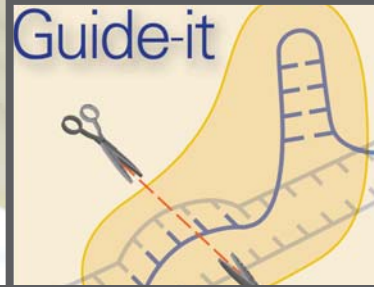


Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicles



that's
GOOD
science!™

No Transfection! No Viral Delivery !

- Gesicle-mediated delivery of Cas9 and sgRNA
- Cas9-sgRNA 복합체 (RNP)를 효율적으로 세포 내 도입
- Broad range : 다양한 세포에 적용 가능
- Off-target effect 최소화 : 특이성 높은 CRISPR/Cas9 genome editing

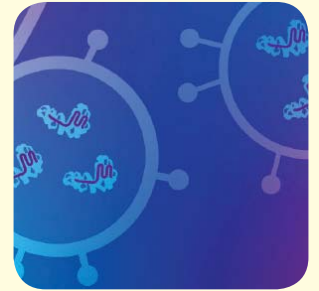
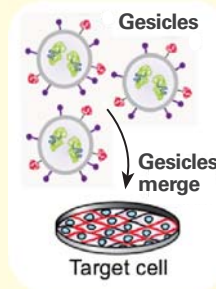
Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicles

Delivery of Cas9-sgRNA to a Broad Range of Cell Types

- Gesicles를 이용하여 Cas9-sgRNA 복합체를 세포 내 도입
- Broad range: 다양한 세포주에 적용 가능
- Hard-to-transfect cell line (분열, 비분열, iPS 세포주)에서 CRISPR/Cas9 적용 가능
- 기존 CRISPR/Cas9 system 대비 off-target effect 감소, editing 특이성 향상

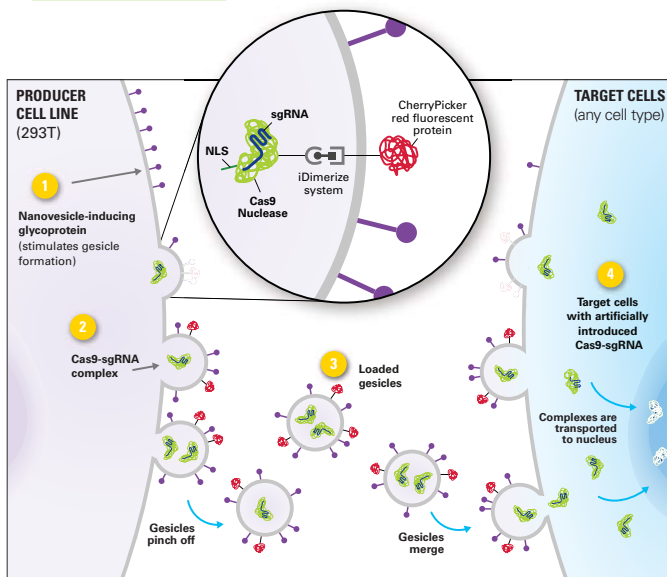
Gesicles란 무엇인가요?

- Glycoprotein을 과발현하는 세포주 유래의 nanovesicles
- 단백질과 같은 거대분자를 세포에서 세포로 수송
- Broad range: VSV-G pseudotype lentivirus와 유사한 특성
→ Transfection이 어려운 세포주에 효율적으로 도입 가능



Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System (Code 632613)

System Overview



1 Gesicles 생성

sgRNA와 Cas9을 발현하는 plasmid를 도입한 293T producer cell line에서 gesicles 생성

2 Gesicles packaging

iDimerize™ system에 의해, small ligand가 Cas9-sgRNA 복합체에 추가됨. 추가된 small ligand는 gesicles 표면의 CherryPicker™ 단백질 (RFP)과 결합하여 gesicles 생성

3 Gesicles 회수

Producer cell line으로부터 생성된 RFP-labeled gesicles 회수

4 목적 세포에 gesicles 처리

회수한 gesicles를 목적 세포에 처리하면 세포막 융합에 의해 Cas9-sgRNA 복합체가 목적 세포 내로 도입

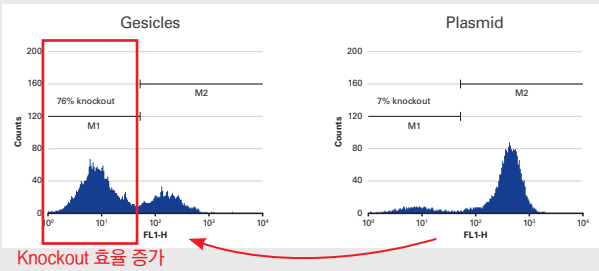
Key Technologies

- **Gesicles delivery** : 다양한 세포주에서 효율적인 CRISPR/Cas9 editing을 가능하게 한 Clontech의 독자적 기술
- **iDimerize™ system** : Cas9-sgRNA 복합체의 효율적인 gesicles packaging이 가능하게 함
- **CherryPicker™ red fluorescent protein (RFP)** : Gesicles 형성과 delivery 효율을 형광으로 확인 가능
- **Nuclear localization signal (NLS)** : Cas9-sgRNA 복합체에 NLS를 tagging하여 목적세포의 핵 내로 도입이 가능

Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicles의 특징

Transfection이 어려운 세포주에서 효율적으로 CRISPR/Cas9 genome editing 가능

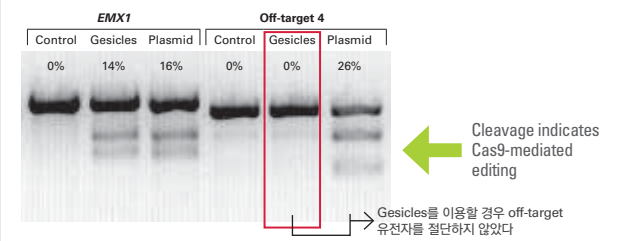
Knockout of an Endogenous Gene in Jurkat Cells



CRISPR/Cas9 Gesicles를 이용한 CD81 knockout 효과
유전자 도입효율이 낮다고 알려진 Jurkat cells에서 CRISPR/Cas9 gesicles를 이용한 도입과 Cas9과 sgRNA plasmid를 co-transfection한 결과를 비교하였다. 6일 후, CD81 antibody labeling을 이용하여 flow cytometry 분석한 결과, CRISPR/Cas9 gesicles를 이용하였을 경우 기존 co-transfection 방법보다 더 높은 knockout 효율을 확인할 수 있었다.

Off-target effect 최소화

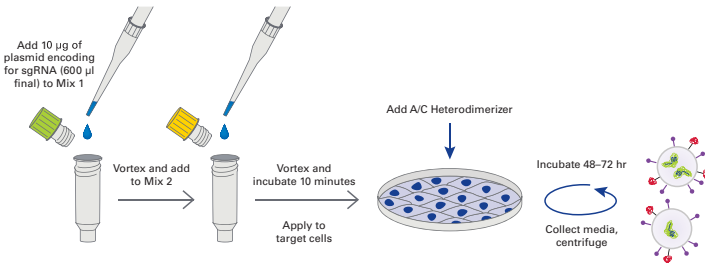
Target sequence *EMX1*:
GAGTCCGAGCAGAAGAAGAAGGG
Potential off-target sequence:
GAGTCTAAGCAGAAGAAGAG
PAM site



Gesicles를 이용한 off-target effect 감소
EMX1 유전자를 타겟팅하는 sgRNA와 Cas9 발현 plasmid를 HEK293T 세포로 co-transfection 또는 CRISPR/Cas9 gesicles를 이용하여 도입하였다. 72시간 후, *EMX1* 유전자와 잠재적인 off-target locus (potential off-target sequence) 유전자의 변이를 Guide-it™ Mutation Detection Kit (Code 631443)으로 확인한 결과 gesicles를 이용한 CRISPR/Cas9 genome editing이 plasmid 도입에 비해 off-target 효과가 낮은 것을 확인할 수 있었다.

Simple & Easy protocol

Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System (Code 632613)



- 모든 제품이 포함된 all-in-one kit
 - Gesicle packaging mix set (lyophilized)
 - pGuide-it-sgRNA1 vector (linearized)
 - Ligation component 등
- 간단한 gesicles production protocol
 - sgRNA, Cas9 발현 vector를 packaging mix와 섞어줌
 - A/C Heterodimerizer 존재 하에서 48-72시간 배양 후 회수하면 끝!

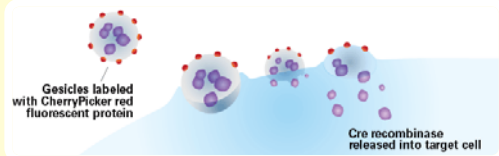
▶ 관련 제품리스트

Code	제품명	용량
632613	Guide-it™ CRISPR/Cas9 Gesicle Production System	1 System
632616	Guide-it™ CRISPR/Cas9 Packaging Set	1 Kit
632617	Gesicle Producer 293T Cell Line	1 ml
632612	pGuide-it-sgRNA1 Vector System	1 Kit

자매품

Cre Recombinase Gesicles (Code 631449)

- Gesicles를 이용한 Cre recombinase의 세포 내 도입
- Cre/LoxP knock-out, knock-in 실험을 보다 쉽게!



Adeno-associated virus (AAV)를 이용한 Cas9, sgRNA 유전자 도입

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)

- Adeno-associated virus (AAV) mediated delivery
- Transfection이 어려운 세포주 (분열, 비분열 세포)의 CRISPR/Cas9 genome editing
- 면역반응이 적은 AAV를 이용하여 in vivo genome editing 가능
- Helper virus 필요없는 편리한 AAV packaging system



AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)

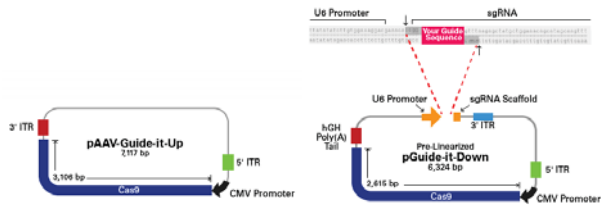
(Code 632619)



- *Staphylococcus aureus* 유래의 SaCas9 (약 3.1 kb)이용
- PAM sequence: 5'-NNGRR-3' (N=A,T,G,C / R=A,T)
- Single vector system으로 AAV packaging 및 genome editing이 보다 편리
- 다양한 세포주 도입 및 off-target effect 감소

AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)

(Code 632608)

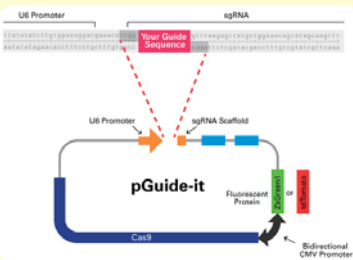


- *Streptococcus pyogenes* 유래의 SpCas9 (4.1 kb) 이용
- PAM sequence: 5'-NGG-3' (N=A,T,G,C)
- Two vector system으로 sgRNA 및 Cas9 발현
- 다양한 세포주 도입 및 off-target effect 감소

※ Cas9과 SaCas9 editing을 위한 sgRNA 디자인 방법은 홈페이지를 확인하세요.

▶ 관련 제품리스트

Code	제품명	용량
632608	AAVpro® CRISPR/Cas9 Helper Free System (AAV2)	1 System
632609	AAVpro® CRISPR/Cas9 Vector System	1 System
632619	AAVpro® CRISPR/SaCas9 Helper Free System (AAV2)	1 System
632618	AAVpro® CRISPR/SaCas9 Vector System	1 System
6666	AAVpro® Purification Kit (All Serotypes)	1 Kit



Plasmid transfection 방식의 CRISPR/Cas9 system을 찾는다면?

Guide-it™ CRISPR/Cas9 System (Green/Red)

(Code 632601/632602)

- CRISPR/Cas9 세팅이 편리한 single vector system
- 하나의 벡터에서 sgRNA, Cas9, 형광 리포터 단백질까지 발현!

▶ Guide-it™ CRISPR/Cas9 제품 flow chart

Clontech은 성공적인 CRISPR/Cas9을 위한 제품을 구비하고 있습니다. 각 실험 절차에 필요한 모든 제품을 다카라코리아 홈페이지에서 확인하세요.

