



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)相關事宜

- 一、基因剔除(剔入)注意事項
- 二、關於Cas9蛋白
- 三、Cas9跳躍子載體介紹
- 四、剔入強化劑實測



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

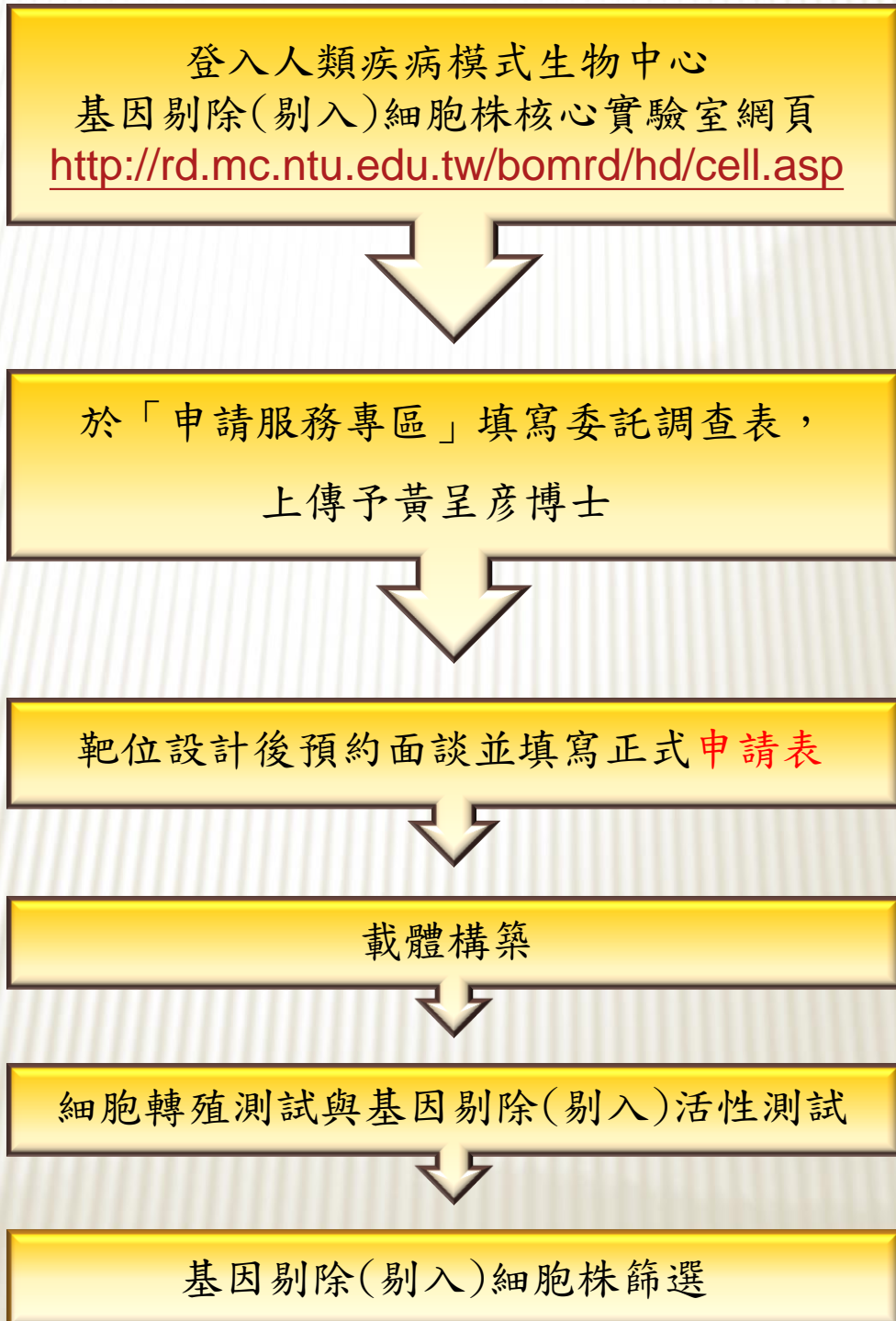
聯絡方式：電子郵件 cyh0729@ntu.edu.tw

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



基因剔除(剔除)注意事項

The successful CRISPR screen

1. Nonessential gene or no housekeeping gene.
2. Low off-target.
3. Cell line can be selected by puromycin or fluorescence sorting.
4. Cell line can be single cell cultured.

基因剔除(剔入)方法比較

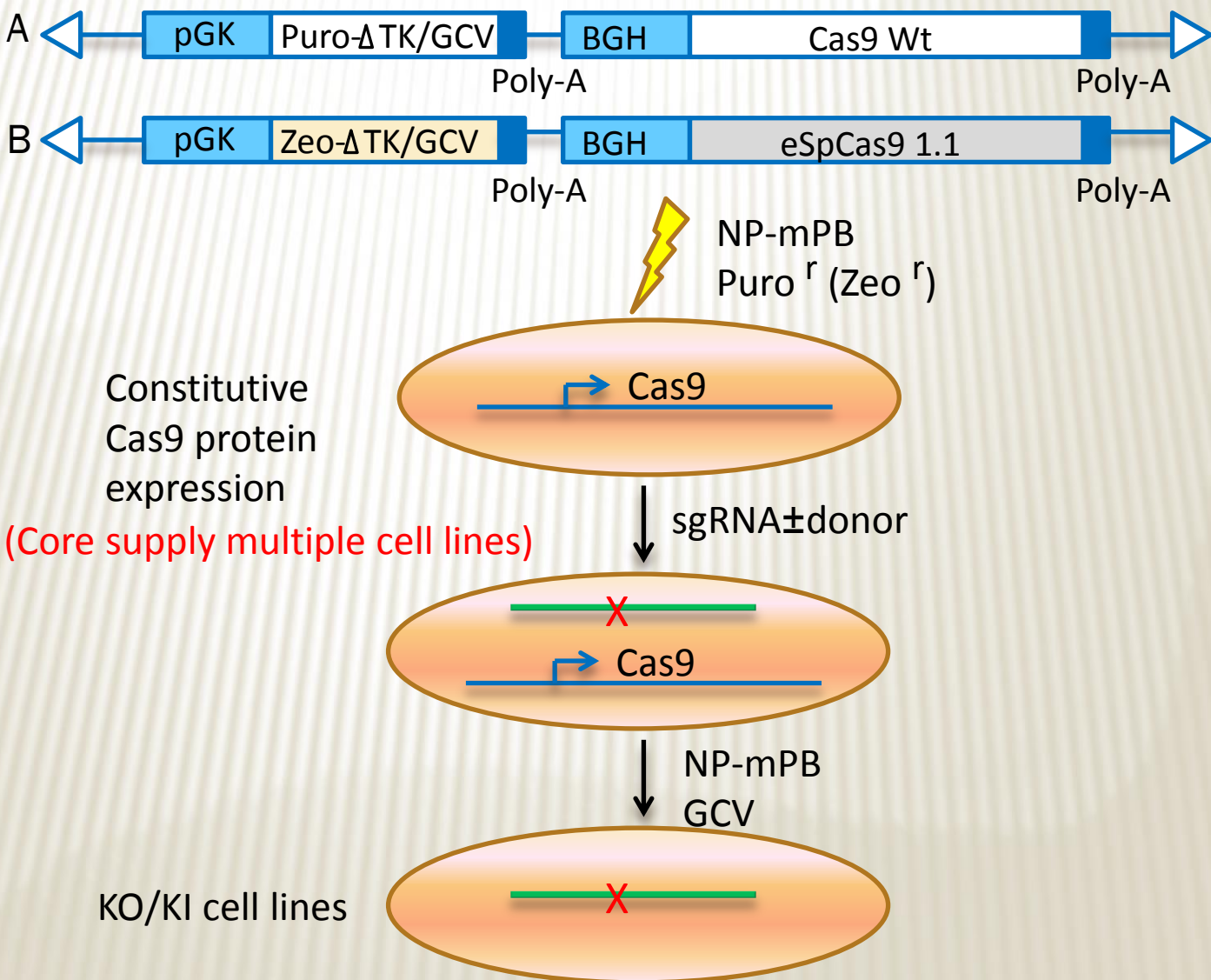
	時間	方便性	價錢
質體	慢	中	低
RNA	中	中	中
RNP	快	高	高

關於基因剔除(剔入)所使用的CRISPR系統，現在主要發展出3種轉殖方式，分別是利用質體轉殖(可以是all-in-one載體，或是Cas9基因與sgRNA分處不同載體)，將Cas9以及sgRNA先行轉錄成RNA模式再送入細胞，或是利用重組Cas9蛋白與合成的sgRNA混合(RNP)後送入細胞。三種方式的比較如上表，其中以RNP的方式最快，但是成本也最高，而質體的方式雖然慢一點，但是價格最為低廉，因此核心目前仍然採用all-in-one質體的方式。

至於質體之前被詬病有脫靶效應高的的問題，目前也有Cas9的突變株可供利用，核心現已全面改用eSpCas91.1 (<http://blog.addgene.org/enhancing-crispr-targeting-specificity-with-escas9-and-spcas9-hf1>)的突變株。

Cas9跳躍子載體介紹

針對一些較難轉染或需轉染多個sgRNA的實驗，核心現有跳躍子的系統可以先將Cas9蛋白送入細胞穩定表現，之後再將sgRNA（也可以是一組library）送入細胞進行多基因KO的實驗。若是之後不再需要Cas9蛋白表現，也可以使其再次跳出，得到已經KO而沒有Cas9蛋白表現的細胞。



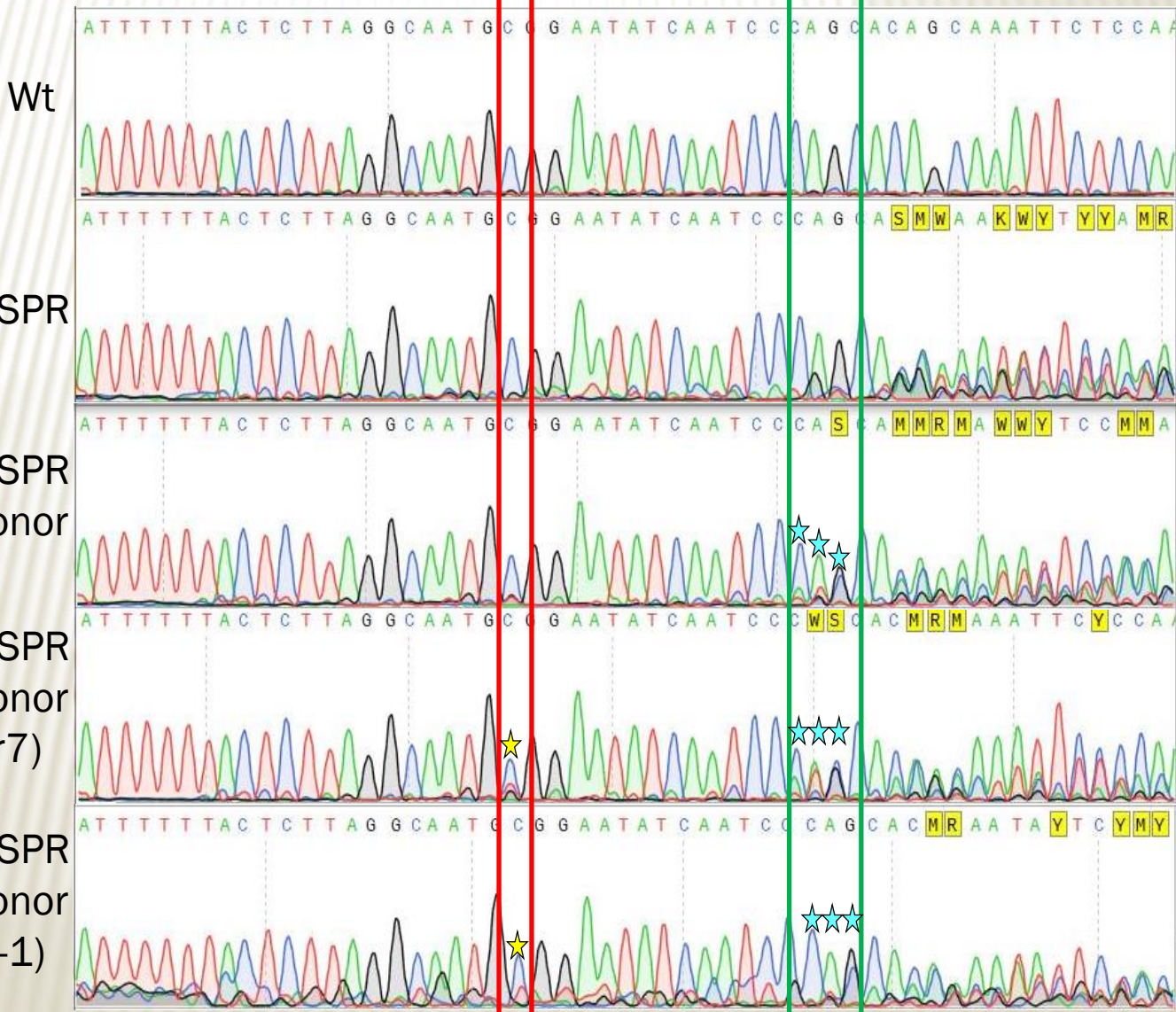
剔入強化劑實測

基因剔入實驗可利用重組強化劑來增加剔入的效率，然而即使是同樣的基因剔入突變，在不同的細胞須利用不同條件的強化劑，如下圖：A細胞在添加SCR7、B細胞則在添加RS-1的時候有較好的重組效果。

A細胞

C->T

CAG->ATC



剔入強化劑實測

B細胞

C->T

CAG->ATC

