

从开始到结束：人iPS细胞基因编辑和单细胞克隆系统

人诱导多能干细胞 (Human induced pluripotent stem cells, hiPSCs) 是一个功能强大的研究工具和疾病模型，因为其具备无限增殖、自我更新、分化为多种细胞类型的能力，而且人iPS细胞还可以再现细胞来源个体的疾病表型和基因型。人iPS细胞结合新的CRISPR/Cas9的基因编辑技术，就可以进行疾病模型中遗传变异的功能性研究以及更深远的再生医学研究。

CRISPR/Cas9系统只需一个Cas9核酸酶结合一个单链向导RNA (single guide RNA, sgRNA)就可以决定其靶向特异性，进行基因编辑 (Jinek et al. 2012)。这两个组件可以通过多种方法成功导入至靶细胞，如载体表达系统，RNA转染系统，或直接导入Cas9/sgRNA核糖核蛋白(ribonucleoprotein, RNP)复合物(Sander and Joung 2014)。与载体表达系统相比，直接导入Cas9/sgRNA RNPs提供了一种快速转入基因编辑实验的方法，同时脱靶效应的可能性更小(Kim et al. 2014)。Takara旗下的Clontech品牌提供两种Cas9/sgRNA RNPs导入方法，即电穿孔(Electroporation)导入系统或者纳米囊泡(Gesicle)导入系统，帮助您实现高效的、低脱靶效应的基因编辑。

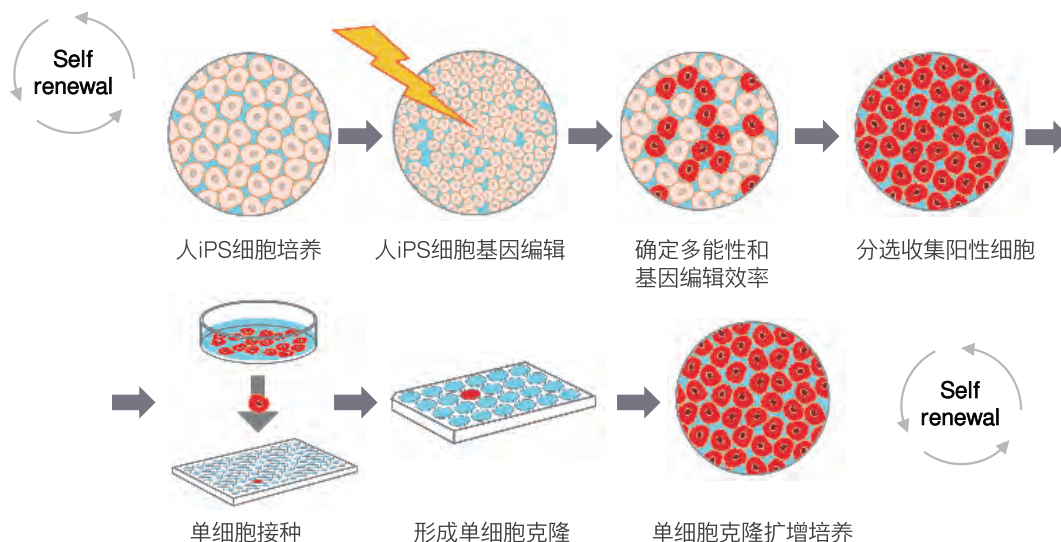
一旦Cas9/sgRNA RNPs复合物被导入，为了分离和筛选感兴趣的基因型，单细胞需要被分离并扩增为克隆细胞系。传统的hiPS细胞以集落状生长和传代，不利于进行单细胞分离和单细胞培养，为基因编辑后人iPS细胞建立克隆增加了难度。Takara旗下Cellartis品牌的DEF-CS™ culture system (Asplund et al. 2016) 是一个支持无饲养层、基于细胞单层培养的系统，规避了集落状培养带来的挑战，允许单细胞传代和促进接种的单细胞存活和后续扩增，帮助您获得基因编辑后感兴趣的单细胞克隆。

从开始到结束，Takara全套的人iPS细胞基因编辑工具任您选择。

◆ 参考文献

- Asplund, A. et al. One Standardized Differentiation Procedure Robustly Generates Homogenous Hepatocyte Cultures Displaying Metabolic Diversity from a Large Panel of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev. Reports* **12**, 90–104 (2016).
- Jinek, M. et al. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* **337**, (2012).
- Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J.-S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res.* **24**, 1012–9 (2014).
- Sander, J.-D. & Joung, J.-K. CRISPR-Cas9 systems for genomic editing, regulation and targeting. *Nat. Biotechnol.* **32**, 347–55 (2014).

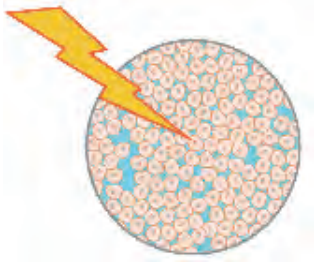
◆ 人iPS细胞基因编辑流程



◆ 人iPS细胞基因编辑关键操作

关键操作：人iPS细胞基因编辑

需求：高效敲除目的基因
拥有低的脱靶效应
尽量简单易操作



解决方案：

Cellartis® iPSC rCas9 Electroporation and Single-Cell Cloning System (Code No. 632643, 1 Kit)

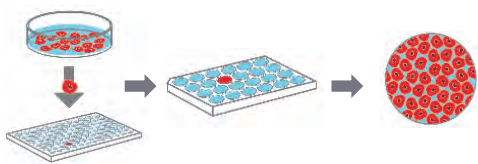
完整的试剂盒，使用电穿孔的方法导入sgRNA和专用的电穿孔Cas9进行有效的基因编辑以及随后的单细胞克隆形成和扩增至48孔板。

Cellartis® iPSC CRISPR/Cas9 Gesicle and Single-Cell Cloning System (Code No. 632642, 1 Kit)

完整的试剂盒，通过gesicle（纳米囊泡）导入Cas9/sgRNA RNP复合物进行有效的基因编辑以及随后的单细胞克隆形成和扩增至48孔板。

关键操作：获得所需突变的单细胞克隆

需求：方便在单细胞水平筛选所需突变
有效形成所需突变的单细胞克隆
同时维持单细胞克隆良好的多能性



解决方案：

Cellartis® iPSC Single-Cell Cloning DEF-CS™ Culture Media Kit (Code No. Y30021, 1 Kit)

完整的试剂盒，成分确定的、无饲养层的培养系统，支持人iPS细胞从接种单细胞至96孔板到扩增至48孔板。

Cellartis® DEF-CS™ 500 Culture System (Code No. Y30010, 1 Kit)

完整的试剂盒，成分确定的、无饲养层的、细胞单层（非集落状）生长的培养系统，支持单细胞克隆扩增培养，以及常规的人iPS细胞培养。

► 选择人iPS细胞基因编辑和单细胞克隆系统，因为：

• 高效的人iPS细胞基因编辑

无论使用电穿孔或者gesicle直接导入Cas9蛋白质和sgRNA，均没有基因整合和减少脱靶效应。

• 良好的单细胞存活率

当以单细胞形式接种到一个96孔板时，基因编辑的人iPS细胞展现了高的存活率(通常约~50%)。

• 有效维持多能性

在基因编辑和单细胞克隆形成中，人iPS细胞维持高水平(>90%)的多能性标志表达 (Oct-4, TRA-1-60, SSEA-4)。

• 保持稳定的核型

从基因编辑、单细胞克隆形成和扩增，始终维持正常的、稳定的核型。

• 灵活选择基因编辑方法

根据自己的基因编辑实验，灵活选择基于电穿孔或基于gesicle的CRISPR/Cas9技术，以及使用单细胞克隆培养系统。

• DEF-CS技术贯穿整个实验

在基因编辑实验前、后，以及在获得单细胞克隆后扩大培养实验，均可以使用Cellartis® DEF-CS 500™ Culture System。

- 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。
- 专利许可及注册商标信息请在本公司网站上确认：<http://www.clontech.com/>。
- 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。

Ver.2 2017年6月制作