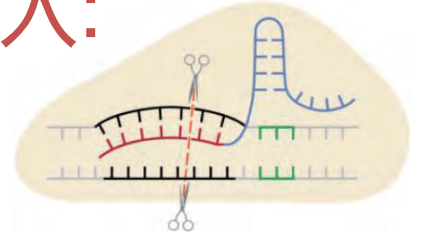
以HeLa细胞CXCR4基因为靶基因，使用不同方法测定并比较4种不同sgRNA的剪切活性。左图分别显示了Guide-it sgRNA Complete Screening Kit体外剪切效率(◆)，Guide-it Mutation Detection Kit体内突变导入效率(■)，及流式细胞术检测的CXCR4基因敲除效率，流式分析所使用的抗体为FITC荧光标记CXCR4抗体(▲)。

通过比较体外和体内剪切活性及基因敲除效率，发现体外剪切活性和体内剪切活性之间具有一定的相关性。





"CRISPR/Cas9导入: so easy now"



Cas9和荧光 蛋白质共表达 质粒系统

Guide-it™ CRISPR/Cas9 System(Green)/(Red)

- 适于哺乳动物细胞
- 结合Xfect™ 纳米转染试剂导入sgRNA和Cas9
- 荧光蛋白质共表达，便于监测转染效率或富集/分选细胞

CRISPR/Cas9 重组腺相关 病毒系统

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System

- 适于难转染哺乳动物细胞(分裂/非分裂细胞)
- 重组腺相关病毒(AAV)载体导入sgRNA和Cas9
- AAV不整合性，避免Cas9持续表达，减小细胞毒性和脱靶效应

CRISPR/Cas9 慢病毒系统

Lenti-X™ CRISPR/Cas9 System Lenti-X™ Tet-On 3G CRISPR/Cas9 System

- 适于难转染哺乳动物细胞(分裂/非分裂细胞)
- 慢病毒Lenti-X载体导入sgRNA和Cas9
- Lenti-X Tet-On 3G CRISPR/Cas9 System可实现尽可能严谨的Cas9表达调控

CRISPR/Cas9 细胞纳米囊泡 制备系统

Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicles Production System

- 适于难转染哺乳动物细胞(分裂/非分裂细胞、iPS细胞)
- 细胞来源的纳米囊泡(Gesicle)导入sgRNA和Cas9
- 表面附有红色荧光蛋白质，便于监测转导效率

关联产品: 电穿孔导入用 重组Cas9 蛋白质

Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)

- 适用于电穿孔方法的低甘油含量、高浓度的Cas9蛋白质溶液
- 与质粒导入系统相比较，脱靶效应受到明显抑制
- NLS(核定位信号)有助于实现快速高效突变导入
- 与Guide-it Complete sgRNA Screening System组合使用实现高效率的基因编辑

携带荧光标记的质粒载体系统，使细胞转染效率监测、细胞富集/分选变得更为简单！

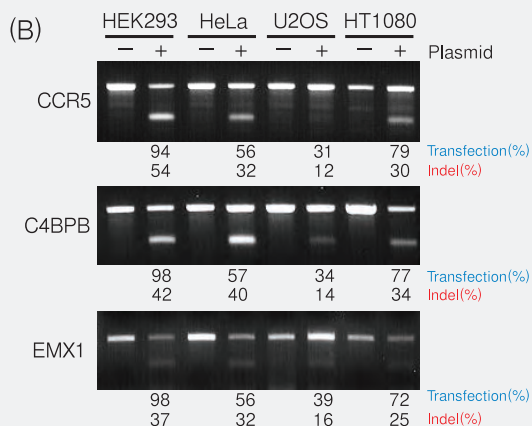
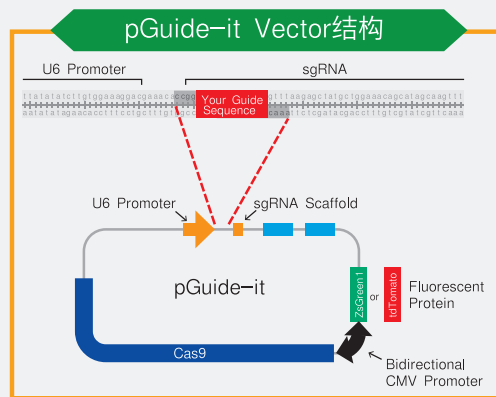
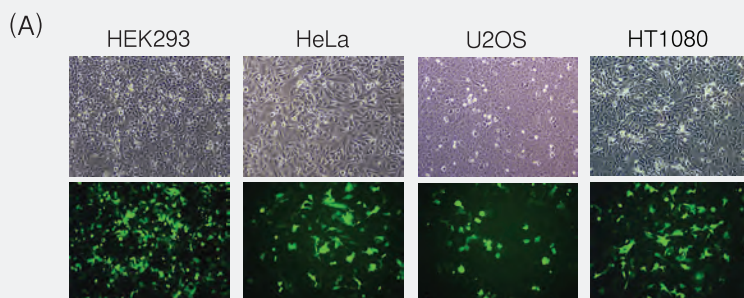
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System(Green)/(Red)

(Code No. 632601/632602)

sgRNA克隆和表达载体系统，适用于哺乳动物细胞

- ◆ 单质粒系统，实现Cas9与荧光蛋白质(ZsGreen1或tdTomato)标记同时表达
- ◆ 只需准备表达sgRNA的oligo DNA，是简便、快速的一体化表达系统
- ◆ 明亮的荧光标记便于监测转染效率

实验例：



分别接种 1×10^5 个HEK293、HeLa、U2OS、HT1080细胞至12孔板，培养16 h后，采用Xfect Transfection Reagent转染2.5 μ g pGuide-it-ZsGreen1质粒至细胞。pGuide-it-ZsGreen1质粒包含分别以CCR5、C4BPB、EMX1为靶基因设计的sgRNA。

转染48 h后，通过荧光显微镜观察ZsGreen1荧光表达情况(A)，通过FACS测定转染效率(B. Transfection%)。

采用Guide-it Mutation Detection Kit测定基因突变导入效率。以细胞为起始直接PCR扩增目的片段，扩增产物经过变性及退火后产生错配位点，之后Guide-it解离酶剪切错配位点。剪切产物经过凝胶电泳后，通过密度分析测定基因突变导入效率(B. Indel%)。

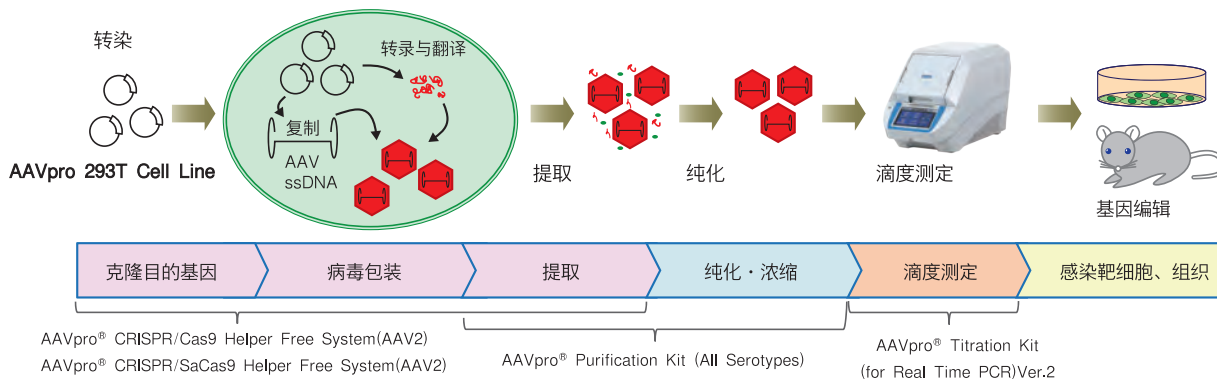
重组腺相关病毒介导的基因编辑系统，适用于难转染细胞Cas9/sgRNA复合物导入

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System系列

是非常适用于CRISPR/Cas9基因编辑的病毒载体系统，尤其适用于采用质粒载体系统基因编辑效率较低的细胞

- ◆ 采用AAV载体导入Cas9和sgRNA
- ◆ AAV的不整合特性避免了Cas9持续性表达，减小了细胞毒性和脱靶效应
- ◆ 一体化系统，包含了制备CRISPR/Cas9 AAV病毒所需要的全部组份

【AAV系统操作流程及相应产品】



2载体系统

AAVpro[®] CRISPR/Cas9 Helper Free System(AAV2) (Code No. 632608)

酿脓链球菌来源的SpCas9基因较大(约为4.1 kb), SpCas9基因被分为两段分别克隆在两个载体上, 实现Cas9基因导入。

1载体系统

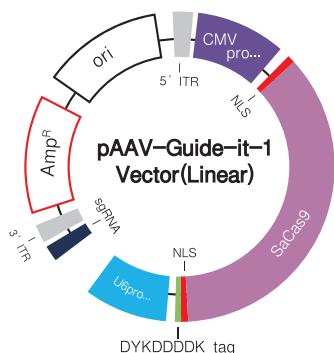
AAVpro[®] CRISPR/SaCas9 Helper Free System(AAV2) (Code No. 632619)

金黄色酿脓葡萄球菌来源的SaCas9基因较小(约为3.3 kb), 可实现采用单个AAV载体进行基因编辑。

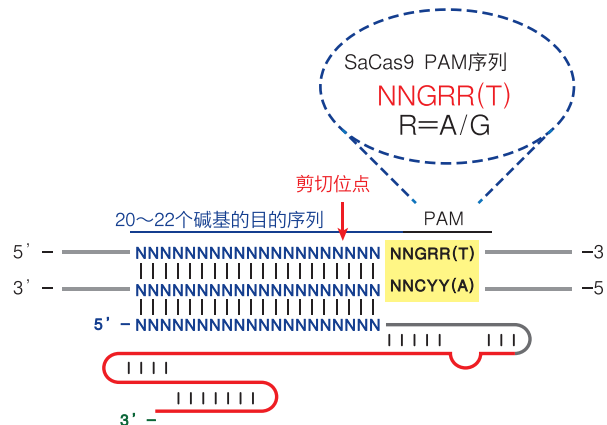
AAVpro[®] CRISPR/SaCas9 System采用了小Cas9" SaCas9"

☑ 单个AAV载体同时表达sgRNA和Cas9。

☑ SaCas9所识别的PAM序列为NNGRR(T)



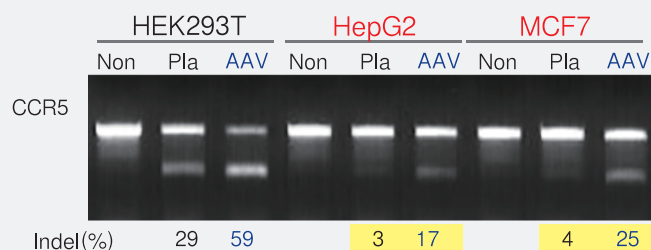
单个AAV载体同时表达sgRNA和Cas9, 可用于多种细胞类型进行体外和体内基因编辑。



SaCas9所识别的PAM序列为NNGRR(T), 剪切位点是在PAM序列上游3个碱基处。(N表示任意碱基, R表示A或者G, T具有较强的偏好性。)

★sgRNA设计请登录TBUSA网站查询Online tools for guide RNA design

实验例1: AAVpro[®] CRISPR/Cas9 System (※) 作用于不同细胞类型的基因编辑效率

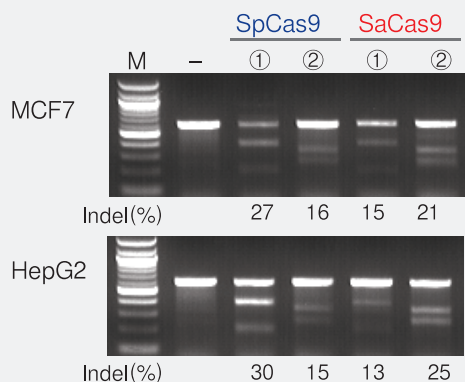


※ 采用的是携带SpCas9基因的2载体系统
 ※ 采用通用的PAM序列 (NGG) 进行sgRNA设计

接种 1×10^5 个细胞至12孔板中过夜培养, 以CCR5基因为靶基因进行基因编辑, 分别采用滴度为 1×10^5 的AAV2-Up病毒和AAV2-Down病毒(基因组定量法)转导靶细胞, 72 hr后收集靶细胞, 采用Guide-it Mutation Detection Kit (Code No. 631448)检测不同细胞类型中突变导入效率(琼脂糖凝胶电泳之后, 采用密度分析软件测定突变导入效率)。作为对照, 采用Xfect转染试剂转染表达Cas9和作用于CCR5基因的sgRNA的pGuide-it-ZsGreen1质粒载体 (Pla:2.5 μ g) 至靶细胞内。

对于使用质粒载体系统基因组编辑效率很低的细胞 (HepG2、MCF7), 使用AAV载体系统也可以得到较高的基因编辑效率。

实验例2: 采用AAV载体系统比较SaCas9和SpCas9的基因编辑效率



以CYP2基因外显子1的两个不同基因组区域 (①、②) 作为靶基因, 分别以AAVpro CRISPR/Cas9 System(2载体系统: SpCas9)和AAVpro CRISPR/SaCas9 System(1载体系统: SaCas9)为载体系统设计sgRNA并制备AAV病毒。将 1×10^5 个细胞接种至12孔培养板中, 过夜培养后, 携带SpCas9的2载体系统和携带SaCas9单载体系统分别以滴度 1×10^5 MOI (基因组定量法) 感染靶细胞。采用Guide-it Mutation Detection Kit检测比较基因组DNA中的突变导入效率 (Indel%)。

采用携带SpCas9的2载体系统和携带SaCas9的单载体系统进行基因组编辑, 所获得的突变导入效率 (Indel%) 是基本相同的。

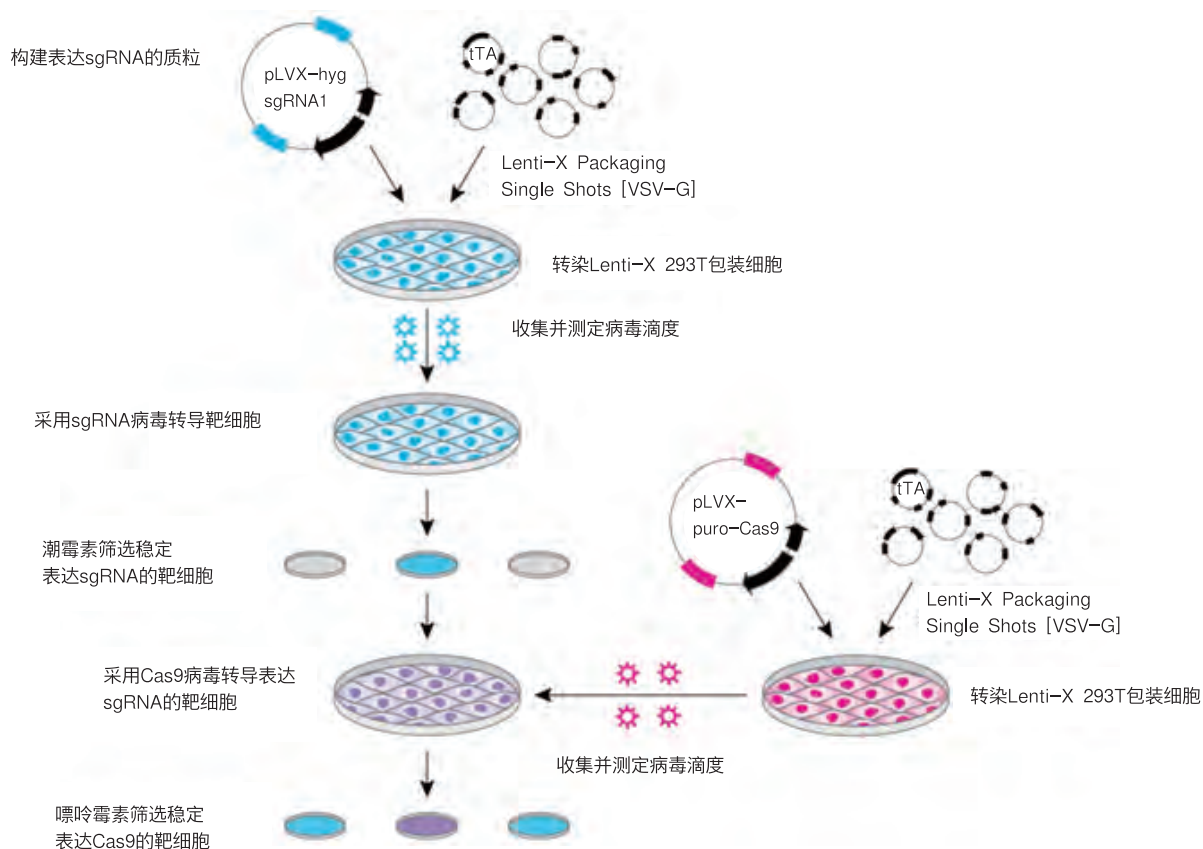
重组慢病毒介导的基因编辑系统，适用于难转染细胞Cas9/sgRNA复合物导入

Lenti-X™ CRISPR/Cas9 System (Code No. 632629)

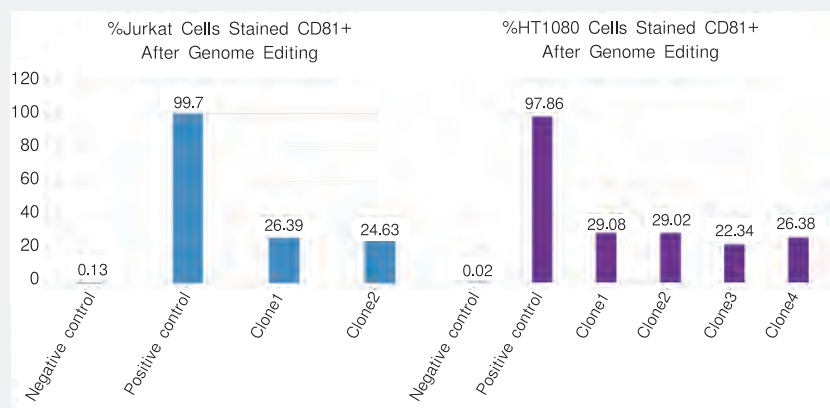
适用于由于转染效率低而导致基因编辑效率低的细胞(分裂细胞和非分裂细胞)

- ◆ Lenti-X Packaging Single Shots可大大简化制备高滴度慢病毒操作流程
- ◆ 提供独立系统可分别用于Cas9组成型表达或者诱导型表达
- ◆ 能严谨调控Cas9的表达(Lenti-X Tet-On 3G CRISPR/Cas9 System (Code No.632633))，大大地降低了产生细胞毒性的可能性，同时也降低了由于Cas9持续表达所引起的脱靶效应

■ Lenti-X CRISPR/Cas9 System操作流程



实验例：Lenti-X™ CRISPR/Cas9 System作用于不同细胞类型的基因敲除效率比较

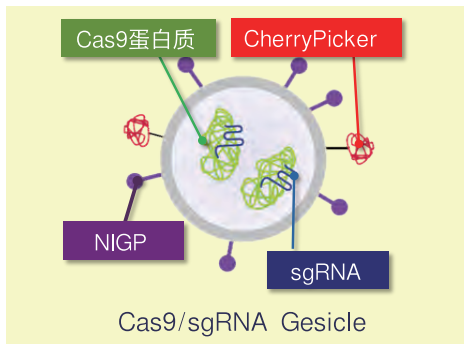


以CD81为靶标设计sgRNA，将其克隆至pLVX-hyg-sgRNA1载体中并制备慢病毒LVX-hyg-CD81-sgRNA，LVX-hyg-CD81-sgRNA转导Jurkat细胞或者HT1080细胞后，经潮霉素筛选获得稳定整合的细胞克隆。之后采用慢病毒LVX-puro-Cas9转导稳定整合细胞克隆，再次经嘌呤霉素筛选获得稳定整合的细胞克隆，然后通过FACS检测稳定整合细胞克隆中CD81敲除效率。以添加anti-CD81抗体处理的未经慢病毒LVX-puro-Cas9转导的亲代细胞作为阳性对照，以不添加anti-CD81抗体处理的未经慢病毒LVX-puro-Cas9转导的亲代细胞作为阴性对照。

细胞来源的纳米囊泡(Gesicle), 可用于直接导入Cas9/sgrNA复合物

Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System (Code No. 632613)

适用于由于转染效率低而导致基因编辑效率低的细胞(分裂细胞、非分裂细胞、iPS细胞)

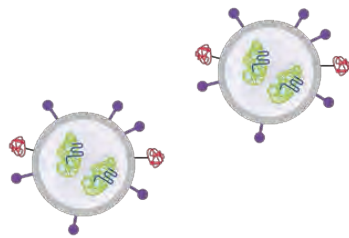


Gesicle是什么?

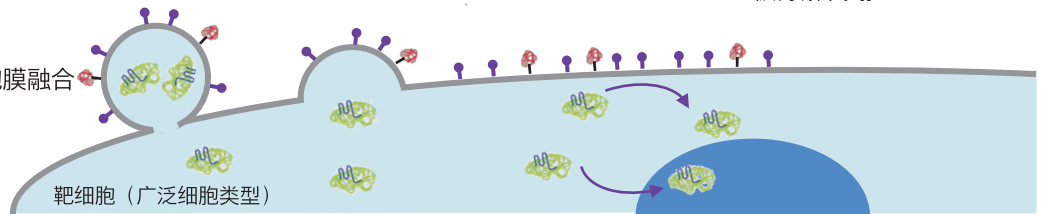
- ◆ 具有细胞膜亲和特性的外泌体小泡, 包被Cas9蛋白质/sgrNA复合体
- ◆ 适用于质粒载体导入效率低的细胞
- ◆ 直接导入Cas9蛋白质, 排除了基因组整合所带来的影响并降低了脱靶效应
- ◆ 表面附有CherryPicker™红色荧光蛋白质, 红色荧光标记便于监测Gesicle制备和转导效率

Cas9/sgrNA Gesicle作用机制

1 添加Gesicle至靶细胞



2 Gesicle与细胞膜融合



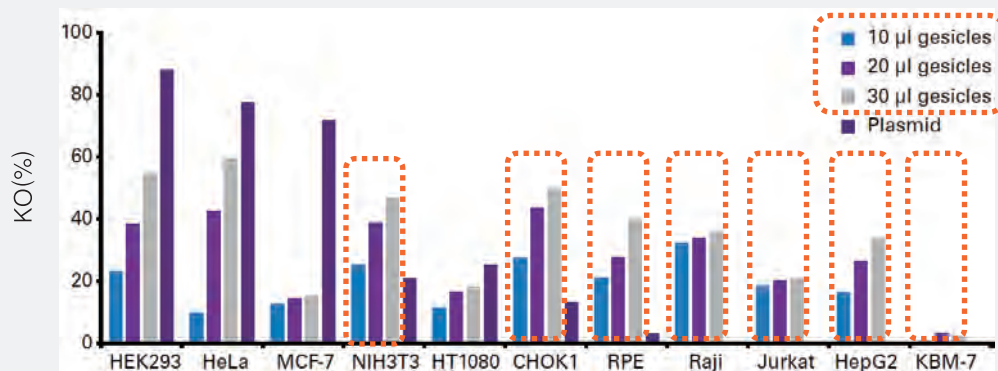
3 Cas9/sgrNA 释放至细胞内

4 Cas9/sgrNA 转移至细胞核

5 Cas9在细胞内 被分解代谢



实验例: 不同细胞类型中基因敲除效率比较



在Jurkat等难转染细胞类型中, Cas9/sgrNA Gesicles 的导入效率和ZsGreen1基因敲除效率要优于Cas9/sgrNA表达质粒。

【方法】

建立整合ZsGreen1表达框的不同细胞系, Cas9/sgrNA Gesicles(sgrNA以ZsGreen1为靶基因)作用于所建立的细胞系进行基因编辑(基因敲除)。以Cas9/sgrNA Gesicles(添加量分别为10 µl、20 µl、30 µl)处理组为实验组、以Cas9/sgrNA表达质粒处理组作为对照组, 通过流式细胞术检测基因敲除效率。

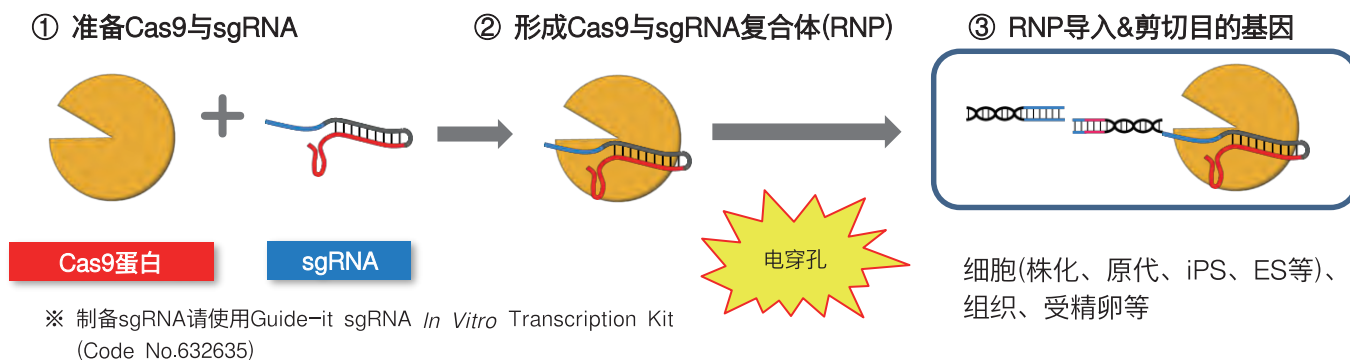
大大降低脱靶效应，可在体内进行有效的基因编辑！

Guide-it™ Recombinant Cas9(Electroporation-Ready) (Code No. 632640/632641)

本产品是用于CRISPR/Cas9基因编辑的Cas9蛋白质溶液。高蛋白质浓度、低甘油浓度、含有NLS(核定位信号)，能够有效实现低细胞毒性的突变导入。尤其适用于电穿孔导入！

- ◆ 高蛋白质浓度(3 μg/μl),尤其适用于电穿孔
- ◆ 经NLS(核定位信号)导入后迅速转运至细胞核
- ◆ 可造成活体损伤的甘油浓度比其他公司低
- ◆ 价格合理适合长期使用

■ Cas9蛋白质进行基因编辑的过程



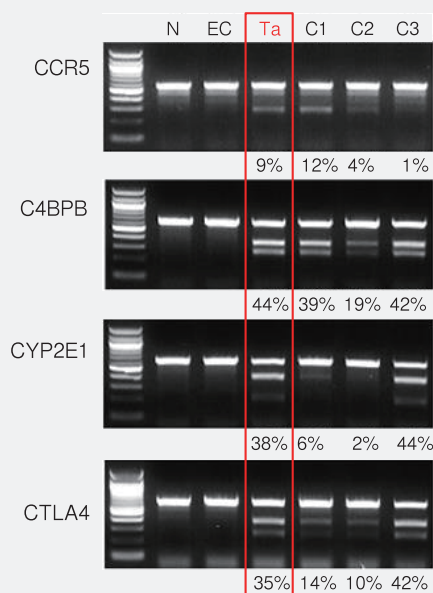
使用Cas9蛋白质的优势

-与质粒导入和病毒导入Cas9基因方法的比较

- ✓ 不使用Cas9基因，从而有效抑制由于基因残留使Cas9持续表达造成的脱靶现象
- ✓ 不需要考虑每个靶向生物的启动子和密码子
- ✓ 可以控制导入的Cas9蛋白质的量
- ✓ 不存在由于蛋白质转录、翻译表达所引起的时间滞后，可实现快速有效的突变导入

→ 由于用于制备转基因动物时镶嵌突变风险小，因此Cas9蛋白质用于受精卵基因编辑的使用例(★)有所增加。

实验例：比较hiPS细胞中不同公司Cas9产品的基因敲除效率



【方法】

将Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) 和Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription Kit (Code No. 632635) 制备的sgRNA, 采用电穿孔导入iPS细胞中, 对不同目的基因进行基因编辑实验。采用Guide-it™ Mutation Detection Kit (Code No. 631448) 检测突变导入效率。百分比(%)表示剪切效率。

N: 阴性对照 EC: 电穿孔对照
Ta: 本产品 (Guide-it™ Recombinant Cas9)
 C1: A公司产品 C2: B公司产品
 C3: C公司产品

Guide-it™ Recombinant Cas9对于所检测的靶基因都可以实现有效的突变导入。

(比较结果来源于Takara Bio USA, Inc.)

① 我们也提供GMP级别重组Cas9蛋白质，了解详情请登录官网查询Recombinant Cas9 Protein GMP grade (Code No. T230)。

用于基因编辑后突变导入效率确认，可大大节约后续克隆所需要的时间和成本

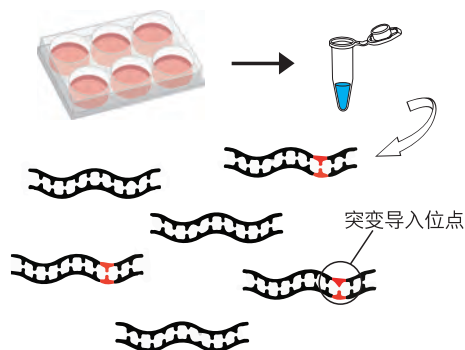
Guide-it™ Mutation Detection Kit (Code No. 631443/631448)

简单快速检测由CRISPR/Cas9、ZFNs、TALENs等人工核酸酶的基因突变导入效率

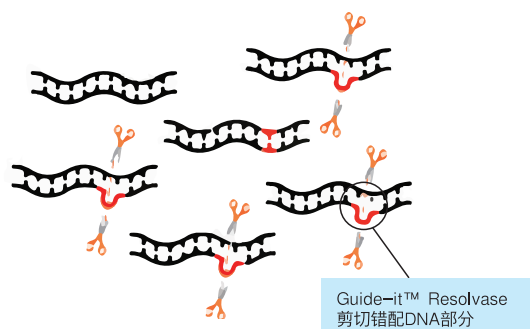
- ◆ PCR方法简单快速检出细胞基因组中导入的插入、缺失突变
- ◆ 包含了识别突变位点用DNA剪切酶、目的片段扩增用PCR酶、DNA提取缓冲液
- ◆ 所包含的Terra™ PCR聚合酶可以直接以动植物组织为起始进行PCR扩增，无需DNA提取过程
- ◆ 用途广泛，不仅可以用于动物样品，还可用于植物、微生物等样品

Guide-it Mutation Detection Kit操作流程

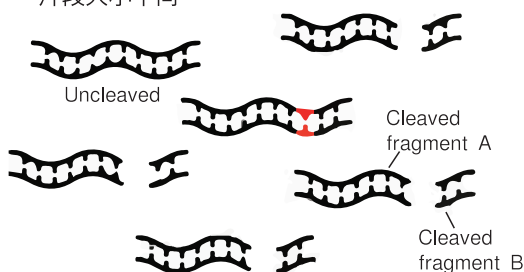
1. 使用Terra PCR Direct Polymerase Mix可以细胞为起始直接扩增目的片段



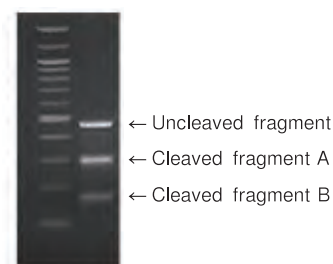
2. 变性&退火后，经Guide-it解离酶剪切所产生的不完全匹配DNA



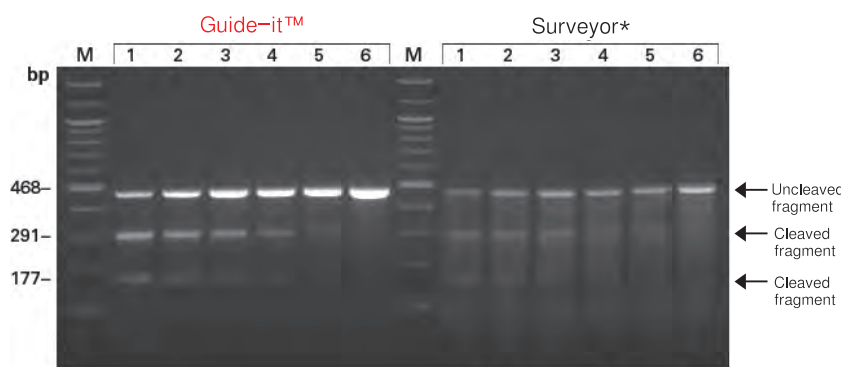
3. 被Guide-it解离酶剪切和未被剪切的DNA片段大小不同



4. 琼脂糖凝胶电泳确认(切断=突变成功导入)



实验例：Guide-it™ Mutation Detection Kit 与其他公司同类产品的比较



*注意：由于非特异剪切引起的弥散。

转染表达Cas9核酸酶的质粒和特异作用于AAVS1位点的sgRNA至293T细胞，转染48 hr后收集细胞，将其与未经转染的细胞按照不同比例*进行混合，分别进行突变导入效率检测。采用Terra PCR Direct Polymerase Mix扩增含有AAVS1位点的目的片段并纯化其产物，之后分别采用Guide-it解离酶和Cel1酶（Surveyor assay）进行剪切。采用Guide-it解离酶剪切后条带清晰易于识别，而Surveyor assay剪切后则显示明显的弥散，这样使得不容易测定突变效率并且低水平突变导入很难被检测到。

*泳道1-6：转染细胞的比率100%，80%，60%，40%，20%，0%



电泳结果图显示采用Guide-it解离酶剪切后的条带清晰，而采用Surveyor assay剪切后弥散明显，这可能是由于剪切错配DNA的酶的性能差异所引起的。两者的检测灵敏度相差5倍以上。

* 数据来源于Takara Bio USA, Inc.

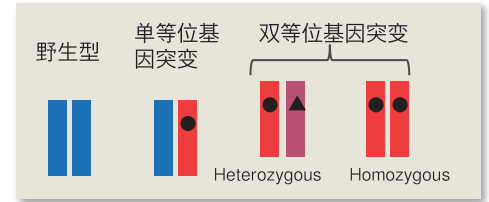
用于基因编辑后细胞克隆、个体基因型识别

Guide-it™ Genotype Confirmation Kit (Code No. 632611)

无需进行测序，识别细胞克隆和个体基因型

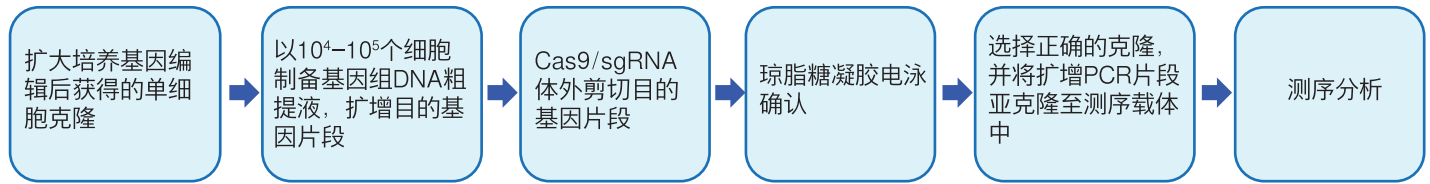
- ◆ 可直接以细胞粗提液为起始扩增目的基因序列
- ◆ 通过Cas9/sgRNA体外剪切反应识别基因型
- ◆ 采用了简便操作方法PCR和凝胶电泳而无需大量测序

基因突变后细胞克隆
4种不同的基因型



采用本试剂盒可以轻松筛选双等位基因突变型克隆!

Guide-it™ Genotype Confirmation Kit操作流程



★ 本试剂盒不包含sgRNA合成部分。sgRNA的合成推荐使用Guide-it sgRNA *In Vitro* Transcription Kit(Code No. 632635)。

通过Cas9/sgRNA体外剪切确定细胞基因型

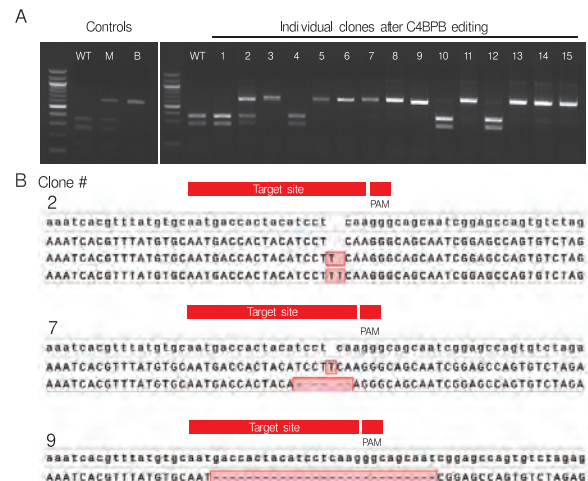
基因型	扩增目的基因片段	Cas9/sgRNA体外剪切目的基因片段	电泳结果
野生型			两条均被切断 → 2条小片段
单等位基因型			一条被切断 → 3条大片段小片段
双等位基因型			两条均未被切断 → 1条大片段

Cas9/sgRNA可识别并切断野生型基因。

由于发生基因编辑后引入了基因突变，Cas9/sgRNA不能识别并切断突变后的基因片段。

实验例：HEK293细胞基因型的确认

采用Cas9和作用于C4BPB基因的sgRNA处理15个HEK293单细胞克隆。Panel A. 采用Guide-it Genotype Confirmation Kit确认细胞基因型，其中左图的野生型(WT)，单等位基因 (M)，双等位基因 (B)作为对照反应。Panel B.小写字母代表野生型基因序列。正如所预期的，2号克隆是单等位基因突变，7号和9号克隆是双等位基因突变。



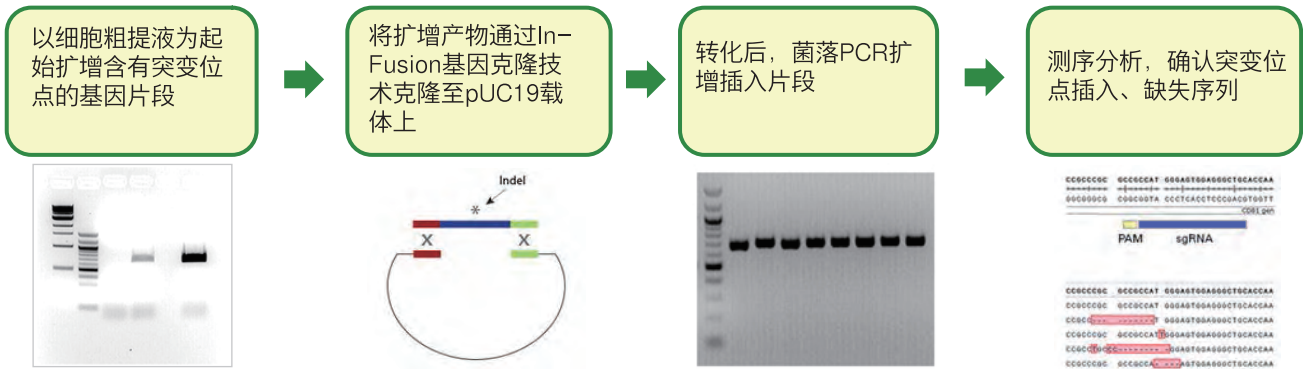
用于基因编辑后插入、缺失等突变位点基因序列的确认，确保获得目的克隆

Guide-it™ Indel Identification Kit (Code No. 631444)

采用In-Fusion基因克隆技术，快速有效确认突变位点基因序列

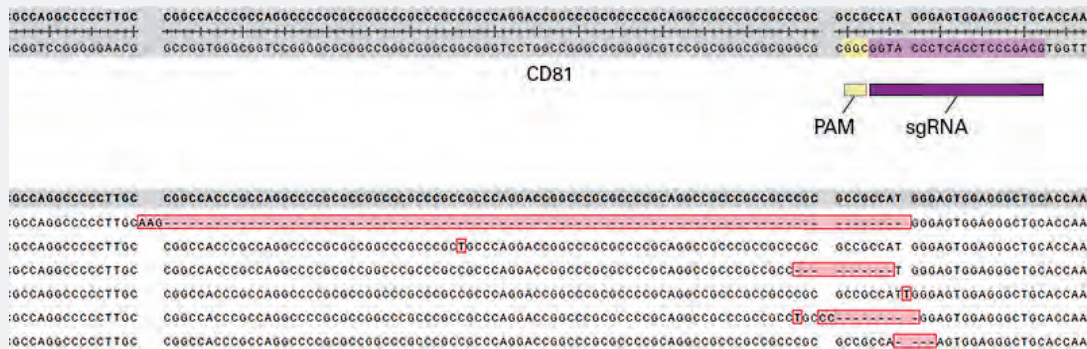
- ◆ 包含目的基因扩增、克隆、制备测序用样品所需的全部试剂的完整试剂盒
- ◆ 直接PCR与In-Fusion基因克隆技术相结合，简便、快速且正确地获得目的克隆

Guide-it™ Indel Identification Kit操作流程



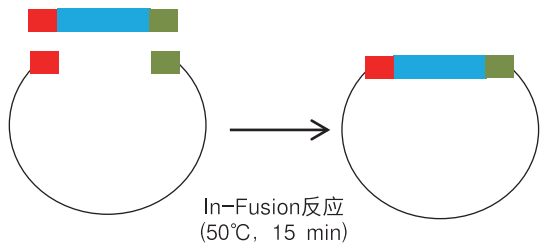
实验例：CRISPR/Cas9基因编辑后，确认CD81基因插入、缺失序列

转染表达Cas9和作用于CD81基因的sgRNA至HeLa细胞进行基因编辑，采用Guide-it Indel Identification Kit制备CD81基因靶位点测序用样品。选择6个克隆进行测序并将测序数据与野生型基因序列进行比对，确认CD81基因导入的突变位点序列。



In-Fusion®基因克隆技术：

目的基因片段的两端具备与载体插入位点两端完全相同的15 bp碱基序列。



采用附加了互补序列的引物通过PCR扩增获得目的基因片段就可完成In-Fusion的准备工作。

- 简便、快速的定向基因克隆技术
- 可在任意载体的任意位点进行克隆
- 无需限制性酶切处理
- In-Fusion反应时间仅需15 min
- 实现多片段同时克隆、长片段克隆

→ In-Fusion引物设计可以使用网站上在线设计工具 [In-Fusion Primer Design Tool](#)。

Cas9检测用兔多克隆抗体&小鼠单克隆抗体

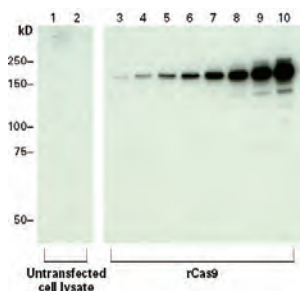
Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody (Code No. 632606/632607)

Guide-it™ Cas9 Monoclonal Antibody (Clone TG8C1) (Code No. 632627/632628)

用于检测酿脓链球菌来源的重组Cas9蛋白质

- ◆ 多克隆抗体可识别野生型Cas9、Cas9切口酶、Cas9核酸酶-缺陷型突变体
- ◆ 高特异性: 检测哺乳动物细胞裂解液样品时背景很低
- ◆ 高灵敏度: 这两种抗体用于Western Blot均可检测低于1 ng的Cas9蛋白质

实验例: 通过Western Blot评估Cas9 Polyclonal Antibody的检测灵敏度



0.15–20 ng重组Cas9蛋白质(rCas9)电泳后采用Guide-it Cas9 Polyclonal Antibody(1:1,000稀释)进行Western Blot检测。采用HRP-conjugated goat anti-rabbit secondary antibody(1:5,000稀释)作为二抗、ECL作为检测试剂。HT1080、HEK293细胞裂解液作为阴性对照。

泳道 1:	HT1080细胞裂解液(3.5×10^4 cells)	泳道 7:	rCas9 protein	2.5 ng	
泳道 2:	HEK293细胞裂解液(3.5×10^4 cells)	泳道 8:	rCas9 protein	5.0 ng	
泳道 3:	rCas9 protein	0.15 ng	泳道 9:	rCas9 protein	10.0 ng
泳道 4:	rCas9 protein	0.30 ng	泳道 10:	rCas9 protein	20.0 ng
泳道 5:	rCas9 protein	0.625 ng			
泳道 6:	rCas9 protein	1.25 ng			

★ 使用文献

Guide-it™ sgRNA *In Vitro* Transcription and Screening System

- Exome sequencing in the knockin mice generated using the CRISPR/Cas system. Kazuo Nakajima, An-a Kazuno, John Kelsoe, Moe Nakanishi, Toru Takumi & Tadafumi Kato *Scientific Reports* **6**, Article number: 34703 (2016)
- Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. Okamoto, Sachiko, *et al. Scientific Reports* (2019) **9**(1):4811.

Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)

- Generation of Pax6-IRES-EGFP knock-in mouse via the cloning-free CRISPR/Cas9 system to reliably visualize neurodevelopmental dynamics. Yukiko U. Inoue, Yuki Morimoto, Mikio Hoshino, Takayoshi Inoue *Neuroscience Research* 2018 **132**: 1–7.
- Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. Hashimoto M, Yamashita Y and Takemoto T *Dev Biol.* 2016 Oct 1; **418**(1):1–9.
- Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs Tanihara F, Takemoto T *et al. Science Advances* 14 Sep 2016: Vol.2, no. **9**, e1600803
- Highly efficient genome editing for single-base substitutions using optimized ssODNs with Cas9-RNPs. Okamoto, Sachiko, *et al. Scientific Reports.* (2019) **9**(1):4811.

Guide-it™ Mutation Detection Kit

- Non-coding recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. Xose S. *et al. Nature* (2015)**526**, 519–524
- A melanosomal two-pore sodium channel regulates pigmentation. Bellono NW, Escobar IE and Oancea E. *Sci Rep.* (2016) May 27;6: 26570.doi:10.1038/srep26570.
- The Development of a Viral Mediated CRISPR/Cas9 System with Doxycycline Dependent gRNA Expression for Inducible In vitro and In vivo Genome Editing. de Solis CA, Ho A, Holehonnur R and Ploski JE. *Front Mol Neurosci.* (2016)Aug 18;9:70. doi:10.3389/fnmol.2016.00070.
- Novel Mechanisms for Heme-dependent Degradation of ALAS1 Protein as a Component of Negative Feedback Regulation of Heme Biosynthesis. Kubota Y, Nomura K, Katoh Y, Yamashita R, Kaneko K. and Furuyama K. *J Biol Chem.* (2016) **291**(39):20516–20529

【产品一览表】

产品名称	概要	包装量	Code No.	备注
sgRNA体外转录及有效性确认				
Guide-it™ Complete sgRNA Screening System	sgRNA体外转录合成后, 采用Cas9检测sgRNA的有效性	50 Rxns	632636	—
Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit		50 Rxns	632635	
Guide-it™ sgRNA Screening Kit		50 Rxns	632639	
Guide-it™ IVT RNA Clean-Up Kit		50 Rxns	632638	
CRISPR/Cas9质粒系统				
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green)	Cas9与荧光蛋白质同时表达	1 System	632601	非营
Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Red)		1 System	632602	
CRISPR/Cas9腺相关病毒系统				
AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System(AAV2)	推荐用于使用质粒载体基因编辑效率低的细胞	1 System	632608	—
AAVpro® CRISPR/Cas9 Vector System		1 System	632609	
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Vector System		1 System	632618	
AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)		1 System	632619	
AAVpro® 293T Cell Line	经过优化的AAV病毒包装细胞	1 mL	632273	—
AAVpro® Purification Kit (All Serotypes)	高效纯化多种血清型AAV病毒	1 Kit	6666	
AAVpro® Titration Kit (for Real Time PCR) Ver.2	只要ITRs来源于AAV2, 可用于测定多种血清型AAV病毒滴度	100 Rxns	6233	
CRISPR/Cas9慢病毒系统				
Lenti-X™ CRISPR/Cas9 System	推荐用于使用质粒载体基因编辑效率低的细胞	1 System	632629	—
pLVX-hyg-sgRNA1 Vector System		10 Rxns	632630	
pLVX-puro-Cas9 Vector		20 µL	632631	
Lenti-X™ Tet-On® 3G CRISPR/Cas9 System		1 System	632633	
Lenti-X™ 293T Cell Line	高效的慢病毒包装细胞	1 mL	632180	—
Lenti-X™ Concentrator	慢病毒浓缩试剂, 没有特殊设备要求	100 mL	631231	
Lenti-X™ GoStix™ Plus	10分钟快速测定慢病毒滴度	20 Tests	631280	
Lenti-X™ qRT-PCR Titration Kit	qRT-PCR方法测定慢病毒滴度, 仅需4小时	200 Rxns	631235	
Lenti-X™ p24 Rapid Titer Kit	ELISA方法测定慢病毒滴度, 仅需4小时	96 Rxns	632200	
CRISPR/Cas9 Gesicle制备系统				
pGuide-it-sgRNA1 Vector System	适用于由于转染效率低而导致基因编辑效率低的细胞	1 System	632612	—
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System		1 System	632613	
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Packaging Set		10 Rxns	632616	
Gesicle Producer 293T Cell Line	Cas9/sgRNA gesicle制备细胞系	1 mL	632617	—
重组Cas9蛋白质				
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)	适用于电穿孔导入的重组Cas9核酸酶	3 × 100 µg	632640	—
Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)		100 µg	632641	
Recombinant Cas9 Protein GMP grade	GMP级别重组Cas9核酸酶	0.6 mg	T230	—
基因编辑效率的监测				
Guide-it™ Mutation Detection Kit	PCR法简便确认基因编辑后的变异导入	25 Rxns	631448	—
		100 Rxns	631443	
细胞基因型确认				
Guide-it™ Genotype Confirmation Kit	基因编辑后细胞基因型确认	100 Rxns	632611	—
基因编辑后突变序列确认				
Guide-it™ Indel Identification Kit	基因编辑后突变位点基因序列确认	10 Rxns	631444	—
CRISPR/Cas9系统Cas9检测抗体				
Guide-it™ Cas9 Polyclonal Antibody	Cas9检测抗体(Western Blot)	100 µl	632607	—
		3 × 100 µl	632606	
Guide-it™ Cas9 Monoclonal Antibody (Clone TG8C1)	Cas9检测抗体 (Western Blot & Immunocytochemistry)	100 µg	632628	—
		3 × 100 µg	632627	

非 非营利的研究机构或法人购买: 购买之前需要用户填写专利确认书, 说明使用目的为研究用。

营 营利的研究机构或法人购买: 购买之前需要获得专利许可(有偿)。订购时, 先要获得专利许可, 然后填写专利确认书交予当地代理商。

DIY您的 基因编辑实验！

- 本宣传页上登载的制品，都是以科研为目的。请不要用于其它方面，如：不要用于人、动物的临床诊断和治疗。也不能用于食品、化妆品及家庭用品等方面。
- 未经本公司许可，严禁产品的转售·转让、以转售·转让为目的的产品更改、以及用于商品的制造。
- 专利许可信息请在本公司网站上确认：<https://www.takarabiomed.com.cn>。
- 本宣传页上登载的公司名称及制品名称即使没有特殊标注，使用的也是各公司的商标或注册商标。
- 本宣传页仅限于中国大陆地区客户使用，其他地区客户请咨询当地代理商。
- 本宣传页上记载的产品信息是2021年4月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

关注Takara微信和微博，
好礼常常有！



Takara微信



Takara微博



Takara官网



Clontech Takara cellartis

销售商：

宝日医生物技术（北京）有限公司

Takara Biomedical Technology (Beijing) Co., Ltd.

地址：北京市昌平区科学园路22号（中关村生命科学园内）

电话：010-80720985, 80720986

制造商：

宝生物工程（大连）有限公司

Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd.

地址：辽宁省大连市经济技术开发区东北二街19号

电话：0411-87621671

官网地址：<https://www.takarabiomed.com.cn>

技术咨询热线：4006518761, 4006518769

技术咨询邮箱：service@takarabiomed.com.cn