

## Cas9/gRNA 构建试剂盒 (Catalog. No. VK001-01)

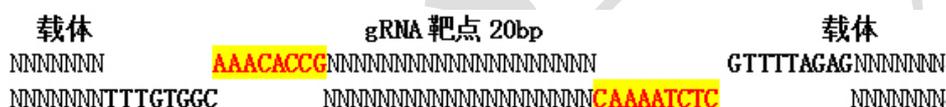
### 产品组成

组成	VK001-01S	VK001-01L
Cas9/gRNA Vector	5T	10T
Solution I (2X)	200μL	200μL
Sqprimer(10μM)	50μL	50μL

**保存条件:** 请将产品于-20℃保存, 避免反复冻融

### 产品说明

此试剂盒能快速方便地将 gRNA 靶点序列插入到 Cas9/gRNA 质粒中。构建好的 Cas9/gRNA 质粒能够同时表达 Cas9 蛋白及 gRNA, 应用 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑。



### 试剂盒使用前 gRNA 靶点引物的设计与合成

请按照如下格式设计引物 oligo:

Target-Sense: 5' -AAACACCG-gRNAsense

Target-Anti: 5' -CTCTAAAAC-gRNAanti

例如设计的 gRNA 的靶点位置为 GTCAGTTCTAAATAATGGCATGG (灰色背景: PAM 序列)。

设计下面的 oligo, 并进行合成: **注意: oligo 不能加上 PAM 序列**

Target-Sense: 5' -AAACACCGGTCAGTTCTAAATAATGGCA-3'

Target-Anti: 5' -CTCTAAAAC TGCCATTATTAGAACTGAC-3'

### 使用方法:

**注意:** 收到试剂盒后, 使用前请离心试管, 避免溶液残留管壁。

### 步骤一: oligo 二聚体 (oligoduplex) 的形成



将合成的 oligo 分别稀释成 10μM, 按如下比例混合

Target-Sense	1μL
Target-Anti	1μL
Solution I	5μL
H <sub>2</sub> O	3μL
最终体系	10μL

混匀后, 按照如下程序处理:

95℃ 3min

95℃ 到 25℃ 缓慢冷却, 例如 -1℃/20S 或者将样品管放在 95℃ 水中, 自然冷却至室温

16°C 5min

### 步骤二：oligo 二聚体插入到载体中

Cas9/gRNA Vector	1μL
步骤一的 oligo 二聚体	2μL
H <sub>2</sub> O	7μL
最终体系	10μL

充分混合后，室温（25°C）静置 5min

### 步骤三：转化

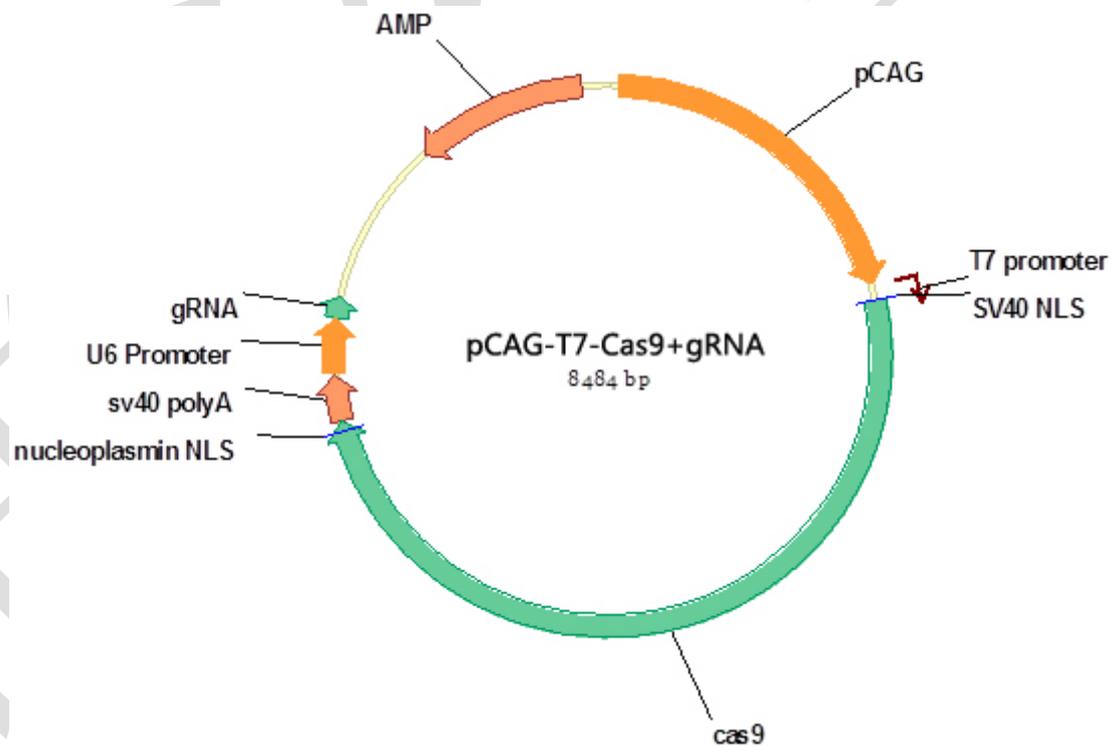
取步骤二的最终产物5-10μL加入到刚解冻的50μL DH5a感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴30分钟后，42°C热激90秒，冰上静置2分钟，直接涂于氨苄抗性的平板。

### 阳性克隆的鉴定

挑3至5个白色菌落摇菌，提取质粒DNA进行测序。测序引物：

sqprimer: TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAG。测序结果例子见文档后。

### 质粒图谱：





北京唯尚立德生物科技有限公司

测序例子:

AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTT  
AGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAG  
TAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAAATTATGTTTTAAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTA  
ACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNN GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAA

hU6gRNA target gRNA骨架

AAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGGATCCGCGCCGCTCGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAA  
GGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCA  
CAAAAATCGACGCTCA

测序引物 (反向)