



# **EuroClone: guida al mondo del Genome Editing**

# Genome Editing

Genome Editing mediato da CRISPR/Cas9 è una nuova tecnologia che utilizza delle speciali "forbici molecolari" per tagliare il DNA cellulare in determinati punti. In corrispondenza delle sequenze tagliate può essere inserito del DNA ex novo, rendendo così possibile il knock-out del gene e/o la mutagenesi sito-specifica.

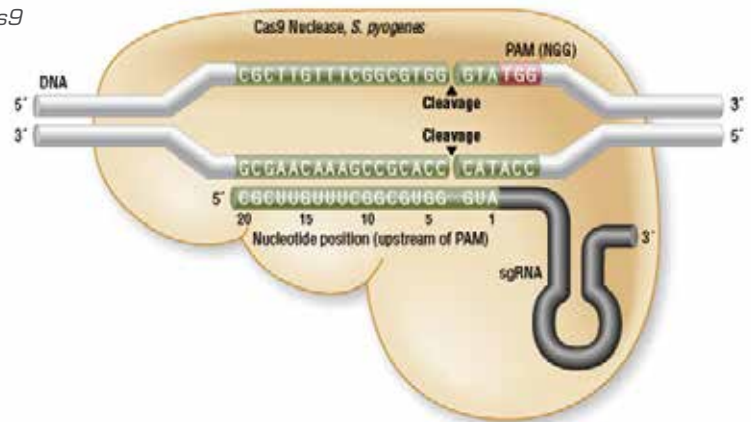
La tecnologia CRISPR/Cas9 rappresenta uno strumento ad alta efficienza per il Genome Editing di ultima generazione ed è attualmente il più promettente e utilizzato (rispetto ai sistemi TALEN e Zinc Finger, molto meno efficienti).

Il sistema è basato sull'interazione di una specifica sequenza, denominata **CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)** con l'enzima Cas9 (CRISPR associated protein-9), una endonucleasi RNA-guided che catalizza il taglio sito-specifico di DNA a doppia elica a monte di una sequenza NGG denominata PAM (Protospacer Adjacent Motif). Il terzo elemento da includere in un esperimento di Genome Editing è il **synthetic guide RNA (gRNA)**, una molecola contenente una sequenza di circa 20 nt, specifica per la porzione di DNA target complementare.

Per ottenere ricombinazione omologa del sito target e trasferire la mutazione desiderata, oltre a Cas9 e gRNA, è necessario anche disegnare un templatolo omologo (HR donor) alla regione di interesse. Le regioni omologhe possono essere amplificate da DNA genomico utilizzando una polimerasi high-fidelity (es. Q5 High-Fidelity DNA Polymerase), quindi clonate in un vettore di espressione. Ulteriori modificazioni della sequenza possono essere introdotte utilizzando sistemi di assemblaggio di frammenti (es. NEBuilder) o mediante mutagenesi sito-specifica, utilizzando Kit ed enzimi dedicati.

L'esperimento avviene di solito mediante i seguenti passaggi:

- ▶ **Scelta del promotore:** in alcuni casi questo può influenzare i siti target disponibili. I promotori U6 e T7 richiedono G o GG al 5' terminale
- ▶ **Misura dell'efficienza di targeting** mediante T7 Endonuclease I Mutation Detection Assay (SURVEYOR Assay)
- ▶ **Scelta del vettore:** diversi plasmidi sono stati validati in modelli cellulari e animali
- ▶ **Scelta tra Cas9 wild-type o double-nickase**
- ▶ **Design dei templati per la ricombinazione omologa**
- ▶ **Design dei templati di gRNA per il Gene Editing ad opera di Cas9**
- ▶ **Trascrizione/amplificazione in vitro dei gRNA**



## Espressione di Cas9

New England Biolabs fornisce Cas9 Nucleasi di *S. pyogenes* in forma di enzima purificato, per la trasfezione diretta del complesso Cas9/gRNA nelle cellule di interesse.

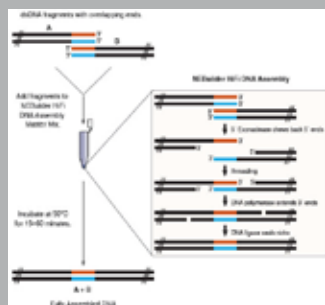
**System Biosciences (SBI)** ha a catalogo mRNA di Cas9 Nucleasi e Nickase, pronti per la trasfezione nelle cellule target. Vettori lentivirali in grado di esprimere Cas9 Nucleasi e Nickase sono prodotti da **SBI** (Precision X) e **Transomic** (transEDIT), in batteri (stock di glicerolo) o in particelle virali, con diverse opzioni di promotori, marker di selezione e reporter fluorescenti.



## Design e costruzione dei templati homologous repair (HR)

Le regioni omologhe possono essere amplificate da DNA genomico con la polimerasi high-fidelity di **NEB** (Q5 High Fidelity DNA Polymerase), quindi clonate nel vettore scelto (NEB PCR Cloning Kit).

Le modificazioni necessarie possono essere introdotte utilizzando NEBuilder o per mutagenesi sito-specifica con Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit. New England Biolabs fornisce sistemi ottimizzati per entrambi i passaggi.



## Trasfezione e Nucleofezione

### Trasfezione

Polyplus JetPRIME è particolarmente adatto ad esperimenti di Genome Editing: è efficiente, richiede piccole quantità di DNA, ed è ideale per la co-trasfezione di più plasmidi. Inoltre assicura un'ottima vitalità cellulare.

### Nucleofezione

La tecnologia brevettata del Nucleofector™ di Lonza è particolarmente efficace in cellule difficili da trasfettare (es. cellule primarie) e in grado di trasportare piccoli quantitativi di substrato mantenendo un basso impatto sulla vitalità cellulare. I programmi pre-impostati consentono un'alta efficienza di trasfezione non solo nel citoplasma, ma anche nel nucleo, indipendentemente dallo stato di proliferazione cellulare.



## Sintesi dei gRNA

▶ **Trascrizione in vitro.** Il sistema HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit di **New England Biolabs** permette una sintesi robusta di RNA di diversa lunghezza. La versione Quick utilizza una master mix, riducendo i tempi, i passaggi e quindi gli errori.

▶ **gRNA pre-designed.** **Transomic** fornisce transEDIT gRNA, plasmidi con design ottimizzato per il knock-down di target annotati e significativa riduzione degli effetti off-target. I design sono disponibili come gRNA singoli per induzione di double stranded breaks (DSBs), oppure come paired gRNA per l'impiego con Nickase.

### ▶ **Templato plasmidico.**

System Biosciences fornisce vettori lentivirali pre-linearizzati per clonaggio ed espressione di gRNA.

▶ **Metodo enzimatico con BbsI.** L'enzima di restrizione BbsI linearizza il vettore di espressione per gRNA, la T4 Kinase fosforila le estremità, e per azione della T4 DNA ligasi, viene riparato il nick creato dall'enzima.

▶ **Assembly Strategy.** Il template viene generato mediante assemblaggio di diversi gRNA in plasmidi (NEBuilder Kit).

▶ **Mutagenesi sito-specifica.** Introduce varianti di sequenza (inserzioni, delezioni, sostituzioni) in diverse tipologie di plasmidi.

## Cas9

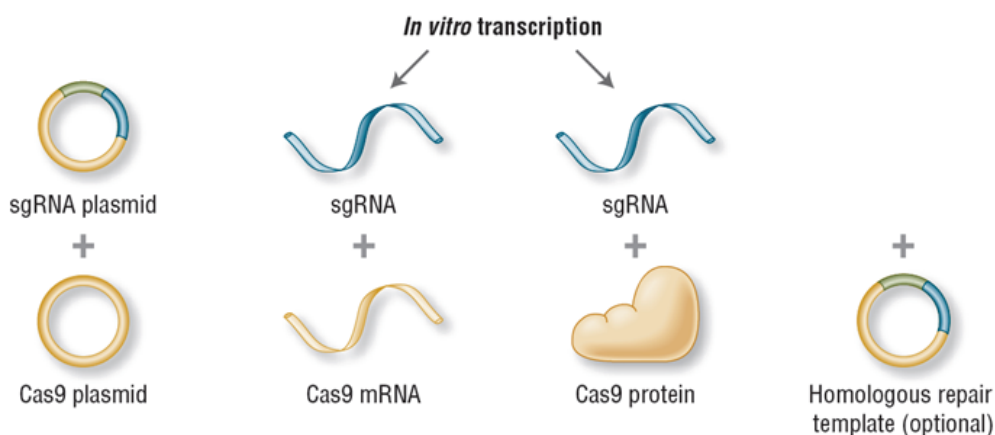
Cas9 è una endonucleasi RNA-guided che catalizza il taglio sito-specifico di DNA a doppia elica, originariamente identificata in *Streptococcus pyogenes* e coinvolta nel processo di immunità adattativa nei batteri, deputato all'eliminazione di materiale genetico esogeno (es. virus). Esistono 2 tipi di Cas9:

- 1) Cas9 wild-type: induce un break double-strand (DSB) sito-specifico, con l'attivazione del meccanismo di riparazione detto Non-Homologous End Joining (NHEJ), con conseguenti inserzioni e/o delezioni. In presenza di un template con omologia di sequenza per il locus target, i DSB possono essere riparati da meccanismi Homology-Directed Repair (HDR), consentendo quindi di ottenere anche mutazioni puntiformi e inserzioni.
- 2) Cas9 mutante: Cas9D10A Nickase, effettua il taglio solo a livello di un'elica di DNA, attivando sempre, in presenza di un template omologo, la riparazione del DNA per HDR.

## gRNA

Il gRNA può essere generato mediante *in vitro* Transcription (IVT), usando come stampo un template plasmidico o un frammento di PCR. Sono inoltre disponibili plasmidi ready-to-use con design pre-ottimizzato per il knock-down del target e conseguente significativa riduzione degli effetti off-target. E' possibile introdurre il gRNA nel vettore di espressione mediante diversi sistemi: metodo enzimatico con Bbs I, assemblaggio di diversi gRNA in plasmidi e mutagenesi sito-specifica.

Il gRNA sintetizzato può essere introdotto nelle cellule direttamente (mediante micro-injection o trasfezione) o indirettamente (mediante trasfezione di un plasmide codificante per gRNA).



### Sistemi all-in-one

Vettori di clonaggio per l'espressione simultanea di Cas9 e gRNA di interesse (SBI) o vettori lentivirali Ready-To-Use per Knock-Out di geni annotati (Transomic transEDIT).

SBI propone due tipologie di plasmidi PrecisionX™ all-in-one, in cui clonare il gRNA, dotati di promotore H1 e diversi marker di selezione: Cas9 SmartNuclease (hspCas9, Cas9 wt) e Cas9 Smart Nickase expression vectors (Cas9 Nickase, Cas9 mutata).

**Transomic** fornisce sistemi all-in-one pre-designed per Knock-Out del gene di interesse (3 diverse sequenze per target). Disponibili con Cas9 Nuclease o Nickase, diversi marker di selezione e reporter fluorescenti, in formato plasmide o particelle virali.

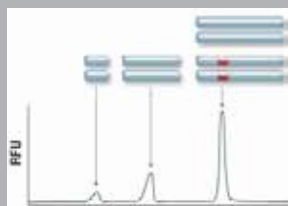
### Sistemi inducibili

Vettori lentivirali pre-disegnati per la trasduzione stabile e inducibile di Cas9 e transattivatore TRE3G. Il vettore di espressione pCLIP-gRNA di **Transomic** permette l'espressione transiente o stabile del gRNA nella cellula ospite, mediante un sistema lentivirale "replication-incompetent". Il vettore pCLIP-gRNA, deve essere utilizzato in combinazione con un vettore esprimente Cas9 dotato di promotore inducibile TRE3G e con un plasmide dotato di transattivatore costitutivo (Tet-On 3G TA).



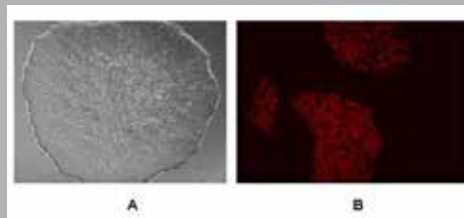
### Misura dell'espressione di Cas9 e dell'efficienza di targeting

Al termine dell'esperimento di Genome Editing è possibile verificare l'efficienza di targeting mediante T7 Endonuclease I Mutation Detection Assay e conseguente analisi con lo strumento Fragment Analyzer. Il saggio è in grado di rilevare heteroduplex di DNA risultanti dall'annealing dell'elica di DNA contenente le mutazioni con l'elica wild-type. Il Fragment Analyzer consente di rilevare gli heteroduplex con altissima sensibilità. SBI offre anche specifici primers per qPCR/RT PCR e anticorpi per quantificare i livelli di espressione del trascritto Cas9 Nuclease, Cas9 Nickase e Cas9 double mutant.



### Generazione di linee cellulari

Il Genome-wide CRISPRCLEAR™ Custom Transfection-Ready Kit di **Applied StemCell (ASC)** consente di generare linee cellulari (uomo, topo, ratto, iPSC) e contiene plasmidi gRNA validati mediante Surveyor Assay disegnati verso target e linee cellulari di interesse, donor DNA e vettori di espressione per Cas9. ASC offre anche servizi di Gene Editing in vitro e in vivo.



## Cas9 Nuclease, *S. pyogenes* (enzima purificato) - New England Biolabs

BM0386S/L Cas9 Nuclease, *S. pyogenes* 50/250 pmoli

### Transfection-ready Cas9 SmartNuclease mRNA - System Biosciences

mRNA sintetici di Cas9 Nuclease e Nickase, offerti da System Biosciences (SBI), pronti per la trasfezione.

### SmartNuclease e SmartNickase Lentivector Plasmids/ transEDIT® CRISPR Cas9 Nuclease Expression Vectors - System Biosciences/Transomic

Vettori lentivirali per l'espressione di Cas9 Nuclease o Nickase, disponibili da SBI e Transomic, in batteri in stock di glicerolo o in particelle virali pre-packaged.

Cas9	Promotore Cas9	Ant R	Fiuo Marker	Formato	Nickase Option
SBI	CMV, MSCV	Blast	GFP, RFP	mRNA, Lentivector, Lentivirus	+
Transomic	CMV, EFS	Blast, Puro	ZsGreen, tRFP	Glycerol stock, Lentivirus	su richiesta

Visita [www.systembio.com](http://www.systembio.com) e [www.transomic.com](http://www.transomic.com) per l'elenco completo.

### HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit - New England Biolabs

Per trascrizione in vitro dei gRNA. Da utilizzarsi con il vettore di clonaggio di SBI.

BE2040S	HiScribe T7 High Yield RNA Synthesis Kit	50 reaz.
BE2050S	HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit	50 reaz.

### NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit - New England Biolabs

Sistema innovativo per la costruzione di templati mediante assemblaggio e clonaggio di diversi gRNA (fino a 6) in un unico vettore grazie al design di primer specifici (on line Design Tool: <http://nebuilder.neb.com/>)

BE5520S	NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit	10 reaz.
BE2621S/L/X	NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix	10/50/250 reaz

### Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit - New England Biolabs

BE0554S	Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit	10 reaz.
---------	----------------------------------	----------

### gRNA linearized SmartNuclease Lentivector Plasmid - System Biosciences

Vettori lentivirali pre-linearizzati per clonaggio ed espressione di gRNA e sistemi per il clonaggio di gRNA multipli. Visita [www.systembio.com](http://www.systembio.com) per l'elenco completo.

SBCAS510A1	T7 gRNA cloning vector, linearized	10 reaz.
SBCAS9GRNAKIT	Multiplex gRNA Cloning Kit	1 Kit

### transEDIT CRISPR gRNA Pre-designed target Gene set - Transomic

Disponibili in formato Lentivector glycerol stock o Lentivirus Pre-packaged. Diverse opzioni di promotori e marker di selezione (antibiotici e fluorescenza).

Visita la pagina di ricerca "FETCH my gene™" sul sito [www.transomic.com](http://www.transomic.com) per la ricerca dei Gene set di interesse.

gRNA	Promotore gRNA	Ant R	Fiuo Marker	Formato	Pre-designed (KO)	+ Custom Cloning
SBI	H1/U6	Blast	GFP, RFP	Lentivector, Plasmide	-	+
Transomic	U6	Blast, Puro	ZsGreen, tRFP	Glycerol stock, Lentivirus	+	-

### Cas9-gRNA linearized SmartNuclease vector/transEDIT Cas9-gRNA All-In-One target Gene set - System Biosciences/Transomic

- SBI PrecisionX™ Cas9 SmartNuclease expression vectors (hspCas9, Cas9 wt) e Cas9 Nickase expression vectors (Cas9 Nickase, Cas9 mutata);

- Transomic transEDIT™ all-in-one pre-designed per KO del gene di interesse (3 diverse sequenze di gRNA per target).

Visita la pagina di ricerca "FETCH my gene™" per l'elenco dei Gene set sul sito [www.transomic.com](http://www.transomic.com)

All-In-One	Promotore gRNA	Promotore Cas9	Ant R	Fiuo Marker	Formato	Nickase Option	Pre-designed (KO)	Custom Cloning
SBI	H1	EF1, CAG, CMV, (MSCV)	Puro	GFP, RFP	Lentivector, Lentivirus, Plasmide	+	-	+
Transomic	U6	EFS	Blast, Puro	ZsGreen, tRFP	Glycerol stock, Virus	+	+	-

### transEDIT CRISPR gRNA target Gene set Inducible Vectors - Transomic

Vettori lentivirali pre-disegnati per la trasduzione stabile e inducibile di Cas9. Disponibili in versione gRNA e all-in-one come particelle virali pre-impaccate (10<sup>6</sup> TU/ml).

- transEDIT Human CRISPR gRNA target gene set (pCLIP-gRNA-EFS-Puro) - Viral Particles (1 ml at >10<sup>6</sup> TU/ml)

- transEDIT Human Inducible CRISPR Cas9 Nuclease plus gRNA All-In-One target gene set (pCLIP-All-EFS-Puro) - Viral Particles (100 ul at >10<sup>6</sup> TU/ml)

Visita la pagina di ricerca "FETCH my gene™" per l'elenco completo dei reporter e dei Gene set sul sito [www.transomic.com](http://www.transomic.com)

### T7 Endonuclease I Mutation Detection Assay - New England Biolabs/Advanced Analytical (AATI)

- Per verificare l'efficienza di targeting mediante heteroduplex e taglio con T7 Endonuclease I di NEB.

- Analisi ad alta risoluzione dei frammenti mediante Fragment Analyzer (AATI).

BM0302S/L	T7 Endonuclease I	250 U/1.250 U
DNF4803000	Fragment Analyzer dsDNA Cleavage Kit	3000 reaz.

### Reagente di trasfezione JetPRIME - Polyplus Transfection

Adatto ad esperimenti di Genome Editing: ideale per co-trasfezione ed elevata vitalità cellulare.

PP11401/07/15	JetPRIME	0,1/0,75/1,5 ml
---------------	----------	-----------------

### Nucleofector™ - Lonza

Nucleofezione: sistema brevettato da Lonza. Ideale per co-trasfezione di plasmidi, proteine e peptidi in cellule difficili (cellule primarie, hESC, iPSC, ...).

Strumenti e protocolli per ogni tipo di modello cellulare.

## EuroClone S.p.A.

Via Figino, 20/22 • 20016 Pero (MI) Italy • ☎ +39 02 38195.1 • 📠 +39 02 38101465 • ✉ info@euroclone.it • www.euroclone.it

Quality Management Systems certified according to ISO 9001 and ISO 13485 international standards