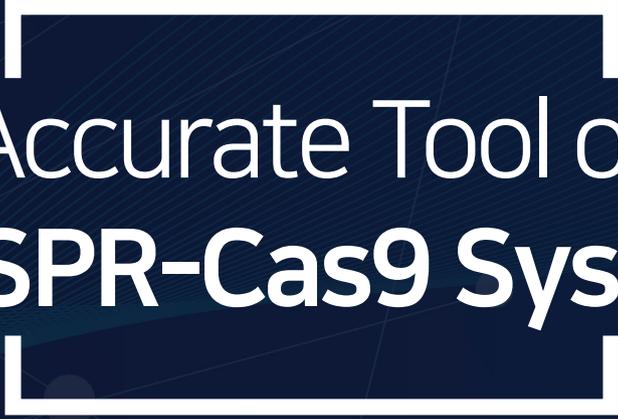


Best Solution for CRISPR Genome-Editing





Accurate Tool of **CRISPR-Cas9 System**



AccuTool[™]
Partnership with ToolGen

AccuTool™

CRISPR Services

1. Design

- gRNA design service
- Donor design service

2. Construction & Synthesis

- RNP (RiboNucleoProtein): aRGEN & Cas9
- Plasmid: dRGEN-sgRNA & pRGEN-Cas9

3. Donor Synthesis

- Single strand DNA Donor
- Double strand DNA Donor

4. Validation

- NGS In/del analysis
- Mutation detection (T7E1 assay) Kit

Plus. All-in-one Kit

- CRISPR-Cas9 Starter Kit
- Safe Harbor Knock-In Kit



AccuTool™ | Accurate Tool of CRISPR-Cas9 System

Global Leader in Genome Editing Technology

CRISPR-Cas9 기술은 1세대 ZFN (Zinc Finger Nuclease), 2세대 TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)보다 경제적이고 효율적인 강력한 3세대 Genome Editing Tool입니다. CRISPR-Cas9 시스템은 target DNA를 정확하게 인식하고 결합하는 guide RNA와 target DNA를 절단하는 Cas9 nuclease로 구성되어 DNA 이중 가닥을 손상시키고 이것을 복구하는 과정을 통해 유전자를 조작할 수 있습니다. 바이오니아는 유전자 편집 기술을 선도하고 있는 툴젠과 협력하여 런칭한 AccuTool™을 통해 gRNA 디자인부터 합성, Cas9 nuclease, Validation까지 Genome Editing 전반의 Total Solution을 제공합니다.

Background Technology

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)-Cas9은 미생물의 적응면역 현상에서 기인한 유전자 편집 기술로, target DNA를 정밀하게 잘라낸 다음 자연적으로 DNA가 복구되도록 함으로써 보다 간단하고 효율적으로 유전자 조작을 가능하게 합니다. 이 시스템은 gRNA (guide RNA)와 Cas9 nuclease로 구성되며, RNA 유전자 가위(RNA-guided engineered nucleases, RGENs) 기술이라고도 불립니다.

gRNA는 target 서열에 상보적으로 결합하는 crRNA와 Cas9-binding을 위한 tracrRNA로 구성됩니다(Figure 1). gRNA는 Cas9을 target 부분으로 안내하는 역할을 하며, target DNA 서열과 상보적으로 결합합니다. Target DNA 서열 3' 말단에는 PAM (Protospacer adjacent motif) 서열이 있어야 합니다.

gRNA가 Cas9 nuclease와 복합체를 형성하고 target 서열에 특이적으로 결합하면, Cas9 nuclease는 PAM 서열을 인식하고 PAM의 3 bp upstream 부분에 이중 가닥 손상(Double Strand Break, DSB)을 일으킵니다(Figure 2).

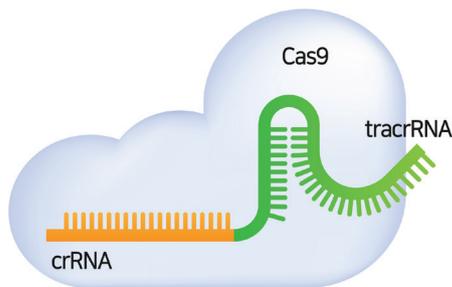


Figure 1. gRNA와 Cas9 nuclease

gRNA는 target specific sequence인 crRNA와, Cas9과 complex를 이루는 scaffold sequence인 tracrRNA로 구성됩니다.

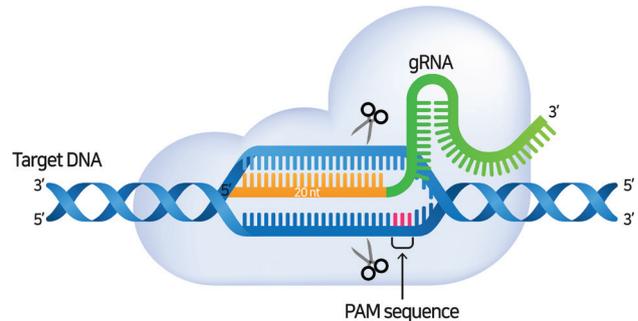


Figure 2. CRISPR-Cas9 system

RNA-guided Cas9이 target 서열의 3' 말단의 PAM 서열의 (5'-NGG-3') 3 bp upstream 부위를 인식하여 DSB를 형성합니다.

DSB로 인해 손상된 DNA를 복구하기 위하여 세포는 일반적으로 두 가지의 경로를 거치게 됩니다.

: Non-homologous end-joining (NHEJ) 또는 Homology-directed repair (HDR) pathway.

Donor template이 없는 경우 **NHEJ pathway**를 통해 DSB가 재조립되며, 유전자의 coding region 내에 Indel (Insertion and deletion) mutations의 발생으로 인한 frameshifts 및 premature stop codon으로 유전자 Knock-out이 만들어집니다.

반면, **HDR pathway**는 Donor template가 있을 때 target 서열에서 정밀하고 정확한 수정을 진행하여 새로운 유전자를 삽입할 수 있습니다(Figure 3).

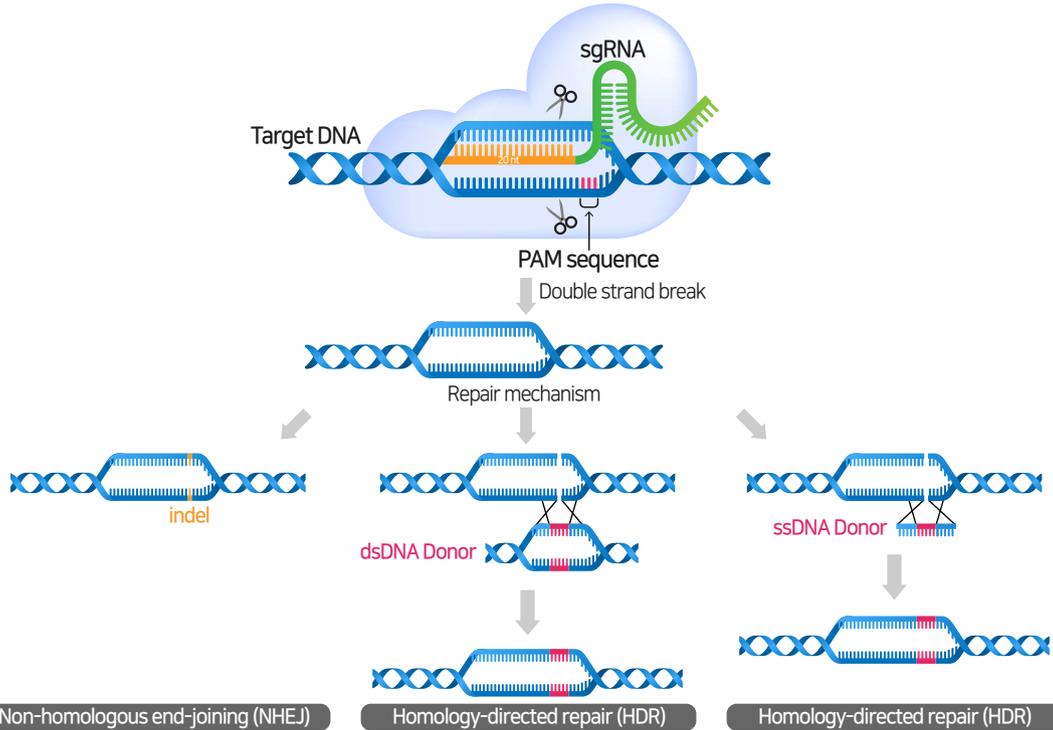
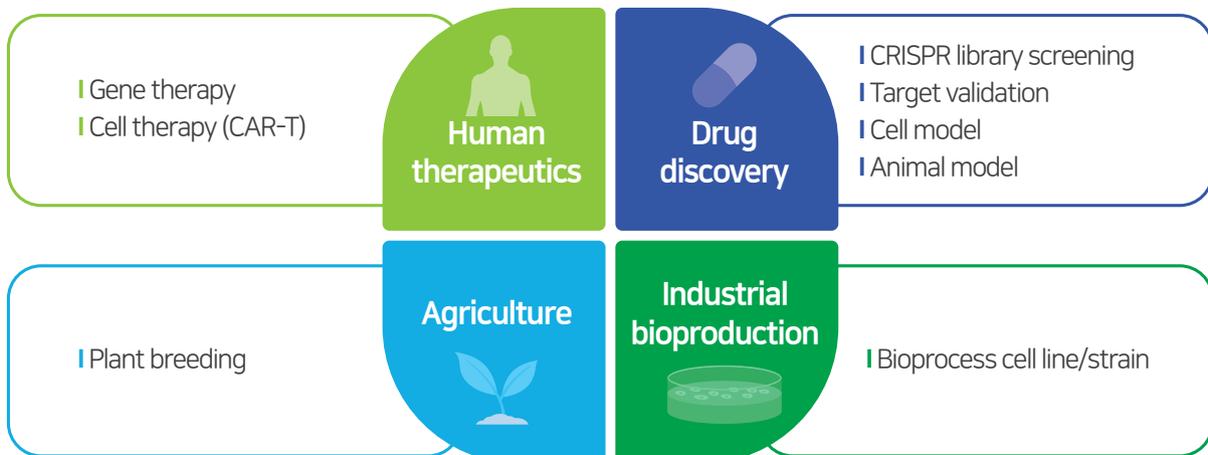


Figure 3. CRISPR-Cas9-mediated DSB repair mechanisms

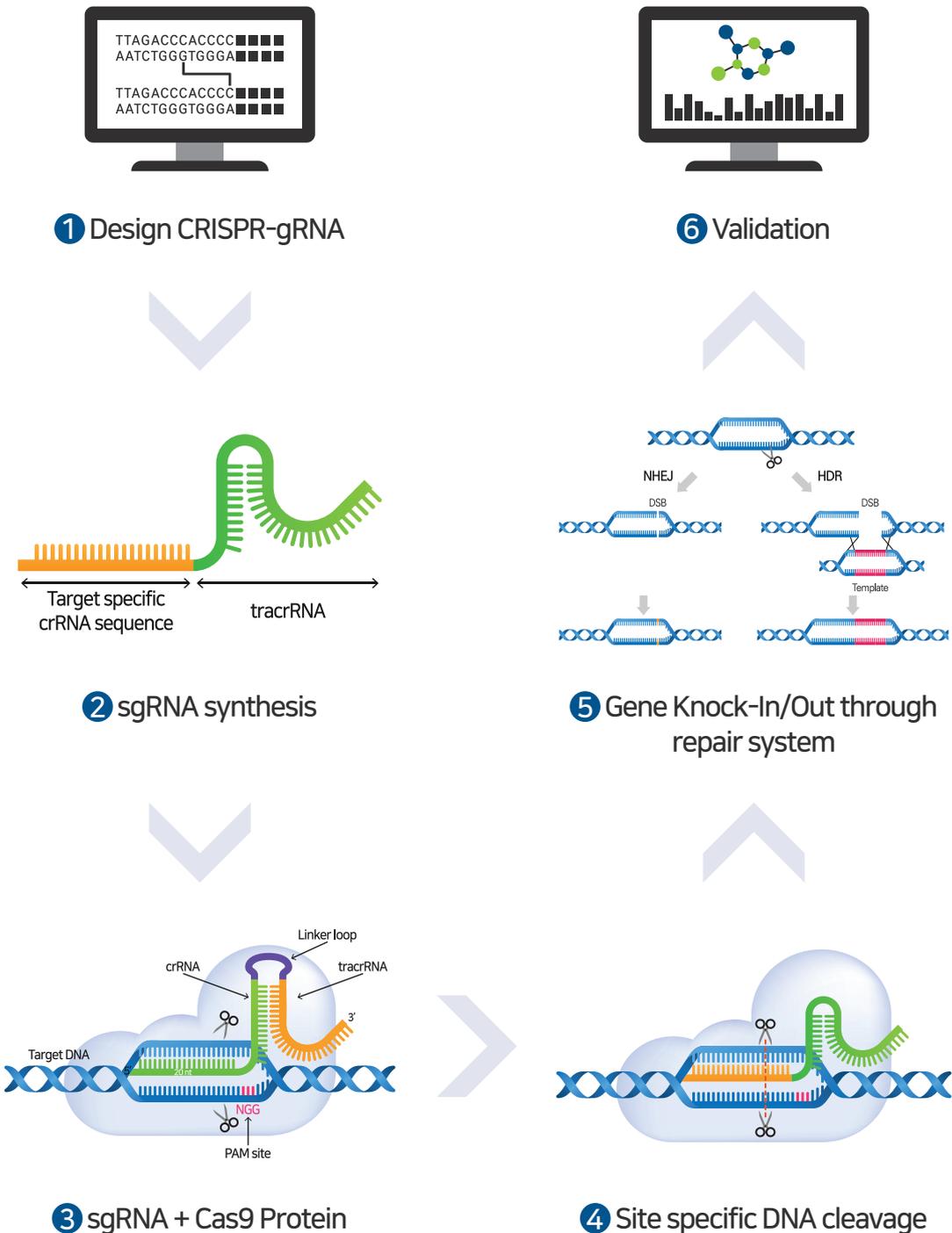
DSB repair 메커니즘에는 NHEJ와 HDR pathway가 있습니다. NHEJ pathway는 DSB의 말단을 연결하는 과정에서 일부 염기가 삽입되거나 결실되어 Indel (Insertion and deletion) 변이를 만듭니다. HDR pathway는 Donor DNA (dsDNA Donor 또는 ssDNA Donor)의 homologous 서열을 통해 정확한 유전자 삽입이 가능합니다.

Applications with CRISPR-Cas9 Technology



Bioneer and ToolGen provide a total solution of Genome editing!

CRISPR-Cas9 Guidelines



[바이오니아가 알려주는 CRISPR-Cas9 실험 가이드]

STEP 1 유전자 편집은 gRNA를 디자인(*AccuTool™ gRNA design service*)하여 Cas9 nuclease를 target DNA 서열로 유도함으로써 시작됩니다.

STEP 2 RNA-guided Cas9 nuclease에 의해 절단된 DSB의 복구를 위한 방법 중 NHEJ pathway를 이용하기 위해서 gRNA와 Cas9 nuclease를 실험에 맞게 합성 및 선택하여 target 세포에 바로 transfection이 가능한 형태로 제공합니다.

- ◉ aRGEN (RNP) (*AccuTool™ gRNA & Cas9 Protein (RNP)*)
- ◉ dRGEN (Plasmid) (*AccuTool™ gRNA & Cas9 (Plasmid)*)
- ◉ 2-part gRNA (*AccuCRISPR™ 2-part gRNA*)

STEP 3 DSB의 복구를 위한 또 다른 pathway인 HDR을 이용하기 위해서는 Donor template를 디자인(*AccuTool™ Donor design service*) 한 후 gRNA, Cas9 단백질과 함께 target 세포에 transfection하여 정밀한 수정을 진행해야 합니다.

- ◉ Donor synthesis (*AccuTool™ Donor DNA*)
 - + 검증되어진 gRNA와 HDR Donor vector를 이용하여 human AAVS1 유전자 부위/mouse Rosa26 유전자 부위에 원하는 유전자를 삽입할 수 있는 Safe Harbor Knock-In Kit (*AccuTool™ Safe Harbor Knock-In Kit*) 또한 만나볼 수 있습니다.
 - + CRISPR 실험을 처음 진행하신다면 실험에 필요한 모든 Materials와 Protocol을 받아볼 수 있는 All-In-One Kit (*AccuTool™ CRISPR-Cas9 Starter Kit*)를 추천합니다.

STEP 4 Mutation Detection Kit 또는 NGS 서비스를 통해, 제작된 gRNA의 유전자 편집 효율성을 평가할 수 있는 Validation 서비스 (*AccuCRISPR™ Validation Service*)를 제공합니다.



1. Design

AccuTool™ gRNA 및 Donor Design Service는 정확한 CRISPR-Cas9 유전자 편집을 위해 효율이 높은 gRNA와 Donor를 디자인하여 제공하는 서비스입니다.

CRISPR-Cas9 기술에서 가장 중요한 gRNA 디자인

CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 유전자를 편집할 때 정확도가 높은 gRNA를 디자인하는 것은 성공적인 결과를 얻기 위해 매우 중요합니다. gRNA는 Cas9과 복합체를 이루는 tracrRNA와, 편집할 유전자의 target 서열에 특이적으로 결합하는 약 20-nt의 crRNA로 구성된 single strand RNA입니다. gRNA의 target 서열을 바꾸는 것만으로 Cas9 nuclease의 유전자 target을 바꿀 수 있으므로 gRNA 디자인 및 합성은 CRISPR-Cas9 실험에서 가장 중요하고 기초적인 단계입니다.

Knock-In 실험에서 가장 중요한 Donor 디자인

Homology-directed repair (HDR)은 주요한 DSB repair 시스템으로, 유전자 knock-in/out, replacement, point mutations 등을 수행할 수 있습니다. 유전체의 특정 부분에 target 유전자를 삽입하는 Knock-in은 homologous 서열이 포함된 donor template를 삽입하여 DSB를 복구하므로, HDR 시스템을 통한 유전체의 정밀한 편집이 가능합니다.

바이오니아는 디자인이 어려운 연구자들을 위해 Knock-In 효율이 가장 높은 HDR Donor template를 디자인하여 제공합니다. 제공받은 HDR Donor 서열은 ssDNA Donor 또는 dsDNA Donor 형태로 주문 가능합니다.



소요 시간 : 1주일(영업일 기준)

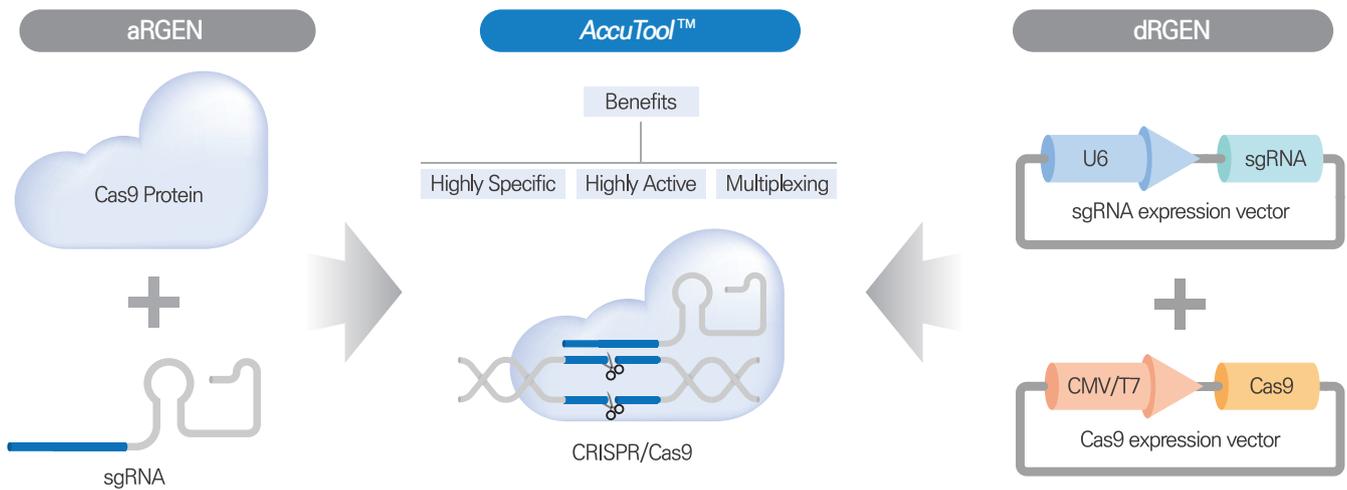
RGEN Target	Direction	Mismatch			
		0 bp	1 bp	2 bp	3 bp
TCCCCACCATGCCTAGCCTTTGG	+	1	0	0	13
CCTCACCATGCCTAGCCTTTGGG	+	1	0	0	19
GAGAAGTGTGCCCAAGGCTAGG	-	1	0	0	6

결과 레포트 발송



2. Construction & Synthesis

RNA-Guided Endonuclease (RGEN)은 CRISPR-Cas9 시스템을 기반으로 한 차세대 nuclease로, 유전자 편집을 위한 혁신적인 도구입니다. RGEN은 Cas9과 gRNA로 구성되며, target 서열(19-20 bps)과 PAM (5'-NGG-3') 서열을 인식합니다. 이러한 특성으로 실험자들은 RGEN을 통해 유전체의 모든 영역을 손쉽게 편집할 수 있습니다. 추가적으로, target 서열의 특이적인 절단을 통해 *in vitro*와 *in vivo*에서 유전자 편집(knock-in/knock-out/locus deletion)을 효율적으로 수행할 수 있습니다.



CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein (aRGEN)	CRISPR-Cas9 Plasmid (dRGEN)
<ul style="list-style-type: none"> ◉ Ready-to-inject ◉ KO animal production by embryo injection ◉ Direct delivery into culture cells 	<ul style="list-style-type: none"> ◉ Ready-to-transfect ◉ Plasmid-based system ◉ Compatible with general transfection protocols

2. Construction & Synthesis | RNP (aRGEN)

gRNA와 Cas9 protein의 RNP complex

서열 특이적인 gRNA와 Cas9 단백질은 안정적인 ribonucleoprotein (RNP) 복합체를 형성하여 *in vitro* 와 *in vivo* 모두에서 target 서열에 작동 가능한 nuclease를 형성합니다. 이 Cas9-gRNA RNP 복합체는 primary cell과 같이 transfection이 어려운 세포에 사용될 수 있습니다. 또한 transfection 이후 세포 내 잔여 시간이 짧아, off-target 효과를 최소화할 수 있습니다.

AccuTool™ gRNA & Cas9 protein (RNP) 서비스는 target 세포에 유전자 편집을 적용할 수 있는 매우 효율적이고 구체적인 방법을 제공합니다.

·바이오니아의 aRGEN



높은 Knock-out 효율



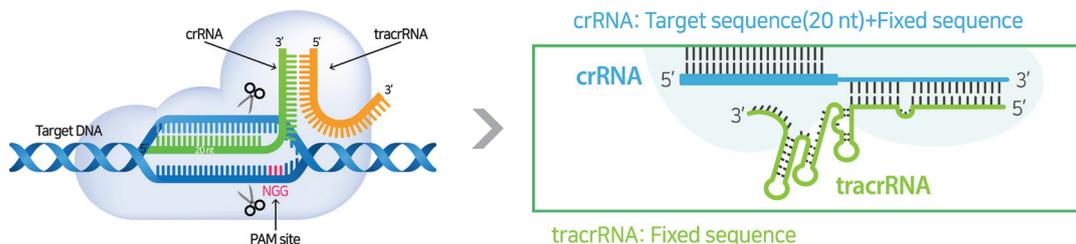
별도 prep 없이
바로 세포 적용



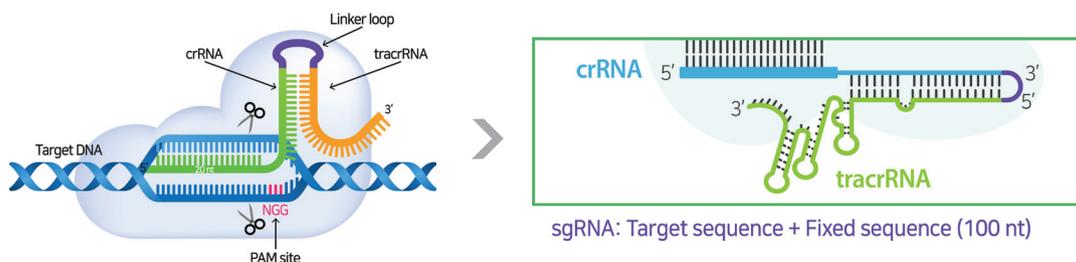
빠른 배송

aRGEN-sgRNA

1 2-Part guide RNA (crRNA:tracrRNA)



2 Single guide RNA (sgRNA)



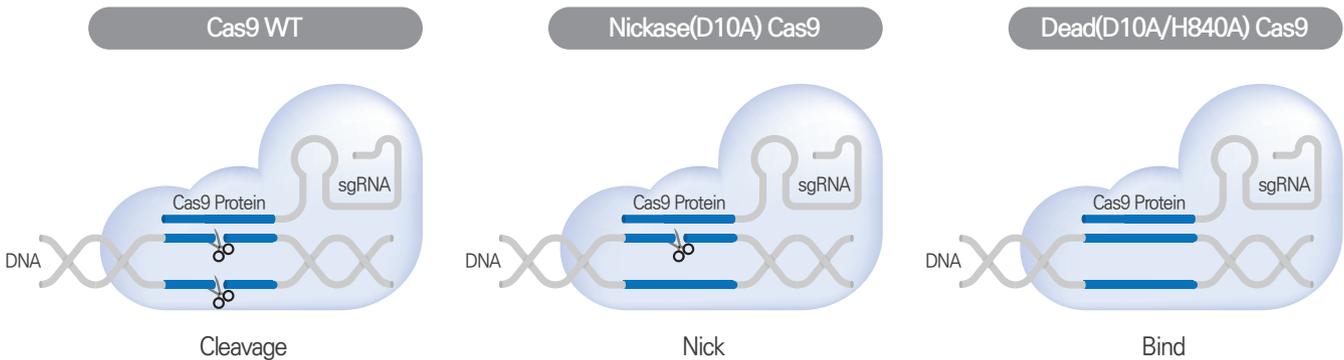
Guide RNA	2-Part guide RNA		Single guide RNA
	crRNA:tracrRNA		sgRNA
Features	Length-optimized for performance and easy manufacturing		Activate the endonuclease for cleavage of genomic DNA
Nuclease	Cas9 Protein		
PAM sequence	NGG		
Cutting mechanism	Blunt ends		

2. Construction & Synthesis | RNP (aRGEN)

Cas9 selection

·Recombinant Cas9 protein selection guide

Cas9 WT Protein	가장 일반적으로 사용되는 Cas9 nuclease로, <i>Streptococcus pyogenes</i> 에서 유래하였으며, site에 특이적으로 DSB를 일으키는 RNA-guided nuclease입니다.
Nickase(D10A) Cas9 Protein	Cas9에 D10A point mutation을 도입한 것으로, single strand DNA nicks을 일으킬 수 있습니다. Paired Cas9 Nickase는 DNA의 각 strand에 하나씩 두 개의 single strand nick을 생성하여 target 서열에 DSB를 일으킵니다. 각각의 잘린 말단에 blunt ends 대신 긴 overhangs이 형성되어 유전자 integration 및 insertion을 더 효과적으로 제어할 수 있습니다.
Dead (D10A/H840A) Cas9 Protein	Cas9에 D10A 및 H840A point mutations를 도입한 것으로, 이 단백질은 endonuclease 활성은 없지만 target 서열에 결합하는 특성은 그대로 가지고 있습니다. 이러한 특성을 활용하여 해당 단백질에 유전자의 과발현 혹은 억제를 유도하는 단백질들을 결합시켜 특정 유전자 발현 조절 실험에 적용할 수 있습니다.
Sniper Cas9 Protein	SpCas9의 variants로, on-target 효과가 우수한 특징을 가지고 있습니다. (high-specificity, low off-target)
Cyanine3-Cas9 Protein	Cyanine3가 표지된 제품으로, Cas9 WT과 Cas9 dead (D10A/H840A) Protein이 있습니다. Delivery를 직접 확인할 수 있는 Cyanine3 형광 표지된 Cas9을 제공합니다.



	Cleavage	Nick		Bind
		Single	Double	
NHEJ Mutagenesis (InDel)	O	X	O (insertion specificity)	X
HDR Genome Editing (Knock-in)		O (reduced efficiency)	O	X

·Cas9 nuclease

gRNA-Cas9 protein RNP complex	<ul style="list-style-type: none"> Transfection이 어려운 target 세포에 electroporation을 통해 전달이 가능합니다. Cas9과 gRNA 발현을 위한 전사나 번역 과정이 필요 없으므로 빠르게 유전자 편집이 가능합니다. 핵으로 전달되는 transfection 방법인 nucleofection 또는 microinjection을 선택할 때 유리합니다. 	<ul style="list-style-type: none"> Cell-type specific promoter activity와 무관합니다. Host genome 내에 무작위적으로 삽입될 위험이 없습니다.
gRNA and Cas9 mRNA	<ul style="list-style-type: none"> Target 세포에 chemical transfection 또는 electroporation을 통해 전달이 가능합니다. 전사가 필요 없으므로 빠르게 유전자 편집이 가능합니다. 	

2. Construction & Synthesis | Plasmid (dRGEN)

Plasmid sgRNA + Plasmid Cas9

AccuTool™ gRNA & Cas9 (Plasmid) 서비스는 유전자 편집을 효율적이고 편리하게 사용할 수 있는 plasmid 기반의 시스템입니다. Custom sgRNA 발현 plasmid (GFP 선택)와 Cas9 발현 plasmid (human codon optimization, WT/Nickase/Sniper 선택)가 함께 제공되며, GFP plasmid를 통해 형광 현미경으로 세포 내 활동 수준을 확인할 수 있습니다. Plasmid는 lipofection, nanoparticle 또는 electroporation과 같은 일반적인 방법들을 통해 target 세포 내에 효율적으로 전달될 수 있습니다.

·바이오니아의 dRGEN



실험목적에 맞게
다양한 Plasmid DNA Type의
sgRNA, Cas9 선택



동결건조 형태로
높은 안정성



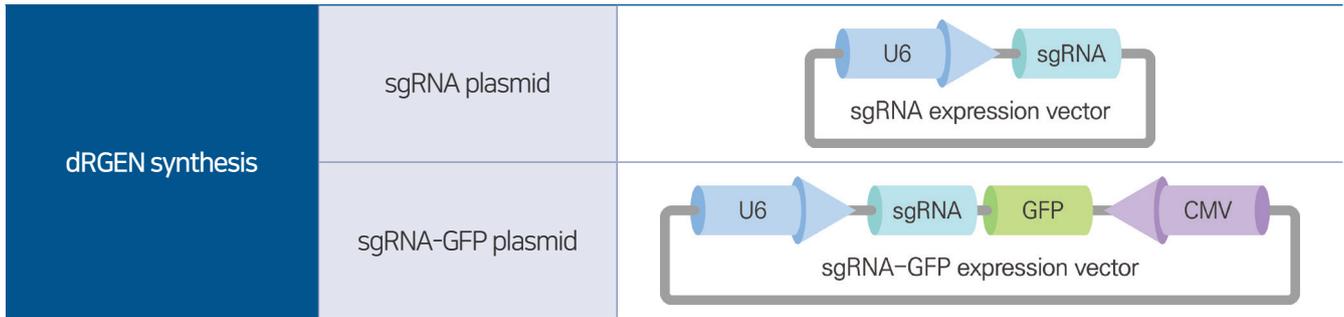
별도 prep 없이
바로 세포 적용

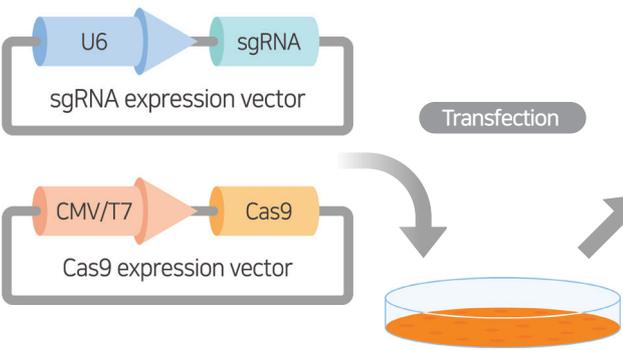


빠른 배송

sgRNA plasmid (dRGEN)

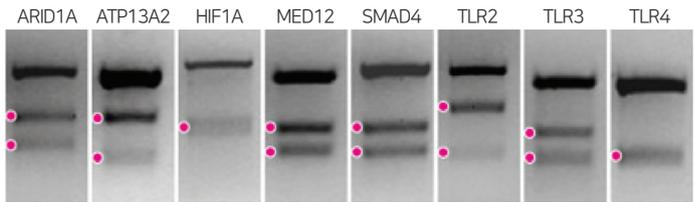
AccuTool™ dRGEN 서비스는 고객이 원하는 서열의 gRNA를 합성하여 기본 sgRNA plasmid (dRGEN-U6-sgRNA) 또는 sgRNA-GFP plasmid (dRGEN-U6-sgRNA-GFP-CMV)에 삽입하여 제공하는 Custom-dRGEN 합성 서비스와 Positive control로 이용할 수 있는 EGFP, HPRT1, CCR5 유전자에 대한 dRGEN-gRNA를 제공합니다. 본 서비스는 Ready-to-transfection 이 가능합니다.





Transfection

T7E1 assay (HEK 293T cells)



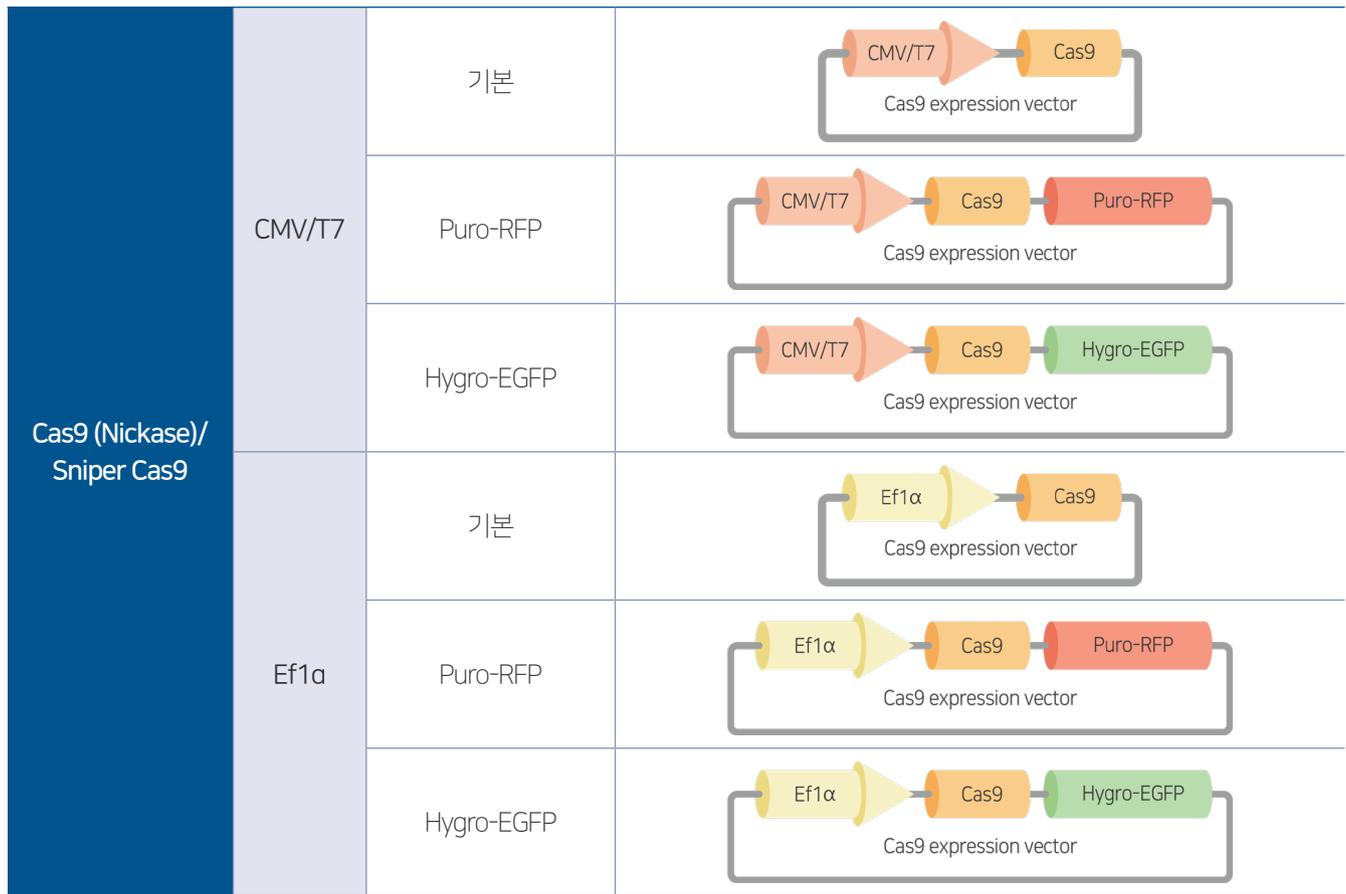
dRGEN_In/Del Analysis

	Total Sequences	Mutation Efficiency		Indel frequency
		Insertions	Deletions	
sgRNA #1	24911	5057	15719	20776 (83.4%)
sgRNA #2	48420	2919	40415	43334 (89.5%)
sgRNA #3	15563	559	9283	9842 (63.2%)
sgRNA #4	42276	1646	28355	30001 (71.0%)

2. Construction & Synthesis | Plasmid (dRGEN)

pRGEN-Cas9

·pRGEN Cas9-Customized vector



·Smallest size Cas9 from *Campylobacter jejuni*

CjCas9은 *Campylobacter jejuni*로부터 유래한 것으로, 가장 작은 크기(2.9 kb)의 nuclease를 제공합니다.

기존 Cas9의 단점인 큰 크기(4 kb)를 개선하기 위해 제작된 CjCas9은 SpCas9으로는 불가능했던 임상 치료에 적용 가능합니다.

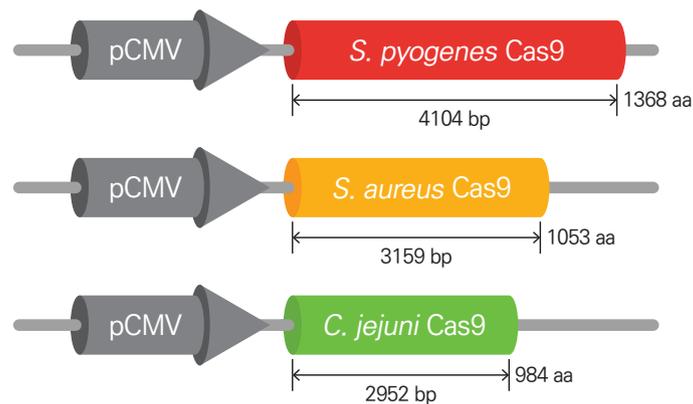


Figure 1. The smallest Cas9 Protein ever known to date

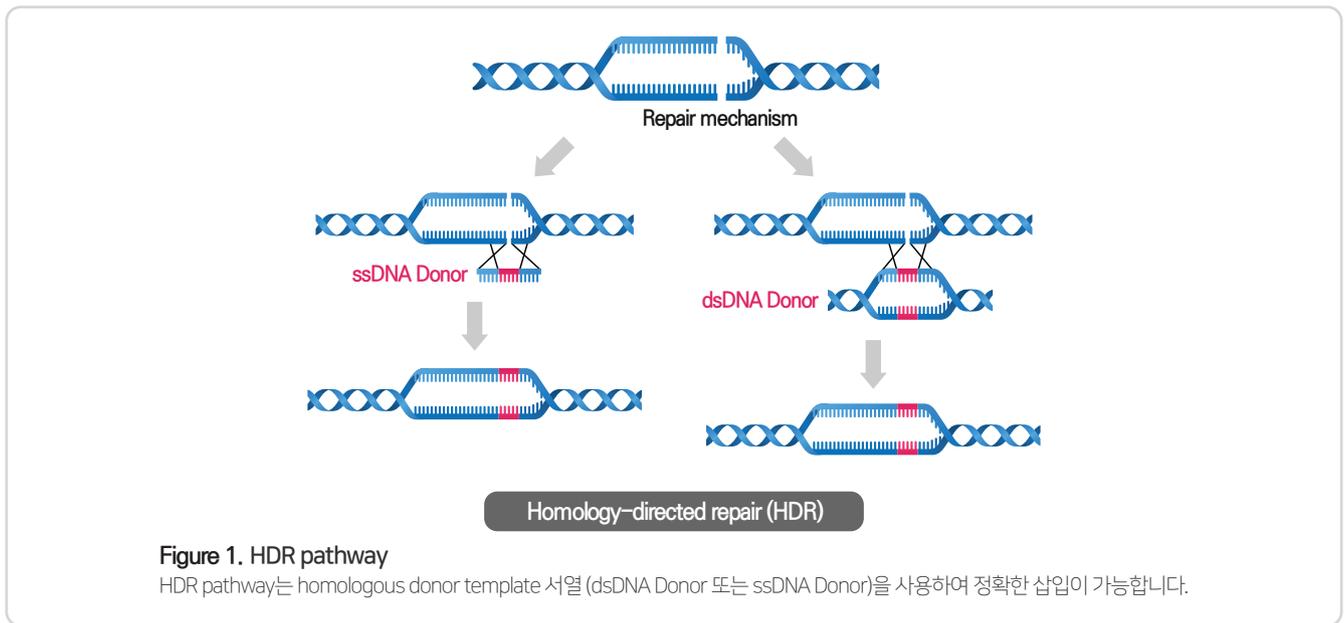
3. Donor Synthesis

- Single strand DNA Donor
- Double strand DNA Donor

Homology-directed repair (HDR)은 자연적인 DNA 복구 시스템 중의 하나로, 유전체의 특정 부분에 target 유전자를 삽입하는 Knock-in은 homologous 서열이 포함된 donor template를 삽입하여 DSB를 복구하므로, HDR 시스템을 통한 유전체의 정밀한 편집이 가능합니다.

이 때 사용되는 donor template는 insertion (또는 수정을 원하는) 서열 양쪽에 homology arms을 포함합니다. AccuTool™ Donor synthesis 서비스는 double-stranded DNA (dsDNA Donor), 또는 single-stranded DNA (ssDNA Donor)의 형태로 주문할 수 있습니다. HDR 시스템의 효율은 target region과 donor template 등에 따라 크게 달라질 수 있습니다 (Figure 1).

ssDNA Donor	dsDNA Donor
<ul style="list-style-type: none"> ◦ Off-target 최소화 ◦ Knock-in 효율성 향상 ◦ 세포 독성이 최소화되어 다양한 종류의 세포에 knock-in 가능 ◦ 100~150 bp ◦ Point mutation small-tagged insert 도입에 적합 	<ul style="list-style-type: none"> ◦ 보편적으로 사용하는 Donor 형태 ◦ Single-stranded DNA에 비해 비교적 저렴한 합성 비용 ◦ 긴 homology arms이 사용됨 ◦ 긴 size의 fragment 도입에 적합



Donor Synthesis Service

Customized Knock-in을 위해 ssDNA Donor와 dsDNA Donor 중 원하는 형태의 HDR Donor template를 합성하여 제공합니다. 아직 Donor 서열이 준비되지 않았다면 바이오니아의 Donor Design Service를 통해 서열을 확보할 수 있습니다. 바이오니아는 디자인이 어려운 연구자들을 위해 Knock-in 효율이 가장 높은 Donor를 디자인하여 드립니다.

• 바이오니아의 Donor



디자인부터 합성까지 완벽하게!



Knock-in 성공을 위한 최적화



어떤 Donor도 자신있게!

4. Validation

- NGS In/Del analysis
- Mutation detection analysis (T7E1 assay)

바이오니아는 제작된 RNA 또는 DNA type의 gRNA에 대한 유전자 편집 효율성 평가를 위해 NGS를 기반으로 한 In/del analysis 서비스 및 Mutation Detection Kit를 제공해 드립니다.

In/del analysis service

AccuCRISPR™ In/del analysis 서비스는 NGS를 통해 유전체의 특정 부분을 분석하는 Targeted resequencing 방법을 이용합니다. 이러한 표적 sequencing 방법은 빠르게 결과를 얻을 수 있고 경제적이므로 CRISPR-Cas9을 통한 유전자 편집 효율성을 평가하기 위한 좋은 방법입니다. NGS 결과는 분석 레포트와 함께 raw 데이터를 제공하며, 주문서 작성 시 기재된 e-mail로 발송됩니다.

- 바이오니아의 In/del service



High-quality 서열 분석 제공
(80 이상의 Q30 (%) 보장)



신뢰도 높은 Data



한 눈에 보기 쉬운 결과 레포트

Only Mi-seq running

Mi-seq running만 진행하여 FASTQ 파일로 결과를 제공하는 서비스로 최소 1개 plate (96 samples) 단위로 제공합니다. Running 준비가 완료된 sample 및 index, adaptor 정보를 정확하게 제공해 주셔야 합니다.

Total Joined Sequences	With both primers	More than minimum frequency	Insertions	Deletions	Indel ratio
67069	5857	5596	0	4689	83.8%

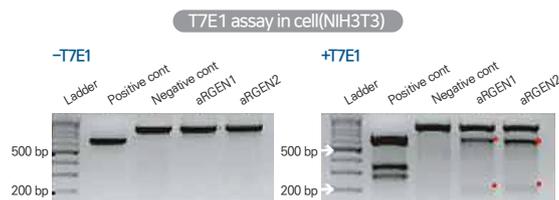
```

A A A T G T T C A G A G A A C A A A C T A C C A G C - - - - - A G T G G C G T G G G C T G C T T T C C C G C T A G
A A A T G T T C A G A G A A C A A A C T A C C A G C - - - - - T A C T G G T C A G C T C C T T C G G A C A A G C C A G T G G C G T G G G C C T G C T T T C C C G C T A G
A A A T G T T C A G A G A A C A A A C T A C C A G C - - - - - C A T A C T G G T C A G C T C C T T C G G A C A A G C C A G T G G C G T G G G C C T G C T T T C C C G C T A G
    
```

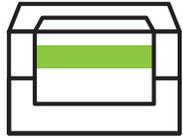
STEP 0.	STEP 1.	STEP 2.	STEP 3.	STEP 4.	STEP 5.
	Full Service			Only running service	
Order	1st PCR	2nd PCR	3rd PCR & Purification	Miseq, Running	Analysis
	Library 제작				

Mutation Detection Kit (T7E1)

Genotyping 에서 가장 간편하게 많이 사용되는 T7E1 enzyme 과 positive control로 구성된 제품입니다.



- 바이오니아의 Mutation Detection Kit (T7E1)



Mutation detection에 필요한 모든
제품으로 구성된 All-in-one kit



세포로부터 직접 PCR
증폭하여 높은 효율



손쉬운 사용

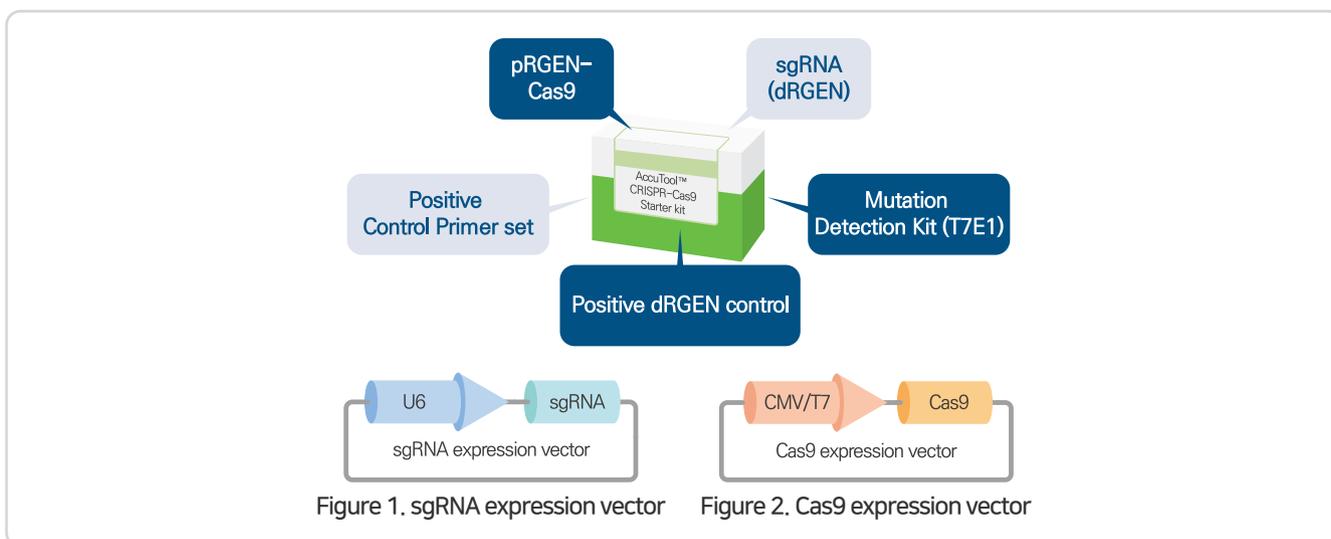
Plus. All-in-one Kit | Starter Kit

AccuTool™ CRISPR-Cas9 Starter Kit

이런 연구자분들께 추천합니다!

- CRISPR-Cas9 실험을 처음 접하는 분
- CRISPR-Cas9 실험을 하고 싶지만 어떤 제품들을 사야할 지 모르는 분
- Plasmid 형태의 CRISPR 실험을 원하시는 분
- 적은 양의 CRISPR-Cas9 실험을 하시는 분

sgRNA, Cas9, Mutation Detection Kit 등을 포함하여 CRISPR-Cas9 실험에 필요한 모든 Materials와 Protocol을 제공합니다. Plasmid 형태로 CRISPR 실험을 처음 진행하신다면 All-In-One Kit인 AccuTool™ CRISPR-Cas9 Starter Kit를 추천합니다.

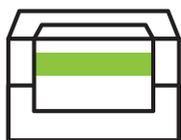


sgRNA와 Cas9은 plasmid 형태로 제공됩니다. sgRNA는 총 3종이 제공되며, 본 Kit를 이용하기 위해서는 미리 디자인된 sgRNA 서열이 필요합니다. 만일 sgRNA 서열이 준비되지 않았다면 바이오니아의 **Custom Design Service**를 통해 빠르게 준비하세요!

이제 편하게 실험하세요!

- sgRNA는 sgRNA expression vector에 cloning하여 제공됩니다(Figure 1).
- Plasmid 형태인 pRGEN-Cas9-CMV/T7 vector가 제공됩니다(Figure 2).
- Positive control인 *EGFP*, *CCR5*, *HPRT1* 중 선택한 하나를 제공합니다.
- 최적화된 유전자 편집 solution으로, Double Stand Breaks (DSB)를 형성합니다.
- T7타이를 이용한 Mutation Detection Kit가 제공되어 유전자 편집 여부를 쉽게 확인할 수 있습니다.

·바이오니아의 CRISPR-Cas9 Starter Kit



하나의 Kit로 CRISPR-Cas9
실험을 간편하게 수행



손쉬운 사용



동결건조 형태로
높은 안정성

Plus. All-in-one Kit | Safe Harbor Knock-In Kit

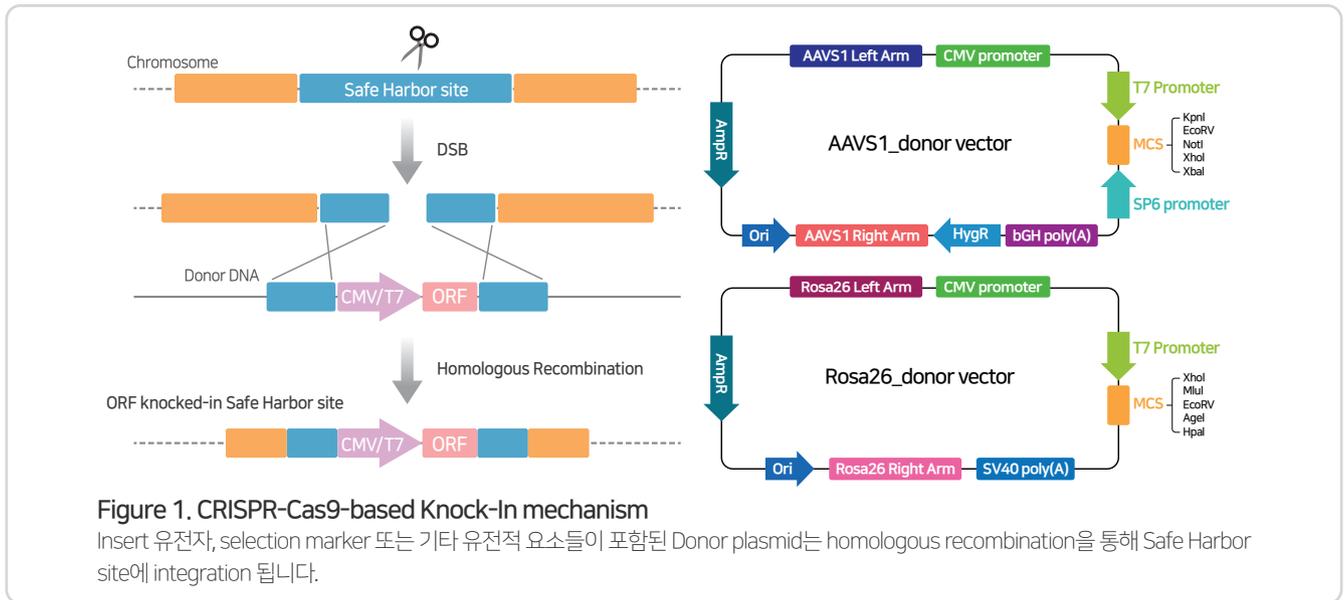
AccuTool™ Safe Harbor Knock-In Kit

Safe Harbor라고 하는 유전체의 특정 부위에 원하는 유전자를 삽입하여 유전자가 항상 안정적으로 발현되게 할 수 있습니다. 본 kit는 Safe Harbor 부위를 targeting하는 최적의 gRNA 발현 plasmid와 고효율로 유전자를 Knock-in 시킬 수 있는 HDR donor vector를 포함하고 있어, 이를 이용하여 원하는 insert 유전자를 안정적으로 발현하기 위한 최적의 제품입니다.

Knock-in 연구 시 주의할 사항은 원하는 유전자가 무작위적으로 host genome 내에 integration되어 돌연변이를 일으키거나 유전자의 침묵을 일으킬 수 있는 가능성입니다.

최근에 개발된 새로운 접근 방식은 유전체 내 'Safe Harbor' 부위에 insert 유전자를 전달하는 것입니다(Figure 1).

인간의 AAVS1 유전자 부위와 마우스의 Rosa26 유전자 부위에 원하는 특정 유전자를 삽입하면 일관되고 안정적인 발현이 가능합니다. AccuTool™ Safe Harbor Knock-In Kit는 인간 또는 마우스의 Safe Harbor 부위를 targeting하는 최적의 gRNA 발현 vector와 고효율로 유전자를 Knock-in 시킬 수 있는 empty donor vector가 포함된 kit입니다.



특정 유전자를 Knock-in시키기 위해서는 원하는 유전자가 cloning된 donor vector가 필요합니다.

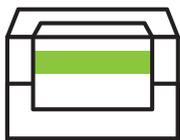
만일 donor template가 준비되지 않았다면 바이오니아의 **Gene Synthesis & Cloning Service**를 통해 준비할 수 있습니다.

Safe Harbor Knock-In Kit는 크게 AccuTool™ AAVS1 donor kit과 AccuTool™ Rosa26 donor kit 2가지 제품으로 판매됩니다.

본 kit에 포함된 AAVS1 donor vector 혹은 Rosa26 donor vector에 원하는 유전자를 cloning 한 후 sgRNA 및 Cas9 발현 vector와 함께 세포 내에 전달하면 각각의 AAVS1 과 Rosa26 부위에 DSB가 발생합니다.

그리고 세포의 자연적인 DNA 복구 과정인 HDR pathway를 통해 knock-in clone의 DNA 조각이 Safe Harbor site로 integration됩니다. 본 kit에 포함된 primer를 사용하여 PCR을 통해 원하는 유전자가 integration 되었는지 쉽게 확인할 수 있습니다.

·바이오니아의 Safe Harbor Knock-In Kit



하나의 Kit로 Knock-in 실험
간편하게 수행



Off-target integration 최소화와 site
특이적 유전자를 정확하게 Knock-in



Safe Harbor 유전자 부위를
이용하여 부작용 없이 지속적이고
안정적으로 유전자 발현

Ordering Information



제품명		규격	카탈로그 번호	
Custom Design Service				
1. guideRNA design service				
AccuTool™ gRNA design service		ea	ATC-0001	
2. Donor design service				
AccuTool™ Donor design service		ea	ATC-0002	
RNP(RiboNucleoProtein) : aRGEN & Cas9 protein				
1. aRGEN-Lyophilized sgRNA				
AccuTool™ sgRNA synthesis (aRGEN)		5 nmol	ATC-0005	
Positive control (aRGEN synthesis)	AccuTool™ Positive control_EGFP sgRNA (aRGEN)	2 nmol	ATS-0006	
	AccuTool™ Positive control_CCR5 sgRNA (aRGEN)	2 nmol	ATS-0007	
	AccuTool™ Positive control_HPRT1 sgRNA (aRGEN)	2 nmol	ATS-0008	
2. Recombinant protein				
Cas9 Protein	AccuTool™ Recombinant SpCas9 WT protein	50 µg	ATS-0010	
		50 µg x 2	ATS-0011	
		50 µg x 5	ATS-0012	
	AccuTool™ Recombinant Cyanine3-SpCas9 WT protein	50 µg	ATS-0013	
		50 µg x 2	ATS-0014	
		50 µg x 5	ATS-0015	
Cas9 nickase(D10A) Protein	AccuTool™ Recombinant SpCas9 Nickase (D10A) protein	50 µg	ATS-0016	
		50 µg x 2	ATS-0017	
		50 µg x 5	ATS-0018	
Cas9 dead(D10A/H840A) Protein	AccuTool™ Recombinant SpCas9 dead (D10A/H840A) protein	50 µg	ATS-0019	
		50 µg x 2	ATS-0020	
		50 µg x 5	ATS-0021	
	AccuTool™ Recombinant Cyanine3-SpCas9 dead (D10A/H840A) protein	50 µg	ATS-0022	
		50 µg x 2	ATS-0023	
		50 µg x 5	ATS-0024	
Sniper Cas9	AccuTool™ Recombinant Sniper Cas9 protein	50 µg	ATS-0025	
		50 µg x 2	ATS-0026	
		50 µg x 5	ATS-0027	
3. Cas9 mRNA				
Cas9 mRNA	AccuTool™ Cas9 mRNA	10 µg	ATS-0040	
	AccuTool™ Nickase(D10A) Cas9 mRNA			10 µg
Plasmid : pRGEN-sgRNA & pRGEN-Cas9				
1. dRGEN Synthesis (sgRNA plasmid)				
dRGEN Synthesis	AccuTool™ sgRNA synthesis (dRGEN)	2 µg	ATC-0050	
		50 µg	ATC-0051	
	AccuTool™ sgRNA synthesis (dRGEN:GFP-CMV)	2 µg	ATC-0052	
Control dRGEN	AccuTool™ Positive control_EGFP sgRNA (dRGEN)	50 µg	ATC-0053	
		2 µg	ATS-0054	
		2 µg	ATS-0055	
AccuTool™ Positive control_HPRT1 sgRNA (dRGEN)	2 µg	ATS-0056		
	2. pRGEN Cas9-Customized vector			
	pRGEN Cas9-Customized vector	AccuTool™ pRGEN-Cas9-CMV/T7	5 µg / 50 µg	ATS-0060/0061
AccuTool™ pRGEN-Cas9-CMV/T7 Puro-RFP		5 µg / 50 µg	ATS-0062/0063	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-CMV/T7 Hygro-EGFP		5 µg / 50 µg	ATS-0064/0065	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-Ef1a		5 µg / 50 µg	ATS-0066/0067	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-Ef1a Puro-RFP		5 µg / 50 µg	ATS-0068/0069	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-Ef1a Hygro-EGFP		5 µg / 50 µg	ATS-0070/0071	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-CMV/T7 nickase(D10A)		5 µg / 50 µg	ATS-0072/0073	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-CMV/T7 nickase(D10A) Puro-RFP		5 µg / 50 µg	ATS-0074/0075	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-CMV/T7 (nickase(D10A) Hygro-EGFP		5 µg / 50 µg	ATS-0076/0077	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-Ef1a nickase(D10A)		5 µg / 50 µg	ATS-0078/0079	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-Ef1a nickase(D10A) Puro-RFP		5 µg / 50 µg	ATS-0080/0081	
AccuTool™ pRGEN-Cas9-Ef1a nickase(D10A) Hygro-EGFP		5 µg / 50 µg	ATS-0082/0083	

Ordering Information

pRGEN Sniper Cas9-Customized vector	AccuTool™ pRGEN-sniper Cas9-CMV/T7	5 µg / 50 µg	ATS-0084/0085
	AccuTool™ pRGEN-sniper Cas9-CMV/T7 Puro-RFP	5 µg / 50 µg	ATS-0086/0087
	AccuTool™ pRGEN-sniper Cas9-CMV/T7 Hygro-EGFP	5 µg / 50 µg	ATS-0088/0089
	AccuTool™ pRGEN-sniper Cas9-Ef1a	5 µg / 50 µg	ATS-0090/0091
	AccuTool™ pRGEN-sniper Cas9-Ef1a Puro-RFP	5 µg / 50 µg	ATS-0092/0093
	AccuTool™ pRGEN-sniper Cas9-Ef1a Hygro-EGFP	5 µg / 50 µg	ATS-0094/0095
3. Smallest size Cas9 from <i>Campylobacter jejuni</i>			
	AccuTool™ dRGEN-CjCas9 (sgRNA plasmid)	2 µg / 50 µg	ATC-0100/0101
	AccuTool™ pRGEN_CjCas9_CMV/T7	5 µg / 50 µg	ATS-0102/0103
Donor DNA			
1. Donor Synthesis			
Single strand Donor	AccuTool™ ssDNA Donor (~150 nt)	2 nmol	ATC-0105
	AccuTool™ ssDNA Donor (150~400 nt)	2 µg	ATC-0106
	AccuTool™ ssDNA Donor (401~2,000 nt)	2 µg	ATC-0107
Double strand Donor	AccuTool™ dsDNA Donor	2~5 µg	ATC-0108
Kit			
1. Starter Kit			
Starter kit	AccuTool™ CRISPR-Cas9 Starter Kit	1 ea	ATC-0110
2. Safe Harbor Knock-In Kit			
AAVS1 donor kit	AccuTool™ AAVS1 donor kit	1 ea	ATS-0115
Rosa26 donor kit	AccuTool™ Rosa26 donor kit	1 ea	ATS-0116
Validation			
1. Next Generation Sequencing(NGS) service			
	AccuCRISPR™ In/del analysis service	rxn	ATC-0120
	AccuCRISPR™ Only Mi-seq running	1 plate	ATC-0121
2. Mutation Detection Kit			
	AccuCRISPR™ Mutation Detection Kit (T7E1)	1 ea	ATS-0125

✉ CRISPR-Cas9 제품 관련 문의: crispr@bioneer.co.kr



바이오니아는 연구자분들의 CRISPR 실험을 응원합니다!



BIONEER
Innovation • Value • Discovery

ㅣ 바이오니아(본사)

대전광역시 대덕구 문평서로 8-11 (문평동) ☎ 1588-9788 ✉ sales@bioneer.co.kr 🌐 www.bioneer.co.kr

ㅣ 강동사무소 | 강서사무소 | 강남사무소 | 강북사무소 | 판교사무소 | 대전·전북사무소 | 대구사무소 | 부산사무소

AccuTool™ is a trademark of Bioneer Corporation. All Rights Reserved