

pP1C 系列植物敲除试剂盒说明书

Cat. No. GP0143, GP0144

Protocol No. PT161117-1

出版日期 Nov.2016

(仅供科研使用)

南京市汉中门大街 301 号 01 栋 13 层

电话: +86-25-66776730

传真: +86-25-66776701

邮编: 210036

网址: www.genloci.com



订购&技术咨询

订购&技术咨询	
客服/订购	技术支持
Telephone: +86-25-66776730	Telephone: +86-18066095106
Fax: +86-25-66776701	Fax: +86-25-66776701
Web: www.genloci.com	Web: www.genloci.com
E-mail: sales@genloci.com	E-mail: service@genloci.com

目 录

I. 组份列表.....	2
II. 产品概要.....	3
III. 操作步骤.....	4
1.引物设计.....	4
2.片段扩增, 获得 sgRNA 克隆框.....	5
3.线性化载体制备.....	5
4.重组酶整合.....	5
5.转化, 筛选阳性克隆.....	6
IV. 附录一.....	6
V. 附录二: pP1C 系列载体图谱.....	7-8
VI. 参考文献.....	9

图

Figure 1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

Figure 2. pP1C.3 质粒图谱

Figure 3. pP1C.4 质粒图谱

表

Table1. pP1C 系列植物敲除试剂盒组份列表

I. 组份列表

pP1C 系列植物敲除载体分两种类别：适用于单子叶植物的载体 pP1C.3 和适用于双子叶植物的载体 pP1C.4，如下：

Table1. pP1C 系列植物敲除载体组份列表

组份列表	Cat. No. GP0143	Cat. No. GP0144
pP1C.3	4 µg	——
pP1C.4	——	4 µg
G-force 重组酶	50 µL	50 µL
G-force 缓冲溶液 (5X)	100 µL	100 µL

贮存条件

※注意：在收到货后，请您将 pP1C 系列载体瞬时离心后再保存。载体总量为 20µL (200ng/µL)

短期保存，请将 pP1C 系列载体置于-20℃保存，且避免污染；若长期保存，请转化大肠杆菌，并使用甘油菌进行保存。

请将 G-force 重组酶、G-force 缓冲溶液 (5X) 置于-20℃保存，使用过程中避免反复冻融，保质期为一年。

II. 产品概要

pP1C 系列植物敲除试剂盒系统是一款高效、精准的基因编辑载体，它是基于最新一代的人工核酸内切酶 CRISPR/Cas9 而研发的，相对于传统敲除技术和 TALEN、ZFN 技术而言，其操作更加简便，敲除效

率高，基因的编辑更加的精准，大大降低了脱靶机率。

pP1C 系列载体是 CRISPR/Cas9 系统在植物中应用的载体，支持使用农杆菌介导进行的随机整合以及

原生质体共转的瞬时表达系统。pP1C 载体系列中使用的 Cas9 基因已按照人密码子进行优化，其核定位信号已经文献报道能够正常发挥其作用，并在多种植物中得到实践。该 pP1C 系列载体使用整合酶重组片段和载体的方式进行载体构建，整个载体构建仅需 1 天即可完成，缩短了载体构建周期，并简化构建难度。

根据您的研究对象，您可以选择适用于单子叶植物的 pP1C.3 载体（OsU3 启动子），或者适用于双子叶植物的 pP1C.4 载体（AtU6 启动子）。

该载体系统能够让您仅靠单个载体就可以轻松地完成基因组 DNA 的编辑，实现精准、低 off-target 的基因编辑体验。

吉锐生物为您提供完整的基因敲除解决方案，从敲除方案设计→敲除位点设计→载体构建→转染→敲除检测→结果分析，让您的实验一次成功！

产品特点

精准的修饰

Cas9 蛋白切割位点高度特异性，降低脱靶效应，实现精准的基因编辑

敲除效率高

较传统技术和 TALEN、ZFN 技术，敲除效率高；

CRISPR/Cas9 系统集两大功能组件于一个载体上，转染效率更高

实验周期短

不需要中间载体，仅需 1 天即可完成载体构建

可持续使用

提供环状载体，可持续扩增

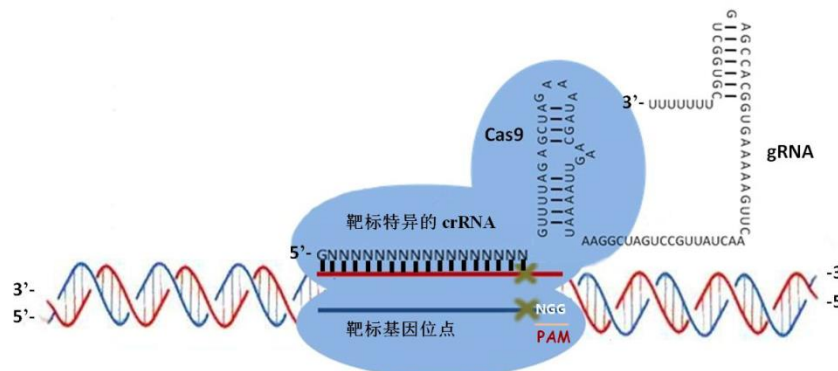


Figure1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

III. 操作步骤

实验前，请您务必做好以下验证实验：

目的基因的表达情况分析，为防止因染色体缺失等情况导致靶基因缺失，首先需要 PCR 扩增靶基因，并对 PCR 结果进行测序，确保靶基因的完整存在；其次，您还可以用 RT-PCR 分析靶基因的活跃度。

※注：pP1C 系列载体用于载体构建时，需要使用 DNA 体外重组相关的试剂盒，因此要求线性化的载体和片段都具有较高的纯度。

1. 引物设计

首先，您需要在靶标 DNA 区域中设计一对 20bp 左右的 oligo DNA，您可以通过以下在线工具设计：

• <http://cbi.hzau.edu.cn/cgi-bin/CRISPR>

※注：靶点设计准备，及设计原则参见附录一。

(1) 针对 pP1C.3 载体（单子叶）的靶位点引物设计

A. 正向通用引物序列如下

U3p.3-F: 5'_CAGGAAACAGCTATGACCATATTC**A**AGGGATCTTTAAAC_3'

B. 反向引物设计方法

① 若设计的靶序列（长度 20bp），第一个碱基为 A，则反向引物 Oligo-R 为：

Oligo-R: 5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAC-(20bp 靶序列反向)-TGCCACGGATCATCTGC_3'

示例：

靶序列为：AAGCAAAGAAATCAGGGACC

则 Oligo-R 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAC-GGTCCCTGATTTCTTTGCT**T**-TGCCACGGATCATCTGC_3'

② 若设计的靶序列（长度 20bp），第一个碱基不为 A，则反向引物 Oligo-R 为：

Oligo-R: 5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAC-(20bp 靶序列反向+T)-TGCCACGGATCATCTGC_3'

示例：

靶序列为：GGCCATGGAAGAATCGTTCCG

则 Oligo-R 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAC-CGAACGATTCTTCCATGGCC**T**-TGCCACGGATCATCTGC_3'

将设计后的序列送到值得信赖的公司合成，纯化级别为 PAGE。

(2) 针对 pP1C.4 载体（双子叶）的靶位点引物设计

A. 正向通用引物序列如下

U6p.4-F: 5'_CAGGAAACAGCTATGACCATATTC**A**TTTCGGAGTTTTTGTATC_3'

B. 反向引物设计方法

① 若设计的靶序列（长度 20bp），第一个碱基为 G，则反向引物 Oligo-R 为：

Oligo-R: 5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAC-(20bp 靶序列反向)-AATCACTACTTCGACTCT_3'

示例：

靶序列为：GGCCATGGAAGAATCGTTCCG

则 Oligo-R 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAC-CGAACGATTCTTCCATGGCC**C**-AATCACTACTTCGACTCT_3'

② 若设计的靶序列（长度 20bp），第一个碱基不为 G，则反向引物 Oligo-R 为：

Oligo-R: 5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-(20bp 靶序列反向+C)-AATCACTACTTCGACTCT_3'

示例：

靶序列为：AAGCAAAGAAATCAGGGACC

则 Oligo-R 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-GGTCCCTGATTTCTTTGCTTC-AATCACTACTTCGACTCT_3'

将设计后的序列送到值得信赖的公司合成，纯化级别为 PAGE。

2. 片段扩增，获得 sgRNA 克隆框

使用高保真 DNA 聚合酶，以载体为模板，将上述合成的引物（pP1C.3 载体使用 U3p.3-F 和其对应的 Oligo-R，pP1C.4 载体则使用 U6p.4-F 和其对应的 Oligo-R），用 PCR 扩增获得 sgRNA 克隆框。反应体系请参照相应的高保真 DNA 聚合酶使用方法。

扩增后，将 PCR 产物进行凝胶电泳，回收目的片段（pP1C.3 载体回收约 450bp，pP1C.4 载体则回收约 350bp）；要求 PCR 的目的条带要单一明亮无弥散，回收产物 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0。

3. 线性化载体制备

使用 *EcoRI*、*XbaI* 双酶切 pP1C.3 载体，酶切产物进行凝胶电泳后割胶回收大小约 14kb，要求回收产物 OD_{260}/OD_{280} 为 1.8~2.0；

※注：

a. pP1C.4 载体线性化方法与 pP1C.3 相同

b. 酶切体系参照相应内切酶的说明书进行操作，推荐延长酶切时间以使载体充分切割从而降低转化克隆中的假阳性率。

c. 其浓度在现有的柱回收中一般较低，但回收量依然足够多次使用，若想提高回收浓度可以使用磁珠法进行回收。

4. 重组酶整合

使用 DNA 重组酶将步骤 3 中的线性化载体和步骤 2 中回收得到的扩增片段重组，构建重组载体。请参照以下配置反应体系：

G-force 缓冲溶液 (5X)	2 μ L
G-force 重组酶	1 μ L
线性化 pP1C 载体	100ng
扩增片段产物	5~10ng
Add ddH ₂ O	to 10 μ L

反应条件：37 $^{\circ}$ C，30min，孵育结束后迅速置于冰上 15min。

5. 转化，筛选阳性克隆

将重组产物转化大肠杆菌感受态细胞（经验证，一般推荐选用 GT115 感受态），转化实验步骤请您参考《分子克隆实验指南》，pP1C 载体在原核中抗性为卡纳霉素抗性。

阳性克隆筛选有两种推荐方法：

方法 a：分两步。首先使用上游引物（pP1C.3 载体使用 U3p.3-F，pP1C.4 载体使用 U6p.4-F）和下游通用引物 gRNA-R^① 进行 PCR 检测，回收目的片段（pP1C.3 载体回收片段大小为 500bp 左右，pP1C.4 载体回收片段大小为 400bp 左右）。然后，对回收的产物用 XbaI 内切酶酶切检测，未被切开的则为阳性克隆。筛选到阳性克隆后，再进行测序验证序列的正确性。

方法 b：预先合成靶点的反向互补序列作为下游引物（例如，靶点为：GGCCATGGAAGAATCGTTCG，则合成引物序列为：CGAACGATTCTCCATGGCC；），并合成通用引物 P1CP-F：GAAACAGCTATGACCATATTC（适用于 pP1C.3 和 pP1C.4），使用以上两条引物进行 PCR 检测，检测结果阳性则为阳性克隆（pP1C.3 目标片段大小约 420bp，pP1C.4 目标片段大小约 320bp）；必要时可再抽提阳性克隆质粒，以 XbaI 酶切验证（阳性克隆无法切开）。筛选到阳性克隆后，再进行测序验证序列的正确性。

一般情况下送 2 个阳性克隆做测序，测序引物为 M13F（-47），对目的片段的测序为反向。

阳性克隆验证完毕后，再使用引物 Hygjc2-F/R^②，以及 Cas9 相关的引物对载体中另外两个元件进行 PCR 检测，检测阳性即为最终载体。

※注：

① gRNA-R: 5'_AGCACCGACTCGGTGCCAC_3'

② Hygjc2-F: 5'_GTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCC_3'

Hygjc2-R: 5'_GTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGG_3'

③ RTCas9-F: 5'_AAGCCCATCAGAGAGCAGG_3'

④ RTCas9-R: 5'_TGTCGCCTCCCAGCTGAG_3'

⑤ RTCas9-F/R: 目标片段长度约 208bp。

IV. 附录一

1. 设计准备：

获得目的基因的基因组序列以及其转录本信息，分析基因组序列中内含子和外显子信息，确定靶点放置的大致位置。例如目的基因对应的是一个酶，则靶点最佳位置应在活性中心的上游的外显子中。一般的，靶点应靠近翻译起始点，在没有特殊要求的情况下，靶点均置于外显子区域，且选定区域 GC 含量最好在 40%~60%（有利于后续检测等）。

2. 一般设计原则：

- （1）靶点序列长度 19~22bp，一般选择 20bp；
- （2）靶点序列相对特异，避免出现重复序列以及多联 A，多联 T；
- （3）选择靶点时应包含 3'端 NGG，构建载体引物时，不应包含 3'端 NGG；
- （4）靶点序列应在基因组数据库中进行比对，避免脱靶；
- （5）靶点可位于 DNA 正链或负链，设计时序列均应按照 5'向 3'端的排列，识别关键依然为 NGG；
- （6）靶点 5'端允许 1~2bp 的错配，但应保障靶点碱基匹配数大于 18bp。

V. 附录二：pP1C 系列质粒图谱

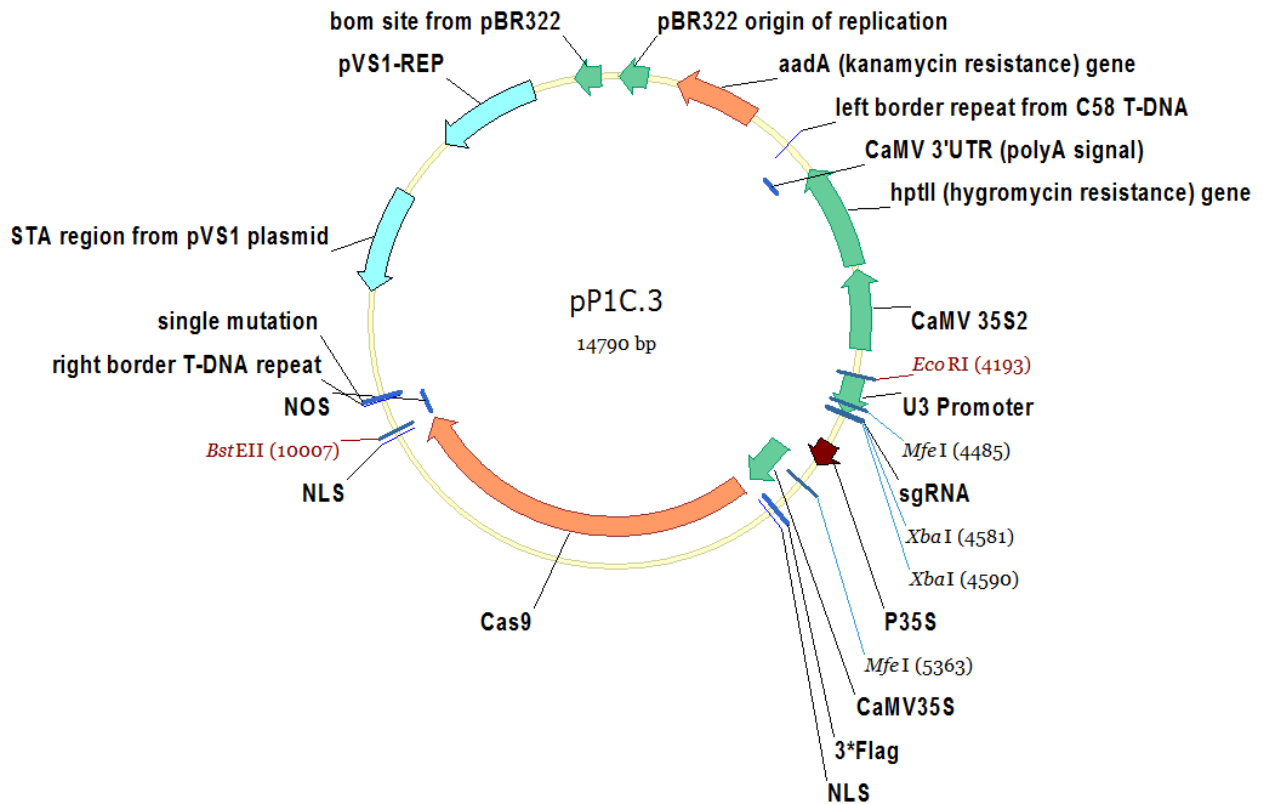


Figure 2. pP1C.3 质粒图谱

pP1C.3 部分序列（U3 Promoter 及靶点部分）

5'.....GAATTCAGGGATCTTTAAACATACGAACAGATCACTTAAAGTTCTTCTGAAGCAACTTAAAGTTA
 TCAGGCATGCATGGATCTTGGAGGAATCAGATGTGCAGTCAGGGACCATAGCACAAGACAGGCGAC
 TACTACTGGTGCTACCAGCAAATGCTGGAAGCCGGGAACACTGGGTACGTTGGAACCACGTGATG
 TGAAGAAGTAAGATAAACTGTAGGAGAAAAGCATTTCGTAGTGGGCCATGAAGCCTTTCAGGACATGT
 ATTGCAGTATGGGCCGGCCATTACGCAATTGGACGACAACAAAGACTAGTATTAGTACCACCTCGG
 CTATCCACATAGATCAAAGCTGATTTAAAAGAGTTGTGCAGATGATCCGTGGCA**A**tctagaGCCtctagaG
 TTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAG
 TCGGTGCTTTTTT.....3'

EcoRI 位点: GAATTC

灰色底纹标示的序列: OsU3 Promoter

黑色方框标示为转录起始位点: **A**

XbaI 位点: tctaga

靶点插入位置: tctagaGCCtctaga

下划线标示的序列: sgRNA

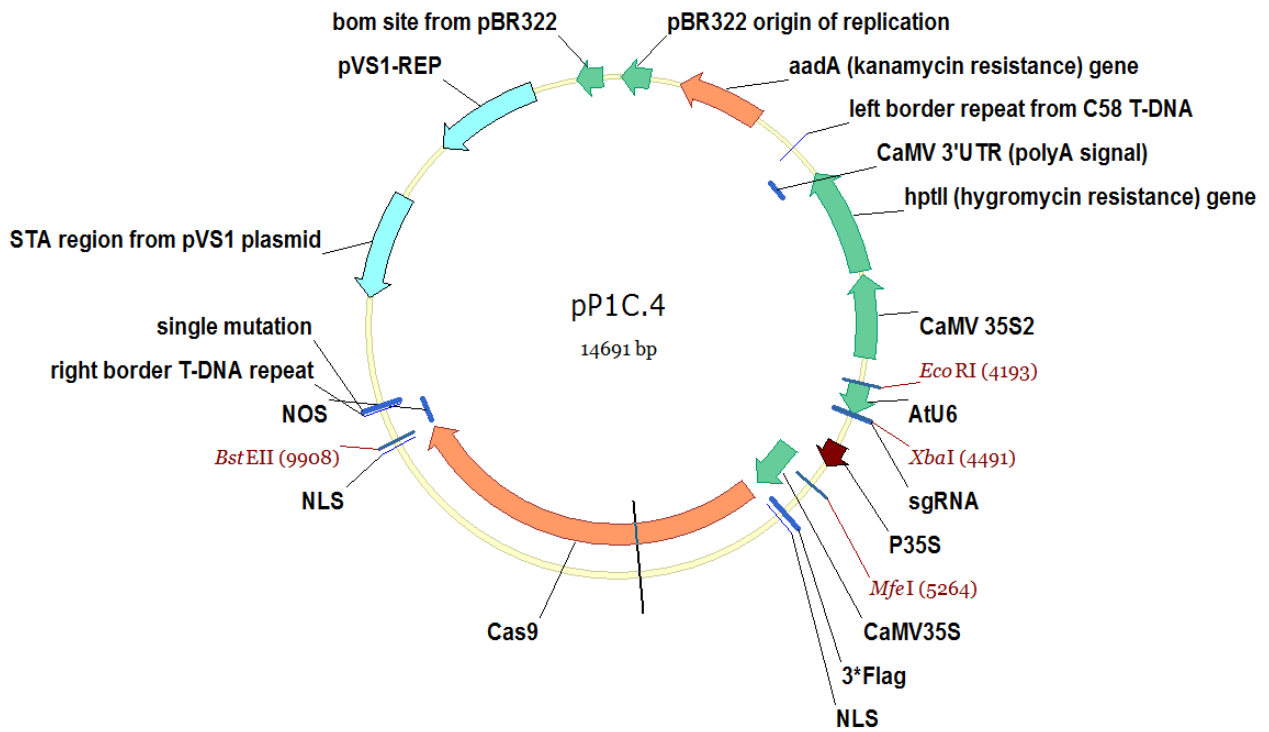


Figure 3. pP1C.4 质粒图谱

pP1C.4 部分序列 (AtU6 Promoter 及靶点部分)

5'.....**GAATTC**ATTCGGAGTTTTTGTATCTTGTTCATAGTTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGCATCG
 AACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAGGCCCC
 TGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTATATAGGCC
 CATTAAAGTTGAAAACAATCTTCAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGCTGAGTTTATAT
 ACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTtctagaGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTC
 CGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCCGAGTCGGTGCTTTTTTAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGA
 TCCGCTAGA.....3'

EcoRI 位点: GAATTC

灰色底纹标示的序列: AtU6 Promoter

XbaI 位点: tctaga

下划线标示的序列: sgRNA

※注: 该启动子以碱基“G”为转录起始信号, 要注意的是这个载体中不含转录起始碱基“G”, 故靶位点引物设计时需要注意, 操作步骤 1 中已介绍。

VI. 参考文献

1. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012,337: 816~821.
2. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327 (5962): 167~170.
3. Hale CR, Zhao P., Olson S., *et al.* RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*, 2009, 139 (5): 945~956.
4. Zhang F., *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819~823
5. Westra ER., Swarts DC., Staals RH., Jore MM., Brouns SJ., van der Oost J. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 311~339.
6. Marraffini LA., Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Rev Genet*, 2010, 11 (3): 181~190.
7. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 233~239.
8. Zhou H, Liu B, Weeks DP, Spalding MH, Yang B. Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic Acids Res*, 2014;42(17):10903-14.
9. Hyun Y, Kim J, Cho SW, Choi Y, Kim JS, Coupland G. Site-directed mutagenesis in *Arabidopsis thaliana* using dividing tissue-targeted RGEN of the CRISPR/Cas system to generate heritable null alleles. *Planta*, 2014 Oct 1.
10. Schiml S1, Fauser F, Puchta H. The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for in planta gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant J*. 2014 Dec;80(6):1139-50.
11. Shan Q, Wang Y, Li J, Gao C. Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc*, 2014 Oct;9(10):2395-410.
12. Barrangou R. RNA events. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*. 2014, 344(6185):707~708.
13. Nishimasu H., *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5)935~949.