

Cas9 Nickase/gRNA 构建试剂盒 (Catalog. No. VK001-07)

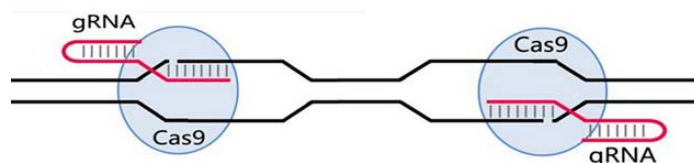
产品组成

组成	VK001-07s	VK001-07L
Cas9/gRNA(D10A) Vector	6T	10T
Solution1 (2X)	200μL	200μL
Sqprimer(10μM)	50μL	50μL

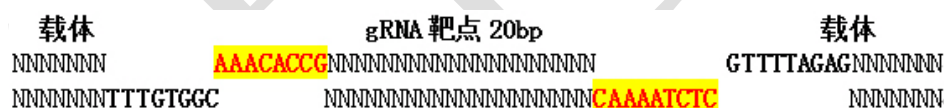
保存条件: 请将产品于-20℃保存, 避免反复冻融

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。



3、该质粒同时表达抗性标签 puromycin 和荧光蛋白 mcherry, 方便对难转染的细胞进行筛选。

4、本试剂盒主要适用于哺乳动物的细胞筛选, 也可适用于模式动物的显微注射。

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

AAACACCGTTCAGTTCTAAATAATGGCA
CAGTCAAGATTATTACCGTCAAAATCTC

将合成的 oligo 分别稀释成 10 μ M, 按如下比例混合

Target-Sense	1 μ L
Target-Anti	1 μ L
Solution1	5 μ L
H ₂ O	3 μ L
最终体系	10 μ 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 μ L
步骤一的 oligo 二聚体	2 μ L
H ₂ O	7 μ L
最终体系	10 μ 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 μ L 加入到刚解冻的 50 μ 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: TGAGCGTTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAG。测序结果例子如下:

测序例子:

AAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTT
AGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGTA AACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAG
TAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTA
ACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNN

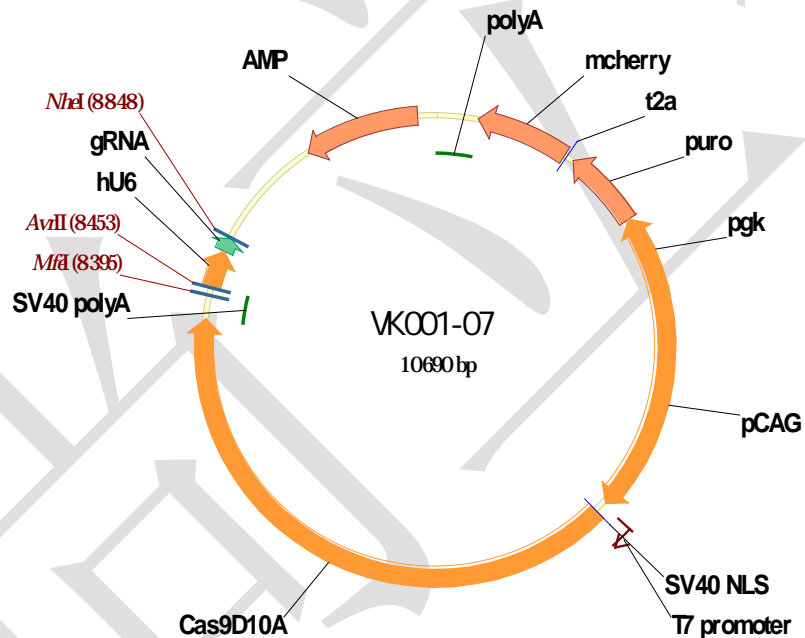
NNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGG

hU6 gRNA target gRNA骨架

CACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGATCGCTAGCAACAAGTGCACGCGTGC GGCCGCTCGACATGTGAGCAA
AAGGCCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCC
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.....

北京唯尚立德生物科技有限公司

2. 将质粒Cas9-D10A/gRNA1使用NheI和MfeI酶切（10.24Kb+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，10.63Kb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）。