

KunGre[®] CRISPR/Cas9 基因敲除试剂盒

目录号

GT206-02

产品组成 (两次装)

| 组分 | 规格 |
|------------------------|--------|
| Linear vector | 8.0 μL |
| DNA ligase | 0.4 μL |
| 10 X DNA ligase buffer | 4.0 μL |

注：使用前请充分解冻并高速离心备用，10 X DNA ligase buffer 需要解冻至溶液清澈。

保存条件

所有组分-20°C保存 24 个月。

产品简介

该系统中的载体同时表达 Cas9 核酸酶、针对特定位点的 sgRNA 和绿色荧光蛋白。绿色荧光蛋白用于监测转染效率或在后期使用流式细胞仪富集/分选转染细胞。该系统中的载体为线性，启动子为 U6。使用时将用户提供的、与目标序列对应的两条核酸单链退火结合成为双链，再使用系统中包含的高效率连接混合液将双链插入到线性化的质粒中即可。

产品特点

- ◇ 单质粒线性载体：特异性靶向 sgRNA 的表达由人的 U6 启动子驱动，同时还表达 Cas9 核酸酶及绿色荧光蛋白。
- ◇ 绿色荧光蛋白作为标志可以被用于检测转染效率或使用流式细胞仪富集/分选转染细胞。
- ◇ 质粒构建简便：针对您的靶序列设计的特异性寡核苷酸，然后使用试剂盒中提供的高效率连接液将其克隆到预先线性化的质粒中。

适用范围

- ◇ 使用 CRISPR/Cas9 技术对哺乳动物进行基因敲除时，靶向单链向导 RNA (sgRNA) 的克隆和表达。

使用方法

1、sgRNA 设计及载体构建：

- ① 在 NCBI 上获取需要敲除的目的基因序列；
- ② 在线预测设计目的基因的 sgRNA (如 <http://crispr.mit.edu/>) ；
- ③ 建议选择评分最高的 20 bp sgRNA，sgRNA 的 5'端尽量保证 G 开头 (或可加上一个 G)，保证基因表达效率。此外，在 sgRNA 正链 5'端再加上 CACC 酶切位点，sgRNA 互补链 5'端再加上 AAAC 酶切位点。分别委托公司合成 sgRNA 正链和互补链 (纯化级别为 PAGE) ；
- ④ 将合成后的 2 条 oligo sgRNA 稀释成 10 μ M，退火形成 dsDNA。退火反应体系如下：

| 组分 | 10 μ L 体系 |
|-------------------------|---------------|
| sgRNA 正链 (100 μ M) | 1.0 μ L |
| sgRNA 互补链 (100 μ M) | 1.0 μ L |
| ddH ₂ O | 8.0 μ L |

- ⑤ 将以上体系瞬时离心后，置于 PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 孵育 3min，孵育后自然冷却 20min。取 1 μ L 的杂交后的 dsDNA 进行 DNA Ligase 连接反应，反应体系如下：

| 组分 | 10 μ L 体系 |
|------------------------|---------------|
| Linear vector | 4.0 μ L |
| dsDNA | 1.0 μ L |
| DNA ligase | 0.2 μ L |
| 10 X DNA ligase buffer | 1.0 μ L |
| ddH ₂ O | 3.8 μ L |

将以上体系瞬时离心后，置于 PCR 仪中 16 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。

- ⑥ 连接产物可以直接转化 DH5a 高效感受态细胞后将其涂布到氨苄抗性的 LB 平板上，12-24 小时后挑取阳性克隆，接种到氨苄抗性的 LB 培养基中扩大培养。
- ⑦ 小提质粒或者直接将菌液送专业公司测序以确认载体构建成功 (测序的通用引物是 Human U6 promoter: GAGGGCCTATTTCCCATGATT) 。

2、细胞准备及阳性克隆筛选：

- ① 细胞培养：在六孔板中培养哺乳动物细胞密度达到 60%-70%，用脂质体转染试剂向细胞中转染构建好的上述载体 (具体实验步骤参考脂质体转染试剂说明书) ；
- ② 24h 后对六孔板细胞进行流式分析。分析前需要提前在 96 孔板内加入 100 μ L/孔 含 10%胎牛血清的细胞培

Greact Biotechnology Co., Ltd

培养基 (含 1%青霉素-链霉素溶液) , 经流式细胞分选仪分离带有绿色荧光的单克隆细胞于 96 孔板中;

③ 培养一段时间后, 将细胞克隆转移至 24 孔板、6 孔板和细胞培养皿逐级扩大培养;

④ 设计靶基因的正反向引物通过 PCR 扩增靶基因 (扩增的靶基因需要包含 gRNA 靶点) , 测序检测靶基因中 gRNA 靶点是否连续出现突变/缺失等错配修复现象, 如果有该现象说明靶基因可能被沉默。进一步 Western blotting 检测靶基因蛋白水平情况进行确认。也可以直接选择 Western blotting 进行检测即可。

注意事项

- ✧ 对于首次敲除的靶基因, 建议选择 3 条评分最高且处于不同 exon 的 20 bp sgRNA。
- ✧ 由于 Linear vector 中含有 U6 启动子, 因此在 sgRNA 的 5' 端尽量保证 G 开头 (或可加上一个 G) , 保证基因表达效率, 然后进一步在两端增加酶切位点序列。
- ✧ 流式分选获得阳性单克隆先在 96 孔板中培养至单克隆细胞长到足够数量 (不同细胞株成活率及生长速度不同, 一般约 1~3 周) 后再逐步扩大培养。