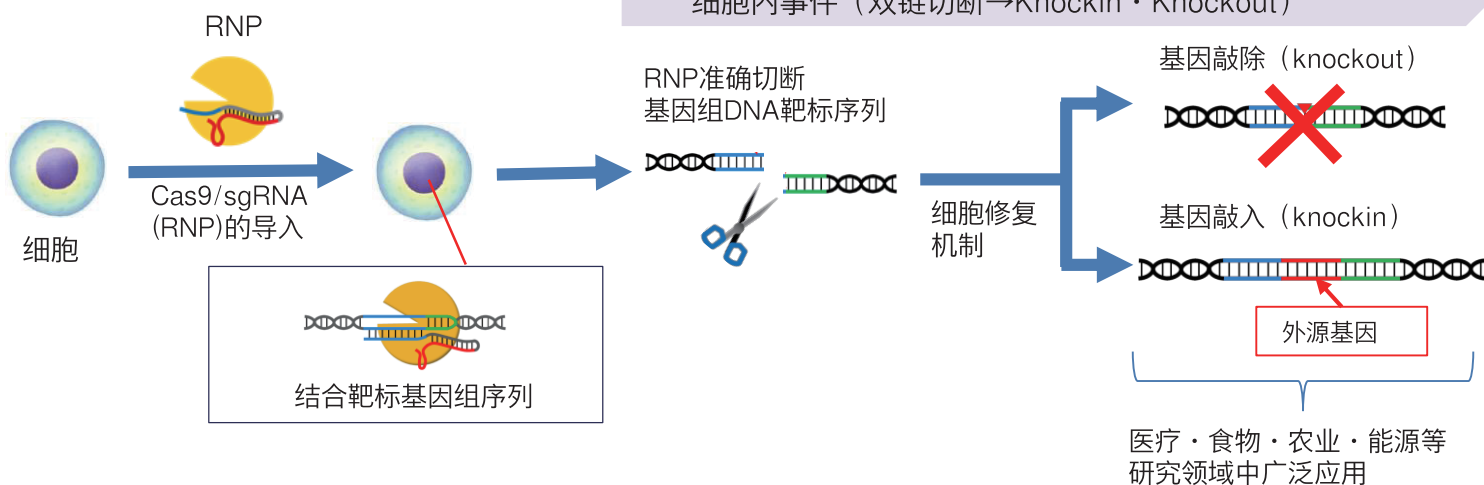




前言：由于简便易用的特点，【CRISPR-Cas9基因编辑技术】在癌症和遗传性疾病、能源及粮食领域相关的研究方面都有很大突破，其应用广泛性将止于何处犹未可知。本期【Clontech通信】，主要传达关于直接使用最近流行的核糖核蛋白（Ribonucleoprotein，缩写RNP：“Cas9蛋白质”和“向导RNA”的复合物）进行基因编辑的相关信息。

RNP基因编辑原理示意图



RNP基因编辑要点

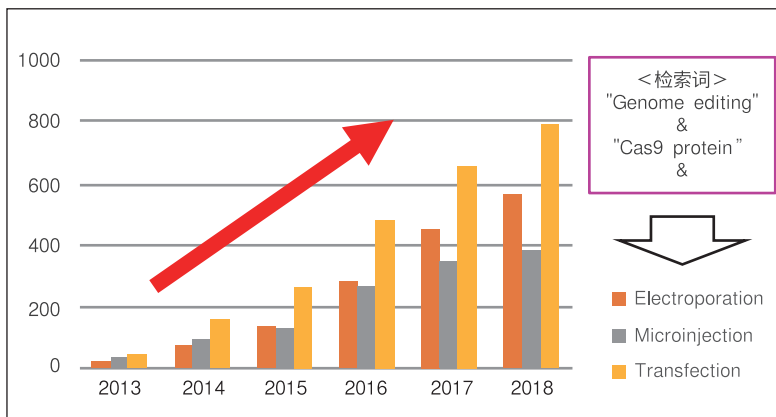
RNP导入细胞后，会迅速激活DNA剪切活性，因此可快速切断靶标序列。另外，由于RNP在细胞内能够快速分解，从而能够有效避免基因组上靶标序列以外的相似序列被切断（off-target效应），这种方式也因此成为近期CRISPR基因组编辑研究趋势。

参考文献：Hendriks, WT. *et al.*, Genome Editing in Human Pluripotent Stem Cells: Approaches, Pitfalls, and Solutions. *Cell Stem Cell*. 2016, 18(1): 53.

RNP导入方法



使用Google Scholar检索到的文献数量



无论哪种导入法，相关文献数量都在逐年增加。

RNP关联产品

Code No.	产品名称	产品内容
632641/632640	Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready)	Cas9蛋白质
632635	Guide-it™ sgRNA <i>In Vitro</i> Transcription Kit	sgRNA体外制备
632644	Guide-it™ Long ssDNA Production System	HDR模板制备

客户实验例

使用Cas9蛋白质和向导RNA复合物 (RNP) 通过显微注射的方法进行小鼠基因组编辑 (knockout/knockin)



东京医科齿科大学未来基因组研究开发支援室的平冈优一先生提供了使用Guide-it Recombinant Cas9(Electroporation-Ready)(Code No. 632641)进行实验的实验例。此外，平冈优一先生还提供了关于CRISPR/Cas9的详细研究内容和感受，欢迎阅读。

■ 实验背景

未来基因组研究开发支援室是一个内部共同使用实验室，可提供使用基因组编辑技术 (CRISPR/Cas) 构建基因修饰小鼠模型，转基因小鼠构建及饲养，特定病原体消除，受精卵冷冻保存等服务，为各个领域的研究提供了支持。

■ 在研究过程中遇到的问题和解决策略

在使用Takara公司产品之前，已经使用过其他多家公司的Cas9蛋白质产品。但是，由于其高浓度的甘油含量，在显微注射时容易堵塞毛细管，带来了很大的操作压力；并且不同批次产品的基因编辑效率不稳定。为解决这个问题，对多家公司销售的Cas9蛋白质进行了调查，发现Takara公司的Cas9蛋白质甘油浓度很低，于是快速购入，分析了批间差异，同时也与其他公司产品进行了性能比较。

■ 实验结果

使用Takara公司的Cas9蛋白质，改善了用毛细管做显微注射时的堵塞情况，大幅减轻了操作时的压力。此外，到目前为止所使用的多个批次的Cas9蛋白质性能均较为稳定，能够顺利的进行基因编辑实验。与其他公司产品相比，Takara公司的Cas9蛋白质用于同源重组修复实验，所产生的基因敲入效率更高。下表显示了使用Takara公司的Cas9蛋白质进行小鼠基因组编辑的结果。

基因名	插入片段长/缺失长	Donor	产仔数	基因编辑产仔数	效率
基因A	KI (insert长=3 kb)	质粒	9	4	44%
基因B	KI (insert长=7.5 kb)	质粒	11	4	36%
基因C	KO (deletion长=51 kb)	Oligo DNA	14	4	28%
基因D	SNP	Oligo DNA	8	2	25%
基因E	Flox	质粒	6	2	33%
基因F	Flox	质粒	8	2	25%

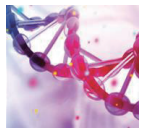
■ 客户评价

Takara公司的Cas9蛋白质能够高效地进行基因敲入和基因敲除，并且性能稳定，后续计划继续使用。

■ 实验方案

1. Aida *et al.* Genome Biology (2015) 16:87
2. Aida *et al.* BMC Genomics (2016) 17:979

RNP基因编辑发表文献



受精卵: 通过电穿孔的方式直接导入“RNP”降低镶嵌突变风险

Hashimoto, M *et al.*, Electroporation of Cas9 protein/sgRNA into early pronuclear zygotes generates non-mosaic mutants in the mouse. *Dev Biol.* 2016. **418**(1): 1.

T细胞: 通过电穿孔的方式直接导入“RNP”修饰识别特定癌细胞抗原的TCR

Roth, TL. *et al.*, Reprogramming human T cell function and specificity with non-viral genome targeting. *Nature.* 2018. **559**(7714): 405

植物: 通过PEG介导法直接导入“RNP”至生菜和水稻等的原生质体中进行基因敲除

Woo, JW. *et al.*, DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol.* 2015. **33**(11): 1162.

绿藻衣藻: 通过电穿孔的方式直接导入“RNP”进行基因敲除

Shin, SE. *et al.*, CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *SciRep.* 2016. **6**: 27810.

- 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2023年4月1日的信息，最新信息请参考公司官网。

Ver.2 2023年4月制作