

## 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室 Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core

本期編輯：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室 黃呈彥

編輯委員：鄧述諄 詹迺立 楊偉勛 林淑華 林泰元

本期目錄：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介

申請方式與服務流程

基因剔除(剔入)實驗應注意事項

基因剔除(剔入)實驗方法介紹：

靶位設計 基因轉殖 基因剔入實例



# 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介

為協助醫學校區學術研究，醫學院研究發展分處第一共同研究室在2014年4月於人類疾病模式生物中心(Human disease modeling center)底下增設基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室(Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core)，由黃呈彥博士負責相關業務。服務與收費方式詳見醫學院研發分處第一共研人類疾病模式生物中心網頁：

<http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/hd/cell.asp>

設置地點：醫學院基礎醫學大樓R1448, R1442 & R1439

開放時間：週一至週五 9:00~17:00

使用資格：本校各科系所實驗室或計畫及附設醫院各科部負責人為主

服務項目：基因剔除(剔入)靶位設計

載體構築

基因剔除(剔入)活性測試

基因剔除(剔入)細胞株篩選

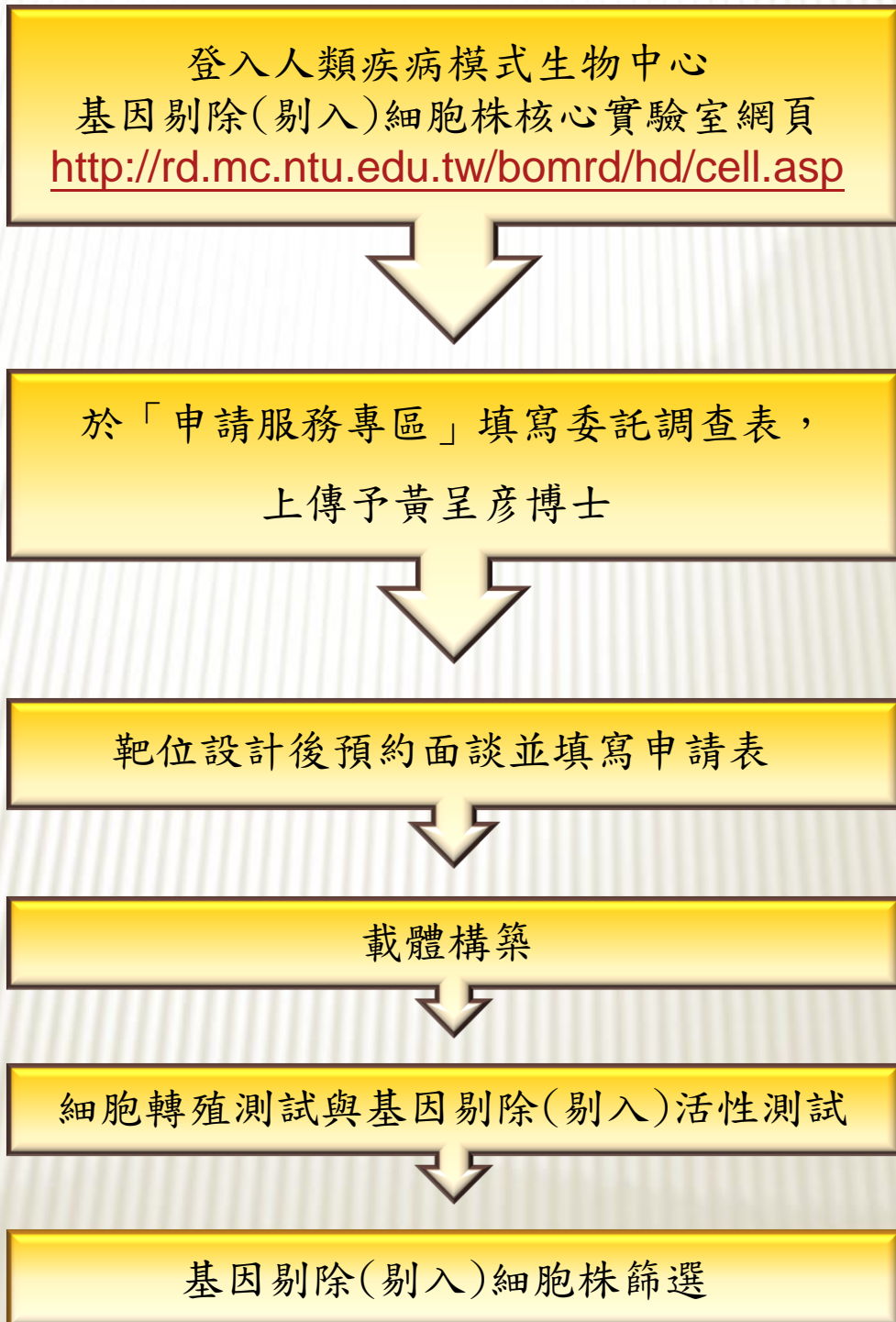
聯絡方式：電子郵件 [cyh0729@ntu.edu.tw](mailto:cyh0729@ntu.edu.tw)

分機 88930或88507

(請多利用電子郵件聯絡，謝謝。)



# 申請方式與服務流程







# 申請方式與服務流程

進入人類疾病模式生物中心基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室網頁  
<http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/hd/cell.asp>

rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/hd/cell-7.asp

Human Disease Modeling Center  
**人類疾病模式生物中心**  
國立臺灣大學醫學院 National Taiwan University College Of Medicine

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共研服務使用成員註冊

Google 自訂搜尋

最新公告 本中心簡介 基因剔除(剔入)細胞株核心 台灣酵母菌生物資源中心 酵母菌模式 果蠅模式 線蟲模式 小鼠模式 Q&A及留言板

本中心成員登入 Members Login  
帳號   
密碼   
登入 忘記密碼

**基因剔除(剔入)細胞株**

- 簡介
- 實驗原理與技術
- 委託服務流程
- 注意事項
- 收費標準
- 致謝格式

**申請服務專區**

- 基因剔除(入)
- 實驗耗材

**會員須知** Member Notice

- 如何成為本中心成員
- PI專區(可修改個人資料)

**使用管理辦法** User Rules

- 人類疾病模式生物中心
- 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

**友站連結** Links

- 核酸定序核心
- 流式細胞分析暨分選核心
- 顯微影像核心
- 生醫資源中心

**基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室**  
國立臺灣大學醫學院 National Taiwan University College Of Medicine

申請服務專區

首頁 · 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

填寫委託調查表 >> 委託調查列表 >> 進行中列表 >> 已領貨列表

**新成員註冊,預約權限開通與網路下單流程等相關注意事項**

- PI如何取得帳號密碼?**  
若要取得帳號密碼,請洽詹琍婷 博士, 電郵:ltjiang@ntu.edu.tw ; 分機:88931/88507。
- 下單服務限制**  
取得帳號密碼並"登入"後即可至下列核心下單:  
「台灣酵母菌生物資源中心」(開放校內外PI申請)  
「酵母菌模式核心」(限台大校內PI)  
「果蠅模式核心」(限台大校內PI)  
「線蟲模式核心」(限台大校內PI)  
「小鼠模式核心」(限台大校內PI)  
「基因剔除(剔入)細胞株實驗室」(限台大校內PI)
- 欲進行人類疾病模式生物中心網路下單時,請先前往本中心網頁左側"本中心成員登入"後,再點選左側之"申請服務專區"即可進行下單。
- 請特別注意**,欲使用本中心實驗室服務的人員,如非計畫主持人(PI),必需徵得計畫主持人本人同意後,方可代為下單。
- 每次下單後,系統會自動電郵給計畫主持人,告知下單情形。

**填寫委託調查表**

國立臺灣大學醫學院第一共同研究室人類疾病模式生物中心  
Human Disease Modeling Center of the First Core Laboratory, College of Medicine, National Taiwan University  
管理人員: 詹琍婷 博士 TEL: 02-23123456 ext 88931/88507 E-mail: ltjiang@ntu.edu.tw

登入後點選左側「申請服務專區」填寫委託調查表，按下下方「確認送出委託調查表」即可。



本中心成員登入  
Members Login

您好, 黃星彥

我要登出

基因剔除(剔除)細胞株

- 簡介
- 實驗原理與技術
- 委託服務流程
- 注意事項
- 收費標準
- 致謝格式
- 申請服務專區**
- 基因剔除(入)
- 實驗耗材

會員須知  
Member Notice

- 如何成為本中心成員
- PI專區(可修改個人資料)

使用管理辦法  
User Rules

- 人類疾病模式生物中心
- 基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室

友站連結  
Links

- 核酸定序核心
- 流式細胞分析暨分選核心
- 顯微影像核心
- 生醫資源中心

基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

### 申請服務專區

首頁 · 基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室

»填寫委託調查表 »委託調查列表 »進行中列表 »已領貨列表

#### 委託調查表

申請時間	2015/5/28 上午 11:37:09
單位	基因剔除(剔除)細胞株
計畫主持人	黃星彥
實驗室分機號碼	88930
使用人 email	cyh0729@ntu.edu.tw
聯絡人	黃星彥 <input checked="" type="checkbox"/> PI本人親自領取 請填寫聯絡人姓名，材料製備完成後，系統將會通知聯絡人
聯絡人 Email	cyh0729@ntu.edu.tw 請填寫聯絡人 email，材料製備完成後，系統將會通知聯絡人

#### 打靶基因

1. 基因名稱 (gene):
2. 基因功能 (gene function):
3. 是否為必須基因 (essential gene):  是  否

#### 細胞株

1. 細胞株名稱 (cell line):
2. 細胞株物種來源:  human  mouse  others
3. 細胞株培養條件 (culture methods):
4. 細胞株轉殖質體方式 (plasmid DNA transfection methods):
5. 細胞株轉殖質體效率 (plasmid DNA transfection efficiency):
6. 細胞株是否具有抗藥性? (antibiotic resistance):  是  否
7. 細胞株內欲打靶基因的基因型是否為野生型?  是  否  未知

#### 打靶需求 (可面議再詳填)

1. 打靶方式:  剔除 (knock-out)  剔除 (knock-in)
- 

\* 若經預測並無最佳靶位是否仍要嘗試  是  否

確認送出委託調查表 取消

靶位設計與面談完成後請再次登入，此時備註欄下方會出現「填寫申請表」，請按下進入申請頁面填寫。

The screenshot shows the Human Disease Modeling Center website. The header includes the center's name and logo, and navigation links for various models: 基因剔除(剔除)細胞株核心, 台灣酵母菌生物資源中心, 酵母菌模式, 果蠅模式, 線蟲模式, 小鼠模式, and Q&A及留言板. A user is logged in as 黃星彥. The main content area is titled "基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室" and "申請服務專區". It features a progress bar with steps: 填寫委託調查表, 委託調查列表, 進行中列表, and 已領貨列表. Below this is a table with columns for 申請日期, PI, 代申請人, 委託調查表, 申請書, 進度, and 備註. The first row shows an application from 2015/5/28 by 黃星彥, with the status "審核中".

申請日期	PI	代申請人	委託調查表	申請書	進度	備註
2015/5/28	黃星彥	黃星彥	委託調查表		審核中	

This screenshot is similar to the one above but highlights the next step in the application process. The progress bar now shows the "委託調查列表" step as active. The table below shows the application status updated to "同意申請". A red arrow points to a new button labeled "填寫申請表" in the "備註" column of the table row.

申請日期	PI	代申請人	委託調查表	申請書	進度	備註
2015/5/28	黃星彥	黃星彥	委託調查表		同意申請	填寫申請表

申請表填寫完成後，請按下方「確認送出申請表」完成申請程序。



**本中心成員登入**  
Members Login

您好, 黃呈彥

我要登出

- 基因剔除(剔除)細胞株
- ▶ 簡介
- ▶ 實驗原理與技術
- ▶ 委託服務流程
- ▶ 注意事項
- ▶ 收費標準
- ▶ 致謝格式
- ✦ 申請服務專區
- ▶ 基因剔除(入)
- ▶ 實驗耗材

- ✦ 會員須知  
Member Notice
- ▶ 如何成為本中心成員
- ▶ P專區(可修改個人資料)

- 📄 使用管理辦法  
User Rules
- ▶ 人類疾病模式生物中心
- ▶ 基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室

- 🔗 友站連結  
Links
- ▶ 核酸定序核心
- ▶ 流式細胞分析暨分選核心
- ▶ 顯微影像核心
- ▶ 生醫資源中心

**基因剔除(剔除)細胞株核心實驗室**  
國立臺灣大學醫學院 National Taiwan University College Of Medicine

**申請服務專區** [首頁](#) [基因剔除\(剔除\)細胞株核心實驗室](#)

- »填寫委託調查表
- »委託調查列表
- »進行中列表
- »已領貨列表

臺灣大學醫學院第一共同研究室  
基因剔除(剔除)核心實驗室申請表

申請時間	2015/5/28 上午 11:52:54
單位	基因剔除(剔除)細胞株
計畫主持人	黃呈彥
實驗室分機號碼	88930
使用人email	cyh0729@ntu.edu.tw
聯絡人	黃呈彥 <input checked="" type="checkbox"/> P(本人親自領取) 請填寫聯絡人姓名, 材料製備完成後, 系統將會通知聯絡人
聯絡人Email	cyh0729@ntu.edu.tw 請填寫聯絡人email, 材料製備完成後, 系統將會通知聯絡人
收據抬頭	台大醫學院

**基因名稱**

AA

(例如: 人類基因H2AF2)

**特殊要求**

**備註**

【註一】收費標準及工作天數請參見「國立臺灣大學醫學院第一共同研究室基因剔除(剔除)細胞株核心管理辦法」, 如有其它疑問請洽分機88930或88507, 黃呈彥博士。

【註二】備妥後會發送取貨通知, 請親至本核心索取。

分期領貨: 預設4期, 將依據實際出貨狀況調整期數



TOP



申請成功後，於進行中列表可以見到四重複申請列表，為方便分批取貨之設計。若實驗完成，會以電子郵件通知取貨並於其中一備註欄出現「列印領貨單」，請列印簽名後至第一共研取貨。

Human Disease Modeling Center  
人類疾病模式生物中心  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共研服務使用成員註冊

Google™ 自訂搜尋

最新公告 本中心簡介 基因剔除(剔入)細胞株核心 台灣酵母菌生物資源中心 酵母菌模式 果蠅模式 線蟲模式 小鼠模式 Q&A及留言板

本中心成員登入 Members Login  
您好, 黃呈彥  
我要登出

基因剔除(剔入)細胞株

- 簡介
- 實驗原理與技術
- 委託服務流程
- 注意事項
- 收費標準
- 致謝格式
- 申請服務專區
- 基因剔除(入)
- 實驗耗材

會員須知

基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

申請服務專區  
首頁, 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

»填寫委託調查表 »委託調查列表 »進行中列表 »已領貨列表

申請日期	PI	聯絡人	委託調查表	申請書	進度	備註
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-1)	進行中	
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-2)	進行中	
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-3)	進行中	
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-4)	進行中	

Human Disease Modeling Center  
人類疾病模式生物中心  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共研服務使用成員註冊

Google™ 自訂搜尋

最新公告 本中心簡介 基因剔除(剔入)細胞株核心 台灣酵母菌生物資源中心 酵母菌模式 果蠅模式 線蟲模式 小鼠模式 Q&A及留言板

本中心成員登入 Members Login  
您好, 黃呈彥  
我要登出

基因剔除(剔入)細胞株

- 簡介
- 實驗原理與技術
- 委託服務流程
- 注意事項
- 收費標準
- 致謝格式
- 申請服務專區
- 基因剔除(入)
- 實驗耗材

會員須知

基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

申請服務專區  
首頁, 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

»填寫委託調查表 »委託調查列表 »進行中列表 »已領貨列表

申請日期	PI	聯絡人	委託調查表	申請書	進度	備註
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-1)	已完成, 通知領貨	列印領貨單
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-2)	進行中	
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-3)	進行中	
2015/5/28	黃呈彥	黃呈彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-4)	進行中	



領貨完成後，於進行中列表可以見到申請列表減少一行，而於已領貨列表中出現一筆紀錄。



**人類疾病模式生物中心**  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

Human Disease Modeling Center

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共研服務使用成員註冊

最新公告
本中心簡介
基因剔除(剔入)細胞株核心
台灣酵母菌生物資源中心
酵母菌模式
果蠅模式
線蟲模式
小鼠模式
Q&A及留言板

**本中心成員登入**  
Members Login

您好, 黃昱彥

我要登出

---

**基因剔除(剔入)細胞株**

- ▶ 簡介
- ▶ 實驗原理與技術
- ▶ 委託服務流程
- ▶ 注意事項
- ▶ 收費標準
- ▶ 致謝格式
- 申請服務專區**
- ▶ 基因剔除(入)
- ▶ 實驗耗材

**基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室**  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine



**申請服務專區** 首頁 · 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

»填寫委託調查表
»委託調查列表
»進行中列表
»已領貨列表

申請日期	PI	聯絡人	委託調查表	申請書	進度	備註
2015/5/28	黃昱彥	黃昱彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-2)	進行中	
2015/5/28	黃昱彥	黃昱彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-3)	進行中	
2015/5/28	黃昱彥	黃昱彥	委託調查表	申請書 (20150528114956-4)	進行中	



**人類疾病模式生物中心**  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine

Human Disease Modeling Center

回首頁 / 臺灣大學 / 醫學院 / 研發分處 / 第一共研服務使用成員註冊

最新公告
本中心簡介
基因剔除(剔入)細胞株核心
台灣酵母菌生物資源中心
酵母菌模式
果蠅模式
線蟲模式
小鼠模式
Q&A及留言板

**本中心成員登入**  
Members Login

您好, 黃昱彥

我要登出

---

**基因剔除(剔入)細胞株**

- ▶ 簡介
- ▶ 實驗原理與技術
- ▶ 委託服務流程
- ▶ 注意事項
- ▶ 收費標準
- ▶ 致謝格式
- 申請服務專區**

**基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室**  
國立臺灣大學醫學院 Nation Taiwan University College Of Medicine



**申請服務專區** 首頁 · 基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

»填寫委託調查表
»委託調查列表
»進行中列表
»已領貨列表

申請日期	領貨日期	領貨內容	PI	聯絡人	委託調查表	申請書
2015/5/28	2015/5/28		黃昱彥	黃昱彥	委託調查表	申請書(1/4)

# 基因剔除(剔入)實驗應注意事項

- 一、CRISPR打靶效率相較於TALEN技術為優，而且製備上更為快速且經濟，但是須注意脫靶效應問題。
- 二、設計靶點時，靶點位置盡量在基因前端，最好能破壞重要的domain和所有的轉錄產物isoform。
- 三、基因剔除成功與否由許多因素決定：
  1. 切割區域內存在染色體複雜結構，使得所設計靶位不具有剔除活性或活性過低。
  2. 欲剔除基因為必須或關鍵基因，如：細胞週期基因、細胞貼附基因等等，剔除後導致細胞死亡或生長狀況不佳，因此無法獲得同型合子細胞株。
  3. 細胞轉殖效率過低，需嘗試各種轉殖方式，一般以大於百分之五十成功率較高。此時可利用報導基因做進一步篩選，如：螢光基因或抗藥基因。螢光基因表現可利用流式細胞儀進行細胞分選，而進行藥物篩檢，要先檢測出殺死細胞的最小濃度，轉殖後的細胞會較未轉殖前對藥物敏感度提高。
  4. 細胞是否可以進行單一細胞群落培養也是關鍵因素，如果所選用的細胞株無法進行單一細胞株培養，則需以別的細胞株取代。
  5. 欲剔除基因在細胞中存在多個基因拷貝，也會增加剔除的困難度。
- 四、由於細胞內存在對偶基因，一次轉殖得到對偶基因同時被破壞的機率低於只有單一股基因被破壞，若無法在第一輪篩選得到對偶基因同時被破壞的細胞株，則需進行第二輪的轉殖與篩選。
- 五、基因剔入大片段重組實驗如果沒有進行報導基因篩選，成功率不高。細胞內發生同源重組機率一般為 $10^{-6}$ ，有TALEN或CRISPR共轉的細胞約為0.1%~5%，僅少數例子可以高達10%，如果進行報導基因篩選則成功率可提升為10%~50%。最近有報導利用藥物SCR7抑制NHEJ可提高HR(KI)效率。

# 基因剔除(剔入)實驗方法介紹

## 靶位設計

關於靶位設計，以下提供幾個不錯的網站：

1. Zifit

<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>

2. E-CRISP

<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>

3. E-TALEN

<http://www.e-talen.org/E-TALEN/>

4. CHOPCHOP

<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>

5. CRISPR Design

<http://crispr.mit.edu/>

6.sgRNA Designer

<http://www.broadinstitute.org/rnai/public/analysis-tools/sgrna-design>

7.RGEN Cas-OFFinder

<http://www.rgenome.net/cas-offinder/>

需注意，網站上所設計的靶位皆為參考，仍須以實際轉殖進入細胞測試Insertion and Deletion (Indel)效率為準。

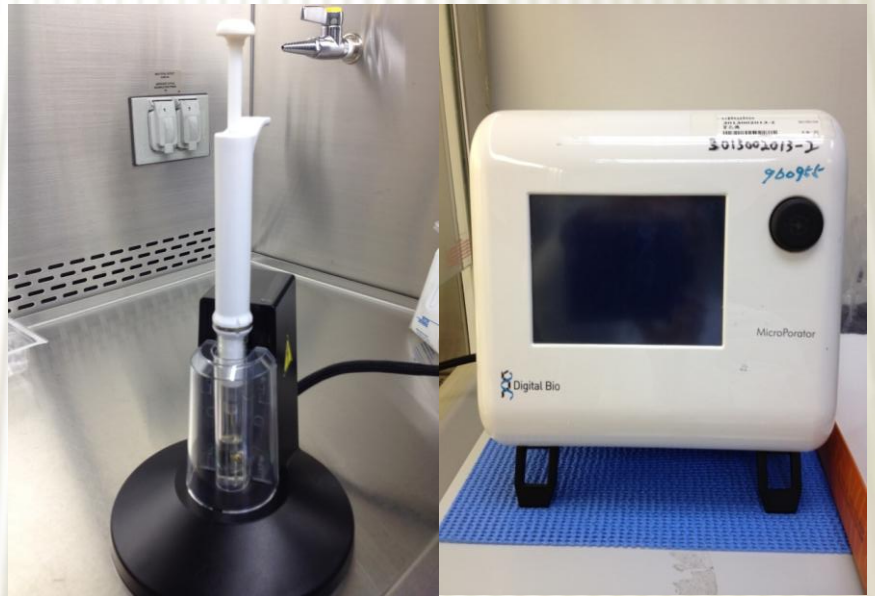
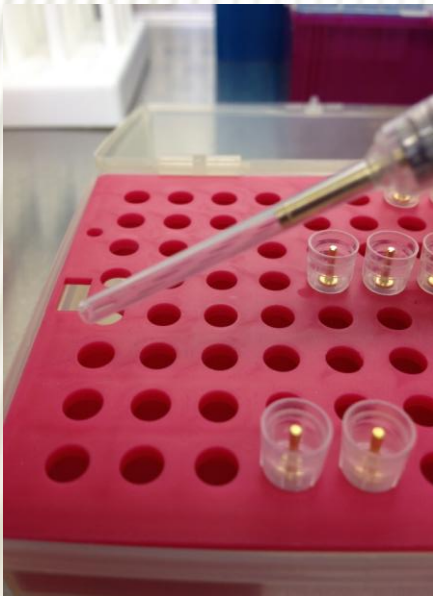


# 基因剔除(剔除)實驗方法介紹

## 基因轉殖

- 核心實驗室使用電轉方式進行基因轉殖，並提供少量分裝轉殖試劑供醫學校區實驗室付費索取。
- 核心實驗室提供首次上機教學，相關轉殖條件設定請參考底下連結之原廠網站：

<http://www.lifetechnologies.com/tw/zt/home/life-science/cell-culture/transfection/transfection---selection-misc/neon-transfection-system/neon-protocols-cell-line-data.html>

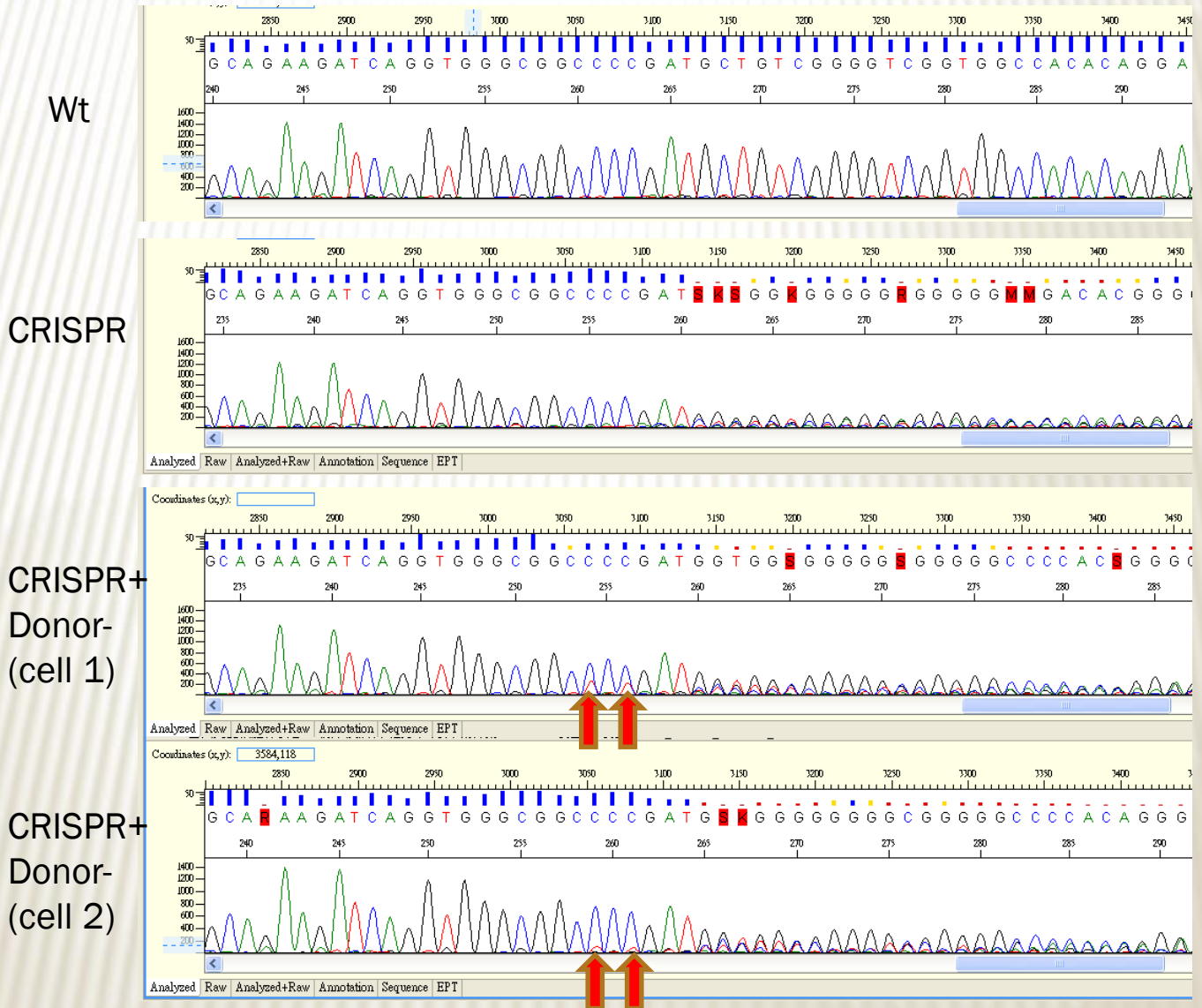


Neon transfection system

# 基因剔除(剔入)實驗方法介紹

## 基因剔入實例

於不同細胞針對同一基因進行剔入實驗發現效率不同



# 基因剔除(剔入)實驗方法介紹

## 基因剔入實例

越接近Cas9切點附近，發生同源重組機率越高，因此基因剔入成功率也提高。

同源重組機率

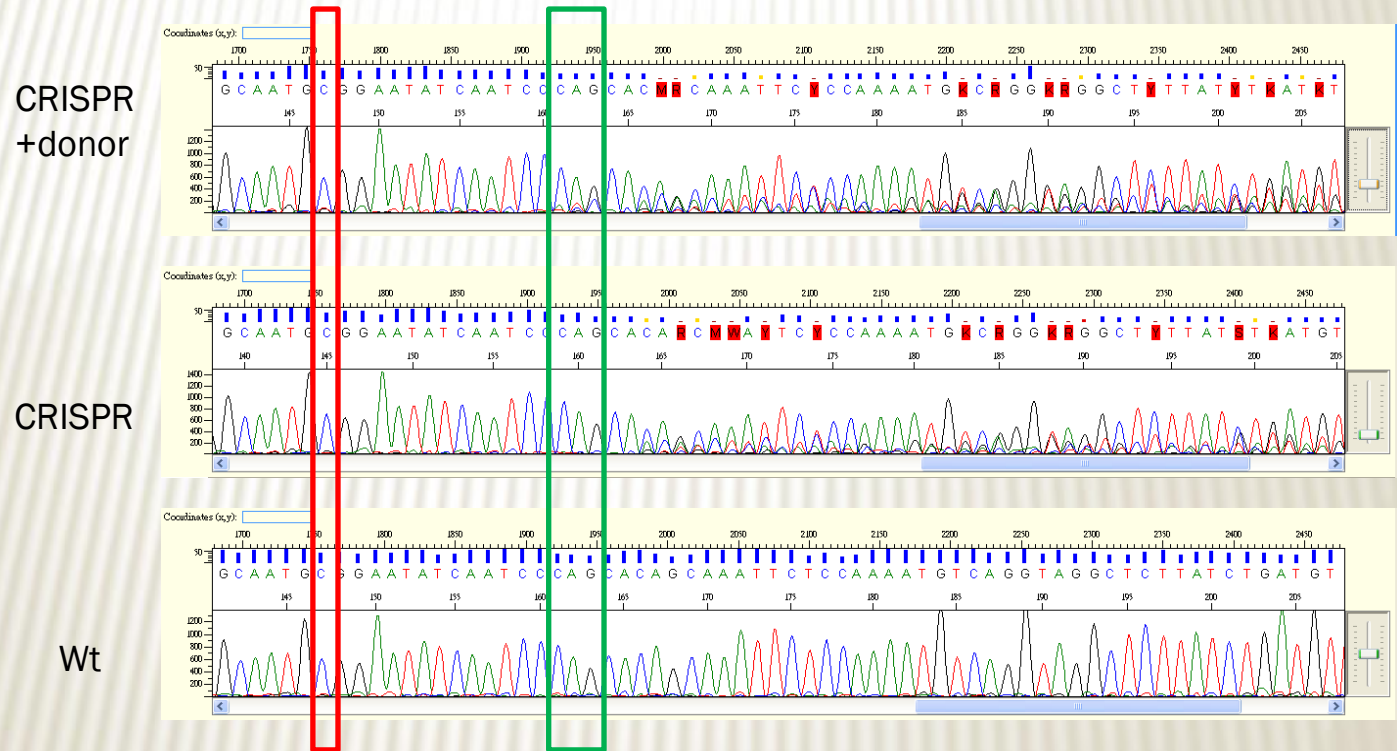
1/40

1/10

Wt **GCAATGCGGAATATCAATCCAGCAGCAAATTCTCCAAATG**

Donor seq. **GCAATGTGGAATATCAATCCATCCACAGCAAATTCTCCAAATG**

▲Cas9切點





# 相關生技公司網站連結

---

## 圖爾思生物科技

<http://www.toolsbiotech.com/>

## 力鈞生物科技

<http://www.zgenebio.com.tw/>

## 威新生物科技

<https://www.facebook.com/wethinkbio>

## 冷泉港生物科技

<http://www.fjbio.com.tw/index.php?do=prod&toppid=195&pid=197&id=352>

## lifetechnologies

[http://www.lifetechnologies.com/tw/zt/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-precision-tals/geneart-crispr.html?s\\_kwcid=AL!3652!3!43210957038!b!!g!!+crispr&ef\\_id=U1c6-wAAAPaivQiT:20140728043100:s](http://www.lifetechnologies.com/tw/zt/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-precision-tals/geneart-crispr.html?s_kwcid=AL!3652!3!43210957038!b!!g!!+crispr&ef_id=U1c6-wAAAPaivQiT:20140728043100:s)

## System Bioscience

<http://www.systembio.com/cas9?gclid=CIGJ4IGM778CFVh6vQodoxsArA>

## ASC: Applied StemCell

<https://www.appliedstemcell.com/services/cell-line-models/cell-line-modification/>

## Sigma-Aldrich

[http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/crispr?lang=en&region=TW&cm\\_guid=1--1000000000000000038491--50835121278&cm\\_mmc=Google\\_Biosilencing--CRISPR--CRISPR--sigma%20crispr\\_Phrase\\_50835121278](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/crispr?lang=en&region=TW&cm_guid=1--1000000000000000038491--50835121278&cm_mmc=Google_Biosilencing--CRISPR--CRISPR--sigma%20crispr_Phrase_50835121278)