



Genome-TALER™ & Genome-CRISPR™ 小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

Catalog# SH-ROS-K100

Catalog# SH-ROS-K000

Catalog# SH-ROS-K200

Catalog# SH-ROS-K002

用户手册

广州易锦生物技术有限公司
Guangzhou iGene Biotechnology Co., Ltd.

地址：广州科学城揽月路3号F区F801（510663）
Address : F801, Building F, #3, Lanyue road,
Science park, Guangzhou (510663)

电话(Tel): (020) 28069288、28069233

订购电话(To order): 4006-020-200

网站: www.igenebio.com

用户手册

Genome-TALER™ 小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

Genome-CRISP™ 小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

I. 技术简介.....	3
II. 试剂盒内容及储藏条件.....	5
III. 实验示例.....	8
IV. Safe Harbor 基因敲入实验概览.....	10
V. 关键步骤.....	11
VI. 参考文献.....	17
VII. 相关服务.....	18
VIII. 有限使用许可及质保声明.....	20

I. 技术简介

安全的基因靶向实验

通过在染色体上的特定位点插入目的基因和其他遗传因子，对基因组进行改造——这项实验在细胞工程上具有极大的价值。经过基因改造的细胞在医疗研究、基因功能研究及族系跟踪和分析中扮演着重要角色。而所有这些应用都取决于转入基因功能的可靠性和可预测性，同时需要转入基因不扰乱内源基因和/或其他调控因子的功能。相反，随机整合的转入基因会带来不可预知的插入或突变，构成威胁。

最新的方法是将基因转入基因组上一个已知的安全位点。ROSA26 位点（又称为 ROSA β geo26 位点）位于小鼠基因组第6号染色体，最早是在一支名为 ROSA β geo26 的小鼠品系中被发现的。该品系的小鼠因为一个随机插入的基因，在所有组织中都能检测到高水平的 β 半乳糖苷酶表达。该位点表达一个编码转录本和两个非编码的转录本，只有非编码转录本的序列受到这个外源插入的干扰。虽然两个等位区都带有外源插入片段的纯合子小鼠幼崽出生率略低于杂合子幼崽，但纯合子幼崽也能正常发育并繁殖。自此，“ROSA26”位点就被用于基因转入；这个位点的基因敲入对细胞及小鼠的健康无副作用，并能保证转入基因的正常稳定表达。

GeneCopeia提供特异靶向 ROSA26 位点的 TALEN 或 CRISPR-Cas9 体系。它们能在小鼠第6号染色体上的 ROSA26 位点上生成 DNA 双链断裂，触发细胞的 DNA 修复机制，诱导基因组与 ROSA26 供体克隆之间发生同源重组（HR），将供体克隆上的 DNA 片段整合到基因组上的 ROSA26 safe harbor 位点。

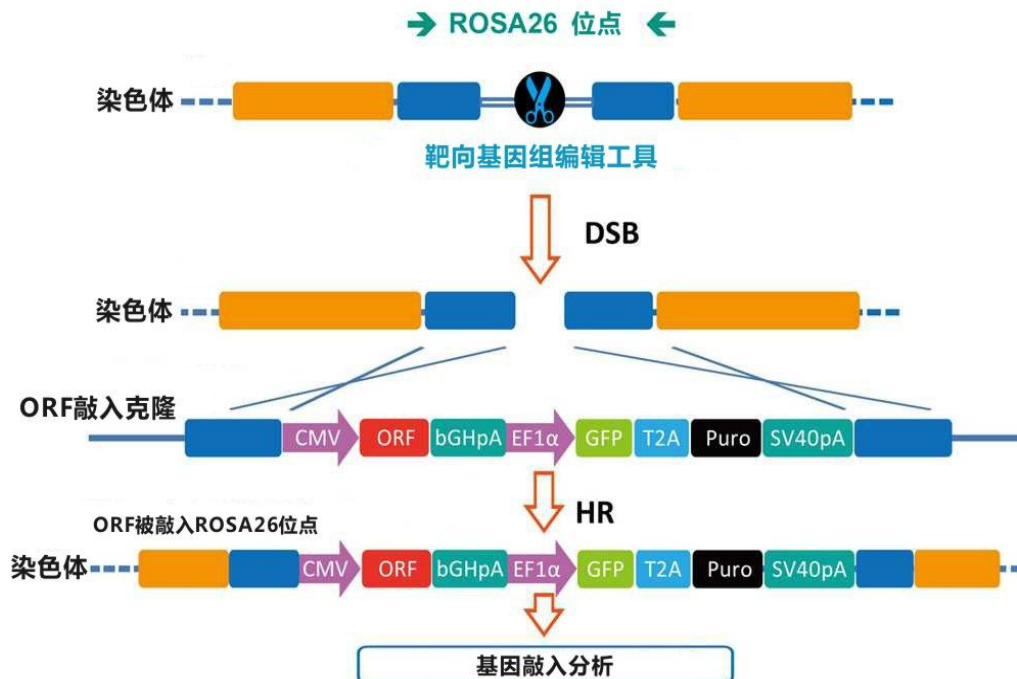


图1. 基因组编辑工具介导的小鼠ROSA26 safe harbor 基因敲入原理图

TALEN 技术简介

转录激活因子样效应子(TAL effectors)中间含有一个重复区域, 该区域由约34个氨基酸的重复单元组成。每个重复单元的氨基酸序列高度保守, 除了第12位和13位的两个氨基酸可变, 即重复单元可变的双氨基酸残基(RVD)。TALE单体通过RVD识别DNA靶点上的碱基, 有如下——对应关系: NI = A, HD = C, NG = T, NN = G 或 A。

TAL效应子已被广泛应用于靶向基因组编辑工具的制备, 通过与核酸酶、转录因子或其他功能的结构域融合, 构建靶向核酸内切酶(TALEN)、靶基因转录调控因子(TALE-TFs)或者其他基因组修饰蛋白。TALE融合蛋白通过TALE特异识别并结合染色体上的靶序列进行基因组编辑, 如基因敲除、敲入(结合使用重组供体质粒), 基因组修饰、基因转录激活或抑制等。

CRISPR-Cas9 技术简介

在CRISPR-Cas9系统中, CRISPR RNA (crRNA) 与转录激活crRNA (Trans-activating crRNA, tracrRNA) 退火形成的复合物能特异识别基因组序列, 引导Cas9核酸内切酶在目的片段生成DNA双链断裂(double-strand breaks, DSBs)。这个识别复合体可以通过融合crRNA与tracrRNA序列形成sgRNA (single-guided RNA) 进行简化。基因组的靶序列中有长约20bp的片段与crRNA或sgRNA互补配对; 靶序列末端的三核苷酸区域PAM (5'-NGG-3')为Cas9识别位点, 是实现剪切功能的关键。CRISPR-Cas9体系的RNA-DNA识别机制为基因组工程研究提供了一项简便而强大的工具。

GeneCopoeia Genome-TALER™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 专为转基因实验设计, 通过TALEN介导的同源重组(HR)反应, 将您的目的基因、筛选标记或其他遗传因子整合到小鼠第6号染色体上的ROSA26 safe harbor位点, 确保转入基因长期、稳定的表达。同源重组(HR)是一种DNA的自然修复机制。TALEN核酸酶特异剪切ROSA26位点, 生成DNA双链断裂(DSB), 诱发靶点与供体DNA之间的同源重组(HR)。

GeneCopoeia Genome-CRISP™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 专为转基因实验设计, 通过CRISPR-Cas9介导的同源重组(HR)反应, 将您的目的基因、筛选标记或其他遗传因子整合到小鼠第6号染色体上的ROSA26 safe harbor位点, 确保转入基因长期、稳定的表达。同源重组(HR)是一种DNA的自然修复机制。TALEN核酸酶特异剪切CRISPR-Cas9位点, 生成DNA双链断裂(DSB), 诱发靶点与供体DNA之间的同源重组(HR)。

优势

安全整合

靶向小鼠基因组 ROSA26 位点的 safe harbor 基因敲入能保证转入基因的正常转录，且无已知的副作用。

特异靶向

特异靶向 ROSA26 位点的 TALEN 或 CRISPR-Cas9 介导 DNA 双链断裂，诱发同源重组，促使转入基因整合进 ROSA26 safe harbor 位点。

生理学水平表达

靶向 ROSA26 safe harbor 位点的基因敲入能保证外源基因以低拷贝数的形式整合到目标基因组，确保转入基因表达接近生理学水平，从而简化了表型解读，也避免了转基因表达沉默。

ORF 敲入亲和性

我们有超过 20,000 条经过序列验证的小鼠 ORF 可用于转入基因的供体克隆设计。

II. 试剂盒内容及储藏条件

Genome-TALER™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 (Cat# SH-ROS-K100)

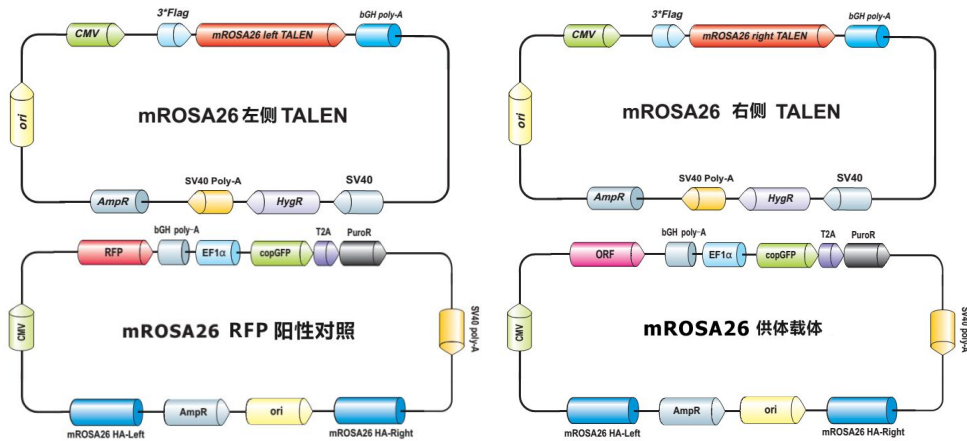
Genome-TALER™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 (不含供体载体) (Cat# SH-ROS-K000)

货号	产品	总量	浓度	运输及储存条件
TN-ROSA26-L	ROSA26 左侧 TALEN	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C 储存。
TN-ROSA26-R	ROSA26 右侧 TALEN	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C 储存。
DC-DON-SH02*	ROSA26 供体载体	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C 储存。
DC-RFP-SH02	ROSA26 RFP 阳性对照供体克隆	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C 储存。
MQPROSHR-5	5' HR 验证引物组合	200 个反应	5 pM/µl	室温运输。-20°C 储存。
MQPROSHR-3	3' HR 验证引物组合	200 个反应	5 pM/µl	室温运输。-20°C 储存。

* DC-DON-SH02 载体只随 SH-ROS-K100 试剂盒发售。我们能为您定制 ROSA26 ORF 敲入克隆。

小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

(A) TALEN、供体载体及阳性对照供体克隆质粒



(B) 基因敲入验证PCR引物组合



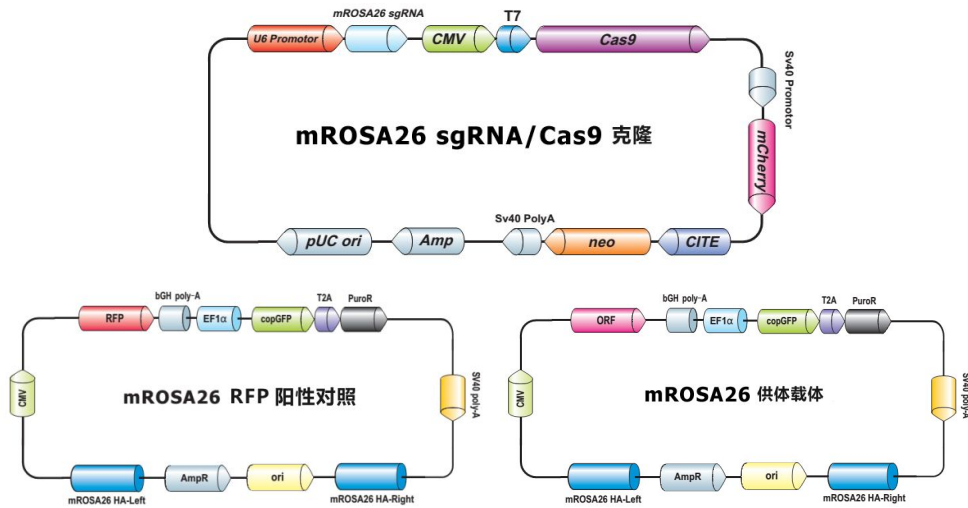
图2. Genome-TALER™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒组分。(A) ROSA26 TALEN、供体载体及阳性对照供体克隆质粒；(B) 基因敲入验证PCR引物组合。

Genome-CRISPT™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 (Cat# SH-ROS-K200) Genome-CRISPT™ 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒 (不含供体载体) (Cat# SH-ROS-K002)

货号	产品	总量	浓度	运输及储存条件
MCP-ROSA26-CG01	All-in-one ROSA26 sgRNA /Cas9 表达克隆	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C储存。
DC-DON-SH02*	ROSA26 供体载体	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C储存。
DC-RFP-SH02	ROSA26 RFP 阳性对照供体克隆	10 µg	500 ng/µl	室温运输。-20°C储存。
MQPROSHR-5	5' HR 验证引物组合	200 个反应	5 pM/µl	室温运输。-20°C储存。
MQPROSHR-3	3' HR 验证引物组合	200 个反应	5 pM/µl	室温运输。-20°C储存。

* DC-DON-SH02 载体只随SH-ROS-K200 试剂盒发售。我们能为您定制 ROSA26 ORF 敲入克隆。

(A) CRISPR-Cas9、供体载体及阳性对照供体克隆质粒



(B) 基因敲入验证PCR引物组合



图 3. Genome-CRISPTM 小鼠 ROSA26 safe harbor 基因敲入试剂盒组分。(A) ROSA26 CRISPR-Cas9、供体载体及阳性对照供体克隆质粒；(B) 基因敲入验证PCR引物组合。

其他所需实验材料

1. LB琼脂糖培养基或液体培养基，含浓度为50 μg/ml的卡那霉素。
2. 6孔细胞培养板及相关的细胞培养材料。
3. 目的细胞类型所需的其他特定培养基及添加剂。
4. 任意高转化效率的RecA-及EndA-型E.coli感受态细胞。
5. 高葡萄糖、含丙酮酸钠及谷氨酸盐的D-MEM培养基 (Invitrogen, Cat. # 11995073)
6. EndoFectin™ Plus 转染试剂 (Genecopoeia, Cat. # EFP1003-01/02)
7. Qiagen EndoFree 无内毒素质粒大提试剂盒 (Qiagen, Cat. # 12362)
8. Qiagen DNeasy 血液组织DNA提取试剂盒 (Qiagen, Cat. # 69504)
9. iProof高保真DNA聚合酶 (BioRad, Cat. # 172-5301)
10. 胎牛血清 (Invitrogen, Cat. # 16000036)
11. 青霉素/链霉素 (Invitrogen, Cat. # 15070063)
12. 胰蛋白酶-EDTA (Sigma, Cat. # T3924)
13. **可选**——对于难转染细胞，强烈建议使用电转系统 (如Lonza的NucleoFector或Invitrogen的Neon电转系统)

III. 实验示例

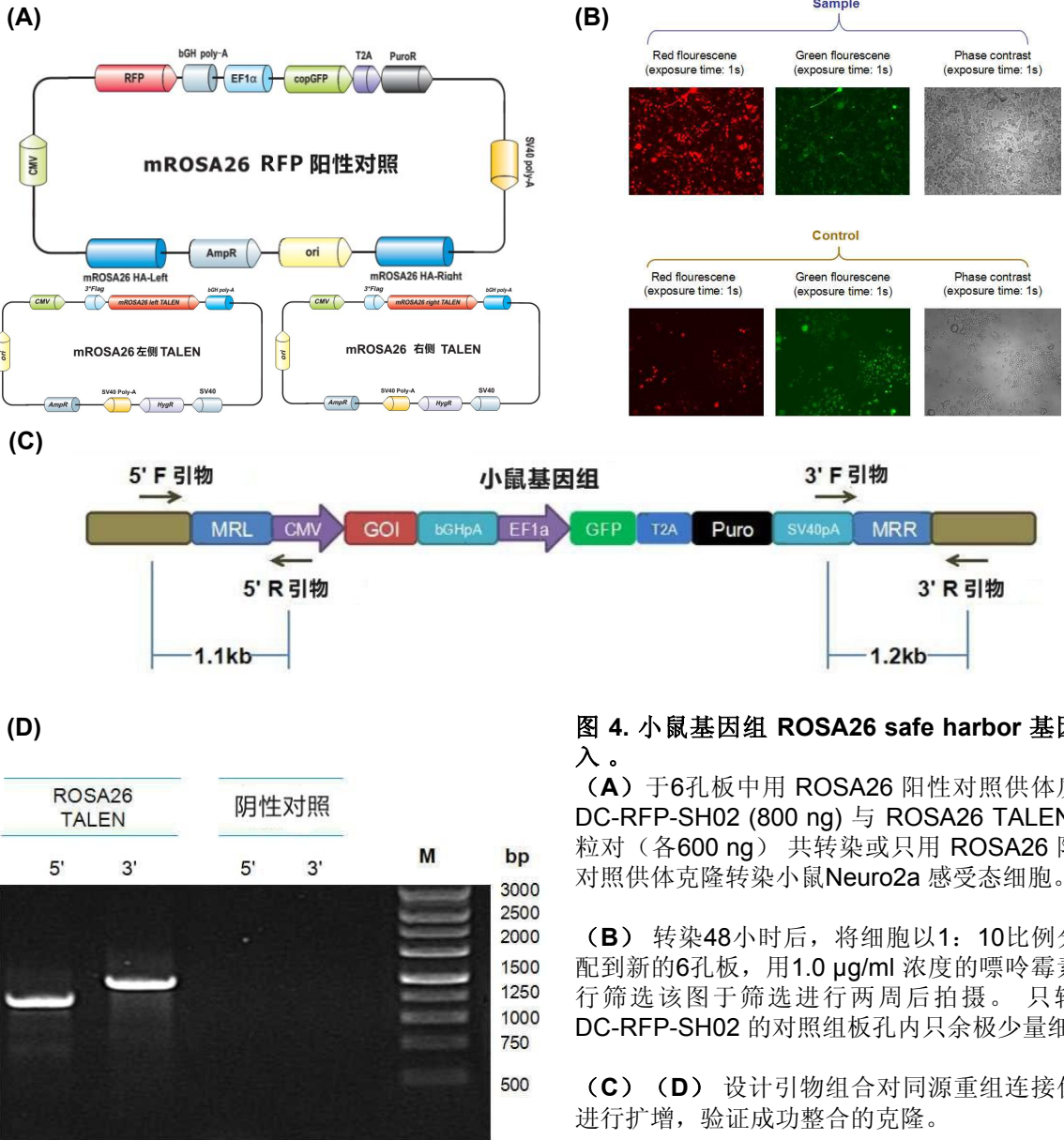


图 4. 小鼠基因组 ROSA26 safe harbor 基因敲入。

(A) 于6孔板中用 ROSA26 阳性对照供体质粒 DC-RFP-SH02 (800 ng) 与 ROSA26 TALEN 质粒对 (各 600 ng) 共转染或只用 ROSA26 阳性对照供体克隆转染小鼠 Neuro2a 感受态细胞。

(B) 转染48小时后, 将细胞以1: 10比例分。配到新的6孔板, 用1.0 μg/ml 浓度的嘌呤霉素进行筛选该图于筛选进行两周后拍摄。只转染 DC-RFP-SH02 的对照组板孔内只余极少量细胞。

(C) (D) 设计引物组合对同源重组连接位点进行扩增, 验证成功整合的克隆。

基因敲入验证引物PCR结果

小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

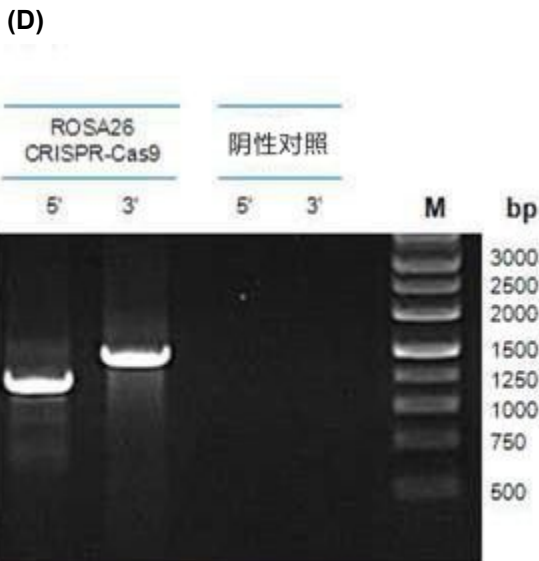
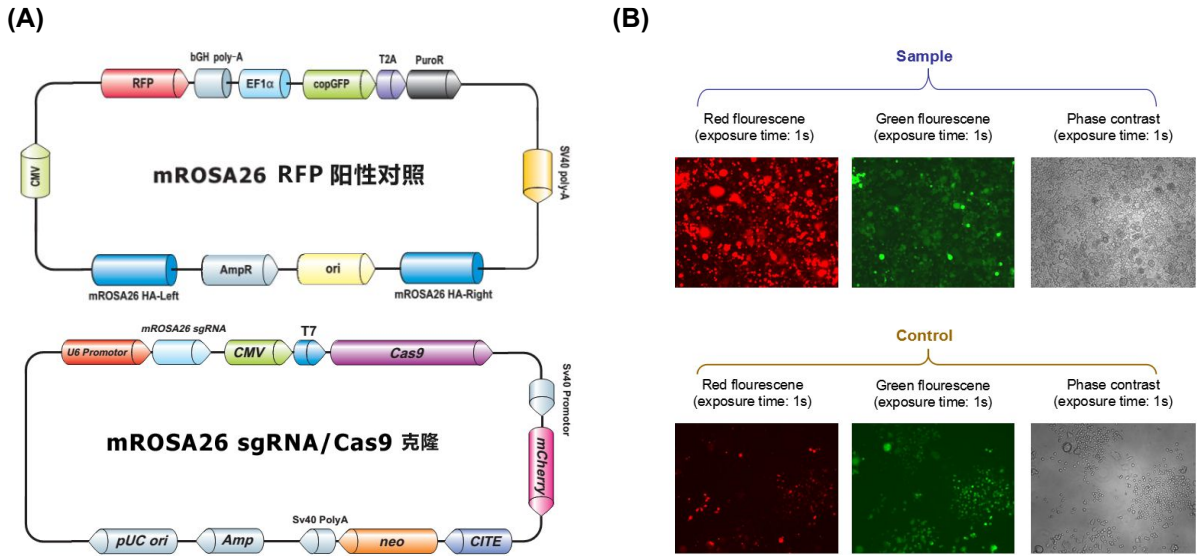


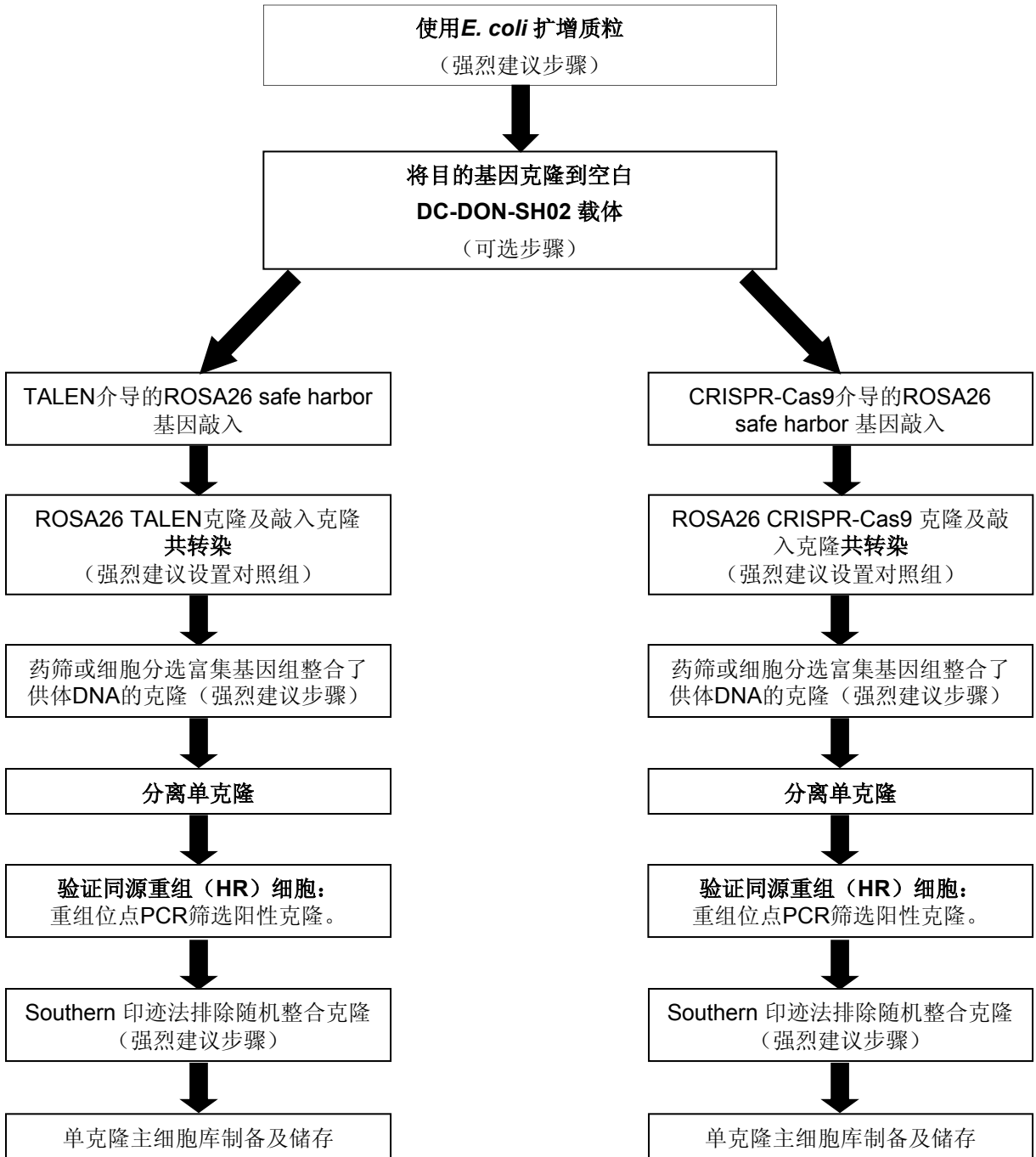
图 5. 小鼠基因组 ROSA26 safe harbor 基因敲入。

(A) 于6孔板中用 ROSA26 阳性对照供体质粒 DC-RFP-SH02 (800 ng) 与 ROSA26 sgRNA/Cas9 表达克隆 (800 ng) 共转染或只用 ROSA26 阳性对照供体克隆转染小鼠 Neuro2a 态细胞。

(B) 转染48小时后，将细胞以1: 10比例分。配到新的6孔板，用1.0 μg/ml 浓度的嘌呤霉素进行筛选该图于筛选进行两周后拍摄。只转染 DC-RFP-SH02 的对照组板孔内只余极少量细胞。

(C) (D) 设计引物组合对同源重组连接位点进行扩增，验证成功整合的克隆。

IV. Safe Harbor 基因敲入实验概览



V. 关键步骤

A. 质粒扩增

我们建议客户在基因靶向实验前先对基因组编辑工具质粒进行扩增。质粒转化可使用RecA-和EndA-型E.coli感受态细胞以及适用于该感受态的标准实验条件。

在进行 ROSA26 TALENs质粒, ROSA26 CRISPR-Cas9 质粒及以 DC-DON-SH02 为载体的质粒转化时, 建议使用新制的氨苄霉素抗性 (50µg/ml) LB固体培养基平板, 用50-200µl已转化的感受态细胞涂板。将平板在37°C下孵育过夜, 所得菌落接种到约200ml的含50µg/ml氨苄青霉素的LB培养基, 在37°C下摇菌过夜。过夜培养后, 使用去内毒素质粒DNA大量提取试剂盒提取质粒DNA。

如需确证扩增质粒的完整性, 我们建议客户使用限制性内切酶酶切或直接测序进行验证。

B. 把目的基因克隆到空白 DC-DON-SH02 载体

1. 连接

- 1) 对载体质粒进行酶切及胶回收。稀释到 10ng/µl。
- 2) 实验组及对照组样品都设置 10µl 连接反应体系。

体积	组分
1.0 µl	酶切 DC-DON-SH02 空白载体
7.0 µl	DNA 插入片段 (~30-50 ng) 或纯水作对照
1.0 µl	10X T4 DNA ligase buffer
1.0 µl	T4 DNA Ligase (40 U/µl)
10.0 µl	总反应体积

- 3) 反应体系至于 25°C 孵育1-2 小时 (黏端连接) 或置于16°C 孵育过夜 (平端连接)。

2. 转化

使用感受态细胞随附的标准流程进行转化。用整个连接反应体系进行转化, 涂氨苄霉素/羧苄霉素抗性的LB琼脂糖培养基平板 (感受态细胞转化效率至少应达到 1×10^9 菌落/µg pUC19)。

3. 筛选正确的克隆

- 1) 参考测试样品平板与空白对照平板的菌落数比例, 在测试样品平板随机标记5个或更多单菌落。

小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

2) 制备含插入片段两端引物的PCR反应母液。

1 个反应	10 个反应	组分
0.1 μ l	1 μ l	5' PCR 引物 (5pM/ μ L)
0.1 μ l	1 μ l	3' PCR 引物 (5pM/ μ L)
0.2 μ l	2 μ l	50X dNTP mix (10 mM of each)
2.5 μ l	25 μ l	10X PCR 反应缓冲液
21.9 μ l	219 μ l	无核酸酶蒸馏水
0.2 μ l	2 μ l	Taq DNA 聚合酶 (约 5 U/ μ l)
25 μl	250 μl	总体积

3) 将反应母液混匀，每PCR管或96孔板每孔分装24 μ l。

4) 用灭菌枪头挑取步骤1)的标记菌落与PCR反应体系混匀，每菌落一孔或一管。

5) 使用以下程序进行PCR扩增：

94°C, 4 min	1 cycle
94°C, 0.5 min; 然后68°C, 1 min/1 kb*	25 cycles
68°C, 3 min	1 cycle

* 根据PCR产物长度决定延伸时长。

6) 取5 μ l PCR反应产物，使用1X TAE缓冲液和含EtBr的1.2%琼脂糖凝胶进行电泳，分辨含有正确插入的克隆。

4. 用适量的氨苄霉素/羧苄霉素抗性 LB 液体培养基接种含有正确插入的阳性克隆，并在37°C培养过夜。次日用去内毒素质粒纯化试剂盒提取并纯化质粒。可选择测序鉴定插入片段。

C. 靶向ROSA26位点的基因组编辑工具克隆及供体克隆共转染

1. 按照目的细胞类型的建议实验条件，在六孔细胞培养板每孔接种约100,000到300,000个待转染细胞。实验应包含针对下述a)-d)的测试样品或对照的板孔。转染前一日，用胰蛋白酶进行消化并计算细胞数目。决定每孔接种的细胞数，以使它们在转染时达到70-80%的融合率。.

- ROSA26 TALENs (或 MCP-ROSA26-CG01) + 阳性对照质粒DC-RFP-SH02
- 只有阳性对照质粒 DC-RFP-SH02
- ROSA26 TALENs (或 MCP-ROSA26-CG01) + 使用载体DC-DON-SH02的供体克隆
- 只有使用载体DC-DON-SH02的供体克隆

小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

2. 次日，根据厂商提供的说明书，使用适合的转染试剂制备基因组编辑工具质粒及供体质粒转染混合物。让转染混合物在细胞上反应超过6小时。

示例：使用EndoFectin™ Plus转染试剂转染Neuro2A 细胞时，TN-ROSA26-L及TN-ROSA26-R质粒为每种0.5µg，供体质粒用量为1µg。

技术说明：

1) 因为不同细胞系的转染效率有所不同，我们建议客户优化基因组编辑工具质粒与供体载体的用量比例，直至取得最佳效果。我们推荐客户从1:1开始尝试（如供体质粒1µg，TALEN质粒对每个0.5µg 或1µg MCP-ROSA26-CG01质粒）

2) 为取得最优的转染效果，我们建议将质粒DNA与转染试剂、无抗性培养基及完全培养基内生长的细胞预混合（如DMEM/F12+10%无抗性FBS）。

3) 对于难转染细胞（如原代细胞、干细胞或造血干细胞），利用非被动的转染方法也许更为明智。请按照该细胞类型的厂商提供的实验准则操作。

3. 转染24小时后，弃去转染培养基，加入含抗生素的完全生长培养基，取1/10或1/20细胞接种6孔板，保留1组板用作重组位点PCR检测鉴定样品（见后文）。让细胞回复24小时。

4. 转染48小时后开始嘌呤霉素筛选。Neuro2A 细胞的建议嘌呤霉素浓度为1 µg/ml。

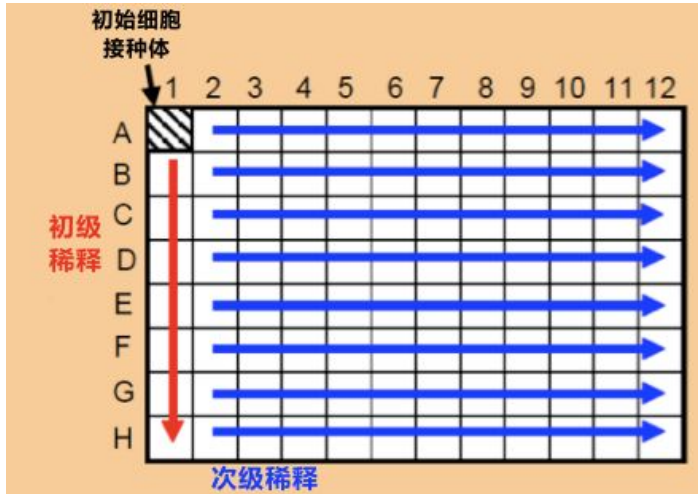
技术说明：

通过用未转染细胞确立致死曲线，可以确定嘌呤霉素对靶细胞系的有效浓度。药筛48小时能杀死超过90%细胞的嘌呤霉素浓度（一般有效范围为0.5µg-5µg/ml）即为该靶细胞系筛选的正确剂量。

D. 分离单克隆细胞系

连续稀释法被广泛用于分离含有目的修饰的单细胞，以进行扩增培养构建新的单克隆细胞系。像大多数单克隆分离方法，该方法也不能保证所选的细胞群落源自单一细胞。建议的做法是进行第二轮分离增大筛选到单克隆系的概率。此外值得一提的是，不同细胞类型在连续稀释法中的表现也有很大区别，因此实验时应针对目的细胞类型查阅相关的文献资料。

1. 在灭菌的96孔板每孔加入100 μ l培养基，留空A1孔。



2. 在A1孔加入200 μ l细胞悬浮液，取其中100 μ l与B1孔中的培养基混匀，混匀过程中避免产生气泡。继续在第1列进行同样的1:2稀释至H1孔，并用培养基将第1列每孔体积定容至200 μ l。
3. 混匀第1列的细胞悬浮液，各取其中100 μ l加至第2列孔中。用移液器轻柔混匀，避免产生气泡。重复此1:2稀释至第12列，并用培养基将每孔体积定容至200 μ l。
4. 将培养板放在 37 $^{\circ}$ C 培养，避免扰动。
5. 培养3天后可通过显微镜观察到细胞；至5-8天左右，视细胞生长情况，可开始进行标记。在培养板盖上对含单群落的孔进行标记。这些群落其后可转移至更大的容器进行扩大培养。

技术说明：

- 1) 在A1孔加入4000个细胞（ 2×10^4 cells/ml）是较理想的起始浓度。对难生长的细胞系，可增加起始浓度。
- 2) 如有荧光报告基因，应观察哪些细胞群落有荧光表达。如果报告基因不是能直接观察的类型，则需等到其后的培养步骤再进行相关测量。
- 3) 每一个有单细胞群落的孔都应用独特的标识号标记，并在对应的培养板和实验笔记上使用同样的标识号。

E. 同源重组 (HR) 细胞验证

1. 实验样品的基因组编辑工具酶切及供体克隆同源重组 (HR) 检测方法如下:

- 1) ROSA26 TALENs (或 MCP-ROSA26-CG01) + 阳性对照 DC-RFP-SH02:
嘌呤霉素筛选7-10天后, 存活的细胞应为RFP及GFP阳性。
- 2) 只有阳性对照质粒 DC-RFP-SH02:
嘌呤霉素筛选7-10天后, 对比【ROSA26 TALENs (或 MCP-ROSA26-CG01) + 阳性对照 DC-RFP-SH02】的阳性对照组, 应只余极少量细胞存活 (如还有细胞存活)。表现出嘌呤霉素抗性及RFP/GFP阳性的细胞是因为阳性对照克隆的随机整合。
- 3) ROSA26 TALENs (或 MCP-ROSA26-CG01) + 使用载体DC-DON-SH02的供体克隆:
嘌呤霉素筛选7-10天后, 存活的细胞应为GFP阳性。通过qPCR或Western blot可以检测转入基因表达。
- 4) 只有使用载体DC-DON-SH02的供体克隆:
嘌呤霉素筛选7-10天后, 对比【ROSA26 TALENs (或 MCP-ROSA26-CG01) + 阳性对照 DC-RFP-SH02】的阳性对照组, 应只余极少量细胞存活 (如还有细胞存活)。表现出嘌呤霉素抗性 & GFP阳性的细胞是因为供体克隆的随机整合。

2. 通过重组位点验证PCR可以确证供体载体装载的DNA片段已被特异整合到 ROSA26 位点。验证PCR的引物组合分别设在5端 ROSA26 重组臂(5' ROSA26-HA-L)和3端 ROSA26 重组臂 (3'ROSA26-HA-R) 的两端。

3. 重组位点验证PCR

1) 引物序列

引物描述	引物名称	引物序列
5' ROSA26 阳性对照供体 -正向引物	MQPROSHR-5F	见数据表
5' ROSA26 阳性对照供体 -反向引物	MQPROSHR-5R	见数据表
3' ROSA26 阳性对照供体 -正向引物	MQPROSHR-3F	见数据表
3' ROSA26 阳性对照供体 -反向引物	MQPROSHR-3R	见数据表

引物以混合物形式提供 (正/反向引物), 浓度为5pM/μL。检测任意一端同源重组位点通常已足以验证供体DNA的整合。可以同时两端重组位点进行验证作为额外的证明

2) 重组位点验证PCR步骤:

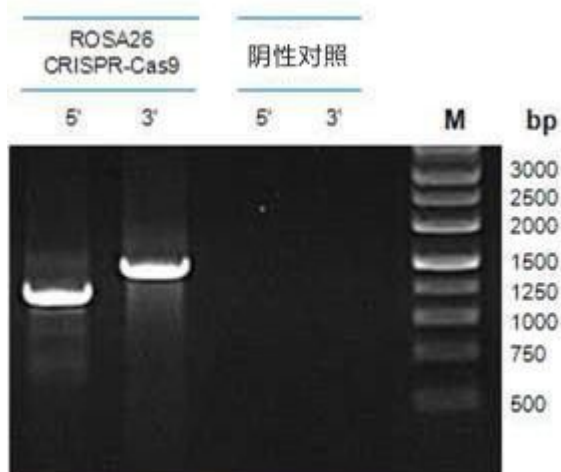
- a) 用合适的基因组DNA小量提取试剂盒从阳性对照细胞或实验组细胞中分离基因组DNA。请按照试剂盒制造商提供的实验说明操作。
- b) 重组位点验证PCR (反应体系如下)

小鼠 ROSA26 Safe Harbor 基因敲入试剂盒

试剂	实验组 (TALEN+阳性对照供体克隆)	对照组 (阳性对照供体克隆)
基因组 DNA(60~100ng/μl)	1μl	1μl
10μM 5' (or 3') ROSA26 PCR Primer Mix	1μl	1μl
5×UltraPFTM Buffer (Mg2+ free)	5μl	5μl
10 mM dNTPs	0.5μl	0.5μl
20mM MgSO4	2.5μl	2.5μl
UltraPF(5U/μl)	0.25μl	0.25μl
PCR级蒸馏水	14.75μl	14.75μl
总体积	25μl	25μl

98°C, 5min
 98°C, 20sec
 55°C, 30sec
 72°C, 1min
 72°C, 7min
 Hold at 4~16°C

} 35 cycles



基因敲入验证引物PCR结果

PCR产物用1X TAE缓冲液和1% Agarose/EtBr凝胶电泳，确认重组位点验证PCR结果。

样品的5端及3端重组位点验证PCR检测原理如下图：



技术说明:

- 1) 如果3端重组位点验证PCR结果较5端重组位点的PCR结果弱。原因有可能是3端重组位点的染色体结构、修饰和该区域的序列影响了PCR的扩增效率。
- 2) 一端重组位点的验证PCR结果为阳性就足以确证整合成功。
- 3) 供体克隆同时与基因组safe harbor位点以外其他位点发生随机整合的情况也有可能发生。Southern blotting可被用于检测细胞中同时存在的随机整合。实验方法可见以下论文：
<http://www.bloodjournal.org/content/117/21/5561>

VI. 参考文献

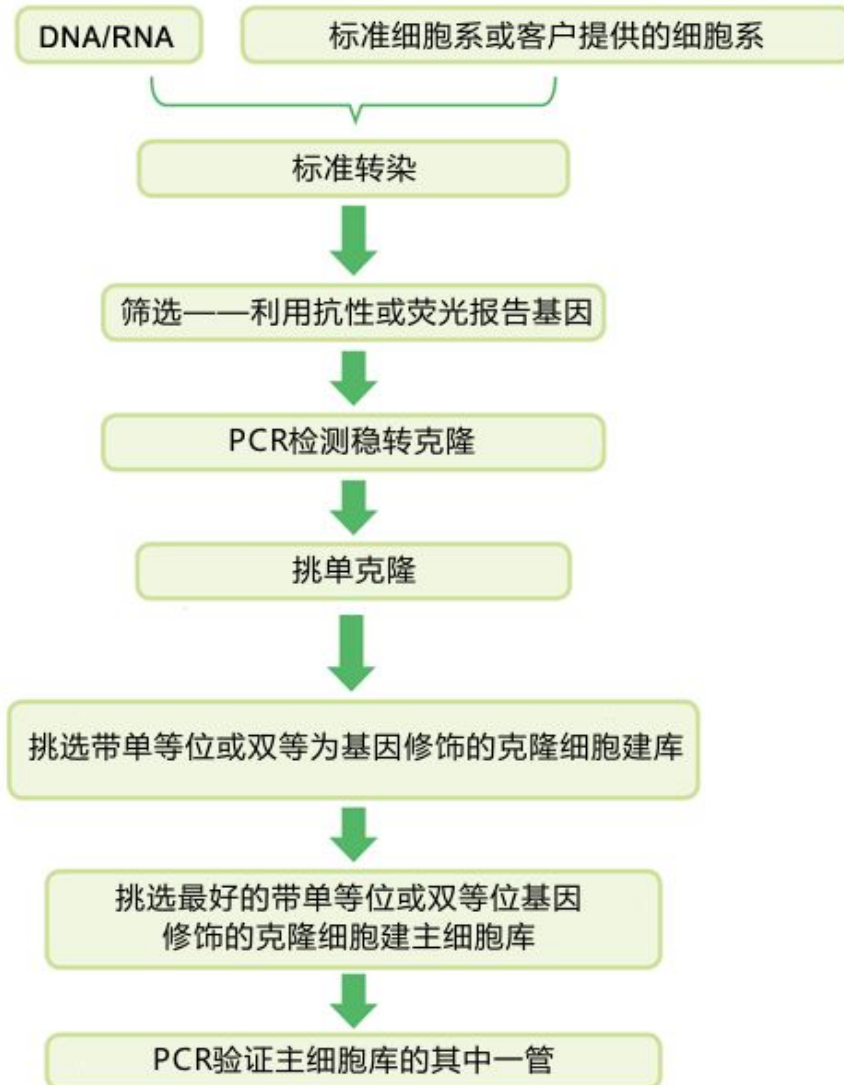
1. Zou, J. et al. 2009. Gene targeting of a disease-related gene in human induced pluripotent stem and embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Jul 2;5(1):97-110
2. Sadelain, M. et al. 2011. Safe harbours for the integration of new DNA in the human genome. *Nat Rev Cancer*. 2011 Dec 1;12(1):51-8.
3. van Rensburg, R. et al. 2013. Chromatin structure of two genomic sites for targeted transgene integration in induced pluripotent stem cells and hepatopoietic stem cells. *Gene Therapy*. 2013 20(2):201-14.
4. Papapetrou, EP. et al. 2011. Genomic safe harbors permit high β -globin transgene expression in thalassemia induced pluripotent stem cells. *Nat. Biotechnol*. 2011 29(1):73-8.
5. Lombardo, A. et al. 2011. Site-specific integration and tailoring of cassette design for sustainable gene transfer. *Nat. Methods*. 2011 8(10):861-9.

VII. 相关服务

稳转细胞株服务

GeneCopoeia 为含有TALEN或CRISPR-Cas9介导的基因组修饰的细胞提供单克隆稳转细胞株构建服务及细胞建库服务。

TALEN/CRISPR稳转细胞系构建服务

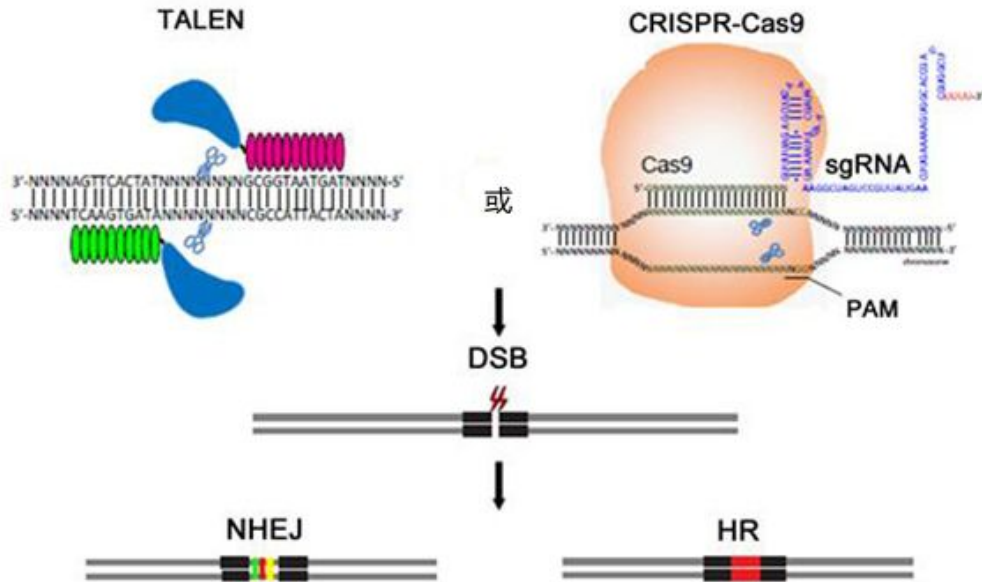


转基因小鼠服务

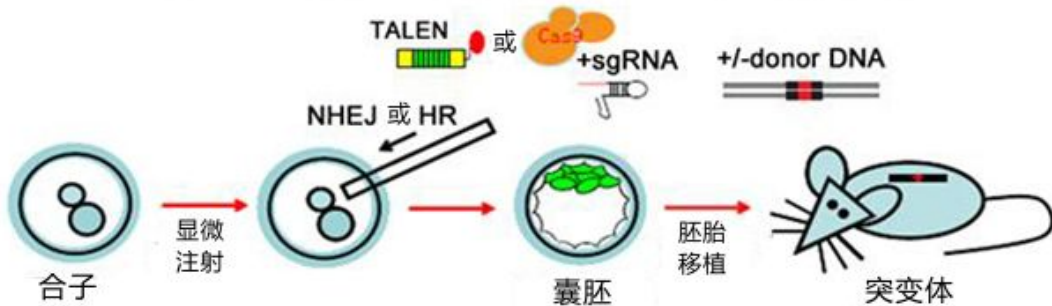
转基因小鼠模型是研究基因产物的分子机制、其相互作用以及对细胞进程影响的理想工具。GeneCopoeia 能为客户定制带有TALEN 或 CRISPR-Cas9 介导的基因组修饰的转基因小鼠。

TALEN/CRISPR-Cas9介导基因组修饰

TALEN和CRISPR-Cas9基因组编辑概述



一步法构建带基因组修饰的小鼠



VIII. 有限使用许可及质保声明

有限使用许可

Following terms and conditions apply to use of the Genome-TALER™ mouse ROSA26 Safe Harbor Gene Knock-in Kit & Genome-CRISP™ mouse ROSA26 Safe Harbor Gene Knock-in Kit (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products or deliver information obtained in service without prior written consent from GeneCopoeia. This Product should be used in accordance with the NIH guidelines developed for recombinant DNA and genetic research. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

有限质量保证

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 301-762-0888.

© 2015 GeneCopoeia, Inc.