

## Cas9Nickase/gRNA 构建试剂盒 (Catalog. No. VK001-05)

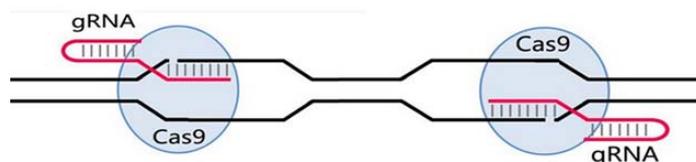
### 产品组成

组成	VK001-05s	VK001-05L
Cas9/gRNA(D10A) Vector	6T	10T
Solution1 (2X)	200μL	200μL
Sqprimer(10μM)	50μL	50μL

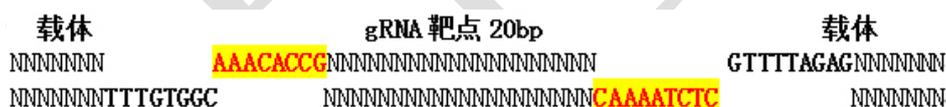
**保存条件:** 请将产品于-20℃保存, 避免反复冻融

### 产品说明

1、CRISPR 系统是一种强大而操作简单的基因组编辑工具。CRISPR 由于识别序列长度的限制, 存在一定脱靶效应 (off-target), 即 Cas9 酶会剪切目标靶点外的其他基因组 DNA。采用 Cas9 Nickase 剪切一对临近的 gRNA 靶点是降低 CRISPR 系统脱靶效应的有效方法, 从而更加精确的进行目标基因的敲除和编辑 (图 1)。



2、此试剂盒能快速方便地将 gRNA 靶点序列构建到 Cas9 Nickase (Cas9-D10A) 和 gRNA 表达质粒中, 并且构建成功后, 可以通过亚克隆方法同时将一对或者多个 gRNA 构建到一个 Cas9 (D10A) /gRNA 质粒上。



### 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' -CTCTAAAACGTCCATTATTAGAACTGAC-3'

### 使用方法:

注意: 收到试剂盒后, 使用前请离心试管, 避免溶液残留管壁上。

### 步骤一: oligo 二聚体 (oligoduplex) 的形成

**AAACACCG**GTCAGTTCTAAATAATGGCA  
CAGTCAAGATTATTACCGT**CAAAATCTC**

将合成的 oligo 分别稀释成 10 $\mu$ M，按如下比例混合

Target-Sense	1 $\mu$ L
Target-Anti	1 $\mu$ L
Solution1	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	3 $\mu$ L
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

充分混合后，室温（25 $^{\circ}$ C）静置 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。测序结果例子如下：

测序例子：

AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTT  
AGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAG  
TAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTA  
ACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG

**TGG**

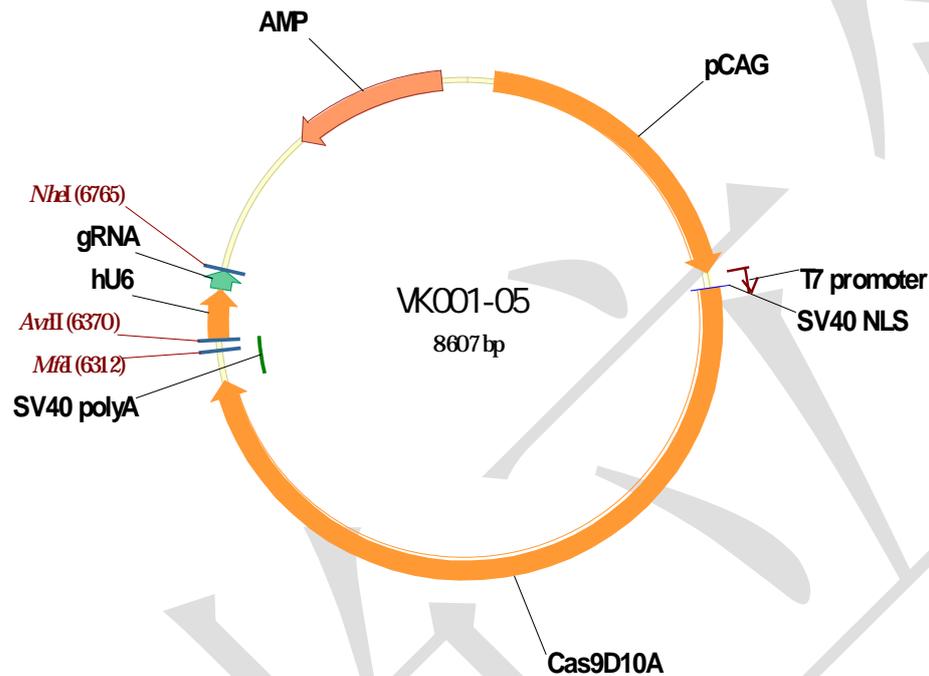
hU6

gRNA target

gRNA 骨架

CACCGAGTCGGTGCTTTTTTTTGATCGCTAGCAACAAGTGCACGCGTGCGGCCGCTCGACATGTGAGCAA  
 AAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC  
CTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA  
 测序引物（反向）

质粒图谱:



使用说明:

由于 Cas9-D10A Nickase 仅酶切 DNA 双链的一条链，形成单链切口。为了形成双链 DNA 断裂 (DSB)，需要 Cas9-D10A Nickase 与成对的 gRNA 共同作用，因此存在两种使用方法:

- 构建好的一对 Cas9-D10A/gRNA 质粒，通过共转染导入到细胞，实现细胞的基因敲除或者剪切。
- 将两个 gRNA 靶点表达元件都构建到一个载体上能增加两个靶点 gRNA 同时进入细胞的概率，从而提高基因敲除的效率。

一对或者多个靶点构建到同一个表达质粒方法:

1. 使用本试剂盒分别构建两个或者多个 gRNA 的 Cas9/gRNA 质粒，并确认测序正确: Cas9-D10A/gRNA1、Cas9-D10A/gRNA2、Cas9-D10A/gRNA3.....
2. 将质粒 Cas9-D10A/gRNA1 使用 NheI 和 MfeI 酶切 (8.15Kb+0.45Kb) 回收 450bp 左右的小带，插入到使用 AvrII 和 MfeI 酶切 (唯一一条带，8.56Kb 左右) 的质粒 Cas9-D10A/gRNA2 中，构建一对 gRNA 靶点到同个表达质粒中。
3. 以此类推，分别逐个地把多个靶点构建到同一个表达质粒中。
4. 最后将组装好的质粒转染目的细胞，同时表达 Cas9 Nickase 蛋白和一对或者多个靶点 gRNA，实现基因敲除或者基因编辑，减少脱靶效应 (off-target)。