

CRISPR/Cas9 基因敲除试剂盒(Cat. GMCA-003)

产品组分

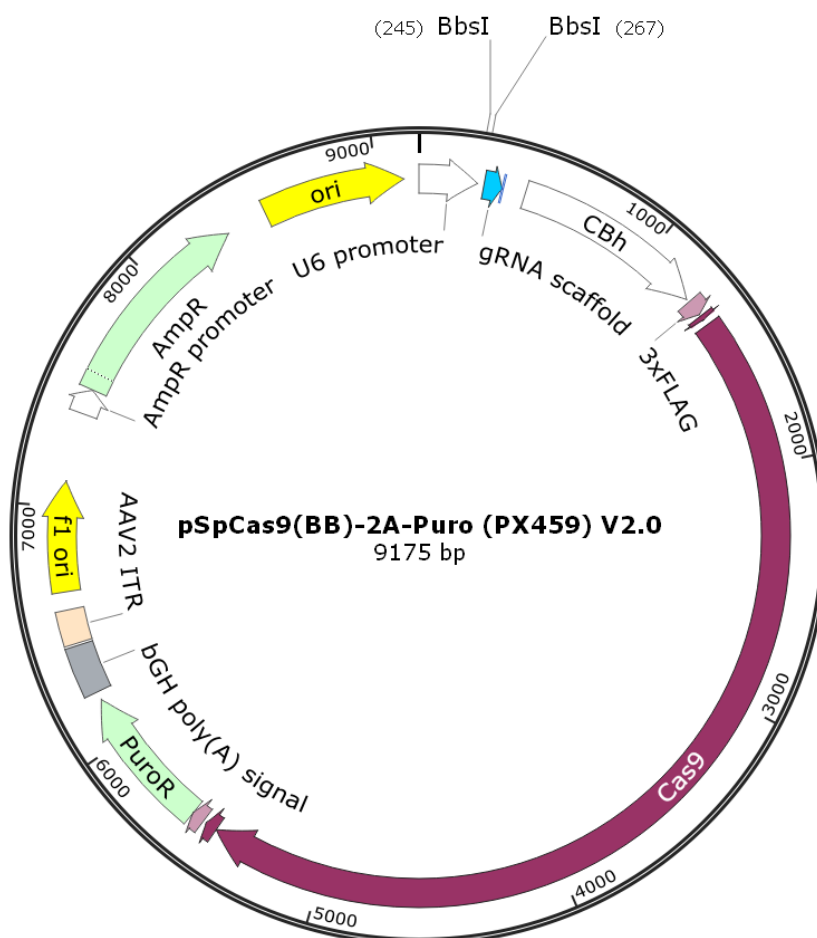
组分	含量
Cas9/gRNA linearized Vector	11 μ l
Annealing Buffer(20x)	100 μ l
T4 DNA Ligase	11 μ l
10xT4 DNA Ligase Buffer	25 μ l

贮存条件

收到货后, 将组分瞬时离心后置于-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 质粒能够同时表达人密码子优化的 Cas9 蛋白及 gRNA, 应用 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑。GMCA-003 Cas9/gRNA 质粒构建试剂盒使用 pGMCA-CM1 载体, 其图谱如下:



操作步骤

1. 预实验

- A. 单细胞生长情况，确保单个细胞可以正常生长形成单克隆。
- B. 靶序列区测序确认，防止因染色体缺失等情况导致靶基因缺失。
- C. 细胞转染效率：根据细胞转染效率及实验平台选择合适的筛选标记载体。
- D. 如有真核抗性标记，提前进行药物浓度预实验。

2. gRNA 靶点引物设计

载体 gRNA靶点: GN₁₉ 载体
NNNNN CACC GNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GTTTNNNNN
NNNNN GTGG C NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CAAA NNNNN

载体 gRNA靶点: HN₁₉ 载体
NNNNN CACCG HNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GTTTNNNNN
NNNNN GTGG C HNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN CAAA NNNNN

H=A/C/T

引物设计例子:

	GN ₁₉ NGG 模式	HN ₁₉ NGG 模式
靶点位置	GCTGCTGGCCTTCAGATGGCTGG	AACTTGTTTCACGCTATATCAGG
gRNA 序列	GCTGCTGGCCTTCAGATGGC	AACTTGTTTCACGCTATATC
反向互补后	GCCATCTGAAGGCCAGCAGC	GATATAGCGTGAAACAAGTT
正链 Oligo	CACCGCTGCTGGCCTTCAGATGGC	CACCGAACTTGTTTCACGCTATATC
负链 Oligo	AAACGCCATCTGAAGGCCAGCAGC	AAACGATATAGCGTGAAACAAGTTC
退火后示例:	CACCGCTGCTGGCCTTCAGATGGC CGACGACCGGAAGTCTACCG CAAA	CACCGAACTTGTTTCACGCTATATC CTTGAACAAAGTGCGATATAG CAAA

注：灰色背景：PAM 序列

U6 启动子转录起始位点第一个碱基一般为 G，所以若选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 G，需要自行加一个 G 上去。增加的 G 不影响 Cas9 酶剪切。

3. Oligo 退火与连接

用 H₂O 将合成的 2 条单链 Oligo DNA 稀释至 100 μM 后，退火形成双链 DNA，与载体连接。Cas9/gRNA linearized Vector 是线性化载体，无需酶切处理，可直接用于 T4 DNA Ligase 连接反应，退火反应体系如下：

正链 Oligo(100μM)	9.5 μl
负链 Oligo(100μM)	9.5 μl
Annealing Buffer(20x)	1 μl
	20 μl

混匀离心后，按照如下程序处理：

95℃ 3min
95℃ 到 25℃ 缓慢冷却，例如 -1℃/20S 或将样品管放在 95℃ 水中，自然冷却至室温
16℃ 5min

退火结束后，将退火产物用 H₂O 稀释 25 倍备用（可吸取 1 μl 加到 24 μl H₂O 中）。取 1.5ul 进入连接反应。体系如下：

Cas9/gRNA linearized Vector	1 μl
退火稀释产物	1.5 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
10xT4 DNA Ligase Buffer	1 μl
ddH ₂ O	5.5 μl

为了降低错配率，连接反应在 22℃ 条件下进行，连接 1 小时。

连接产物可以直接转化大肠杆菌感受态细胞，转化和筛选阳性克隆的实验步骤请参考《分子克隆实验指南》。Cas9/gRNA 载体都为 Amp 抗性。

测序引物为 Hu6-F: GAGGGCCTATTTCCTATGATT。