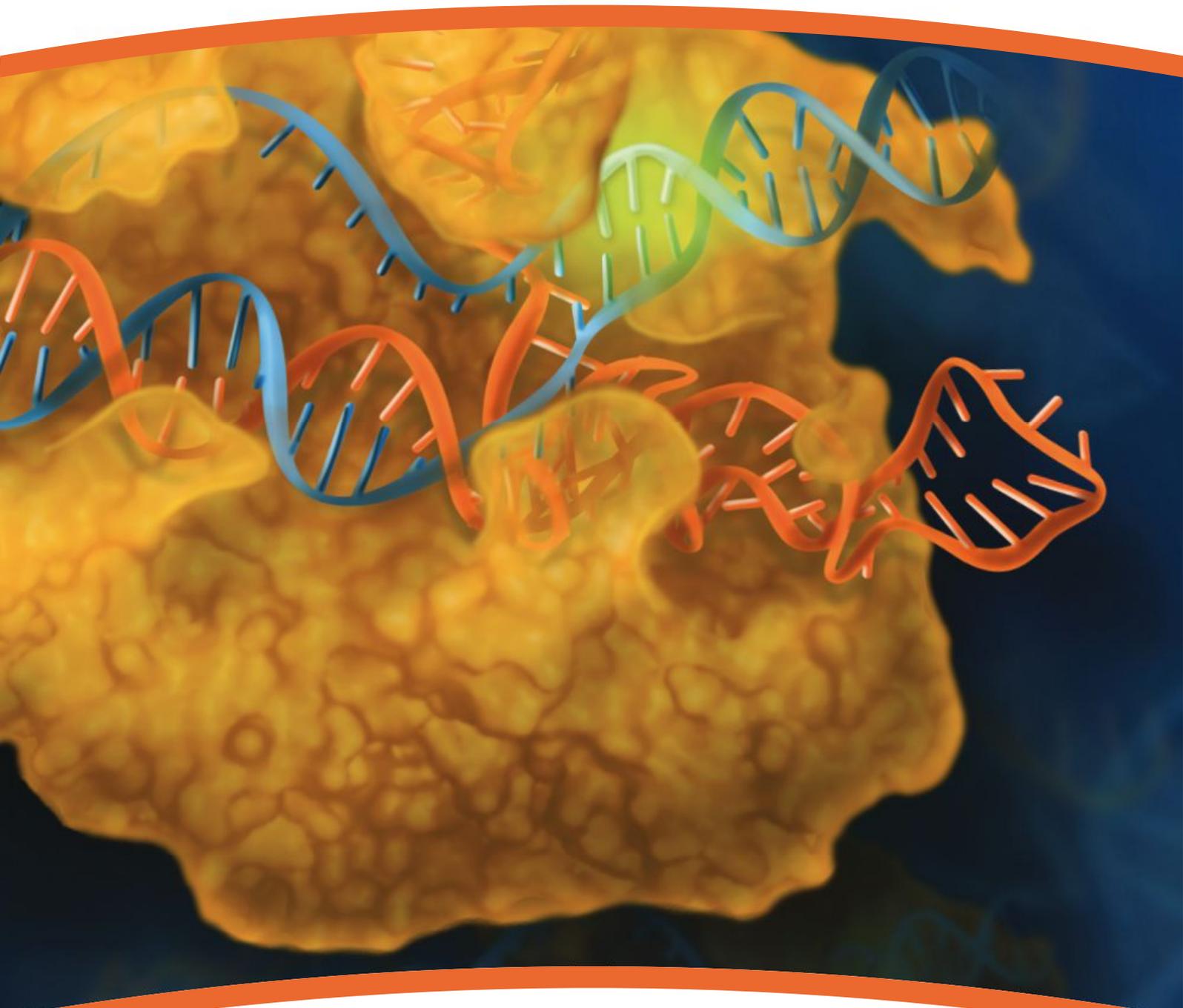


Euroclone: guida al mondo del Genome Editing 2.0



Genome Editing

Il Genome Editing con CRISPR/Cas9 consente di ottenere il knock-out di un gene, mutazioni puntiformi, inserzioni o delezioni con maggiore efficienza rispetto ad altri sistemi, come TALEN e Zinc Finger.

La tecnologia si basa sull'interazione della sequenza CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) con l'enzima Cas9 (CRISPR associated protein-9), una endonucleasi RNA-guidata che catalizza il taglio sito-specifico del DNA a monte della sequenza consenso, denominata PAM (Protospacer Adjacent Motif).

Il synthetic guide RNA (gRNA) parzialmente complementare al DNA target, veicola l'enzima in corrispondenza del sito da modificare.

Per esperimenti di Knock In o sostituzione di sequenza, è necessario introdurre un template di DNA (HR donor) con la variante di interesse. La sequenza del HR donor può essere modificata tramite assemblaggio di frammenti / PCR cloning o con mutagenesi sito-specifica, mediante kit ed enzimi dedicati.

Cas9

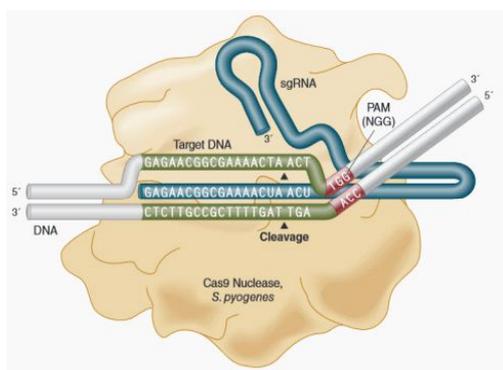
Cas9 è una endonucleasi RNA-guidata, identificata in *Streptococcus pyogenes*, che catalizza il taglio sito-specifico di DNA a doppia elica, coinvolta nel processo di immunità adattativa nei batteri.

Cas9 induce un double-strand break (DSB) sito-specifico, con attivazione della riparazione Non-Homologous End Joining (NHEJ), e conseguente frameshift da inserzioni e/o delezioni casuali che determinano il Knock Out del target. In presenza di un template omologo al locus target, i DSB possono essere riparati da meccanismi Homology-Directed Repair (HDR), consentendo quindi di ottenere mutazioni puntiformi e inserzioni (Knock In).

E' possibile introdurre Cas9 mediante trasfezione o infezione di vettori di espressione, o tramite trasfezione diretta dei complessi ribonucleoproteici Cas9/gRNA.

Vettori lentivirali in grado di esprimere Cas9 Nuclease sono prodotti da **System Biosciences (SBI)** (SmartNuclease) e **Transomic** (transEDIT), e possono essere forniti in forma di glicerato batterico o di particelle virali, con diverse opzioni di promotori, marker di selezione e reporter fluorescenti

New England Biolabs fornisce Cas9 purificata da *S. pyogenes*, con segnale di localizzazione nucleare NLS. E' disponibile anche la variante Cas12a (Cpf1)



gRNA

Sintesi dei gRNA

- **In vitro synthesis:** Il sistema **EnGen sgRNA Synthesis Kit di NEB** consente In vitro Transcription (IVT) del gRNA a partire da un template ssDNA. La reazione avviene in singolo tubo riducendo i tempi, i passaggi e quindi migliorando l'efficienza e l'accuratezza della procedura.

- **gRNA pre-designed:** **Transomic** fornisce i vettori lentivirali **transEDIT** single gRNA o **transEDIT dual-CRISPR**, che esprimono uno o due gRNAs, per lo stesso gene oppure due geni diversi (combinatorial KO).

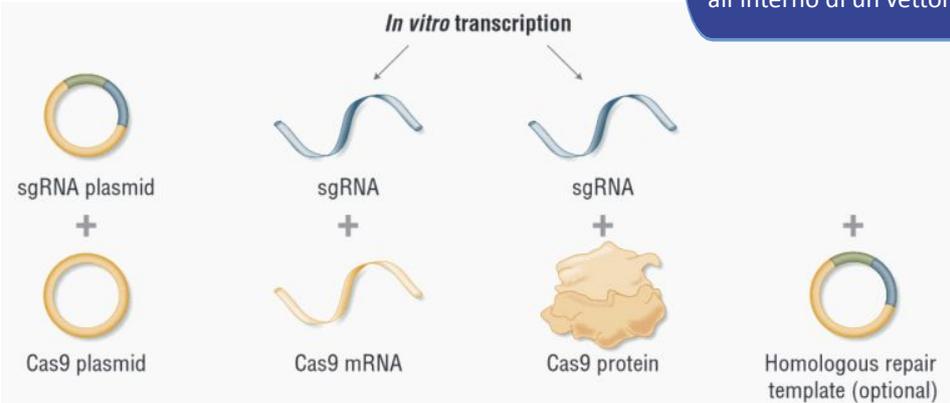
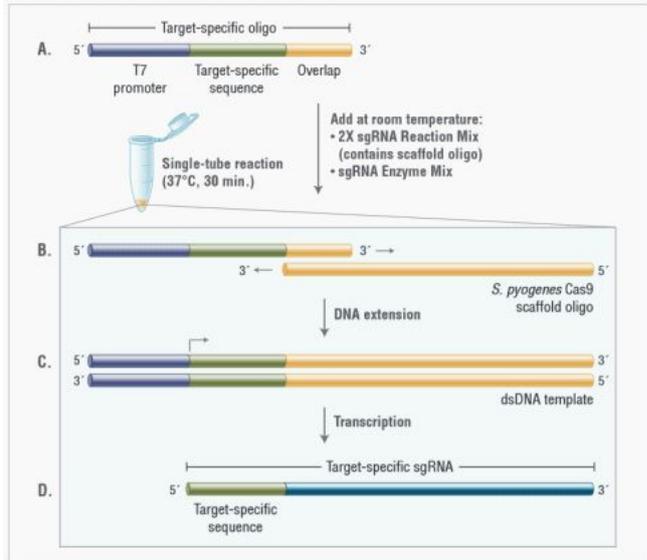
Il design dei gRNA è stato sviluppato utilizzando un algoritmo dedicato. I vettori sono disponibili come target gene set (3 gRNA design).

- **Vettore lentivirale:** System Biosciences fornisce vettori lentivirali pre-linearizzati per clonaggio ed espressione di gRNA, disponibili con diverse opzioni di promotori, marker di selezione e reporter fluorescenti.

- **Clonaggio del gRNA nel vettore:** Il PCR Cloning Kit di NEB permette di clonare il gRNA ottenuto per PCR all'interno del vettore scelto. Con NEBuilder invece è possibile assemblare più gRNA all'interno di un singolo vettore.

- **Mutagenesi sito-specifica:** Introduce modificazioni di sequenza (inserzioni, delezioni, sostituzioni) a livello di un gRNA già clonato all'interno di un vettore.

EnGen sgRNA Synthesis Kit overview



HR Donor

Le regioni omologhe possono essere amplificate da DNA genomico mediante 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.

In sintesi, il workflow dell'esperimento prevede:

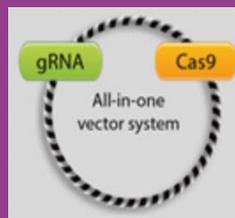
- Design del gRNA ed eventuale clonaggio nel vettore di espressione in vitro (sono disponibili diversi promotori di espressione);
- Scelta del vettore Cas9: diversi plasmidi sono stati validati in modelli cellulari e animali;
- Design dei templati per la ricombinazione omologa;
- Trasfezione o Infezione delle cellule target;
- Misura dell'efficienza di targeting mediante T7 Endonuclease I Mutation Detection Assay e conferma per sequenziamento.

Sistemi all-in-one

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

SBI fornisce vettori in cui clonare il proprio gRNA, dotati di promotore H1 e diversi marker di selezione (antibiotica o fluorescente)

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

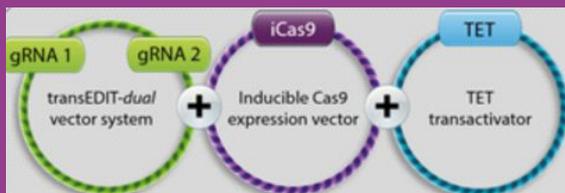


Sistemi inducibili

Il sistema **Transomic** prevede la combinazione di 3 vettori lentivirali per la trasduzione stabile e l'espressione inducibile di Cas9:

- Dual gRNA vector per il target di interesse;
- Cas9 vector (inducibile con promotore TRE3G mediante TET ON/TET OFF);
- TET Transactivator vector.

Per il controllo stringente dell'espressione inducibile, è necessaria l'infezione delle cellule target con particelle virali.



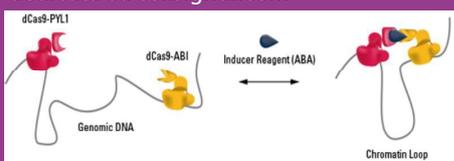
CLOuD9: Gene Expression Regulation

CLOuD9 è un approccio innovativo per lo studio della regolazione genica mediata dallo stato di condensazione cromatinico.

Il sistema determina la formazione di Loop cromatinici, grazie alla dimerizzazione inducibile delle due Cas9 (guidate da specifici gRNA e difettive per l'attività di taglio), che giustappungono così il promotore target e i siti regolatori dell'espressione. I Loop generati con CLOuD9 sono in grado di modificare il livello di espressione del gene target.

System Biosciences ha contribuito alla messa a punto della tecnologia e fornisce un kit unico e completo per l'esperimento (CLOuD9 Gene Expression Regulation Kit), che richiede unicamente il design e il clonaggio dei gRNA specifici.

Per il monitoraggio dell'esperimento e dei suoi effetti, **Cell Signaling Technology** offre kit completi per ChIP e una vasta gamma di anticorpi validati. Visita la sezione dedicata su cellsignal.com



Trasfezione e Nucleofezione

Polyplus JetCRISPR è ideale per le trasfezioni dei complessi ribonucleoproteici, in modo semplice e veloce e garantendo la massima efficienza.

JetPRIME è ottimale per la co-trasfezione di plasmidi, quindi particolarmente adatto ad esperimenti di Genome Editing basati su sistemi a due vettori (Cas9 e gRNA): è efficiente, richiede piccole quantità di DNA ed assicura un'ottima vitalità cellulare.

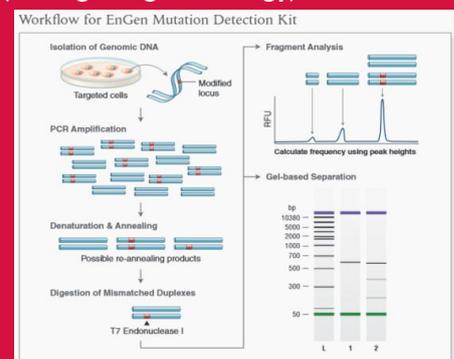
Nucleofezione: La tecnologia brevettata **Nucleofector™** di **Lonza** è particolarmente efficace in cellule difficili da trasfettare (es. cellule primarie): Lonza fornisce kit per la nucleofezione specifici per diverse tipologie cellulari, indicati sia per l'introduzione di plasmidi che dei complessi ribonucleoproteici.



Valutazione dell'efficienza di targeting

È possibile verificare l'efficienza di targeting utilizzando **EnGen Mutation Detection Kit** di **NEB**. Il DNA genomico viene amplificato utilizzando una coppia di primer che amplifica la regione contenente la mutazione introdotta con il sistema CRISPR/Cas9. Dopo uno step di denaturazione/re-annealing, il DNA viene incubato con T7 endonucleasi che digerirà solo i duplex contenenti il mismatch.

L'espressione di Cas9 può essere verificata tramite l'utilizzo di anticorpi (**Cell Signaling Technology**).



Servizi di Genome Editing

Il **CRISPCLEAR™ Custom Transfection-Ready Kit** di **Applied StemCell (ASC)** consente di generare linee cellulari (uomo, topo, ratto, iPSC), impiegando plasmidi gRNA, donor DNA e vettori di espressione per Cas9, disegnati e validati in vitro per il target di interesse.

Cas9

EnGen® Cas9 NLS, *S. pyogenes* – New England Biolabs

Cas9 in forma di enzima purificato, per la trasfezione diretta nelle cellule di interesse.

BM0646T/M EnGen® Cas9 NLS, *S. pyogenes* 400/2000 pmoli

SmartNuclease Lentivector Plasmids

transEDIT CRISPR Cas9 Nuclease Expression Vectors – System Biosciences/Transomic

Vettori lentivirali per l'espressione di Cas9 Nuclease (SBI e Transomic), in batteri in stock di glicerolo o in particelle virali pre-impaccate, con diverse opzioni di combinazione per promotori e marker di selezione (antibiotici e fluorescenza)

Visita www.systembio.com e www.transomic.com per l'elenco completo.

gRNA

EnGen® sgRNA Synthesis Kit, *S. pyogenes* – New England Biolabs

Per trascrizione In vitro dei gRNA

BE3322S EnGen® sgRNA Synthesis Kit, *S. pyogenes* 20 reaz.

transEDIT CRISPR gRNA target Gene set (Single or Dual) - Transomic

Vettori di espressione transEDIT® con design di gRNA ottimizzato per il knock-down di target annotati e significativa riduzione degli effetti off-target.

Visita la pagina di ricerca "FETCH my gene™" per l'elenco dei Gene Set sul sito www.transomic.com

gRNA linearized SmartNuclease Lentivector Plasmid - System Biosciences

Vettori lentivirali pre-linearizzati per clonaggio ed espressione di gRNA.

Visita www.systembio.com per l'elenco completo.

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

HR Donor

Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit – New England Biolabs

Kit per mutagenesi sito-specifica per introdurre mutazioni (inserzioni, delezioni, sostituzioni) in diverse tipologie di plasmidi.

BE0554S Q5 Site-Directed Mutagenesis Kit 10 reaz.

Q5® High-Fidelity DNA Polymerase – New England Biolabs

Polimerasi Hi-Fi. Disponibile anche in formato Kit o MasterMix.

BM0491S/L Q5® High-Fidelity DNA Polymerase 100/500 units

NEB® PCR Cloning Kit – New England Biolabs

BE1202S NEB® PCR Cloning Kit 20 reaz

Sistemi All-In-One

Cas9-gRNA linearized SmartNuclease vector/transEDIT Cas9-gRNA All-In-One target Gene set – System Biosciences/Transomic
diverse opzioni di combinazione per promotori e marker di selezione (antibiotici e fluorescenza)

visita il sito www.systembio.com per l'elenco completo delle opzioni disponibili

Visita la pagina di ricerca "FETCH my gene™" per l'elenco dei Gene set sul sito www.transomic.com

Sistemi Inducibili

transEDIT CRISPR dual gRNA target Gene set Inducible Vectors - Transomic

Vettori lentivirali pre-disegnati per la trasduzione stabile e inducibile di Cas9. IL vettore veicola 2 gRNA. Disponibile come glicerolato o come particelle virali pre-packaged (10⁶ TU/ml).

Visita la pagina di ricerca "FETCH my gene™" per l'elenco dei Gene set sul sito www.transomic.com

CLOuD9

CLOuD9 Gene Expression Regulation Kit

SBCASCL9100AKIT (includes 10 µg each of dCas9-PYL1 and dCas9-ABI1 lentivectors, and 50 µL of 1000x Inducer Agent)

Kit e anticorpi validati per ChIP – Cell Signaling Technologies

BK56383 SimpleChIP® Plus Sonication Chromatin IP Kit

BK9003 SimpleChIP® Enzymatic Chromatin IP Kit (Magnetic Beads)

Lista completa degli anticorpi ChIP-validated sul sito www.cellsignal.com

Trasfezione e Nucleofezione

Reagente di trasfezione JetPRIME/JetCRISPR – Polyplus Transfection

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

PP50201/07/15 JetCRISPR 0,1/0,7/1,5 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.

Valutazione dell'efficienza di targeting

EnGen Mutation Detection Kit – New England Biolabs

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

BE3321S EnGen Mutation Detection Kit 25 reaz.

Euroclone SpA

Via Figino, 20/22 - 20016 Pero (MI) Italy - Tel. +39 02 38195.1 - Fax +39 02 33913713

info@euroclone.it - www.euroclone.it

Quality Management Systems and Environmental certified according to EN ISO 9001, ISO 13485 and EN ISO 14001