

植物 Cas9/gRNA 质粒构建试剂盒 (Catalog. No. VK005-14)

(双子叶植物, 潮霉素抗性)

产品组成

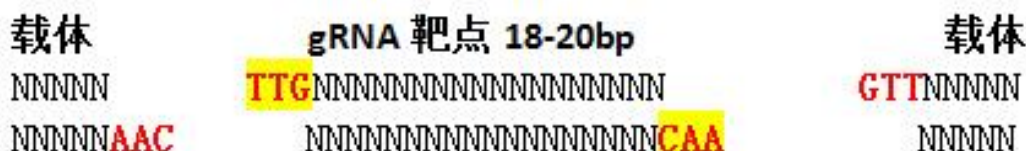
组成	VK005-14S	VK005-14L
Cas9/gRNA Vector	5T	10T
Solution1	20 μ L	20 μ L
Solution2	10 μ L	20 μ L
Sqprimer(10 μ M)	50 μ L	50 μ L

保存条件: 请将产品于-20 $^{\circ}$ C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) 35S启动子表达植物密码子优化的Cas9蛋白;
 - 2) 双子叶的3' UTR提高Cas9蛋白表达水平;
 - 3) 拟南芥U6启动子表达gRNA, 适用于双子叶植物;
 - 4) 35S启动子表达潮霉素抗性
 - 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

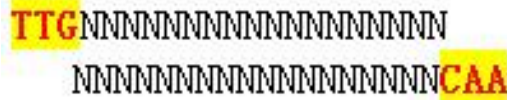
例如设计的 gRNA 的靶点位置为 CAGTTCTAAATAATGGCATGG (其中: 识别序列大约 18-20bp; 灰色背景: PAM 序列)。按照 gRNA 的靶点序列设计下面的 oligo, 并进行合成, **注意: oligo 不能加上 PAM 序列。**

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 μ M，按如下比例混合

Target-Sense	5 μ L
Target-Anti	5 μ L
H ₂ O	15 μ L
最终体系	25 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/gRNAVector	1 μ L
步骤一的 oligo 二聚体	1 μ L
Solution	1 μ L
Solution2	1 μ L
H ₂ O	6 μ L
最终体系	10 μ L

16 $^{\circ}$ C 反应 2 小时。

步骤三：转化

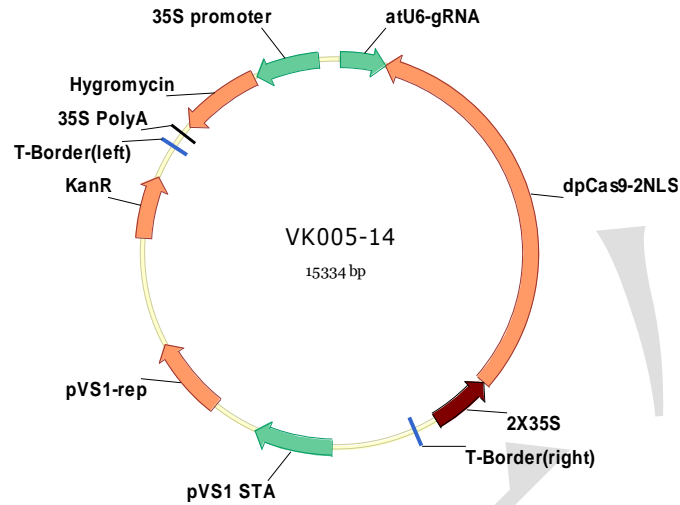
取步骤二的最终产物 5-10 μ L 加入到刚解冻的 50 μ L DH5 α 感受态细胞中，轻弹混匀，冰浴 30 分钟，42 $^{\circ}$ C 热激 90 秒，冰上静置 2 分钟，然后加入 500 微升无抗 LB，置于 37 $^{\circ}$ C 恒温摇床中，170 转，复苏一小时后涂卡纳抗性 (Kana+) 的平板。

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：



VK005-14 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。

```

CTTGTTTCATAGTTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCGAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAA
ACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAG
GCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAA
AAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG
...gRNA...Target...GTTTATAGAGCTAGAAAATAGCAAGTAAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTG
AAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTTACTAGTTTGTATCTTGAAAGATCTTTTATCTTTAGAGTT
AAGAACTCTTTTCGTATTTTGGTGAGGTTTTATCCTCTTGAGTTTTGGTCATAGACCTATTCATGGCTCT
GATACCAATTTTAAAGCGGGGCTTATGCGGATTATTTCTTAAATTGATAAGGGGTATTAGGGGGTAT
AGGGTATAAATACAAGCATTCCCTTAGCGTATAGTATAAGTATAGTAGCGTACCTCTATCAAATTTCCA
TCTTCTTACCTTGACAGGGCCTGCAACCTTATCCTTCCTTGCTTCCTCCTTCCTTCCGTTCCACTTCA
TCATATTTTAAACCAAACCTACGGGGGAGTCAACGT
    
```

← 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 VK005-14 载体中, 分别命名:
 VK005-14-g1;
 VK005-14-g2;
 VK005-14-g3;
 VK005-14-g4;
2. 构建 VK005-14-g1g2: VK005-14-g1 用 **Ascl**+**SpeI** 酶切, 跑胶回收短带 (atU6: 约 570bp), 插入到用 **Ascl**+**AvrII** 酶切的 VK005-14-g2 中。命名: VK005-14-g1g2

北京唯尚立德生物科技有限公司

3. 构建 VK005-14-g3g4: VK005-14-g3 用 *Ascl*+*SpeI* 酶切, 跑胶回收短带 (atU6: 570bp), 插入到用 *Ascl*+*AvrII* 酶切的 VK005-14-g4 中。命名: VK005-14-g3g4
4. 构建 VK005-14-g1g2g3g4: VK005-14-g1g2 用 *Ascl*+*SpeI* 酶切, 跑胶回收短带 (atU6: 2x570bp), 插入到用 *Ascl*+*AvrII* 酶切的 VK005-14-g3g4 中。命名: VK005-14-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。

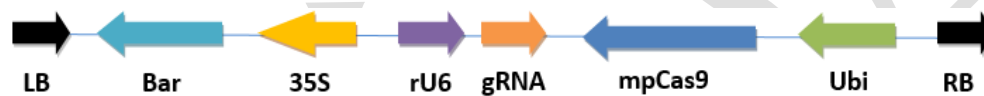
其他植物相关试剂盒:

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



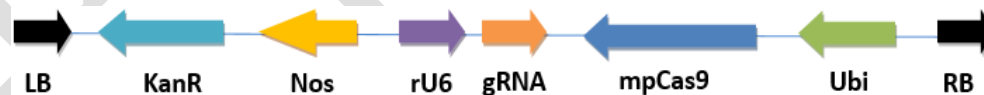
VK005-05: 适用于单子叶植物, 潮霉素抗性



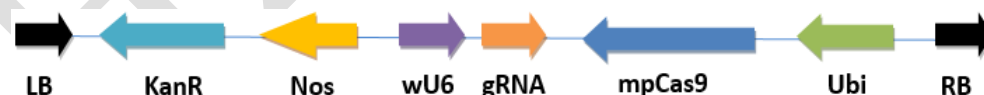
VK005-06: 适用于单子叶植物, 草铵膦抗性



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



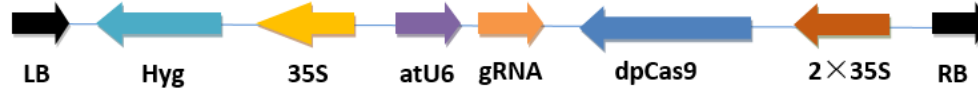
VK005-11: 适用于单子叶植物, GFP 筛选标记



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

