

## 植物 Cpf1/gRNA 质粒构建试剂盒 (Catalog. No. VK005-206)

(双子叶植物, GFP 标记)

### 产品组成

组成	VK005-206S	VK005-206L
<b>Cpf1/gRNA Vector</b>	<b>5T</b>	<b>10T</b>
<b>Solution1</b>	<b>20μL</b>	<b>20μL</b>
<b>Solution2</b>	<b>10μL</b>	<b>20μL</b>
<b>Sqprimer(10μM)</b>	<b>50μL</b>	<b>50μL</b>

**保存条件:** 请将产品于-20℃保存, 避免反复冻融

### 产品说明

CRISPR/Cas 是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御, 可特异剪切外源的病毒及 DNA 以对抗入侵。人工改造过的 Cas9/gRNA 系统通过 gRNA(short guide RNA)引导 Cas9 蛋白识别并剪切带有 gRNA 靶点的双链 DNA, 用于基因敲除和精确编辑 DNA 等操作。

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, 应用潜力更为广泛。

此试剂盒能快速方便地将 gRNA 靶点序列插入到 Cpf1/gRNA 质粒中。构建好的 Cpf1/gRNA 质粒能够同时表达植物密码子优化的 Cpf1 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GFP筛选标记  
 5) 多个gRNA构建到同一载体中

载体	gRNA靶点 20bp	载体
NNNNN	<b>GAT</b> NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN	<b>TTT</b> NNNNN
NNNNN <b>CTA</b>	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN <b>AAA</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' -**GAT**-gRNAsense

Target-Anti: 5' -**AAA**-gRNAanti

例如设计的 gRNA 的靶点位置为 **TTTCCAGTTCTAAATAATGGCAAA** (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。**

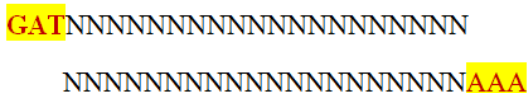
Target-Sense: 5' -**GAT**CAGTTCTAAATAATGGCAAA-3' (正向序列)

Target-Anti: 5' -AAATTTGCCATTATTTAGAACTG-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

Cpf1/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。

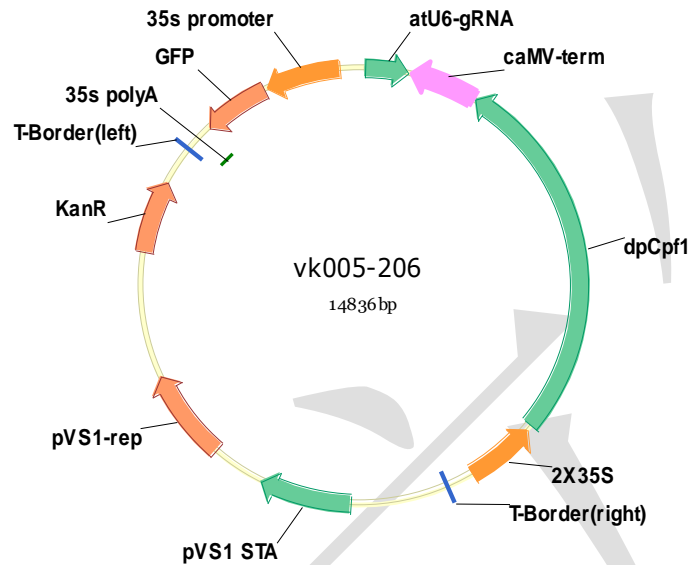
### 步骤三: 转化

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。

质粒图谱:



VK005-206 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。

```

CATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAAGGCCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGG
CCCATTTATATGGGAAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAA
AGTCCCACATCGCTTAGATAAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTGT
TAATTTCTACTCTTGTAGAT...gRNA...Target...TTTTTTACTAGTTTTGATCTTGAAAGATCTTT
TATCTTTAGAGTTAAGAACTCTTTCGTATTTGGTGAGGTTTTATCCTCTTGAGTTTTGGTCATAGACC
TATTCATGGCTCTGATACCAATTTTTAAGCGGGGGCTTATGCGGATTATTTCTTAAATTGATAAGGGGT
TATTAGGGGGTATAGGGTATAAATACAAGCATTCCCTTAGCGTATAGTATAAGTATAGTAGCGTACCTC
TATCAAATTTCCATCTTCTTACCTTGCACAGGGCCTGCAACCTTATCCTTCCTTGCTCTCCTCCTTCCT
TCCGTCCACTTCATCATATTTAAACCAAACCTACGGGGGAGTCAACGTAACCAACCCTGCCTTAGC
    
```

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 VK005-206 载体中, 分别命名:  
VK005-206-g1;  
VK005-206-g2;

VK005-206-g3;

VK005-206-g4;

2. 构建 VK005-206-g1g2: VK005-206-g1 用 **Ascl+SpeI** 酶切, 跑胶回收短带 (rU6: 约 520bp), 插入到用 **Ascl+AvrII** 酶切的 VK005-206-g2 中。命名: VK005-206-g1g2
3. 构建 VK005-206-g3g4: VK005-206-g3 用 **Ascl+SpeI** 酶切, 跑胶回收短带 (rU6: 520bp), 插入到用 **Ascl+AvrII** 酶切的 VK005-206-g4 中。命名: VK005-206-g3g4
4. 构建 VK005-206-g1g2g3g4: VK005-206-g1g2 用 **Ascl+SpeI** 酶切, 跑胶回收短带 (rU6: 2x520bp), 插入到用 **Ascl+AvrII** 酶切的 VK005-206-g3g4 中。命名: VK005-206-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



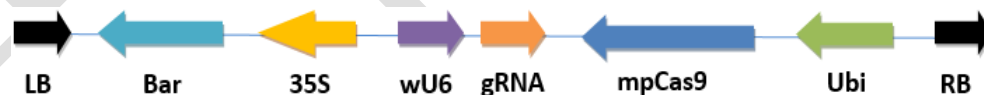
**VK005-02:** 适用于单子叶植物, 特别用于水稻, 草铵膦抗性



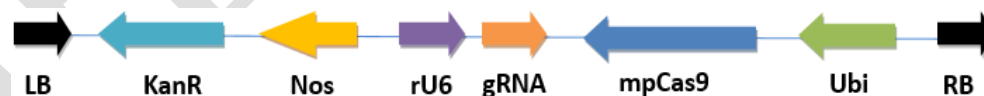
**VK005-05:** 适用于单子叶植物, 潮霉素抗性



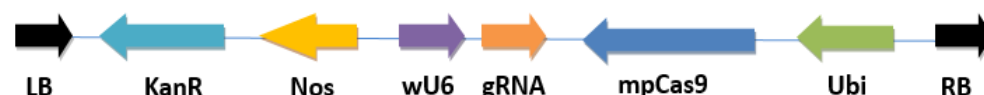
**VK005-06:** 适用于单子叶植物, 草铵膦抗性



**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



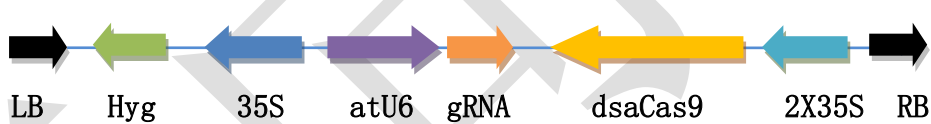
**VK005-16:** 适用于双子叶植物, 卡那霉素抗性



**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

