Genome-CRISPR™ CRISPR 人类 sgRNA 文库

用户手册

广州易锦生物技术有限公司
Guangzhou iGene Biotechnology Co., Ltd.

地址：广州科学城揽月路3号F区F801（510663）
Address : F801, Building F, #3, Lanyue road,
Science park, Guangzhou（510663）

电话(Tel)：(020) 28069288、28069233

订购电话(To order)：4006-020-200

网站： www.igenebio.com

© 2015 GeneCopoeia, Inc.

用户手册

Genome-CRISP™ CRISPR 人类 sgRNA 文库

目录

I. 技术简介.....3

II. 运输及储存条件.....5

III. 入门指南.....7

A. 制备文库.....7

1. 菌种混合文库.....7

2. 转染级质粒 DNA 混合文库.....8

3. 慢病毒颗粒混合文库.....8

B. 分析文库的 sgRNA 表现度.....8

C. 使用 Cas9 稳定表达细胞系进行实验.....9

D. 筛选示值.....10

IV. 实验步骤.....11

A. DNA 转染.....11

B. 慢病毒颗粒转导.....11

C. 筛选.....13

V. 相关产品及服务.....14

VI. 参考文献.....17

VII. 有限使用许可及质保声明.....18

I. 技术简介

通过基因敲除实现的功能缺失型筛选是哺乳动物细胞系统基因分析、促进基因研究、基因组级别功能调查（如信号转导通路）以及药物研究（如靶标甄别和药物机制研究）的强大工具。

最近研究者开始使用 CRISPR sgRNA 文库取代 shRNA 文库来实现基因敲除。在CRISPR-Cas9系统中，sgRNA 与 Cas9 核酸内切酶的复合物能在目的片段生成DNA双链断裂（double-strand breaks, DSBs），诱发由非同源末端连接（NHEJ）修复机制造成的移码突变。

Genome-CRISP™ 人类 sgRNA 文库使用慢病毒载体，可通过两种不同方法（直接转染或包慢病毒颗粒后转导）实现大规模功能筛选。对于每个目的基因，我们会至少设计2个带有 barcode 序列的 sgRNA 分别靶向基因的不同序列区（极少数基因由于序列限制只能设置1条 sgRNA）。这些 sgRNA 序列都经过设计优化、单独进行克隆并测序验证，确保高效的基因敲除。

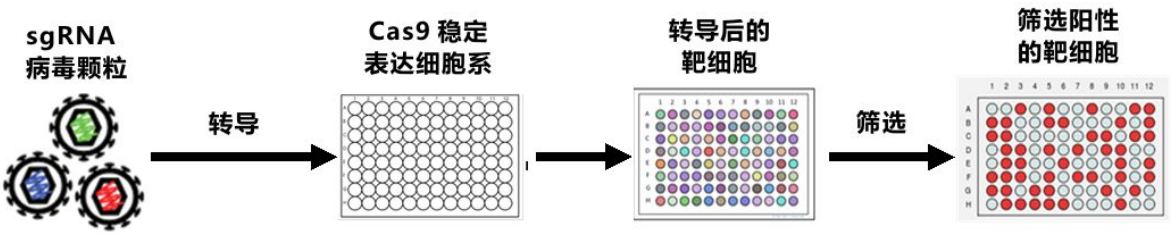


图 1. 使用 sgRNA 文库进行大规模筛选的示意图

优势

- 每个 sgRNA 文库克隆都是单独构建，经过测序验证、分别培养后再混合，以保证文库的质量及对目的基因家族的 sgRNA 表现度。
- 可提供预制或定制 sgRNA 文库。
- 每个目的基因设计2条或更多 sgRNA。
- 多种产品规格可供选择，如慢病毒颗粒混合文库、转染级质粒DNA混合文库或菌种混合文库。

应用

- 使用大量 sgRNA 分别或混合进行高通量基因敲除筛选。
- 药物靶标研究（见附录图2）。

Genome-CRISP™ 人类 sgRNA 文库所有的 sgRNA 克隆都是单独进行构建和培养，之后再混合成菌液文库，直接寄送给客户或用于转染级质粒混合文库及气候的慢病毒颗粒混合文库的生产。（图 2）

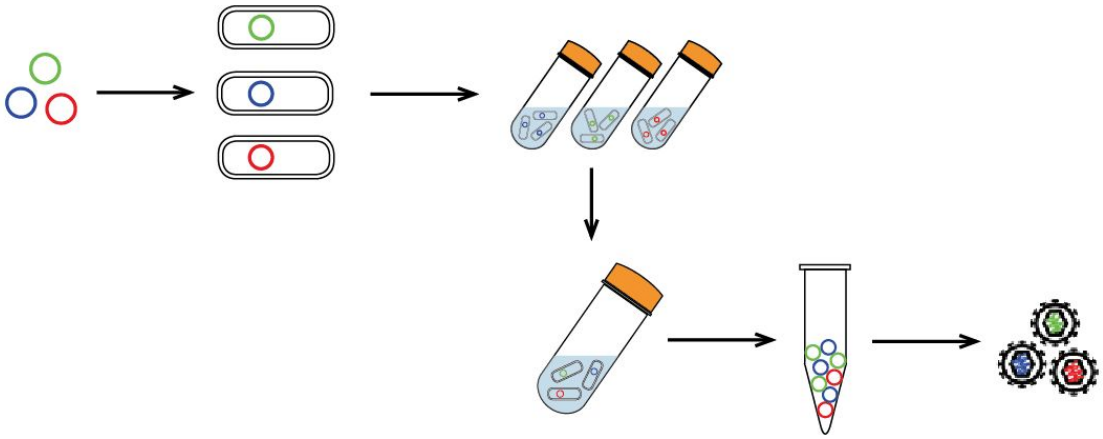


图 2. Genome-CRISP™ 人类 sgRNA 文库混合方法

文库针对每个靶基因分别设计 2 个 sgRNA “A” 和 “B”。所有的 “A” sgRNA 和 “B” sgRNA 会各自分开，属于两个不同的分文库。每个分文库含有不超过 150 个 sgRNA。（图 3）

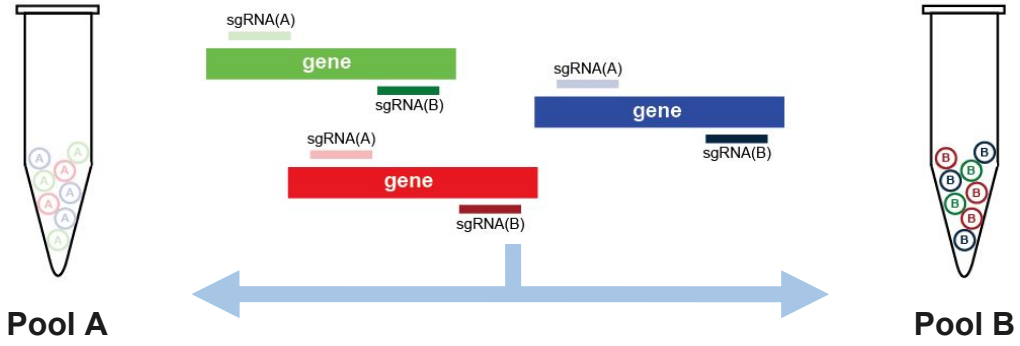


图 3. Genome-CRISP™ 人类 sgRNA 分文库的原则

II. 运输储存条件

- **混合文库，菌种：**每管体积约 1 mL的甘油菌种。

货号	文库	文库组成	运输及储存条件
L01-LS03-B1	Innate kinases & ubiquitin ligases	4 管，每管 118-119 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存。
L02-LS03-B1	Nuclear hormone receptors	2 管，每管118 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存。
L03-LS03-B1	Tumor metastasis genes	2 管，每管 57 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存。
L04-LS03-B1	Oncogenes	4 管，每管 144 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存。
L05-LS03-B1	Tumor suppressor genes	4 管，每管 115-116 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存。
L06-LS03-B1	Protein kinases	10 管，每管 130-131 个 sgRNAs	干冰运输。-80°C储存。
L07-LS03-B1	Key genes in 50 pathways	2 管，每管 139 个sgRNA	干冰运输。-80°C储存。

- **混合文库，转染级质粒：** 每管约 20-30 mg 的转染级质粒 DNA。

货号	文库	文库组成	运输及储存条件
L01-LS03-F1	Innate kinases & ubiquitin ligases	4 管，每管 118-119 个 sgRNA	冰袋运输。-20°C储存。
L02-LS03-F1	Nuclear hormone receptors	2 管，每管118 个 sgRNA	冰袋运输。-20°C储存。
L03-LS03-F1	Tumor metastasis genes	2 管，每管 57 个 sgRNA	冰袋运输。-20°C储存。
L04-LS03-F1	Oncogenes	4 管，每管 144 个 sgRNA	冰袋运输。-20°C储存。
L05-LS03-F1	Tumor suppressor genes	4 管，每管 115-116 个 sgRNA	冰袋运输。-20°C储存。
L06-LS03-F1	Protein kinases	10 管，每管 130-131 个 sgRNAs	冰袋运输。-20°C储存。
L07-LS03-F1	Key genes in 50 pathways	2 管，每管 139 个sgRNA	冰袋运输。-20°C储存。

- **混合文库，慢病毒颗粒：**每管 含2.5 x 10^6 TU、体积为 25 µL. 的慢病毒颗粒。

货号	文库	文库组成	运输及储存条件
L01-LS03-P1	Innate kinases & ubiquitin ligases	4 管，每管 118-119 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存。
L02-LS03-P1	Nuclear hormone receptors	2 管，每管118 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存
L03-LS03-P1	Tumor metastasis genes	2 管，每管 57 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存
L04-LS03-P1	Oncogenes	4 管，每管 144 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存
L05-LS03-P1	Tumor suppressor genes	4 管，每管 115-116 个 sgRNA	干冰运输。-80°C储存
L06-LS03-P1	Protein kinases	10 管，每管 130-131 个 sgRNAs	干冰运输。-80°C储存
L07-LS03-P1	Key genes in 50 pathways	2 管，每管 139 个sgRNA	干冰运输。-80°C储存

其他所需材料（视您的具体实验需要，下述材料可能是必须的，但并不会随试剂盒提供）

货号	产品	应用
Clv-PK-01	GeneCopoeia 293Ta 慢病毒颗粒包装细胞系	包装慢病毒颗粒 。
HPK-LvTR-20 HPK-LvTR-40 HPK-LvTR-50 HPK-LvTR-100	GeneCopoeia Lenti-Pac™ HIV 慢病毒颗粒包装试剂盒	包装慢病毒颗粒 。
CP-LvC9NU-01 CP-LvC9NU-02	Genome-CRISP™ Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆	可用于包装 Cas9 核酸酶慢病毒颗粒，或用于生成基因组带有随机整合的 Cas9 核酸酶基因、能稳定表达 Cas9 核酸酶的稳定细胞系。
LPP-CP-LvC9NU-01-100 LPP-CP-LvC9NU-02-100	Cas9 核酸酶纯化 Lentifect™ 慢病毒颗粒	用于与 sgRNA 慢病毒颗粒共转导，或用于生成基因组带有随机整合的 Cas9 核酸酶基因、能稳定表达 Cas9 核酸酶的稳定细胞系。
SCL-01-CA1 SCL-02-CA2	稳定表达 Cas9 核酸酶基因的人类单克隆细胞系	方便转染或转导 sgRNA，尤其适用于高通量实验应用。

III. 入门指南

A. 准备文库

GeneCopoeia 的 Genome-CRISP™ CRISPR 人类 sgRNA 文库有三类不同的混合文库：菌种、转染级质粒 DNA 以及慢病毒颗粒。请按照以下指南进行文库的使用准备工作：

1. 菌种混合文库。 用于提取转染级质粒 DNA 和/或 慢病毒颗粒。请按以下步骤制备：

注：为使文库的每条 sgRNA 有均等的表现度，不建议直接接种液体培养基进行放大培养。建议将混合文库的菌种用 LB + 氨苄霉素的琼脂糖平板涂板，并刮取收集菌落。每个 10 厘米平板一般能提出 30 μg 质粒 DNA。可使用少量提取的离心柱进行质粒提取。如实验需要更高的质粒产量，可使用更大的平板培养 或/和 增加平板数扩大培养规模。

a) 每管菌种文库使用 1 个含氨苄霉素的 10 厘米 LB 平板。平板使用前应在 37℃ 预热1-2 小时。

b) 在室温下待文库菌种完全解冻，再放置在冰上。

c) 轻敲并颠倒菌种管数次以彻底混匀菌种文库。切勿涡旋混匀。

注：如需多次制备质粒 DNA，请先等量分装多管文库菌种，避免反复冻融。分装后的菌种需储存于 -80℃。

d) 每管文库菌种取 1 μL ，稀释到 1 mL LB 液体培养基中，彻底混匀。

e) 稀释后的文库菌种，每管取 200 μL 涂布到预热的含氨苄霉素 LB 平板上。确保菌种尽可能地涂布均匀。

f) 翻转平板在 37℃ 孵育 16-18 小时。

注：每块平板应可见有 0.5-2 x 10^5 个单菌落，不应长成菌苔。

g) 每块平板加 5 mL LB 培养基，用细胞涂布器或刮取器刮取菌落。

h) 吸取含有刮下菌落的培养基，转移到 15mL 离心管。

i) 重复步骤 g 和 h。

j) 4,000 rpm 下离心 10 分钟。

k) 请按照您使用的质粒准备试剂盒供应商提供的说明进行后续的质粒 DNA 提取。

2. 转染级质粒 DNA 混合文库。

包装慢病毒颗粒方面，推荐使用 GeneCopoeia 的 Lenti-Pac™ 包装产品（http://www.igenebio.com/product/lentiviral-packaging-kit-cells/）并参考 Lenti-Pac™ 慢病毒包装技术的相关技术文档 。

转染细胞系方面，推荐使用 GeneCopoeia 的 Endofectin™ 转染试剂（http://www.igenebio.com/product/endofectin/）。

3. 慢病毒颗粒混合文库。慢病毒颗粒混合文库为即用型。慢病毒转导实验步骤请参考章节 IV。

B. 分析文库的 sgRNA 表现度

如果您是自行放大培养菌种文库来准备实验用的质粒 DNA，很重要的一点就是保证各 sgRNA 在文库有尽可能一致的表现度。我们推荐您在文库中抽样分析一组 sgRNA（约占文库总 sgRNA 数的 10%），通过使用 1 条非 sgRNA 特异引物配合 1 条 sgRNA 特异引物进行 PCR 扩增。您可以从 GeneCopoeia 为文库中的任意 sgRNA 克隆定制类似的引物。

1. 按下述体系配置 PCR 反应母液：

成分	每反应体系用量
5X PCR Buffer	5 μL
纯化后的混合文库质粒 DNA	~10 ng
引物（5pmol/μL）	2 μL
25mM dNTP	0.2 μL
PCR polymerase（5U/μL）	0.25 μL
20mM $Mg2^{+}$	2.5 μL
ddH2O	to 25 μL
总体积	**25 μL**

2. 将 PCR 反应母液等量分装至各 PCR 管或 PCR 反应板孔。

3. 在每反应体系加入体积相等、浓度为 5pmol/μL 的各 sgRNA 特异引物（2 μL 每反应体系）。

4. 轻轻吹打混合均匀。

5. 封好 PCR 反应板或盖上管盖，使用下述 PCR 反应程序：

94℃	5 min	1 cycle
94℃	30 s	
58℃	30 s	25 cycles
72℃	30 s	
72℃	5 min	1 cycle

C. 使用 Cas9 稳定表达细胞系进行实验

为保证所有的文库 sgRNA 在各细胞中都有最好的结果，我们推荐您使用基因组整合了 Cas9 核酸酶基因，能稳定表达 Cas9 核酸酶的细胞系进行实验。您可以通过以下介绍的几种办法获得 Cas9 核酸酶稳定表达细胞系：

1. 用 Cas9核酸酶慢病毒颗粒（图 4A）转导您的细胞系。您可以订购 Cas9 核酸酶表达质粒 DNA（GeneCopoeia 货号 CP-LvC9NU-01, CP-LvC9NU-02）和自行包装慢病毒颗粒，Lenti-Pac™ 表达包装系统（http://www.igenebio.com/product/lentiviral-packaging-kit-cells/）。此外，您也能订购预制的 Cas9 慢病毒颗粒（GeneCopoeia catalog numbers LPP-CP-LvC9NU-01-100, LPP-CP-LvC9NU-02-100）进行实验。通过使用 Cas9 慢病毒颗粒对细胞进行转导，并进行 G418 筛选，可以获得基因组随机整合了 Cas9 表达质粒序列的稳定细胞系。

2. 用 GeneCopoeia 人类 AAVS1 Safe Harbor 敲入试剂盒及 Cas9 敲入克隆（货号 DC-C9NU-04，DC-C9NU-05；图 4B）将 Cas9 核酸酶基因敲入到人类基因组上的 AAVS1 位点（http://www.igenebio.com/product/aavs1-safe-harbor/）。这种方法对细胞无副作用，且能获得持续稳定表达 Cas9 核酸酶、。通过特异靶向 AAVS1 位点的 TALEN 或 CRISPR 将 Cas9 核酸酶基因的稳定细胞系。

3. GeneCopoeia 提供预制的 Cas9 稳定表达细胞系，同时也能为您提供定制服务，将 Cas9 核酸酶基因稳定整合到您选择的细胞系。详情请见：
http://www.igenebio.com/product/cas9-cell-line/ 。

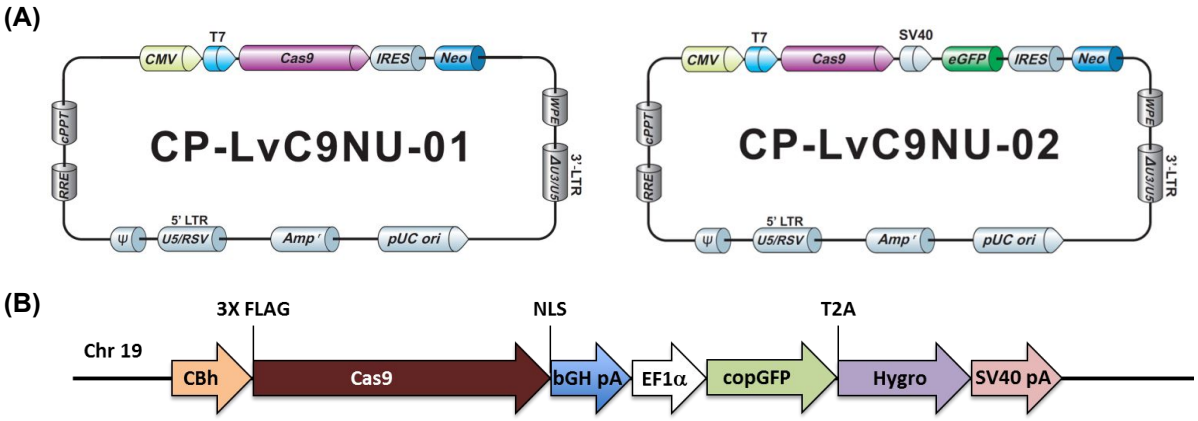


图 4. Cas9 核酸酶表达质粒。（A）Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆s CP-LvC9NU-01（左，无荧光报告基因）和 CP-LvC9NU-02（右，带 eGFP 荧光报告基因）。**（B）**稳定整合到人类 AAVS1 safe harbor 位点的 Cas9 核酸酶表达组件。

D. 筛选示值

使用 Genome-CRISP™ 人类 sgRNA 文库的关键是在转染或转导后进行的细胞筛选。文库的 sgRNA 设计成能通过细胞的 NHEJ 机制在各等位基因的 mRNA 启动子附近造成移码，达到基因敲除的目的。您需要一个能直接观察到的表型或一个方便的检测方法，才能有效使用 sgRNA 文库筛选到您所需的基因敲除和目的基因。

您的筛选示值取决于您使用Genome-CRISP™ 人类 sgRNA 文库研究的特定问题。以下是几种筛选应用的例子：

1. 药物靶标研究。敲除掉文库靶基因的一个子集有可能是致死的。通过连续稀释法在96孔培养板上获得单克隆细胞系，应能观察到大多数培养孔有健康、正在进行分裂的细胞，但部分培养孔中的细胞则出现生长率下降或无活细胞的现象。筛查存活的克隆中缺了哪些 sgRNA 。它们的靶基因即为药物靶标的候选。

2. 药物抗性。一种特定的药物有可能对野生型细胞有致死性。敲除掉文库靶基因的一个子集有可能使细胞对药物产生抗性，为药物动力学研究提供帮助和间接。确定存活细胞中哪些基因被修饰，即能发现该药物的靶标候选。

3. 可见的细胞表型变化。举个例子：能在软琼脂上生长的细胞是一个经典的癌细胞转移示值。敲除掉文库靶基因的一个子集后，原来非侵入性的细胞开始能在软琼脂上生长。鉴定这些入侵性的细胞有哪些基因被修饰，即能找到对既定实验条件下癌细胞转移有重要作用的候选基因。

4. 蛋白质运输。敲除掉文库靶基因的一个子集有可能会导致蛋白质定位发生亚细胞水平的变化。如蛋白质本身有融合荧光标签（如 GFP），即能借此对定位变化进行追踪。

5. 转录激活。敲除掉文库靶基因的一个自己有可能会导致一个受某启动子序列控制的荧光报告基因（如 GFP）表达被激活。

IV. 实验步骤

A. DNA 转染

注：了解嘌呤霉素杀死对药物敏感的细胞所需的最低浓度。Genome-CRISP™ CRISPR 人类 sgRNA 文库质粒带有嘌呤霉素抗性基因，能用于筛选基因组整合 sgRNA 表达质粒（图5）的稳定细胞系。如您未知嘌呤霉素杀死对药物敏感的细胞的最低浓度，则应先用连续稀释法稀释的嘌呤霉素进行预实验，获得致死曲线。本步骤极为重要，因为慢病毒转导需要在转导后不久即进行嘌呤霉素筛选。

我们推荐您使用 GeneCopoeia Endofectin™ 转染试剂盒（货号：EFL1001-01, EFL1001-02, EFL1003-01, EFL1003-02）。实验请参考试剂盒提供的详细 DNA 转染实验方法。

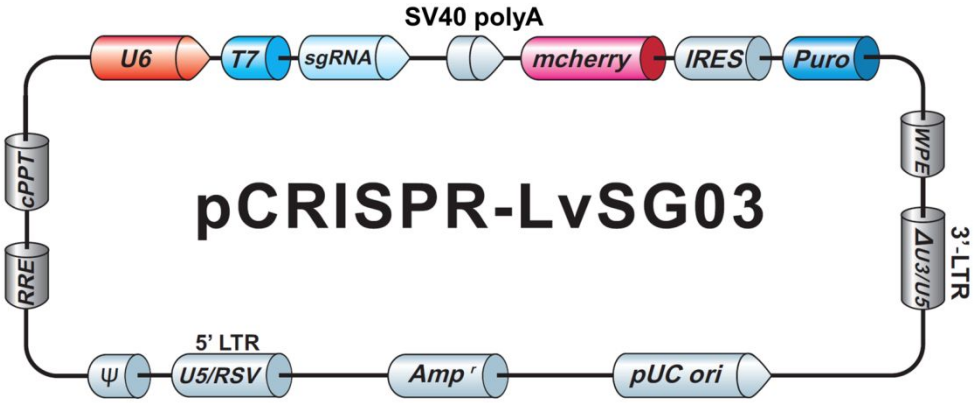


图 5. Genome-CRISP™ CRISPR 人类 sgRNA 文库所使用的慢病毒载体。

B. 慢病毒转导

使用 sgRNA 慢病毒颗粒转导您的细胞前，需考虑以下问题：

1. 了解嘌呤霉素杀死敏感细胞所需的最低浓度。详情请见“B. See previous section, “B. DNA 转染细胞”。

2. 了解您细胞系的 MOI 值。如您未了解该信息，则应先用连续稀释法稀释的 pCRISPR-LvSG03 阴性对照病毒颗粒（GeneCopoeia 货号：阴性对照慢病毒颗粒——LPP-CCPCTR01-LvSG03；如希望使用菌液或转染级质粒自行包装——CCPCTR01-LvSG03-B 或 CCPCTR01-LvSG03-10）对您的细胞系进行转导和滴定。连续稀释的细胞如果含有慢病毒颗粒，可以显微镜下观察到 mCherry 的荧光。

第一天：细胞涂板

病毒转导前 24 小时，在 24 孔板上每孔涂布 2–10 x 10^4 个靶细胞。每孔使用 0.5 mL 添加了 5% 热灭活胎牛血清的细胞特定培养基以及青霉素-链霉素（可选）。在 5% CO_2 和 37℃ 下孵育过夜。

注：保证细胞在转导时达到 70-80% 融合。实际需要涂板的细胞数取决于细胞类型。

第二天：靶细胞转导

每孔准备 0.5 mL 病毒悬液。病毒悬液由凝聚胺终浓度为 5-8 μg/mL 的完全培养基稀释而成。

注：使用浓度不同的假病毒（0.1 μL 至 100 μL）同时进行实验。我们推荐标准慢病毒颗粒使用0.1 μL、0.3 μL、3 μL、10 μL、30 μL的浓度梯度，纯化病毒使用 0.1 μL、0.3 μL、0.5 μL、0.7 μL、0.9 μL 的浓度梯度。 用颠倒混匀的方法轻柔地混合病毒与培养基。切勿涡旋混匀。此外，我们推荐您在转导中使用 eGFP 对照及其它合适的阳性和阴性对照。

1. 去除旧培养基，每孔添加 0.5 mL 稀释的病毒悬液以感染细胞，再添加 0.5 mL 含凝聚胺的完全培养基。培养板置于 5% CO2 和 37℃ 下孵育过夜。（可选：将培养板置于 4-8°C 下 2 小时，然后转移到5% CO2 和 37℃ 下孵育过夜）。)

注：含病毒的细胞在低温下孵育 2 小时能显著增加转导效率。但如果细胞不能耐受低温，则应该跳过这个步骤。

第三天：替换培养基 / 分盘培养

用 0.5 mL 新鲜的完全培养基（不含聚凝胺）替换旧培养基。 另外，可以将细胞以 1：5 到1：25 的比例（取决于细胞类型）进行胰蛋白酶处理及重接种到 6 孔培养板或 10 cm 培养板上，继续在细胞特定培养基中孵育 48 小时。

第五天：分析转导后细胞或药筛稳定转导的细胞

感染后的靶细胞可以使用合适的方法检测转入基因的瞬时表达。如果使用 eGFP 对照，可以用细胞计数器或荧光显微镜对荧光细胞进行计数。如需筛选稳定转导的细胞，每 3-4 天使用新鲜的含筛选药物的完全培养基替换旧培养基，直到带抗性的细胞群落可见（通常在筛选后的 7-14 天）。

C. 筛选

筛选策略取决于您的实验“示值”，比如您目的的表现或您使用的检测方法。但筛选策略通常都会包含一些通用的元素，如图 6 所展示的步骤：

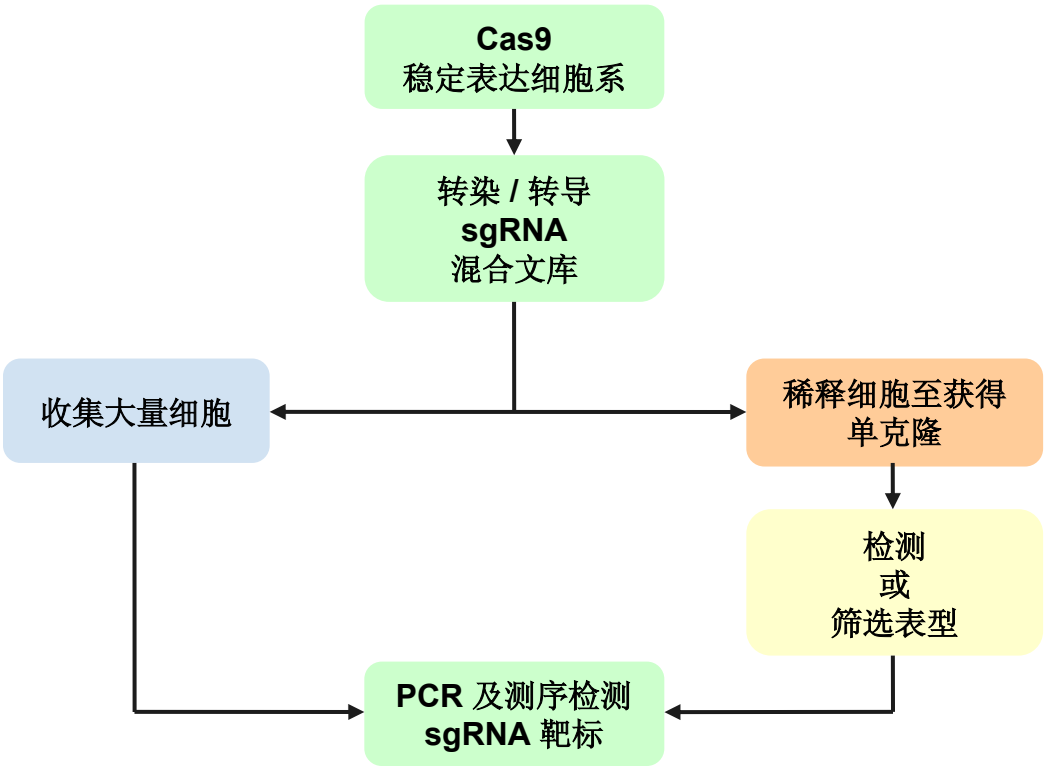


图 6. Genome-CRISP™ CRISPR 人类 sgRNA 文库使用及筛选流程。

不论您使用何种表型或测试获得文库筛选的示值，都需要鉴定是哪些基因被敲除而导致了示值的改变。我们推荐您进行以下步骤：

1. 使用错配酶切检测分析所有文库靶基因的基因型。错配酶切检测的目的是确认哪些基因带有 CRISPR 介导的敲除突变。使用 GeneCopoeia IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系（货号：ICPE-050, ICPE-200）。该项测试可针对混合的细胞或者分离后的单克隆，请参考 IndelCheck™ 检测体系的相关文档提供的实验方法进行操作。

2. 错配酶切检测鉴定出来的候选基因必须进行进一步的确证。您可以使用候选基因的 sgRNA 表达克隆转染细胞，或使用它们的慢病毒颗粒对细胞进行转导，观察您是否能够重现与之前的筛选同样的表现变化或检测结果。如果您此前使用的是混合文库，您可以直接向 GeneCopoeia 订购单独的sgRNA 克隆或其慢病毒颗粒。

V. 相关产品及服务

Genome-CRISP™ Cas9 稳定表达细胞系

GeneCopoeia 提供稳定表达 Cas9 核酸酶的稳定细胞系。这些细胞系能方便您进行高效的 CRISPR 基因组编辑应用，如使用 sgRNA 文库进行高通量功能缺失型筛选。

我们提供预制的人类或小鼠 Genome-CRISP™ Cas9 稳定表达细胞系（如 H1299 或 HEK293T）。这些细胞系的基因组 safe harbor 位点（如人类 AAVS1）都稳定整合了 Cas9 核酸酶基因。此外，我们提供客户定制服务，将 Cas9 核酸酶基因稳定整合到您所需的细胞系中。

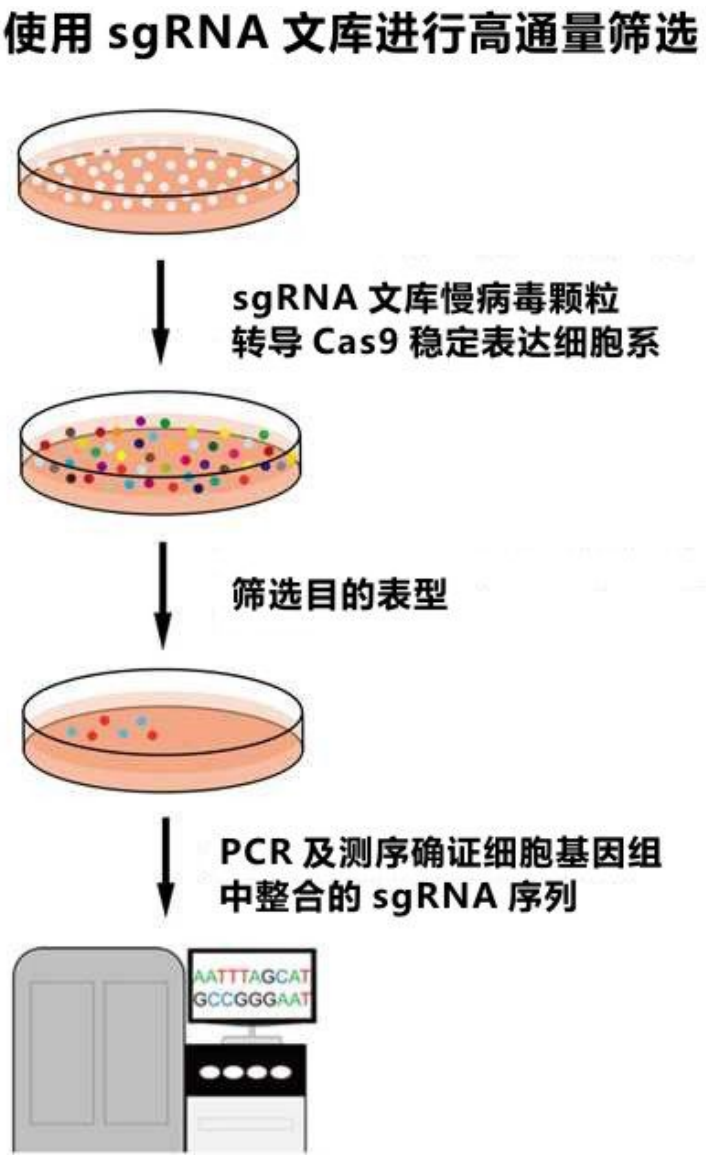


图 7. 使用 Cas9 稳定细胞系及 sgRNA 混合文库进行高通量筛选。

稳定表达 Cas9 核酸酶的人类细胞系

货号	应用	细胞系	启动子	Cas9 整合位点	产品规格
SCL-01-CA1	方便转染或转导 sgRNA，特别适合高通量应用。	人类 H1299	CMV	AAVS1	1 管，2 x 10^6 个细胞
SCL-02-CA2		人类 HEK293T	CBh	AAVS1	1 管，2 x 10^6 个细胞

靶向人类 AAVS1 safe harbor 位点的 Cas9 敲入克隆

货号	产品	应用	筛选标记	启动子	Cas9 整合位点
DC-C9NU-03	Cas9 AAVS1 敲入克隆	使用 TALEN 或 CRISPR 将 Cas9 核酸酶基因敲入到人类 AAVS1 Safe Harbor 位点	Puro	CBh	AAVS1
DC-C9NU-04			Hygro	CBh	AAVS1
DC-C9NU-05			Neo	CBh	AAVS1

人类 AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒

货号	产品	描述
SH-AVS-K100	Genome-TALER™ 人类 AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒	包括： AAVS1 TALEN 组合(TN-AAVS1) AAVS1 供体克隆载体 (DC-DON-SH01) AAVS1 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH01) 基因敲入验证引物组合(HQPAVSHR)
SH-AVS-K000	Genome-TALER™ 人类 AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒（不含供体载体）	包括： AAVS1 TALEN 组合(TN-AAVS1) AAVS1 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH01) 基因敲入验证引物组合(HQPAVSHR)
SH-AVS-K200	Genome-CRISP™ 人类 AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒	包括： AAVS1 sgRNA/Cas9 表达克隆 (HCP-AAVS1-CG02) AAVS1 供体克隆载体 (DC-DON-SH01) AAVS1 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH01) 基因敲入验证引物组合(HQPAVSHR)
SH-AVS-K002	Genome-CRISP™ 人类 AAVS1 safe harbor 基因敲入试剂盒（不含供体载体）	包括： AAVS1 sgRNA/Cas9 表达克隆 (HCP-AAVS1-CG02) AAVS1 阳性对照供体克隆 (DC-RFP-SH01) 基因敲入验证引物组合(HQPAVSHR)

定制 CRISPR sgRNA 文库

我们除了提供预制的人类 CRISPR sgRNA 文库，也能针对您选定的一系列基因构建定制的 sgRNA 文库。如您需要定制 sgRNA 文库，请联系我们的客服 sales@igenebio.com。

稳定细胞系定制服务

GeneCopoeia 能为您定制基因组带有 TALEN 或 CRISPR 介导的位点特异基因组修饰的稳定细胞系。全套服务包括项目咨询、TALEN、CRISPR-Cas9 及供体克隆的设计及构建、修饰阳性的单克隆细胞系筛选及分离，还有主细胞库的构建。我们的细胞系服务也提供 safe harbor 整合体系方面的服务。 .如您需要了解更多关于我们的基因组编辑稳定细胞系服务的信息，请联系我们的客服 sales@igenebio.com。

预制 Cas9 核酸酶慢病毒颗粒

货号	产品	启动子	报告基因 / 筛选标记
LPP-CP-LvC9NU-01-100	Cas9 核酸酶纯化 Lentifect™ 慢病毒颗粒（100 µl x 1 vial, >1x10^7 TU/mL）	CMV	Neomycin
LPP-CP-LvC9NU-02-100		CMV	eGFP/Neomycin

Genome-CRISP™ Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆

货号	产品	启动子	报告基因 / 筛选标记
CP-LvC9NU-01	Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆	CMV	Neomycin
CP-LvC9NU-02	Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆	CMV	eGFP / Neomycin

IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系

货号	产品	描述
ICPE-050	IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系（50个反应）	I包含靶点 PCR 试剂盒 （TPCR-050）及 T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒（TENI-050）
ICPE-200	IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系（200个反应）	包含靶点 PCR 试剂盒 （TPCR-200）及 T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒（TENI-200）
TPCR-050	靶点 PCR 试剂盒，50 个反应	PCR 扩增基因组上的靶点序列
TPCR-200	靶点 PCR 试剂盒，200 个反应	PCR 扩增基因组上的靶点序列
TENI-050	T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒，50 个反应	使用 T7 核酸内切酶 I 剪切错配的PCR产物，以检测插入缺失突变。
TENI-200	T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒，200 个反应	使用 T7 核酸内切酶 I 剪切错配的PCR产物，以检测插入缺失突变。

VI. 参考文献

1. Shalem, et al. (2014). Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. Science 343, 84.

2. Wang, et al. (2014). Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. Science 343, 80.

3. Zhou, et al. (2014). High-throughput screening of a CRISPR/Cas9 library for functional genomics in human cells. Nature 509, 487.

VI. 有限使用许可及质保声明

有限使用许可

Following terms and conditions apply to use of the Genome-CRISPR™ human sgRNA libraries (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products or deliver information obtained in service without prior written consent from GeneCopoeia. This Product should be used in accordance with the NIH guidelines developed for recombinant DNA and genetic research. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

有限质量保证

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 301-762-0888.

© 2015 GeneCopoeia, Inc.