



Target+PAM

基因

編輯

Gene editing

Cas9-gRNA RNP Complex

Basic
Research

Pathogenic
mechanism

Therapeutics

Disease
Model

Industrial
& Biopro-
duction

Food &
Beverage

Drug
development

Animal
Health



騰達行



0800-211-819

“

CRISPR

Clustered, Regularly Interspaced,
Short Palindromic Repeats

CRISPR 系統是細菌對抗侵入性的病毒攻擊的一種防禦機制。該系統是一套基因編輯工具的基礎，這些工具使得疾病修復、診斷、農業和能源等各種研究得以推進。基因編輯是針對特定的 DNA 序列進行針對性的改變，涉及 DNA 的添加、去除或修改。

”

目錄

前言	P.03
sgRNA-Cas9 (RNP)	P.05
SygRNA	P.06
CRISPR HDR Enhancers	P.07
Cas9 Protein	P.08
Long ssDNA Production	P.09
轉染	P.10
驗證	P.14
其他相關產品	P.16

CRISPR

執行基因編輯三個步驟：

1

找到目標物
targeting

CRISPR 機制主要是由 gRNA 及 Cas9 共同執行，原生的 gRNA 由 crRNA 與 tracrRNA 組成，crRNA 是目標序列的互補序列，而 tracrRNA 則會吸引 Cas9 蛋白形成複合物，最後 CRISPR 複合物會到正確的基因組位置進行基因編輯。

為了實驗設計方便以及操作便利性與成功率，現今亦有科學家將此兩股 RNA (crRNA、tracrRNA) 合併為單股 sgRNA。

2

將 DNA
切割
cleavage

一旦 CRISPR 複合物到達並結合至目標序列上時，Cas9 則會辨識目標 DNA 上的 PAM (protospacer adjacent motif) 序列，並對 DNA 進行切割，產生 DNA 雙股斷裂 (double strand break; DSB)。

3

進行修補
repair

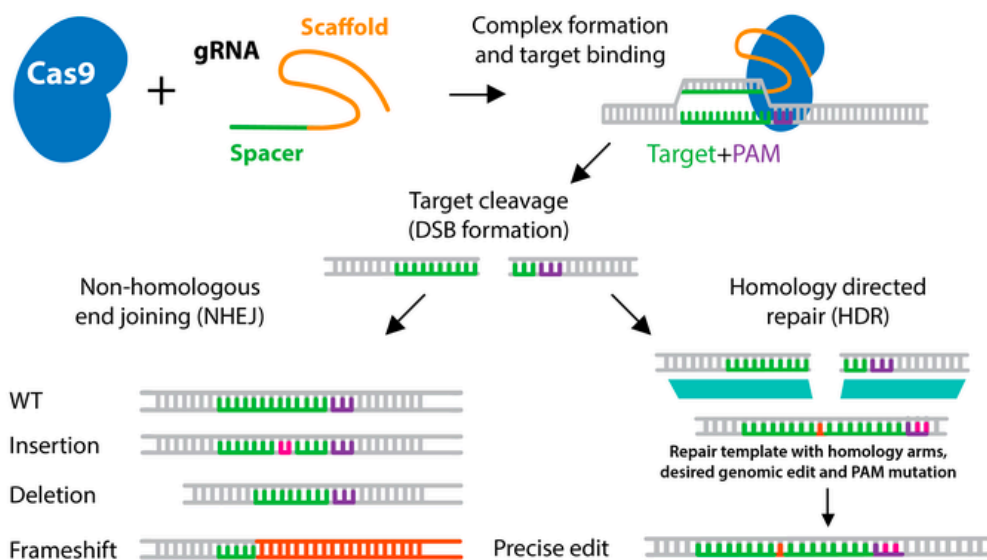
Cas9 切割 DNA 後，原生細胞 DNA 即會透過兩種機制來進行修補。

A. 非同源的末端連接 (non-homologous end-joining; NHEJ)

當細胞通過 NHEJ 通路修復 DSB 時，通常會造成 frameshift，在 DNA 斷裂末端片段隨機黏上，發生短片段的插入或刪除，最終使蛋白失去功能。

B. 同源基因修復 (homology-directed repair ; HDR)

當給予細胞合適的模板時，細胞可以選擇進行同源重組的方式對斷裂的 DNA 進行「精確」修補，我們亦可在同源模板裡添加其他蛋白序列，例如篩藥基因、螢光蛋白等，將外來的序列用這個方式插入基因體。

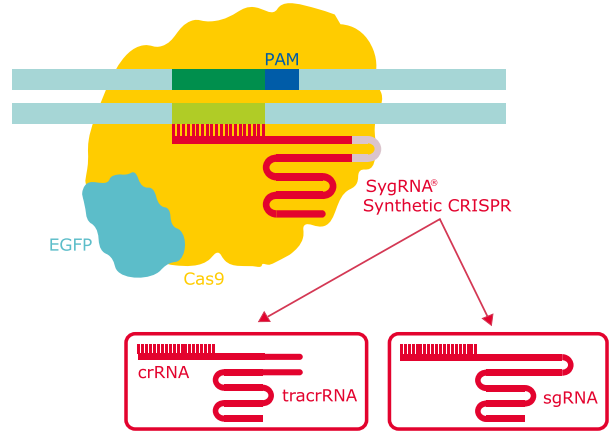


CRISPR 系統通過兩個主要元件完成基因編輯

① 導引 RNA (gRNA) :

主要由兩個部分組成：

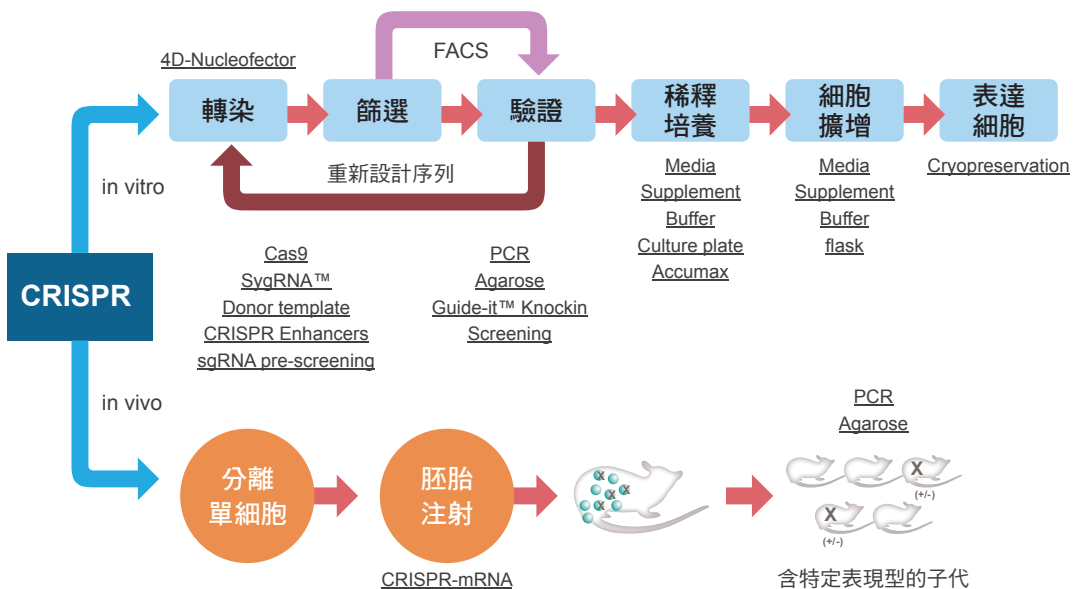
CRISPR RNA (crRNA) 和 trans-activating crRNA (tracrRNA)。crRNA 是一個 17-20 個核苷酸序列，與目標 DNA 互補，因此依據每一個目標基因不同而有所不同。而 tracrRNA 則是一個不變的序列，充當將 Cas 核酸酶連接到 crRNA 的支架。



② 細菌衍生的核酸酶 (如 Cas9) :

Cas 和 gRNA 兩者結合後會從未活化態轉變成活化態，活化態的 CRISPR-Cas 才具有切割 DNA 的能力。

CRISPR 的實驗過程中每個環節都非常的關鍵，我們提供一系列的專業技術和高品質的相關產品，包含細胞培養、細胞保存、核酸萃取和純化、以及基因定序……等，為您提供完整的 CRISPR 實驗解決方案。



直接導入 SgRNA-Cas9 (RNP) 有效減低 off-target 影響， 針對目標基因區域可達到快速編輯效果

RNP 是一種較方便以及迅速進行 CRISPR 的方法，直接導入合成好的 gRNA 以及重組的 Cas9 蛋白，有以下好處：

1. 不用透過轉錄及轉譯表達蛋白，可實現快速有效的基因編輯
2. 不使用 Cas9 DNA 片段，有效抑制由於 DNA 片段殘留使 Cas9 持續表達造成的脫靶現象
3. 不需要考慮每種目標細胞的 promoter, USAGE codon

SygRNA™ (合成的 crRNA 和 tracrRNA) 和重組的 Cas9 蛋白可以形成特核糖核蛋白複合物 (RNP)。直接轉染 sgRNA-Cas9 RNP 可以避免質體 DNA 嵌入宿主基因組，也可進一步增強和擴展 CRISPR 基因修飾技術的應用。早期的報導表明，與轉染 Cas9 質體相比，利用 sgRNA-Cas9 RNP 轉染的基因組修飾具有更高的特異性 (Juris et al. 2015, Kim et al., 2014, Lin et al. 2015, Liang et al. 2015)。此外，sgRNA-Cas9 RNP 技術在細胞治療應用中也具有更好的願景，比如近期成功獲得基因插入的人類原代 T 細胞 (Schumann et al. 2015)。

Conventional gene targeting

- Generation of target construct



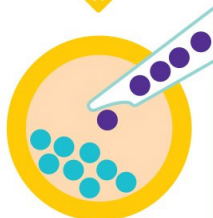
- ES cells electroporation
- Positive/negative selection



- Colony picking and expansion



- Selection and validation of targeted clones

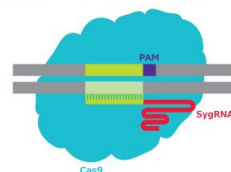


- Injection of targeted ES cells to blastocytes

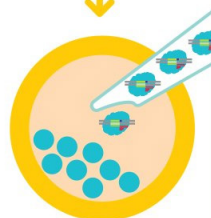
- Embryo transfer

CRISPR/Cas9 gene editing

- Synthesis of targeting gRNA and Cas9



- Injection of Cas9-gRNA to zygotes






- Embryo transfer

SygRNA™ synthetic guide RNA


 100%
品質保證

- 高純度：利用 HPLC 純化，降低影響實驗的不純物質
- 訂製服務：提供修飾 RNA 訂製服務，穩定 RNA 不降解
- 多種選擇：包含了單股 gRNA (sgRNA) 以及 crRNA : tracrRNA 兩種形式
- 品質保證：特有技術和優質試劑的搭配，任何標的物、細胞類型或應用，皆保證編輯活性
- 新手專區：由經驗豐富的 Sigma 團隊提供您 pre-designed gRNA，省時又高效率

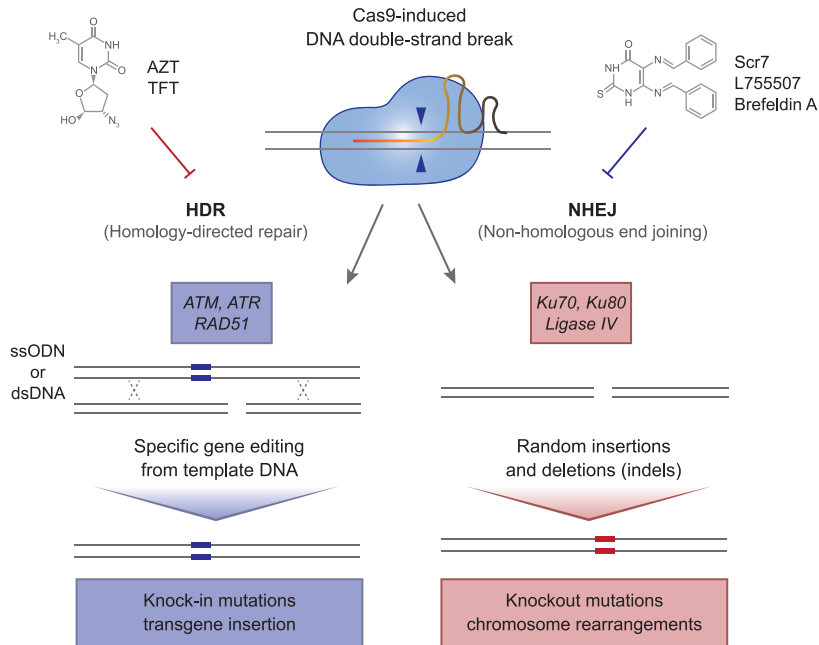
gRNA format	Two-part system		One-part system
	SygRNA® crRNA:tracrRNA	SygRNA® modified crRNA:tracrRNA	SygRNA® modified sgRNA
Structure			
Cost	+	++	+++
Efficiency	++	+++	++++

Cas9 Species	Two-part system		sgRNA - One-part system	
	SpCas9	Fncas9	SpCas9	Fncas9
TracrRNA	Unmodified requires #TRACRRNA05N Modified requires #TRACRRNAMOD	Unmodified requires #FNCAS9TRACR Modified requires Fncas9 tracrRNA (Custom Request)	X	
Synthesis	2 or 5 nmol			
Purification	Desalt or HPLC		HPLC only	
Modification option*	Available for HPLC purification only		Available	

- *2 'O-methyl and phosphothioate modifications can be incorporated to enhance the stability and performance of the synthetic RNA
- Fncas9 should only be used for non-cellular, synthetic application



CRISPR Enhancers



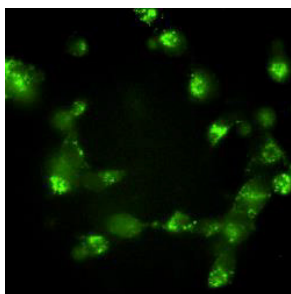
Description	Cat No.	Function
HDR Enhancers		
RS-1	R9782	RAD51 agonist
SCR7 pyrazine	SML1546	inhibitor of DNA ligase IV
Brefeldin A from <i>Penicillium brefeldianum</i>	B7651	increase CRISPR-mediated homology-directed repair (HDR) efficiency.
L755507 ≥98%	SML1362	<ul style="list-style-type: none"> • Increase CRISPR-mediated homology-directed repair (HDR) efficiency • Human induced pluripotent stem cells (iPSCs) • Increasing the efficiency of GFP insertion by 3-fold compared to control cells
Nocodazole	M1404	Enhance CRISPR homology-directed repair (HDR) efficiency and increase Cas9-mediated editing frequencies.
NHEJ Enhancers		
3'-Azido-3'-deoxythymidine	A2169	Azidothymidine has been shown to decrease CRISPR-mediated homology-directed repair (HDR) efficiency
降低 off-target		
(Z)-4-Hydroxytamoxifen	H7904	ligand-dependent inteins 4-Hydroxytamoxifen was used control Cas9 function, which reduced off target effects in CRISPR-mediated gene editing.



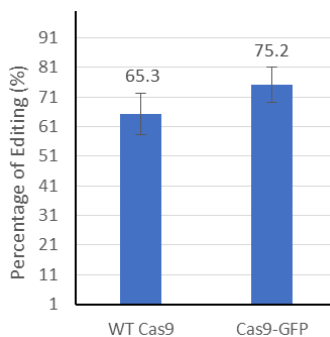
Enhanced specificity SpCas9-EGFP Fusion #ECAS9GFPPR

Enhanced specificity SpCas9 #EPCAS9PRO

- 降低脫靶率：Streptococcus pyogenes 突變株，可降低脫靶機率 (off-Target)
- 好驗證：含 EGFP 螢光，方便確認傳遞效率及後續以流式細胞儀來收集細胞
- 高效率：含有三個核定位訊號 (nuclear localization signals;NLS)，穩定送進細胞核進行基因編輯，增加編輯成功率
- All in one：產品包含 dilution buffer 以及 nuclease-free water，方便使用
- 好穩定：提供粉末包裝，品質穩定



HEK293 cells were transfected with Cas9-GFP RNP complex. Cell image was taken 24 hours post transfection with 40x magnification.



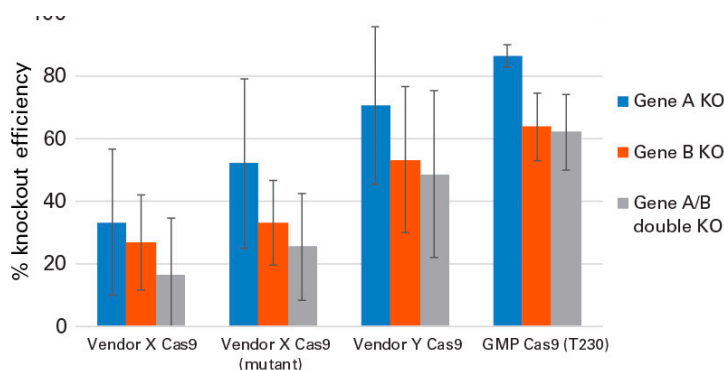
RNP complexes were transfected into U2OS cells targeting a VEGFA3 target. Genome editing activity was assessed by next generation sequencing.

快速

高
成功率

Recombinant Cas9 Protein #T230

- 效率好：最佳化重組 wild-type Streptococcus pyogenes 的 Cas9 蛋白，C 端帶有 NLS，有助於順利送進細胞核中，進行基因編輯
- 此產品生產標準與品質管制皆符合 Good Manufacturing Practice (GMP) 規範，符合臨床試驗使用標準

GMP
Grade

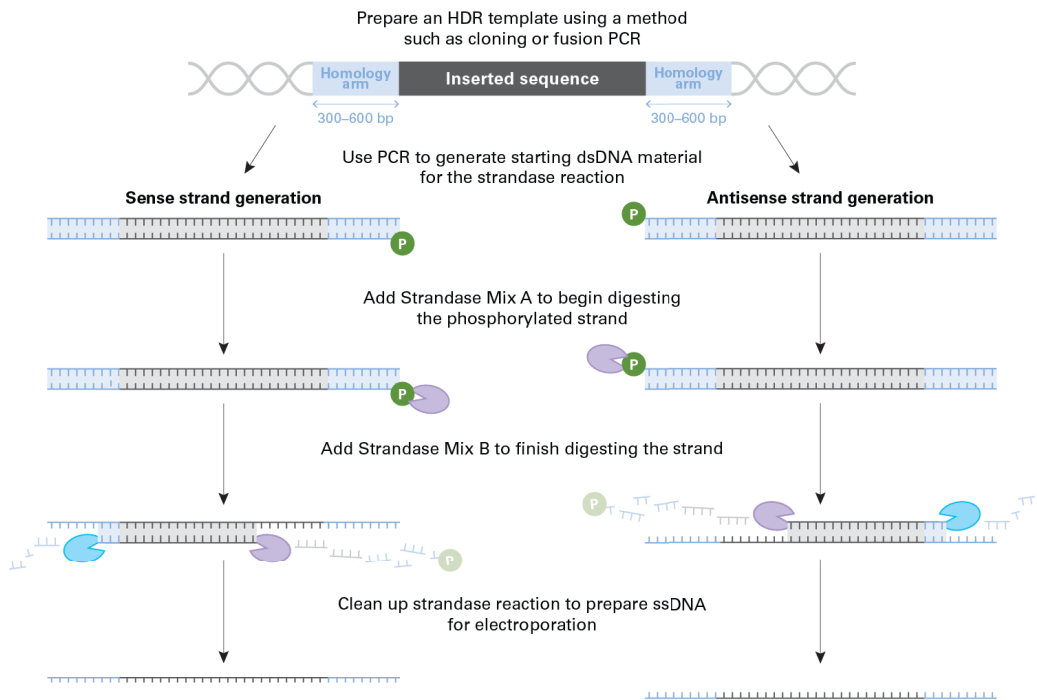
使用人類 iPS 細胞透過電穿孔方式進行 CRISPR Knock-out 實驗，相較於競爭對手的 Cas9 蛋白，TaKaRa GMP Cas9 蛋白經過流式細胞分析顯示有較高的基因剔除效率。

Guide-it Long ssDNA Production System v2 #632666

將 Repair Template 轉化成 single-stranded 做為 Knock-In 修飾模板來降低細胞免疫反應，增加基因編輯的成功機率。

當利用 CRISPR/Cas9 系統進行基因 Knock-In 時，使用 single-strand DNA 作為修飾模板能帶來許多優勢：

- ssDNA 比起 dsDNA 具有較低的細胞毒性，能增加編輯成功的細胞存活率
- 解決 dsDNA 會隨機 (Random) 與脫靶 (off-target) 插入基因的問題，進而有效提高基因編輯的成功率
- 輕鬆簡單辨識出正確編輯的細胞，不需擔心轉殖基因錯誤表達的背景干擾



Synthetic Donor template

- 訂製服務：依照客戶需求訂製
- 品質保證：多年合成經驗，提供高品質產品

物種選擇



提供序列



訂購



Guide-it™ Complete sgRNA Screening System #632636

利用簡單快速的 **In-Vitro** 試管反應檢測所設計 **sgRNA** 與 **Template** 結合作用的效率，篩選出高效率的 **sgRNA**，簡單初步建立最佳化的 **CRISPR/Cas9** 系統，有效提升基因編輯成功率

Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit #632635

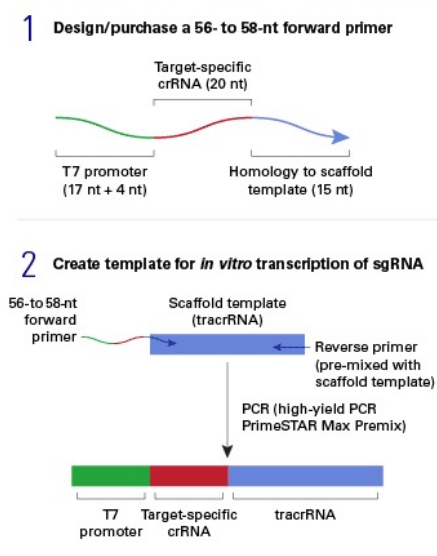
- 初步篩選必備工具：直接以體外轉錄 (IVT) 產生 sgRNA
- 低干擾：附有 DNase I (RNase-Free) 可除去 Plasmid Template 的干擾
- 高產量：sgRNA 產量可高達 20 µg

使用合成的 **sgRNA** 可單買此試劑
即可進行預篩選喔！

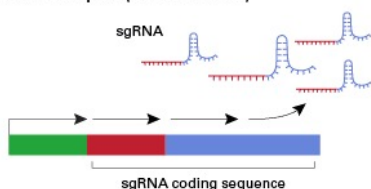
Guide-it™ sgRNA Screening Kit #632639

- 好品質：提供高效率重組 Cas9 Nuclease，測試 sgRNA 與 Template 結合作用的效率
- 超前佈署：CRISPR 實驗前挑選高效率的 sgRNA，有利於提升基因編輯的成功率

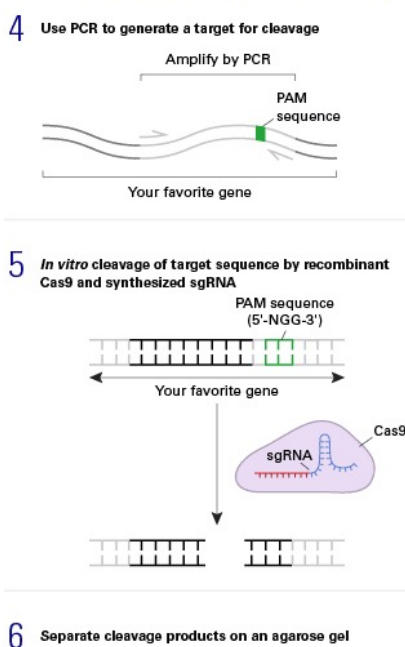
Guide-it sgRNA In Vitro Transcription Kit (Cat. No. 632635)



3 Production of sgRNA by *in vitro* transcription and purification with the provided Guide-it IVT RNA Clean-Up Kit (Cat. No. 632638)



Guide-it sgRNA Screening Kit (Cat. No. 632639)



同場加映

Guide-it™ IVT RNA Clean-Up Kit # 632638

- 不須繁瑣的萃取流程：phenol-free
- 純化後的 sgRNA 可直接進行 transfection, electroporation or *in vitro* cleavage assays
- 方便：內含 RNase Free Water

Lonza

新世代 Nucleofector™ 核轉染技術系統

直送
細胞核

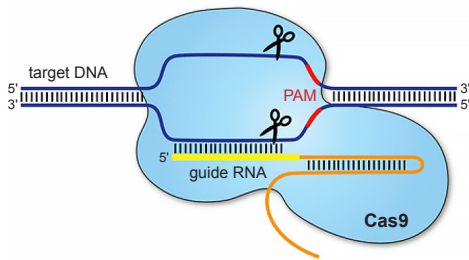
Nucleofector™ 技術已被證明是 CRISPR 的基因組編輯工具的可靠轉染方法

- 將各種遺傳物質引入細胞核的能力 ▶ 實現高效率的基因組編輯
- 對廣泛的細胞類型具有很高的轉染效率，包括 iPSCs、免疫細胞
- 可高效地共同轉染各種遺傳物質
- 可用相同的條件轉染 plasmid、DNA、mRNA、PCR cassettes 或 ssODN

2010 推出，2021 全新改版

超過 750 種細胞類型的優化條件

超過 10,000 多篇的文獻與卓越的技術支持



體驗優異核轉染結果

無毒
安全

高
效率

高
一致性



Non-Viral 高效核轉染

一機解決從開發到製程的各種規模需求



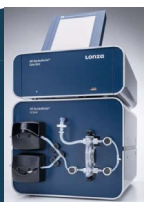
Ease-of-use
Intuitive operation software
and predefined protocols

Research

Substrate variability
same conditions
for DNA, RNA, RNPs

Unmatched scalability
from 1×10^4 up to
 1×10^9 cells

Manufacturing



Lonza

新世代 Nucleofector™ 核轉染技術系統

多篇 **Nature Protocols** 提供了使用 **4D-Nucleofector™** 平台進行 **CRISPR** 轉染的全面性指南：

- Ran, F. Ann, et al. "Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system." *Nature protocols* 8.11 (2013): 2281-2308. (cells: HEK293 and HUES62)
- Ran, F. Ann, et al. "Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity." *Cell* 154.6 (2013): 1380-1389. (cells: various cell lines, e.g. HEK293FT)
- Petit, Constance S., Agnes Roczniak-Ferguson, and Shawn M. Ferguson. "Recruitment of folliculin to lysosomes supports the amino acid-dependent activation of Rag GTPases." *Journal of Cell Biology* 202.7 (2013): 1107-1122. (cells: HeLa)

[Blood Adv. 2020 Jul 28; 4\(14\): 3357–3367.](#)

Large-scale GMP-compliant CRISPR-Cas9-mediated deletion of the glucocorticoid receptor in multivirus-specific T cells

[Basar, Rafet, May Daher, Nadima Uprety, Elif Gokdemir, Abdullah Alsuliman, Emily Ensley, Gonca Ozcan et al.](#)

病毒特异性 T 細胞 (Virus-specific T cells) 已被證明對於治療造血幹細胞移植 (hematopoietic stem cell transplant, HSCT) 後的嚴重患者或難治癒感染患者非常有效。然而，因為患者經常被給予糖皮質激素來治療移植植物對抗宿主疾病 (graft-versus-host disease, GvHD) 等併發症，細胞的療效因使用糖皮質激素而受到阻礙。

為了瞭解這一局限性，作者開發了一種新的策略：利用 CRISPR-Cas9 基因編輯技術與 4D-Nucleofector 快速地生產 GMP 等級的抗糖皮質激素的多病毒特异性 T 細胞 (glucocorticoid-resistant multivirus-specific T cells, VSTs)。此研究顯示，刪除 nuclear receptor subfamily 3 group C member 1 (NR3C1；編碼糖皮質激素受體的基因) 會使得 VSTs 對糖皮質激素的淋巴細胞毒性作用產生抵抗性。在體外和體內有高劑量的 dexamethasone 的情況下，NR3C1-knockout (KO) VSTs 可以殺死它們的目標並成功增殖。

作者也開發了一種可快速生產出具有高 on-target activity 和最小 off-target editing 的 GMP 等級 NR3C1-KO VSTs 的方法。使用基因編輯技術產生的 VSTs 有望成為治療接受糖皮質激素治療的 HSCT 患者的一種新方法。

依據需求選擇合適的電擊模組

- 直接將轉殖物送達至細胞核，不需透過病毒亦可有高核轉染效率，轉染後 2~8 小時即可觀察基因表現
- 高存活率！使用 Conductive polymer 材質，降低金屬離子對細胞的傷害，效率可超過 90%
- 使用靈活，適用反應細胞數從 2×10^4 到 2×10^7 細胞

4D-Nucleofector® 系統的模組化設計，適用於小、中、大規模與貼附細胞或懸浮細胞的核轉染，可自由地配置，滿足特定的實驗需求。



Core unit

4D-Nucleofector® 系統的指揮中心，操作所有功能模組



X unit

適用於懸浮細胞的功能模組



96 well shuttle

高通量模組
一次進行 96 個核轉染反應



Y unit

適用於貼附細胞的功能模組



Scale UP! 進行大規模 GMP 等級轉染

- 密閉系統，可無菌進行大量細胞轉殖，適用細胞數 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^9$
- 可利用小體積先在 X-Unit 進行，優化後的條件可無縫接軌至 LV Unit 進行大規模轉殖
- 4D-Nucleofector™ LogWare 系統控制軟體符合 FDA 21 CFR Part 11 規範



廠牌	貨號	產品	規格
Lonza	AAF-1003B	4D-Nucleofector™ Core Unit	1 Unit
Lonza	AAF-1003X	4D-Nucleofector X Unit	1 Unit
Lonza	AAF-1003Y	4D-Nucleofector™ Y Unit	1 Unit
Lonza	AAF-1003S	4D-Nucleofector® 96-well Unit	1 Unit
Lonza	AAF-1002LW	4D-Nucleofector® LV Unit White	1 Unit

Seki, Akiko, and Sascha Rutz. "Optimized RNP transfection for highly efficient CRISPR/Cas9-mediated gene knockout in primary T cells." *Journal of Experimental Medicine* 215.3 (2018): 985-997. doi.org/10.1084/jem.20171626

Gaj, Thomas, Charles A. Gersbach, and Carlos F. Barbas III. "ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering." *Trends in biotechnology* 31.7 (2013): 397-405. doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.04.004



Clontech Takara cellartis

Knock-out

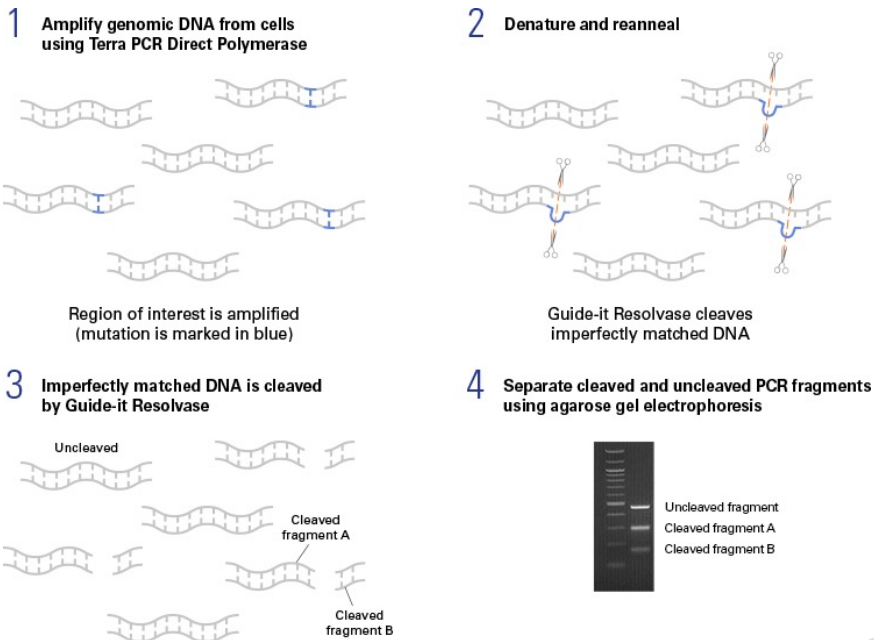
Guide-it™ Mutation Detection Kit #631448

對於 CRISPR/Cas9 編輯 Insertion 或 Deletion 基因位置偵測 NHEJ 修飾與否來確認基因編輯效率，節省昂貴的定序費用

- 方便快捷：利用 PCR 方法即可簡單又快速的檢測出細胞基因的突變，省去定序的昂貴費用與等待時間
- 快速：採用 Terra Direct PCR 技術，不用萃取 DNA 可直接擴增樣品
- 可視化結果：使用 Guide-it Resolvase 辨認 mismatched 的位置，進行雜交 (hybridization) 與切除 (cleavage)，最後用洋菜膠電泳分析即可得知是否有突變基因產生

快速

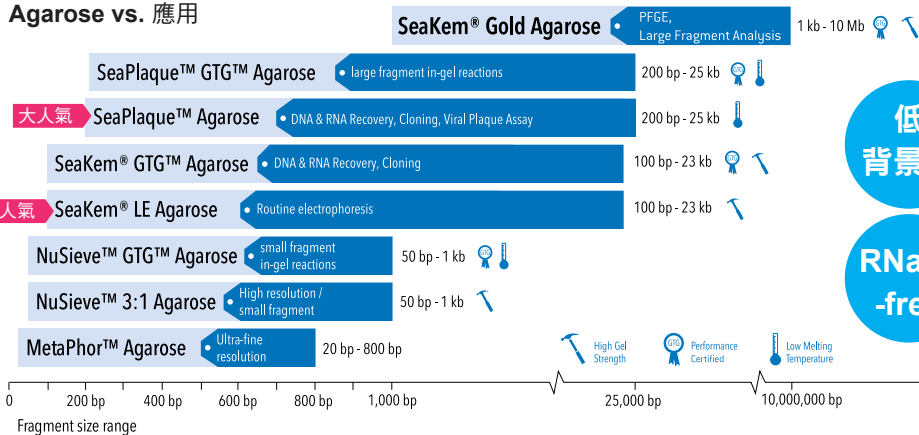
經濟



同場加映

Lonza Agarose 低熔點 / 標準熔點選擇，適合不同應用

Agarose vs. 應用



低背景值
高分辨率
RNase-free
DNase-free

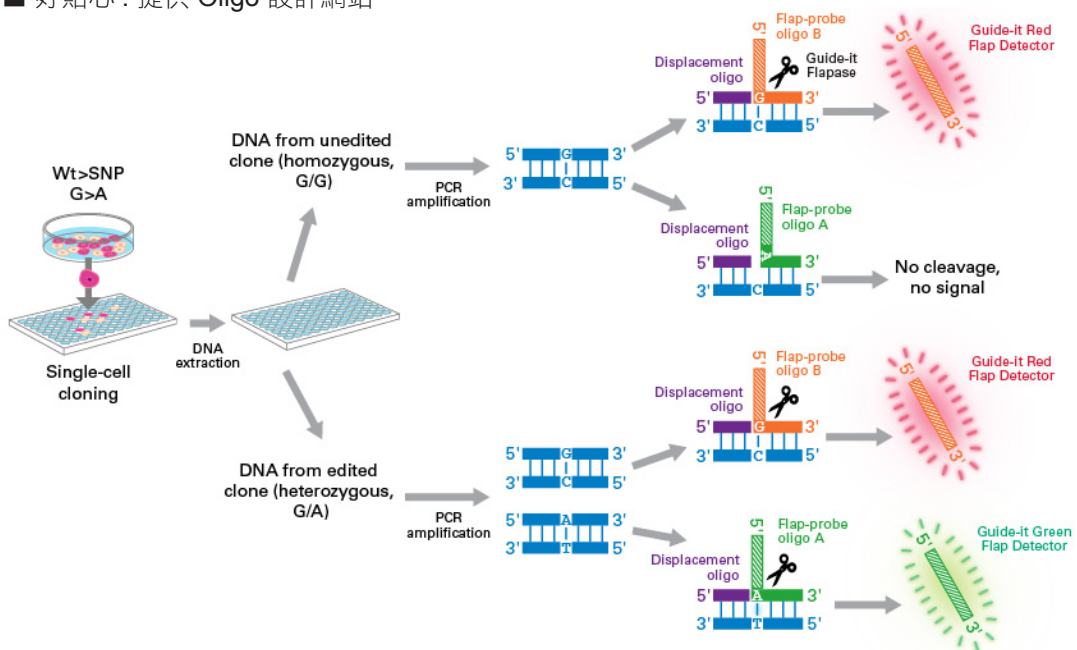
Guide-it™ Knock-in Screening Kit #632659

在精準醫療盛行使用 CRISPR-Cas9 做 Knock-in 單點突變 (Single Nucleotide Polymorphism) 時，提供簡單快速的套組偵測 HDR repair 效率以及鑑定 heterozygous SNP

- 簡單：提供有效且快速的方法偵測成功編輯的 SNP 或長片段 Insertion 的序列，解決以往要培養且分離 single-cell clone 來做基因定序的瓶頸
- 快速：搭配實驗室基礎的工具，只需四小時即可精準辨認基因編輯區域的正確率
- 針對 96 孔盤的 single-cell cloning 提供靈敏的雙螢光辨認 CRISPR-Cas9 Knock-in 實驗中 Homology-directed Repair (HDR) 修飾的成功率
- 篩選套組包含 DNA 萃取試劑、PCR 擴增與雙螢光染劑，使用螢光標記的 Probe Oligo 偵測該基因位置編輯的效率，取代並克服 SNP Array 所需要的高品質 DNA 樣品要求
- 好貼心：提供 Oligo 設計網站

快速

簡單



1. 萃取篩選細胞的 DNA
2. PCR 擴增 (建議片段約 400–800 bp 為佳)
3. 設計並額外訂購 Oligo
4. 使用所設計之螢光的 Oligo 序列，執行 the Guide-it Flapase enzymatic assay，辨認所結合序列，針對成功編輯的位置結合並切割發出螢光訊號，快速判讀基因編輯完成的細胞

其他相關產品

Cas9 protein

Brand	Cat No.	Description	Feature
Sigma-Aldrich	CAS9PROT	Wild-type SpCas9	· 野生菌種來源 · 經濟實惠
	CAS9GFPPRO	Wild-type SpCas9-EGFP Fusion	· 好驗證 · All in one · 高效率
	CAS9D10APR	Cas9D10A Nickase	· 降低脫靶率 · 可一次進行兩個不同 gRNA 的傳遞
	DCAS9PROT	dCas9-3XFLAG™ Biotin	· 突變株 · 有效率:透過獨家技術可打開 DNA 的螺旋
	FNCAS9PROT	FnCas9 Protein	· 適用於 cell-free 系統

Transfection Reagent

Brand	Cat No.	Description	Feature
PolyPlus	101000051 (0.1 mL)	jetOPTIMUS (Plasmid)	· 有效增加轉染效率 · 針對難轉染成功的細胞做強化 · 兼容血清與抗生素，簡單操作且省時 · 使用極少量 reagent 與 DNA 即達到高效率轉染 · 細胞毒性低，維持細胞健康的型態
	101000025 (0.75 mL)		
	101000006 (1.5 mL)		
	101000056 (0.1 mL)	jetMESSENGER (mRNA)	· 針對 mRNA 有高轉染效率 · 保有基因組的完整性 · 細胞毒性低，維持細胞優良的存活率
	101000005 (0.75 mL)		
	101000040 (0.1 mL)	In vivo-jetPEI® (Plasmid、siRNA/miRNA)	· 動物體內高基因表達效率 · 各器官皆有高水準表達 · 提供 GMP 等級試劑輕鬆接軌臨床試驗
	101000030 (0.5 mL)		
	101000013 (0.3 mL)		
	101000021 (1.0 mL)	In vivo-jetRNA® (mRNA)	· 完整包覆 mRNA 並能成功送入動物體內表現 · 各器官皆有高水準表達 · 安全性高，簡單快速的操作

Screening

Brand	Cat No.	Description	Feature
Zymo	D6060	Quick-DNA HMW MagBead Kit	· 可獲得高純度高產量的 DNA
TaKaRa	RR350A	SapphireAmp® Fast PCR Master Mix	· PCR 鑑定使用 · 快速且高效率，可用來擴增 Target 序列，以利定序分析
	RR037A	TaKaRa PrimeScript™ RT Reagent Kit	· 針對 CRISPR/Cas9 Knock-Out 或 Knock-In 基因使用，具快速且高靈敏，可利用 RT-PCR 來分析基因表現

Antibody

Brand	Cat No.	Description	Applications
Sigma-Aldrich	SAB4200701-100UL	Anti-CRISPR/Cas9 antibody, Mouse monoclonal	WB, IP, IF
	SAB4200735-100UL	Anti-CRISPR/Cas9 -FITC antibody, Mouse monoclonal	IF
	SAB4200751-100UL	Anti-CRISPR/Cas9 antibody, Mouse monoclonal	WB, IP, IF



尚有 plasmid、virus 以及細胞培養系列產品，歡迎洽詢。