

CRISPR/Cas9 Selection 试剂盒

产品说明书

本说明书适用于以下产品：

货号	货号
CRISPR/Cas9 Selection 试剂盒	CR0003
CRISPR/Cas9Nick Selection 试剂盒	CR0004
pCas9/gRNA1 载体	CR1001
pCas9/gRNA3 载体	CR1004
pEGFP/puro 载体	CR1020

V1.1

北京英茂盛业生物科技有限公司
北京市昌平区沙河镇青年创业大厦 B-916
Tel: 010-62495135
Email: order@inovogen.com
Web site: <http://www.inovogen.com>

产品内容

Cas9 基因敲除试剂盒 货号 CR0003

内容	包装
pCas9/gRNA1 载体	3ug in TE Buffer
pEGFP/puro 载体	3ug in TE Buffer

Cas9Nicknase 基因敲除试剂盒 货号 CR0004

内容	包装
pCas9/gRNA3 载体	3ug in TE Buffer
pEGFP/puro 载体	3ug in TE Buffer

pCas9/gRNA1 载体 货号 CR1001

内容	包装
pCas9/gRNA1 载体	3ug in TE Buffer

pCas9/gRNA3 载体 货号 CR1004

内容	包装
pCas9/gRNA3 载体	3ug in TE Buffer

保存条件:

冰袋运输, -20℃冻存

所需其他材料

- EcoRV 限制性内切酶。T4 DNA ligase。
- dH5a、Top10 或其他常用感受态细胞。
- 细胞培养基及其他细胞培养相关试剂。
- HEK293T 细胞或 293V 细胞 ([货号 C1201](#))。
- 转染试剂 (Polyfect-V [货号 P2010-1](#))。
- 嘌呤霉素 1mg/ml (货号 PK101)

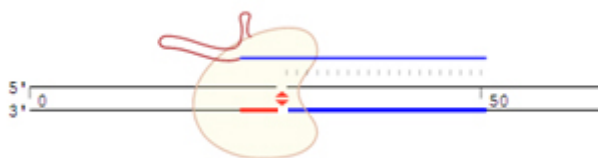
CRISPR Cas9 基因敲除原理

CRISPR (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats)是一种来自细菌降解入侵的病毒 DNA 或其他外源 DNA 的免疫机制。在该机制中, Cas 蛋白 (CRISPR-associated protein) 含有两个核酸酶结构域, 可以分别切割两条 DNA 链。一旦与 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA 结合形成复合物, Cas 蛋白中的核酸酶即可对与复合物结合的 DNA 进行切割。切割后 DNA 双链断裂从而使入侵的外源 DNA 降解。

1、Cas9 蛋白

来自 *Streptococcus pyogenes* 的 Cas9 由于 PAM 识别序列仅为 2 个碱基 (GG), 几乎可以在所有的基因中找到大量靶点, 因此得到广泛的应用。Cas9 蛋白在目前测试过的几乎所有生物和细胞中均有活性, 包括细菌、酵母、植物、鱼、以及哺乳动物细胞。识别 RNA (gRNA) 可以通过载体表达或者化学合成后与 Cas9 蛋白共同进入细胞, 对特异 DNA 序列剪切, 从而促使 DNA 发生 NHEJ (nonhomologous end-joining) 导致的基因缺失或同源重组, 实现基因敲除。

Cas9 对 DNA 切割示意图:



2、Cas9Nickase 蛋白

Cas9Nickase 是 Cas9 蛋白的 D10A 突变体, 切割 DNA 单链。由于 DNA 上的 Nick 缺口会很快被细胞修复, 一般不会造成基因突变。Cas9Nickase 需要成对的 gRNA 辅助才能实现 DNA 双链断裂。

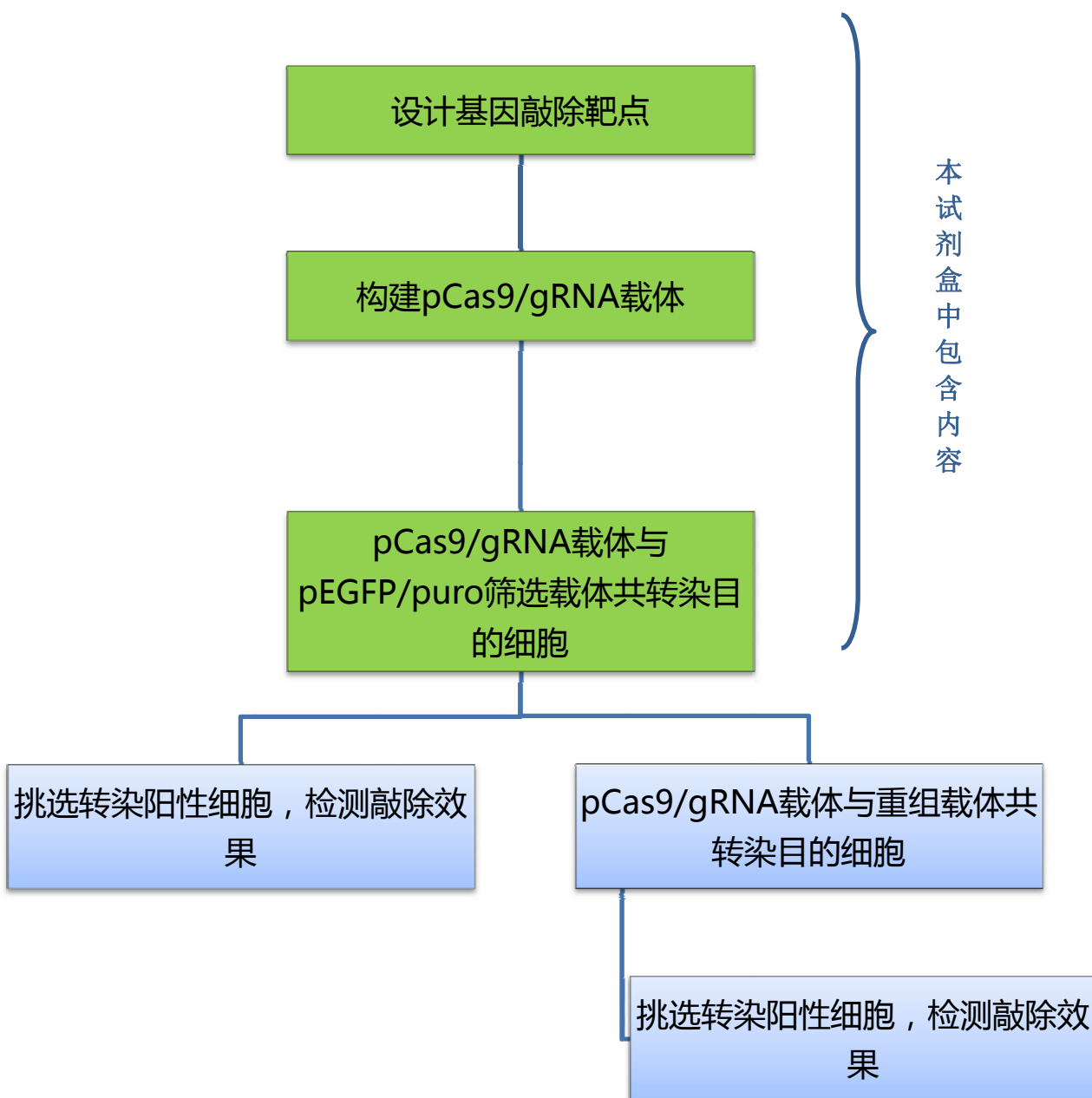
采用 Nickase 蛋白可以提高基因敲除的特异性, 但是对 gRNA 的设计要求较高。敲除效率也比 Cas9 蛋白低一些。

简单地说, Cas9 基因敲除效率更高, 操作更容易; Cas9Nickase 特异性更高。您可以根据实验设计需要进行选择。

Cas9Nickase 对 DNA 切割示意图:



用 pCas9/gRNA1 或 pCas9/gRNA3 载体进行基因敲除流程



操作说明

CRISPR/Cas9 基因敲除载体构建

引物列表:

引物名称	序列 (5' -3')	用途
gRNA-F	GACTATCATATGCTTACCGTAACT	pCas9/gRNA1、pCas9/gRNA3 载体鉴定和测序
gRNA-R	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA	pCas9/gRNA1、pCas9/gRNA3 载体鉴定

所需试剂:

EcoRV 核酸内切酶;

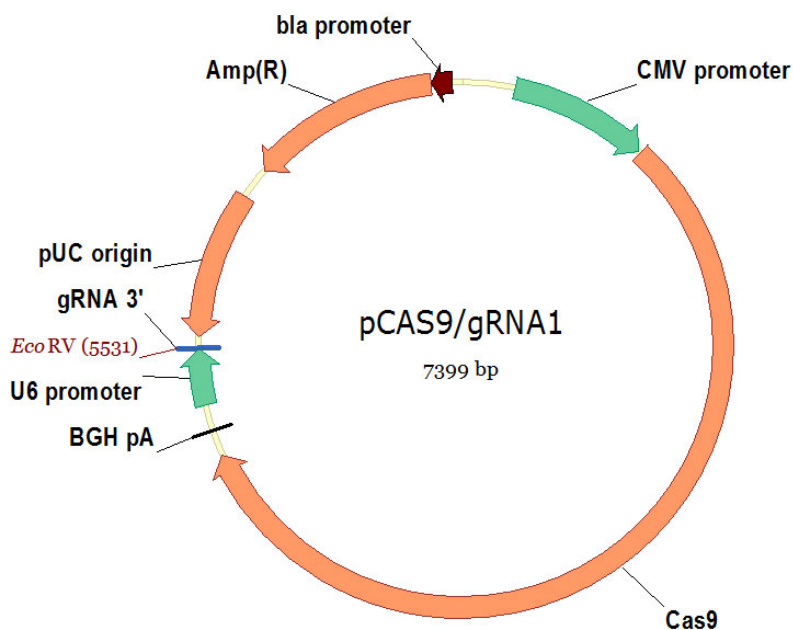
T4 DNA 连接酶;

dH5a、Top10 或其他常用感受态细胞;

DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒。

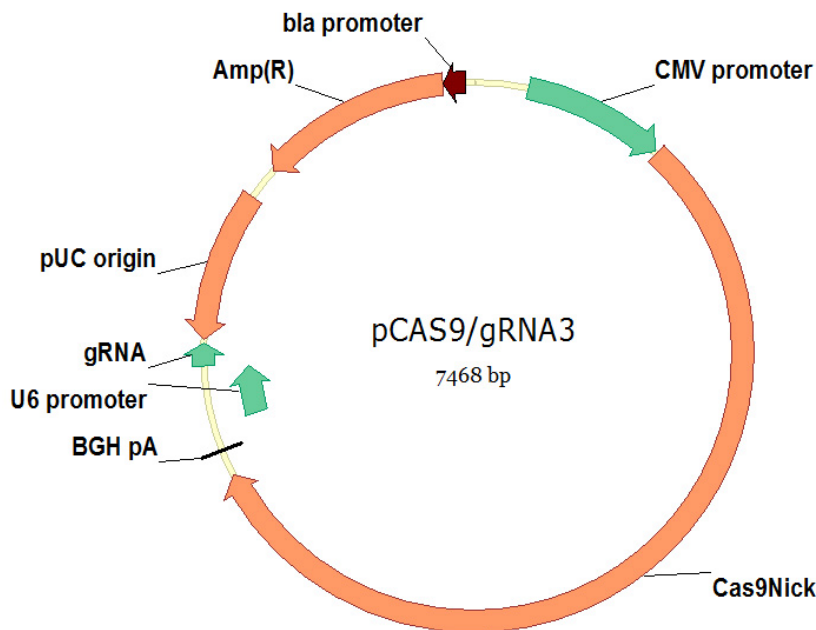
pCas9/gRNA1 载体

pCas9/gRNA1 载体可在哺乳动物细胞内同时表达人源化 Cas9 蛋白和 gRNA，只需转染一个质粒就能实现对靶基因的切割。



pCas9/gRNA3 载体

pCas9/gRNA3 载体可在哺乳动物细胞内同时表达人源化 Cas9Nickase 蛋白和 gRNA。



载体原件说明：

CMV promoter: 最广泛使用的真核细胞启动子之一，在绝大多数哺乳动物细胞中高效表达。

Cas9/Cas9Nick: 人源化的 Cas9 蛋白或 Cas9Nickase 蛋白，实现 DNA 切割功能。

BGH pA: BGH polyA 信号。

U6 promoter: U6 启动子属于 III 类 RNA 启动子，有精确地转录起始位点和终止位点，可以准确的转录出 gRNA，并且在各种动物细胞中都表达良好。

gRNA: 识别基因敲除靶点。

简要步骤

- 1、设计合成寡核苷酸链。
- 2、将寡核苷酸链退火为双链。
- 3、EcoRV 酶切线性化 pCas9/gRNA1 载体。
- 4、寡核苷酸链与 pCas9/gRNA1 载体连接并转化感受态细胞。
- 5、PCR 鉴定阳性克隆并测序。

注：

对于实验中的很多步骤，您可以使用您实验室中常用的方法，或者您的实验经验证实有效的方法。对于酶切、DNA 纯化以及转化等步骤，您可以参照《分子克隆实验指南》进行，也可以参照您购买的试剂盒中生产商提供的使用说明进行。

1 基因敲除靶点和寡核苷酸设计

1.1 基因靶点选择

CRISPR/Cas9 基因敲除系统的靶点由 19 个碱基构成。靶点前面为转录起始信号 G。靶点后面为 PAM 序列 NGG。在设计基因敲除时，在基因的起始密码子附近及下游查找 GN₂₀GG 序列作为靶点。如果没有合适的序列，也可以选择 N₂₀GG 的序列，构建载体时人工加上一个 G 作为启动信号。

推荐使用 Zhang Lab 的在线设计软件进行设计：<http://crispr.mit.edu/>。

以人的 MET 基因(GeneID: 4233)为例，可选的靶点如下：

Start Codon	靶点 1
ATAAACCTCTCATAATGAAGGCCCCCGCTGTGCTTGCACCTGGCATCCTCGTGCTCCTGTTTACCTTGGTGCAGAGGAGC	
靶点 2	
AATGGGGAGTGTAAGAGGCCACTAGCAAAGTCCGAGATGAATGTGAATATGAAGTATCAGCTTCCCAACTTCACCGCGGA	
AACACCCATCCAGAATGTCATTCTACATGAGCATCACATTTTCCTTGGTGCCACTAACTACATTTATGTTTTAAATGAGG	
AAGACCTTCAGAAGGTTGCTGAGTACAAGACTGGGC	

靶点挑选要点：

- 1) Cas9/gRNA 基因敲除原理是对基因组 DNA 序列切割后引发 DNA 修复，产生 DNA 序列缺失突变。因此基因敲除靶点应设计在起始密码子附近（包括起始密码子）或者起始密码子下游的外显子范围内。
- 2) 现有的研究显示不同 Cas9/gRNA 靶点在基因敲除效率上有较大差异，但对其原因尚不清楚。因此同时设计构建 2-3 个靶点的基因敲除载体再从中选出敲减效果较佳的靶点是必要的。
- 3) 现在的研究表明靠近 PAM 的碱基对靶点的特异性很重要，前 7-12 个碱基的错配对 Cas9 切割效率影响较小。而碱基错配的影响在不同靶序列中差别很大，有的靶序列特异性较高而有的较差。将设计好的靶点序列在基因库中进行 BLAST 检测是必要的。同时多设计构建 2-3 个靶点并且在检测敲除效率的同时检测非特异性切割也有助于获得理想的基因敲除效果。
- 4) Cas9Nicknase 需要挑选成对的靶点。我们一般在正义链和反义链上分别挑选相距 20-30bp 的靶点配对。多对靶点的敲除效率常有较大差异。由于基因敲除实验时间长，在正式对目的细胞进行敲除前对靶点进行验证和挑选非常必要。

1.2 插入片段设计

干扰靶点序列通过 EcoRV 位点插入 pCas9/gRNA1 或 pCas9/gRNA3 载体中。

插入完成后完整的 gRNA 表达框序列如下：

U6 promoter

```
TGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCC
TATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGT
AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTA
gRNA-F primer →
TGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTTGTGGA
```

Targeting sequence gRNA sequence gRNA-R primer

AAGGAC GATACACC GNNNNNNNNNNNNNNNNNNN GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG
TTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTT

插入前的 gRNA 表达框序列如下：

U6 promoter

TGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCC
TATTTCCCATGATTCCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGT
AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTA

gRNA-F primer

TGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA
EcoRV
AAGGAC GATATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTT

插入寡核苷酸序列设计：

正向序列

5' ACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT3'

反向序列

3' TGTGGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAATCTCGATCTTTATCGTTCAATTTTATTCCGATCAGGCAA5'

设计时将 19nt 的基因敲除靶点序列替换上面序列中的 N 即可。

以前面 MET 基因的靶点 1 为例，设计插入寡核苷酸序列方法如下：

1、基因敲除 19nt 靶序列为：CCCCGCTGTGCTTGCACC。

2、需合成的正向寡核苷酸序列为：

5' ACACCGCCCCGCTGTGCTTGCACCCTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT3'

3、根据正向寡核苷酸序列生成反向互补序列，即为反向寡核苷酸序列：

5' AACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGGTGCAAGCACAGCGGGGGCGGTGT3'

合成寡核苷酸注意事项：

- a)：合成的寡核苷酸质量对于能否成功构建载体至关重要。请务必委托值得信赖的公司进行合成。
- b)：必须 PAGE 纯化寡核苷酸。

2 pCas9/gRNA 基因敲除载体连接和鉴定

2.1 寡核苷酸退火

用水将寡核苷酸稀释为 100 μM 。按以下体系配制退火反应体系：

正义寡核苷酸 (100 μM)	5 μl
反义寡核苷酸 (100 μM)	5 μl
NaCl	100 mM (终浓度)
Tris-Cl pH7.4	50mM (终浓度)
加水补足	50 μl

将配制好的退火反应缓冲液重复混合，短暂离心后放置 PCR 仪上，运行以下程序：90 $^{\circ}\text{C}$ 4min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 10min。退火后的寡核苷酸可以立刻使用或者在-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

2.2 酶切线性化载体

用 EcoRV 酶切 2 μg pCas9/gRNA 载体。酶切方法和体系参照您购买的内切酶说明书或者按照您的实验室习惯的方法进行。

通常情况下用大约 20-30 单位的酶大约 3 小时可以酶切完全。

酶切后我们建议用琼脂糖凝胶回收线性化载体。将回收后的线性化载体定量，通常线性化载体的工作浓度为 50-100ng/ μl 。

注意事项：

- 1) 在后面的连接体系中，我们使用的载体浓度为 50-100ng/ μl 。如果您回收后的载体浓度不在该范围，请调整连接体系中的载体体积，确保载体用量和推荐用量一致。
- 2) EcoRV 酶切后的载体为平末端，有可能发生载体自连。对回收的线性化载体进行去磷酸化处理可以减少载体自连发生。但载体去磷酸化也会降低连接效率，我们一般不推荐进行去磷酸化处理。

2.3 连接

用水将退火后双链寡核苷酸(10 μM)稀释 100 倍备用。

按照以下体系配制连接反应体系：

T4 DNA 连接酶	5U
EcoRV	5U
线性化载体	2 μl
稀释 100 倍后双链寡核苷酸	1 μl
10 \times 连接酶 Buffer	1 μl
50%PEG4000	1 μl
加水补足	10 μl

反应条件：22 $^{\circ}\text{C}$ 30min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 15min。

注：

- 1) 平末端连接效率较低，在连接体系中添加 PEG4000 可以提高连接效率。

2) 在连接体系中添加 EcoRV 酶可以显著提高阳性率。

2.4 转化感受态细胞及 PCR 鉴定阳性克隆

用连接后产物转化大肠杆菌感受态细胞。市场上常见的大肠杆菌感受态细胞（例如 Top10, DH5 α ）均可以使用，您也可以按照分子克隆中的方法自己制备感受态细胞。转化方法按照供应商的说明书或者您实验室中常用的方法进行。

在氨苄抗性的琼脂平板上 37 $^{\circ}$ C 培养转化后细菌，大约 14-16 小时后，平板上出现单个细菌菌落。挑取多个菌落至氨苄抗性的培养基中培养后进行鉴定。

鉴定方法可以采用 PCR 鉴定。

克隆 PCR 鉴定：

鉴定引物：

gRNA-F	GACTATCATATGCTTACCGTAACT
gRNA-R	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA

阳性克隆鉴定产物大小为 190bp，阴性克隆无条带。鉴定的阳性克隆用引物 gRNA-F 测序。

构建好的 pCas9/gRNA 载体可以转染细胞，进行基因敲除。也可以先用 pTYNE 载体验证构建好的 pCas9/gRNA 载体切割 DNA 效率，再在目的细胞上进行基因敲除实验。

3 细胞转染和筛选

构建好的一个 pCas9/gRNA1 载体或者 1 对 pCas9/gRNA3 载体转染细胞对细胞基因组 DNA 定点切割，发生基因突变或者敲除。为了减少后续对细胞株进行检测的工作量，提高敲除成功细胞的比例，我们推荐将 pCas9/gRNA 载体与筛选载体 pEGFP/puro 共转染细胞，通过筛选载体上的抗性基因和荧光信号对转染阳性细胞进行初步筛选，再从中筛选出基因敲除成功的细胞。

3.1 嘌呤霉素浓度测试

嘌呤霉素是一种快速高效的筛选抗生素。不同的细胞株对嘌呤霉素的耐受度不同，不同批次和厂家的抗生素效力也有不同。为了得到理想的筛选效果，需要在实验前对嘌呤霉素的筛选浓度进行测试。

通常嘌呤霉素的作用范围在 0.5ug/ml~10ug/ml。

测试方法：

- 1、在加入筛选药物前一天将细胞以 50%密度接种到 6 孔板。第二天在培养基中加入嘌呤霉素到终浓度分别为 0；1；2.5；5；7.5；10 μ g/ml。
- 2、用嘌呤霉素处理 4-7 天。每 2 天更换新的有抗生素的培养基。选择 3-4 天细胞全部死亡的抗生素浓度为筛选浓度。

3.2 pCas9/gRNA1 与 pEGFP/puro 载体共转染目的细胞

- 1、转染前 24 小时将目的细胞铺到 6 孔板中。
- 2、按照下列体系制备质粒稀释液
pCas9/gRNA1-P531 0.8ug
pLV-EGFP (2A) puro 0.1ug
DMEM 培养基 X ul

总体积 50ul
- 3、准备转染试剂稀释液：
Polyfect-V 转染试剂 1.6ul
DMEM 培养基 48.4ul
- 4、将质粒稀释液和转染试剂稀释液分别混匀。取 50ul 转染试剂稀释液分别加入质粒稀释液中，充分混匀，室温孵育 15min。
- 5、将转染液加入细胞培养基。
- 6、24 小时后加入 puromycin 至合适浓度。
- 7、筛选 3 天后消化细胞，用有限稀释法将细胞接种到 96 孔板，标记单个细胞的孔，做单克隆细胞培养。培养时不加 puromycin。
- 8、约 7-10 天，细胞形成克隆。消化细胞，将部分细胞继续培养，部分细胞提取基因组 DNA 检测基因敲除结果。

4 问题指南

pCas9/gRNA 载体构建问题	
转化后克隆很少或没有	<ol style="list-style-type: none"> 1、合成引物质量差。解决方法：重新合成引物。 2、退火不成功。解决方法：严格按照说明书退火。 3、纯化后载体浓度过低。解决方法：重新酶切纯化载体，连接前对载体定量。 4、连接效率低。解决方法：设立阳性对照组，排除连接体系中酶、Buffer 及其它成分的问题。 5、转化效率低。解决方法：设立阳性对照组，检测转化效率，必要时更换感受态细胞。
转化后克隆很多但没有阳性克隆	<ol style="list-style-type: none"> 1、载体酶切线性化不完全。解决方法：重新酶切载体，琼脂糖凝胶回收酶切载体。 2、载体自连过多。解决方法：降低连接体系中的载体用量；用磷酸酶对载体进行去磷酸化处理。
测序没有正确的克隆	<ol style="list-style-type: none"> 1、合成引物质量差。解决方法：重新合成引物。
转染及筛选问题	
转染后无荧光	<ol style="list-style-type: none"> 1、pEGFP/puro 载体表达强烈的绿色荧光。如果转染后无荧光或者荧光极少，表明转染效率过低，应考虑更换转染试剂或者采用电转。
筛选后克隆无生长	<ol style="list-style-type: none"> 1、嘌呤霉素浓度过高。解决方法：重新进行嘌呤霉素浓度测试，适当降低浓度。 2、有的细胞系单个细胞难以生长，很难形成单克隆。解决方法：根据细胞特点灵活制定筛选方案。
克隆检测基因敲除效率低	<ol style="list-style-type: none"> 1、靶点效率低。解决方法：重新选择 gRNA 靶点，或者构建 pTYNE 载体对多个靶点进行验证后，选择效率高的靶点进行试验。