



北京唯尚立德生物科技有限公司

## 家禽 cas9/gRNA 构建试剂盒 (Catalog. No. VK001-08)

### 产品组成

组成	VK001-08s	VK001-08L
Cas9/gRNA Vector	5T	10T
Solution1 (2X)	200μL	200μL
Sqprimer(10μM)	50μL	100μL

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 质粒能够同时通过 pCAG 启动表达 Cas9 蛋白及家禽的 U6 启动子表达 gRNA, 实现 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑。

载体	gRNA靶点20bp	载体
NNNNN	<b>CTCTTAGTC</b> NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	GTTTTAGAGNNNNN
NNNNNGAGAATCAG	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <b>CAAATCTC</b>	NNNNN

### 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' -**CTCTTAGTC**-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' -**CTCTTAGTC** GTCAGTTCTAAATAATGGCA-3'

Target-Anti: 5' -**CTCTAAAAC** TGCCATTATTTAGAACTGAC-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

<b>CTCTTAGTC</b> NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <b>CAAATCTC</b>

将合成的 oligo 分别稀释成 10μM, 按如下比例混合

Target-Sense 1μL

Target-Anti 1μL

Solution1 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

## 北京唯尚立德生物科技有限公司

95°C到25°C缓慢冷却，例如 -1°C/20S 或者将样品管放在95°C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

步骤二的 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

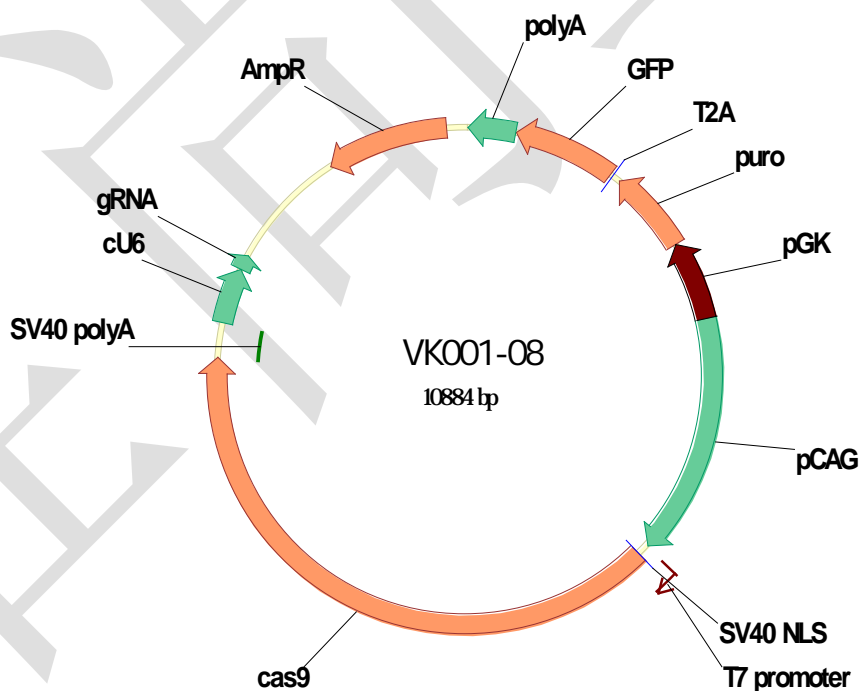
取步骤二的最终产物5-10μL加入到刚解冻的50μL DH5a感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴30分钟后，直接涂于氨苄抗性的平板。

### 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

gene 测序结果（测序引物

sqprimer: TGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAG）：

测序例子：

Atgctcgctagtgcggcgagctgcagaaaggtaacgagctggcactgccctctaatacgttaatttctgtatctggcca  
gccactatgaaaagctcaaagggctcccgaagataatgagcagaagcagctgttcgtggaacaacacaaactacctt  
gatgagatcatcgagcaataagcgaattctccaaaagagtgcctcggcagcctaacctcgataaggtgctttctgctta  
caataagcacaggataagccatcagggagcaggcagaaaacattatccactgtttactctgaccaactggggcgcc  
tgcagcctcaagtacttcgacaccacatagacagaaagcggtagacctctacaaggaggtcctggacgccacactgat  
tcacagcaattacggggctctatgaaacaagaatcgacctctcagctcggggagacaagcgtcctgctgactaag  
aaagctggtcaagctaagaaaaagaaataatctagaactatagtgagctgtattacgtagatccagacatgataagatacatt  
gatgagtttgacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgtaacc  
attataagctgcaataacaagttaacaacaacaattgcattcatttatgtttcaggttcagggggaggtgtgggaggttttta  
attccctagggcgaattgcagacagacgtcaggctttctaagcctggactgagtaagagcgcaagagctccacagcactct  
gagtgcgcacagaccgcggtacagcgcacagccgcggccgctccttcaggcactgccgacgacagcccaggcg  
gaggtcctgagcggcggcgctaaattgcataaagaactaccagggagccctcgcgcgggaaacggcaaaaagggg  
cttctaatatgaaatattacgccgaatcgcttacaaatcgctaaagcggcctaagagttacaagatgtgctattaagcg  
gagccttttggtgggaagaaatggagtagtactgtgttctaaaagaacttcagaatgagcctttaaataccgagctcga  
tgctcttagtc**NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG  
TTAAAA

cU6gRNA target gRNA 骨架

TAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTt  
ttgatcgtagcaacaagtgcacgcgtgcggccgctcgacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaa  
aaaggccgcgttgctggcgttttccataggctccgccccctgacgagcatcacaaaatcgacgctca

测序引物（反向）