

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

本期目錄：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介 P. 1

申請方式與服務流程 P. 2

基因剔除(剔入)相關事宜

一、基因剔除(剔入)注意事項 P. 3

二、質體與RNP複合物之比較 P. 4

三、Cas9跳躍子載體介紹 P. 5

四、剔入強化劑實測 P. 6-7

五、核心現有電穿孔儀介紹 P. 8



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

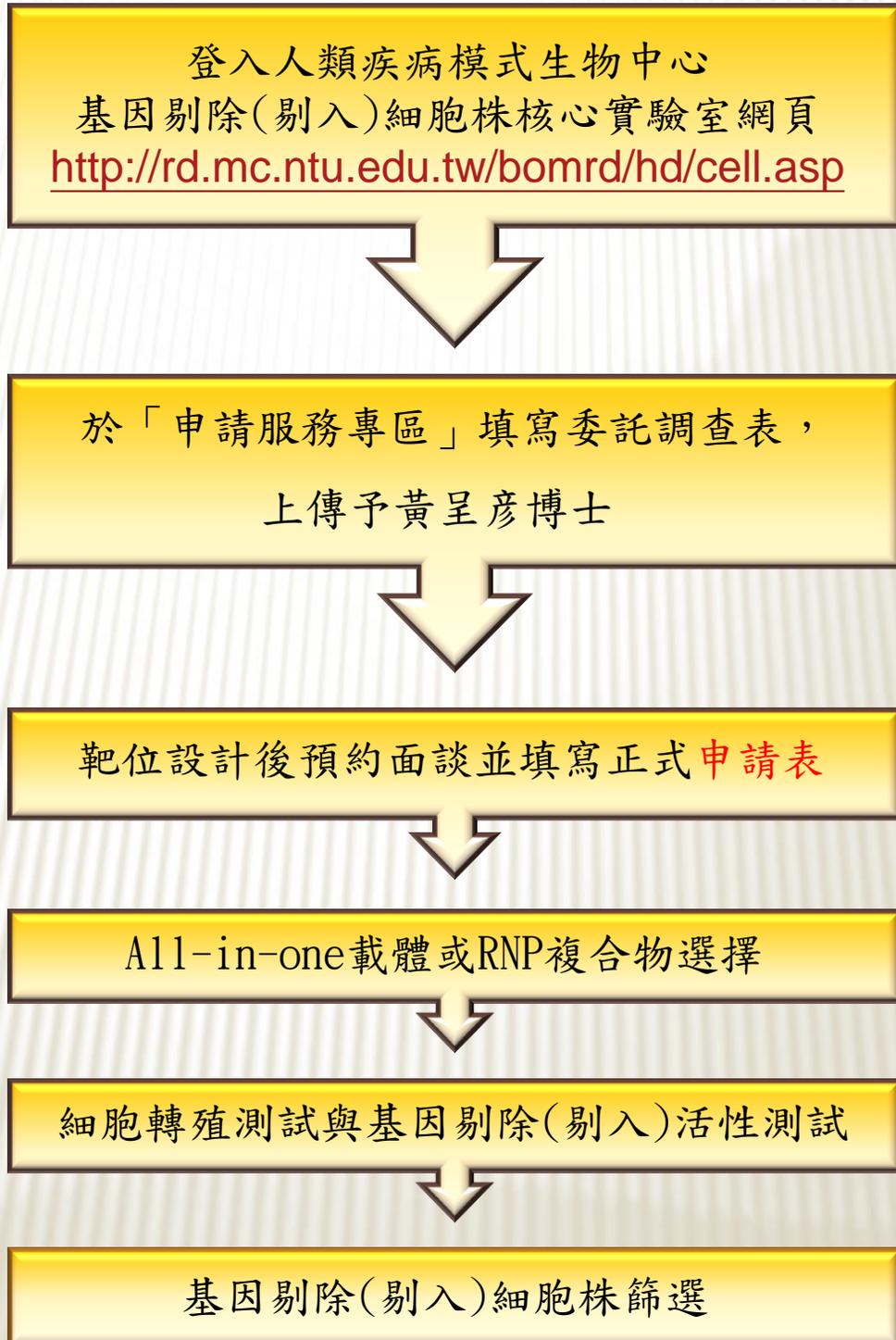
聯絡方式：電子郵件 cyh0729@ntu.edu.tw

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(剔入)注意事項

The successful CRISPR screen

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

基因剔除(剔入)方法比較

	時間	方便性	價錢	脫靶效應	細胞內免疫反應
質體	慢	中	低	高/中	高
RNP	快	高	略高	低	低

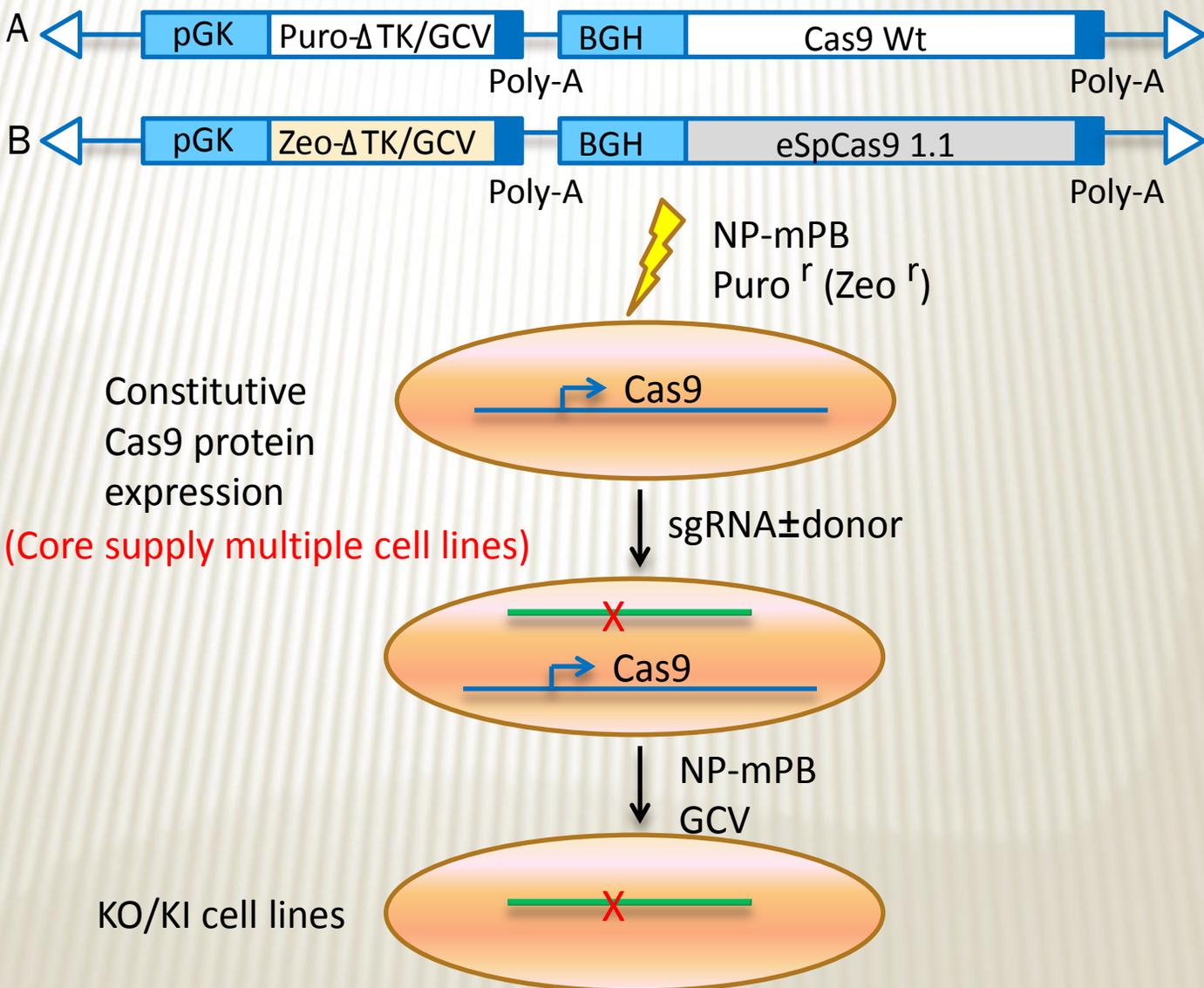
關於基因剔除(剔入)所使用的CRISPR系統，核心目前採用兩種方式併行，分別是利用質體轉殖(all-in-one載體)，或是利用重組HiFi-Cas9蛋白(IDT)與合成的sgRNA(crRNA+tracrRNA)混合成複合物(RNP complex)後送入細胞。

關於脫靶效應高的的問題，目前也有Cas9的突變株可供利用，核心現有eSpCas9.1的突變株，但是測試後發現會降低CRISPR的效率，因此目前還是採行野生型與突變株視情況擇一使用。

基因剔入實驗策略目前仍然使用HDR方式，也就是單點突變採用單股合成DNA同源模板置換方式。至於大片段剔入模板則使用含有同源置換模板的質體(核心代為設計，但質體構築須由委託實驗室自行處理)。

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。



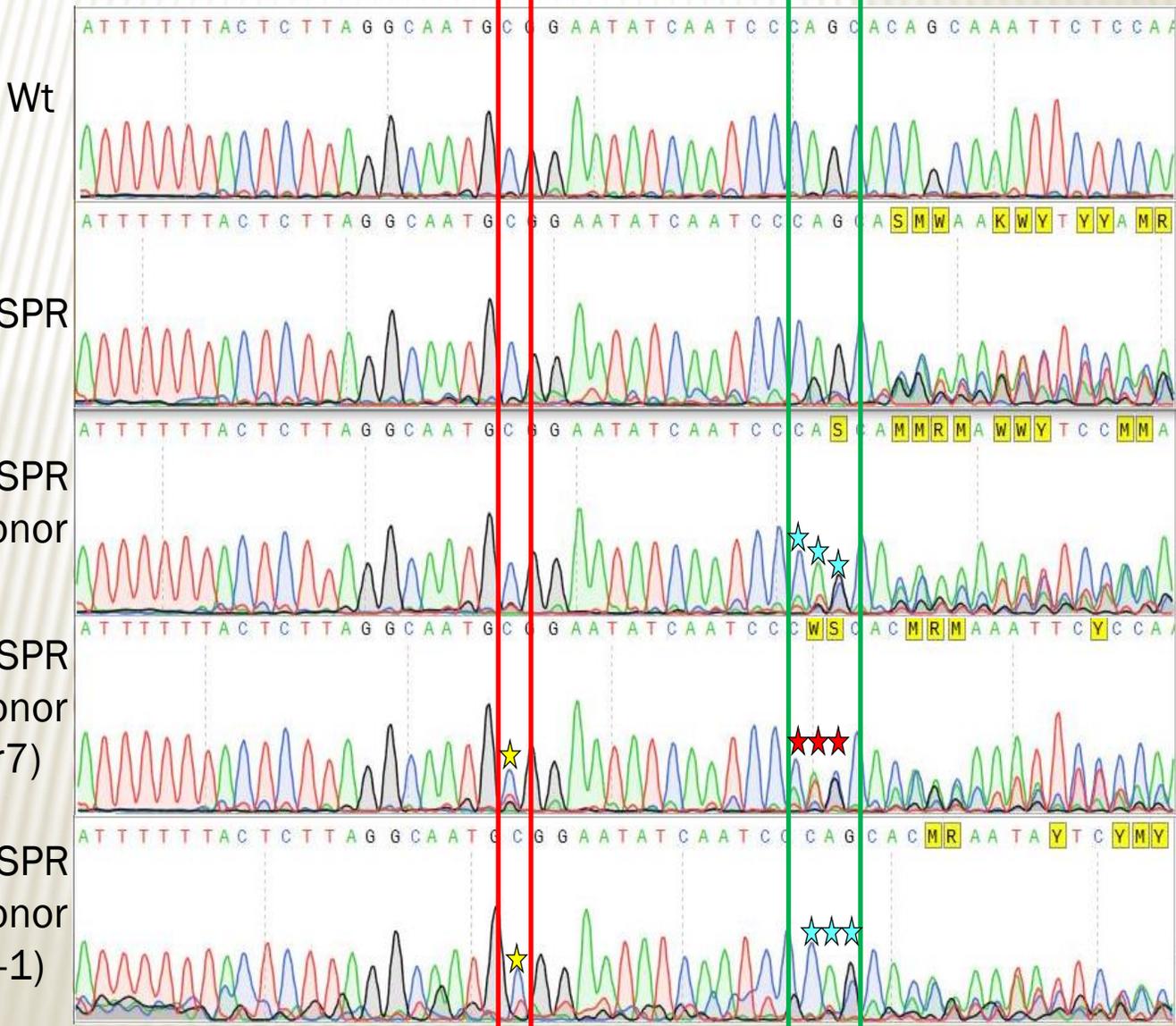
剔入強化劑實測

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

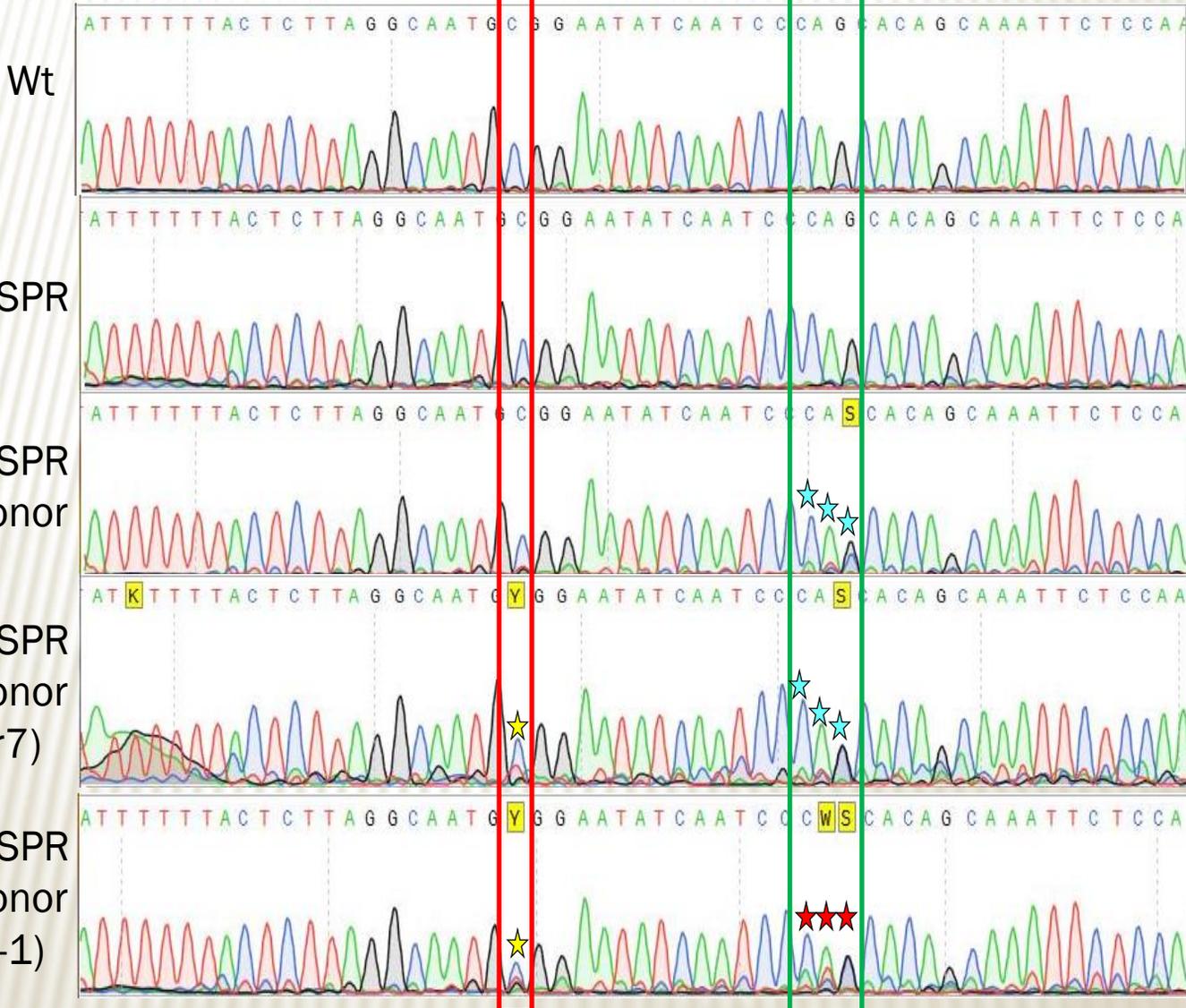


剔入強化劑實測

B細胞

C->T

CAG->ATC



電穿孔儀 (MP-100)



關於基因剔除(剔入)轉殖所使用的電穿孔儀，核心目前使用MP-100機型，目前代理商為ThermoFisher (<https://www.thermofisher.com/tw/zt/home/references/protocols/neurobiology/neurobiology-protocols/transfecting-neural-cells-using-the-neon-transfection-system.html#3>)。

實際測試適用9成以上細胞，包括較難轉染的NIH-3T3、HaCaT，以及今年測試完成的人類hiPSC、hESC和老鼠mES細胞，轉染10K質體，效率皆達5成以上。

此電穿孔儀經教育訓練後可以開放給醫學校區各實驗單位研究人員預約使用。詳細轉染條件與教育訓練請洽黃呈彥博士。

國立臺灣大學醫學院生物安全第三等級實驗室

Biosafety Level-3 (BSL-3) Laboratory

● 簡介：

本院 BSL-3 實驗室最初由微生物學科建置，於 1991 年 5 月初次啟用，為全臺灣第一間可操作第三級危險群(Risk group 3, RG-3)微生物的實驗室。2003 年 2 月至 6 月之間，臺灣爆發嚴重急性呼吸道症候群 (Severe Acute Respiratory Syndrome, 簡稱 SARS) 疫情，在本實驗室的支援下，臺大醫學院成為臺灣首例成功分離 SARS 冠狀病毒之研究團隊，同時完成病毒核酸全長定序，並建立了病毒的各種檢測方法。

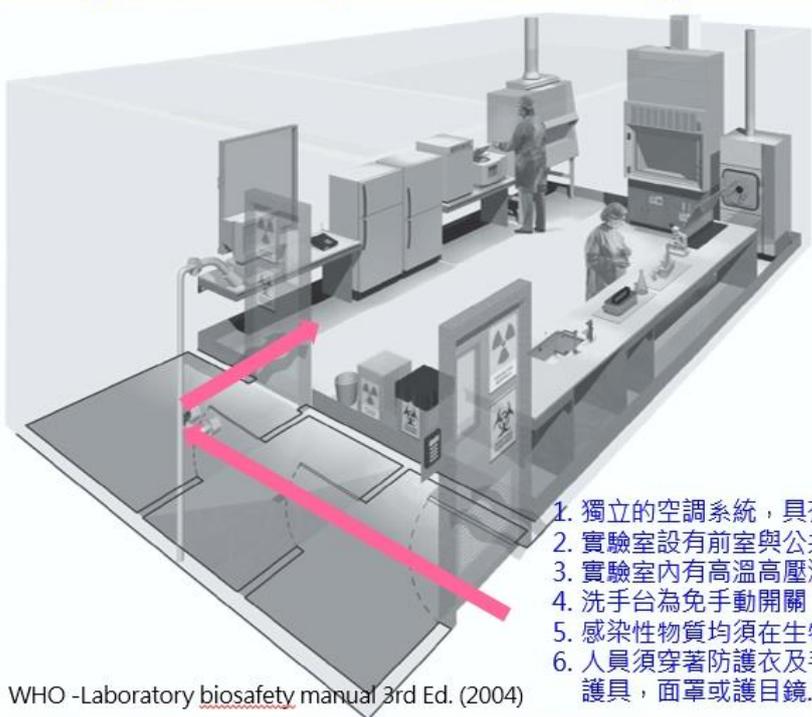
有別於院內一般的生物性實驗室，BSL-3 實驗室的特點在於其內部為一個負壓的環境，且人員須穿著連身防護衣、N95 口罩、雙層手套、膠鞋... 等防護裝備，才能操作實驗(如下圖)。

衛生福利部【感染性生物材料管理辦法】第六條 【感染性生物材料管理作業要點】附表八

- ✓ BSL : Biosafety Level , 生物安全等級
- ✓ 實驗室：指使用感染性生物材料之場所
- ✓ 依實驗室的操作規範、人員防護裝備、安全設備及設施等，區分為四個等級：

生物安全等級	使用範圍
BSL-1實驗室	主要使用於操作 <u>已知不會造成人類疾病</u> 之感染性生物材料。
BSL-2實驗室	主要使用於操作 <u>造成人類疾病</u> 之感染性生物材料。
BSL-3實驗室	主要使用於操作 <u>造成人類嚴重或潛在致命疾病</u> 之感染性生物材料。
BSL-4實驗室	主要使用於操作 <u>造成人類嚴重致命疾病且無疫苗或治療方法</u> 之感染性生物材料。

A typical Biosafety Level 3 laboratory



D級防護衣 + N95



1. 獨立的空調系統，具有向室內流動之定向氣流
2. 實驗室設有前室與公共走道區隔，雙門互鎖
3. 實驗室內有高溫高壓滅菌鍋
4. 洗手台為免手動開關
5. 感染性物質均須在生物安全櫃內操作
6. 人員須穿著防護衣及手套，視須要穿戴呼吸防護具，面罩或護目鏡。

WHO -Laboratory biosafety manual 3rd Ed. (2004)

- **實驗室地點：**

醫學院基礎醫學大樓 R416。

- **開放時間：**

週一至週五 9:00~18:00，為確保人員安全，原則上不開放下班時間或假日操作實驗。

- **申請使用資格：**

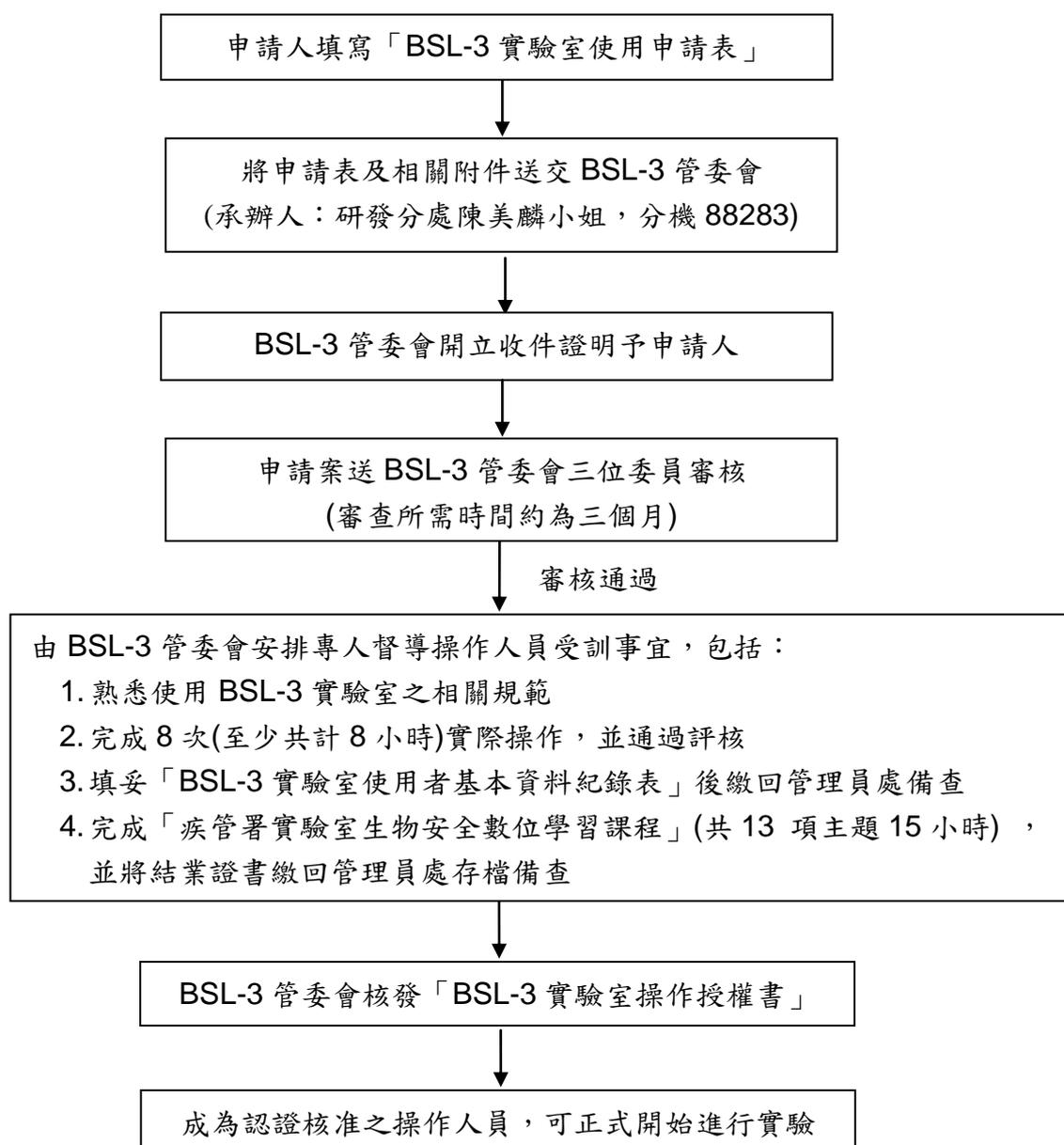
1. 本實驗室採**部分對外開放**，使用對象包括國立臺灣大學各教學研究單位及校外單位，惟不開放給沒有校內人員參與的計畫申請使用。
2. 本實驗室開放操作之微生物主要為**第三級危險群(Risk group 3, RG3)**所屬之**細菌與病毒**。細項請參考疾病管制署所訂定「**感染性生物材料管理作業要點**」之附表三。

● 申請使用程序：

1. 符合下列條件之計畫主持人(以下簡稱 PI)，須向 BSL-3 實驗室管理委員會(以下簡稱 BSL-3 管委會)提出申請，經 BSL-3 管委會審核通過方可使用本實驗室。

- ✓ 首次申請使用 BSL-3 實驗室。
- ✓ 申請操作與前次不同種類之微生物實驗。
- ✓ 其它需由 BSL-3 管委會裁定之申請事項(例:欲攜入大型儀器)。

2. 申請使用流程：



● **收費標準：**

以 4 小時為計次單位，未滿 4 小時者以一次計(以有人員進入實驗室的時間來計算，若有分段則須以另次計)，每位 PI 依所屬單位收費標準如下表所示：

PI 所屬單位	臺灣大學醫學校區 (醫學院、公衛學院、附設醫院)	臺灣大學 其它學院
收費標準 (單位：新臺幣元/次)	1,500	2,250

【註】：

1. 計畫主持人及實驗操作人員皆為本校聘任人員，以校內標準收費。
2. 計畫主持人為本校聘任人員，但是操作人員含計劃 co-PI 單位聘請的校外人員，以校內標準的 2 倍收費。
3. 計劃 co-PI 為本校聘任人員，但是計畫主持人及操作人員為校外人員，以校內標準的 5 倍收費。
4. 為確保操作人員安全，每次操作時間不得超過 4 小時。

● **實驗室主要設備：**

Class II Type A2 生物安全櫃、-80°C 冷凍櫃、CO₂ 培養箱、恆溫培養箱、倒立螢光顯微鏡、落地型冷凍離心機...等。

● **聯絡窗口：**

實驗室管理員：陳美麟小姐

聯絡電話：分機 88283(辦公室)，88710(實驗室)

E-mail：meilinchen@ntu.edu.tw