



最终体系 10 $\mu$ L

混匀后，按照如下程序处理：

95 $^{\circ}$ C 3min

95 $^{\circ}$ C 到 25 $^{\circ}$ C 缓慢冷却，例如 -1 $^{\circ}$ C/20S 或者将样品管放在 95 $^{\circ}$ C 水中，自然冷却至室温

16 $^{\circ}$ C 5min

### 步骤二：oligo 二聚体插入到载体中

Cas9/gRNA Vector 1 $\mu$ L

步骤一的 oligo 二聚体 2 $\mu$ L

H<sub>2</sub>O 7 $\mu$ L

最终体系 10 $\mu$ L

25 $^{\circ}$ C（室温）反应 5min

### 步骤三：转化

取步骤二的最终产物5-10 $\mu$ L加入到刚解冻的50 $\mu$ L DH5a感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴30分钟后，42 $^{\circ}$ 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

### 体外转录(此步仅供参考)

测序正确的质粒使用NheI和NotI酶切，0.7%琼脂糖胶电泳后会看到8Kbp（cas9）和400bp(gRNA)的条带，分别回收这两条带。

#### 1) Cas9体外转录步骤：

1. 转录 cas9 mRNA，37 $^{\circ}$ C 2 小时。

（试剂盒：mRNAmESSAGEmMACHINE<sup>®</sup> T7 Kit, Invitrogen, 具体请参见厂家试剂盒说明）

DEPC H <sub>2</sub> O	To 10 $\mu$ l
2 $\times$ NTP/CAP	5 $\mu$ l
10 $\times$ Reaction Buffer	1 $\mu$ l
Linear template DNA (8K DNA 片段)	500ng ( $\leq$ 3 $\mu$ l)
T7 Enzyme Mix	1 $\mu$ l

2. LiCl 沉淀回收 CAS9 mRNA：在上述反应中加入 15 $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O 和 15  $\mu$ l 12.5M LiCl，-20 $^{\circ}$ C 沉淀 30min。4 $^{\circ}$ C 最大转速离心 15min，弃上清；加入 1ml 70%乙醇，4 $^{\circ}$ C 最大转速离心 10min；弃上清，注意管底的白色沉淀，最后溶于 20~30 $\mu$ l DEPC H<sub>2</sub>O 中，nanodrop 定量。

## 2) gRNA体外转录步骤

**注意：gRNA体外转录请不要使用加帽体外转录试剂盒**

1. 使用我公司的 T7 体外转录试剂盒 (VK010) 转录 gRNA 为例，转录步骤如下：

DEPC H <sub>2</sub> O	X $\mu$ L
10 $\times$ Reaction Buffer	2 $\mu$ L
NTP (100 mM each)	2 $\mu$ L
Linear template DNA	1 $\mu$ g
T7 RNA Polymerase Mix	2 $\mu$ L
Total reaction volume	20 $\mu$ L

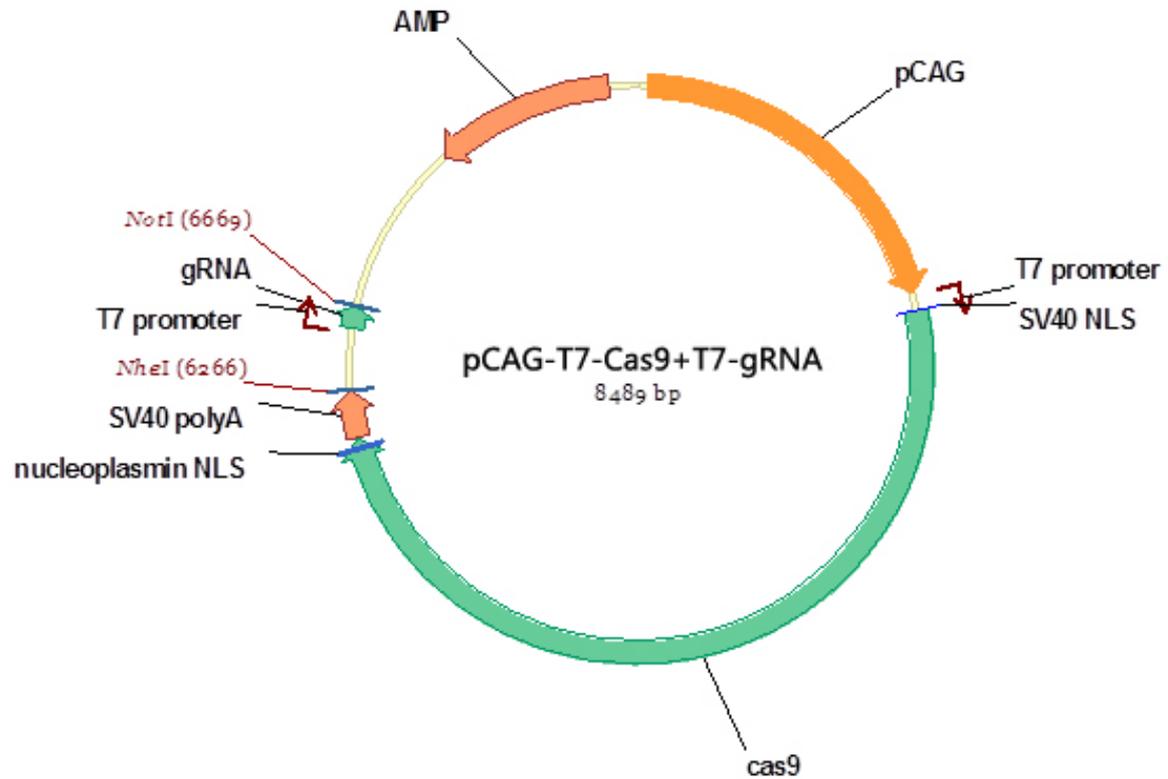
以上混合后，37 度反应 2 小时。反应结束后，加入 1 ul DNase I，37 $^{\circ}$ C 反应 30 分钟。。

2. RNA 提取（使用酚氯仿抽提小片段 gRNA）

- 1) 加入 115 $\mu$ L DEPC 水，15 $\mu$ L Stop Solution 混匀后，加入 2 倍体积（300 $\mu$ L）的无水乙醇（自备），充分混匀后，-20 $^{\circ}$ C 冻存冻存 3 小时以上。
- 2) 13000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 20 min，去除上清保留沉淀。
- 3) 加入 300 $\mu$ L 的 70%冷乙醇清洗（自备，注意用 DEPC 水配制），13000rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min，去除上清保留沉淀，待乙醇晾干后，加入 DEPC 水溶解 RNA 沉淀。
- 4) 测量 RNA 浓度，直接用于后续实验，或者-80 $^{\circ}$ C 保存待用。

将 Cas9 mRNA 和 gRNA 等摩尔比混合，注射不同的浓度梯度到单细胞胚胎中。

质粒图谱:



测序例子:

TTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGTAATACGACTCACTATAGGNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNGTTTTAG

T7

promoter gRNA 靶点 gRNA 骨架

AGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTG  
CTTTTTTTGCGGCCGCTCGACATGTGAGCAAAAAGCCAGCAAAAAGCCAGGAACCGTAAAAAGCCGCG  
TTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA

测序引物 (反向)