

## 植物 Cas9/gRNA 质粒构建试剂盒 (Catalog. No. VK005-13)

(单子叶植物, GFP 筛选标记)

### 产品组成

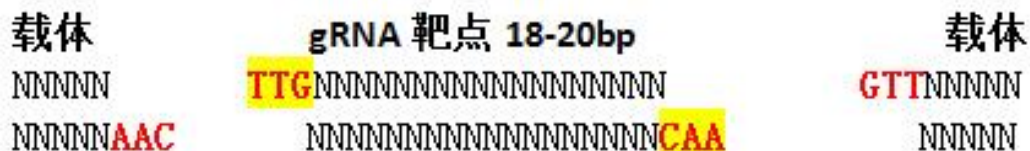
组成	VK005-13S	VK005-13L
Cas9/gRNA Vector	5T	10T
Solution1	20μL	20μL
Solution2	10μL	20μL
Sqprimer(10μM)	50μL	50μL

保存条件: 请将产品于-20℃保存, 避免反复冻融

### 产品说明

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 质粒能够同时表达植物密码子优化的 Cas9 蛋白及 gRNA, 应用 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑。

- 特性:
- 1) 玉米Ubi启动子表达植物密码子优化的Cas9蛋白;
  - 2) 单子叶的3' UTR提高Cas9蛋白表达水平;
  - 3) 小麦U6启动子表达gRNA, 特别适用于单子叶植物;
  - 4) GFP筛选标记;
  - 5) 多个gRNA构建到同一载体中;



### 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' -**TTG**-gRNAsense  
 Target-Anti: 5' -**AAC**-gRNAanti

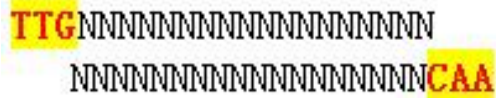
例如设计的 gRNA 的靶点位置为 CAGTTCTAAATAATGGCATGG (其中: 识别序列大约 18-20bp; 灰色背景: PAM 序列)。按照 gRNA 的靶点序列设计下面的 oligo, 并进行合成, **注意: oligo 不能加上 PAM 序列。**

Target-Sense: 5' -**TTG**CAGTTCTAAATAATGGCA-3' (正向序列)  
 Target-Anti: 5' -**AAC**TGCCATTATTTAGAACTG-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, 避免溶液残留管壁上。

### 步骤一：oligo 二聚体 (oligoduplex) 的形成



将合成的 oligo 分别稀释成 10 $\mu$ M，按如下比例混合

Target-Sense	5 $\mu$ L
Target-Anti	5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	15 $\mu$ L
最终体系	25 $\mu$ 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/gRNAVector	1 $\mu$ L
步骤一的 oligo 二聚体	1 $\mu$ L
Solution	1 $\mu$ L
Solution2	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	6 $\mu$ L
最终体系	10 $\mu$ L

16 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

### 步骤三：转化

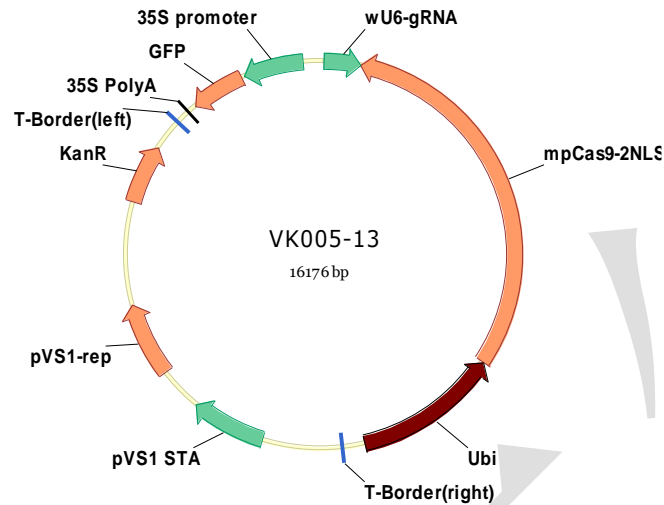
取步骤二的最终产物 5-10 $\mu$ L 加入到刚解冻的 50 $\mu$ L DH5a 感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 热激 90 秒，冰上静置 2 分钟，然后加入 500 微升无抗 LB，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中，170 转，复苏一小时后涂卡纳抗性 (Kana+) 的平板。

### 阳性克隆的鉴定

挑 3 至 5 个白色菌落摇菌，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。

sqprimer: GATGAAGTGGACGGAAGGAAGGAG。测序结果例子见文档后。

质粒图谱：



**VK005-13 质粒示意图:**



**测序例子:**

反向测序，请反向互补测序结果后，再进行序列比对。

```
TAGGAATATTGATCAGAGGAACTACGAGAGAGCTGAAGATAACTGCCCTCTAGCTCTCACTGATCTGGG
TCGCATAGTGAGATGCAGCCCACGTGAGTTCAGCAACGGTCTAGCGCTGGGCTTTTAGCCCGCATGAT
CGGGCTTTTGTGCGGGTGGTCGACGTGTTACAGATTGGGGAGAGCAACGCAGCAGTTCCTCTTAGTTTAG
TCCCACCTCGCCTGTCCAGCAGAGTTCTGACCGTTTATAAACTCGCTTGCTGCATCAGACTTG...gRN
A...Target...GTTTtagagctagaaatagcaagttaaaataaggctagtcggttatcaactgaaaaa
GTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTACTAGTTTTGATCTTGAAAGATCTTTTATCTTTAGAGTTAAGAA
CTCTTTCGTATTTTGGTGAGGTTTATCCTCTTGAGTTTTGGTCATAGACCTATTCATGGCTCTGATAC
CAATTTTTAAGCGGGGCTTATGCGGATTATTTCTTAAATTGATAAGGGGTTATTAGGGGGTATAGGGT
ATAAATAACAAGCATTCCCTTAGCGTATAGTATAAGTATAGTAGCGTACCTCTATCAAATTTCCATCTTC
TTACCTTGCACAGGGCCTGCAACCTTATCCTTCCTTGTCTTCCTCCTTCCTCCGTCCTCCTCATA
TTTAAACCAAACCTACGGGGGAGTCAACGT
```

← 测序引物

**一对或多个靶点构建到同一个表达质粒方法:**

1. 分别把 gRNA 靶点 g1,g2,g3,g4 构建到 VK005-13 载体中，分别命名：  
VK005-13-g1;  
VK005-13-g2;  
VK005-13-g3;  
VK005-13-g4;
2. 构建 VK005-13-g1g2: VK005-13-g1 用 **Ascl+SpeI** 酶切，跑胶回收短带 (wU6: 约 490bp)，插入到用 **Ascl+AvrII** 酶切的 VK005-13-g2 中。命名: VK005-13-g1g2

北京唯尚立德生物科技有限公司

3. 构建 VK005-13-g3g4: VK005-13-g3 用 *Ascl*+*SpeI* 酶切，跑胶回收短带（wU6: 490bp），插入到用 *Ascl*+*AvrII* 酶切的 VK005-13-g4 中。命名：VK005-13-g3g4
4. 构建 VK005-13-g1g2g3g4: VK005-13-g1g2 用 *Ascl*+*SpeI* 酶切，跑胶回收短带（wU6: 2x490bp），插入到用 *Ascl*+*AvrII* 酶切的 VK005-13-g3g4 中。命名：VK005-13-g1g2g3g4

以此类推，将多个靶点串联在一起构建到同一个表达质粒中。用 *Ascl*+*SpeI* 酶切进行克隆的验证，检测酶切带的大小与串联的片段大小是否一致。因为由于为重复序列，两端测序有可能无法测通。

其他植物相关试剂盒：

spCas9 CRSIPR 质粒构建试剂盒系列：

**VK005-01:** 适用于单子叶植物，特别用于水稻，潮霉素抗性



**VK005-02:** 适用于单子叶植物，特别用于水稻，草铵膦抗性



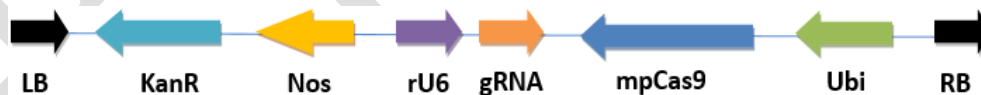
**VK005-05:** 适用于单子叶植物，潮霉素抗性



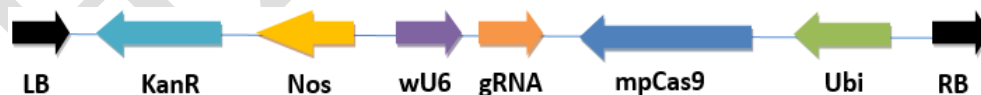
**VK005-06:** 适用于单子叶植物，草铵膦抗性



**VK005-07:** 适用于单子叶植物，卡那霉素抗性



**VK005-09:** 适用于单子叶植物，卡那霉素抗性



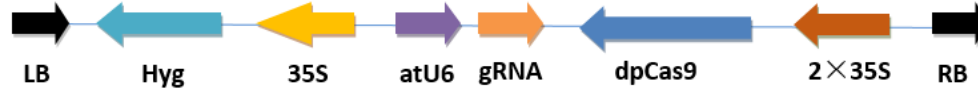
**VK005-11:** 适用于单子叶植物，GFP 筛选标记



**VK005-13:** 适用于单子叶植物，GFP 筛选标记



**VK005-14:** 适用于双子叶植物，潮霉素抗性



**VK005-15:** 适用于双子叶植物，草铵膦抗性



**VK005-16:** 适用于双子叶植物，卡那霉素抗性



**SaCas9 CRSIPR 质粒构建试剂盒系列:**

saCas9 的 PAM 序列和识别序列比常用的 spCas9 都长, 剪切 DNA 的特异性更好, off-target 效应更小, 并且蛋白比 spCas9 小, 因此应用潜力大。

**VK005-101:** saCas9, 适用于双子叶植物, 潮霉素抗性



**VK005-102:** saCas9, 适用于双子叶植物, 草铵膦抗性



**VK005-103:** saCas9, 适用于单子叶植物, 特别用于水稻, 潮霉素抗性



**VK005-104:** saCas9, 适用于单子叶植物, 特别用于水稻, 草铵膦抗性



**VK005-105:** saCas9, 适用于双子叶植物, GFP 筛选标记



**Cpf1 CRSIPR 质粒构建试剂盒系列:**

Cpf1 是新型的 CRISPR Cas9 酶，其识别的 PAM 序列在 5' 端，PAM 序列：TTTN。剪切 DNA 产生粘性末端。Cpf1 的应用将扩大 CRSIRPgRNA 靶点的设计范围，具有独特的应用。

**VK005-201:** Cpf1, 适用于单子叶植物，特别用于水稻，潮霉素抗性



**VK005-202:** Cpf1, 适用于单子叶植物，特别用于水稻，草铵膦抗性



**VK005-203:** Cpf1, 适用于双子叶植物，潮霉素抗性



**VK005-204:** Cpf1, 适用于双子叶植物，草铵膦抗性



**VK005-205:** Cpf1, 适用于双子叶植物，卡那霉素抗性



**VK005-206:** Cpf1, 适用于双子叶植物，GFP 筛选标记

