

昆虫 cas9/gRNA 构建试剂盒 (Catalog. No. VK001-10)

产品组成

组成	VK001-10s	VK001-10L
Cas9/gRNA Vector	5T	10T
Solution1 (2×)	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 质粒能够同时通过昆虫 OPIE2 启动子表达 Cas9 蛋白及家蚕的 U6 启动子表达 gRNA, 实现 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑。

- 特性: 1) 昆虫OPIE2启动子表达昆虫密码子优化的Cas9蛋白;
 2) 家蚕U6启动子表达gRNA;
 3) 昆虫OPIE1启动子表达博来霉素抗性基因。

```

载体                                gRNA 靶点 20bp                                载体
NNNNNN      CTCTACAAGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN      GTTTTAGAGNNNNNNNN
NNNNNNGAGATGTTCA      NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN      CAAAATCTC      NNNNNNN
    
```

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' -CTCTACAAGT-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' -CTCTACAAGTGTCAGTTCTAAATAATGGCA-3' (正向序列)
 Target-Anti: 5' -CTCTAAAAC TGCCATTATTTAGAACTGAC-3' (反向互补序列)

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

```

CTCTACAAGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN      CAAAATCTC
    
```

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

spCas91.1/gRNAVector	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 DH5 α 感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 热激 90 秒，冰上静置 2 分钟，然后加入 500 微升无抗 LB，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中，170 转，复苏一小时后涂博来霉素抗性（Zeocin⁺）的平板。

阳性克隆的鉴定

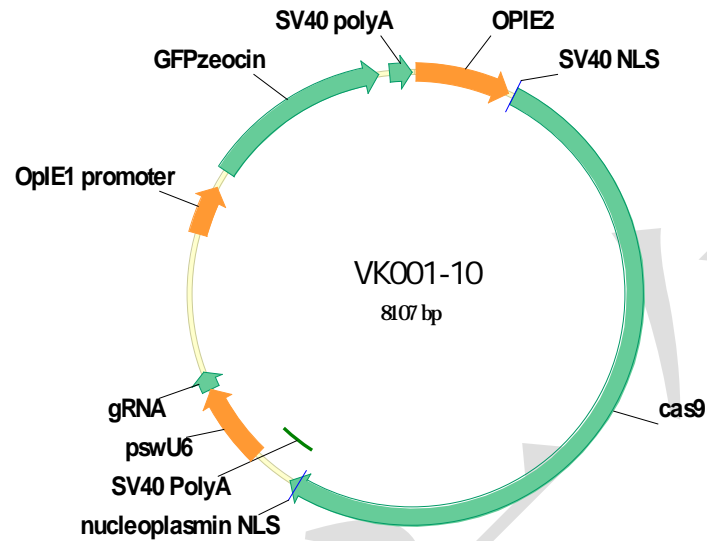
挑 3 至 5 个菌落摇菌，进行测序。这个质粒为低拷贝，请注意要收集 4ml 菌液抽提质粒，浓度太低测序结果就会不理想。如果第一次测序得不到正确结果，请加送 5 个测序样品，进行测序。

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:

TCATAGTGATTTTGTCAAAGTAATAACAGATGGCGCTGTACAAACCATAACTGTTTTTCATTTGTTTTTA
 TGGATTTTATTACAAATTCTAAAGGTTTTATTGTTATTATTTAATTCGTTTTAATTATATTATATATC
 TTTAATAGAATATGTTAAGAGTTTTTGTCTCTTTTTGAATAATCTTTGTAAAGTCGAGTGTGTTGTA
 TCACGCTTTCAATAGTTTAGTTTTTTAGGTATATATACAAAATATCGTGCTCTACAAGT...gRNA...t
 arget...GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGG
 CACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGATCGCTAGCAACAAGTGCACGCGTGCGGCCCGGATGCTCACTCAAAG
 GCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAA
 AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
 CACAAAAATCGACGCTCA

← 测序引物