

pP1C. 7

Cat. No. GP0119
Protocol No. PT161209-1
出版日期 Dec. 2016
()

南京市汉中门大街 301 号01 栋 13 层 A 座
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.....	4-5
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.....	5-6
IV. 附录一:	7
V. 附录二: pP1C.7载体图谱.....	8-9
VI. 参考文献.....	10

图

Figure 1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

Figure 2. pP1C.7

表

Table1.组份列表

I. 组份列表

pP1C.7 为适用于单子叶植物的双敲载体。

Table1.组份列表

组分列表	Cat. No.: GP0119
pP1C.7	4 µg
G-force	50 µL
G-force (5X)	100 µL

贮存条件

※注意：在收到货后，请您将 pP1C.7 载体瞬时离心后再保存。

短期保存，请将 pP1C.7 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 G-force 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.7单子叶植物双敲载体是一款高效、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.7单子叶植物双敲载体是 CRISPR/Cas9 系统在单子叶植物中应用的双敲除载体（OsU6 和 OsU3 启动子），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.7 载体中使用的 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。

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

双敲除

具有两个启动 gRNA 的启动子，两个敲除插入位点，实现基因片段的敲除。

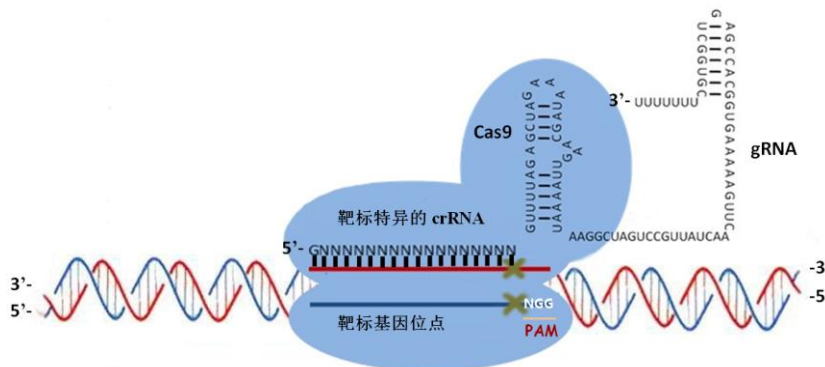


Figure1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

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 区域中设计两对 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>。然后根据两对靶位点分别设计两条引物。

※注：靶点设计准备，及设计原则参见附录一。

A. 正向引物设计方法

①若设计的靶序列 1（长度 20bp），第一个碱基为 A，则正向引物 Oligo1-U3 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-(20bp 靶序列反向)-TGCCACGGATCATCTGC_3'

示例：

靶序列为：AAGCAAAGAAATCAGGGACC

则 Oligo1-U3 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-GGTCCCTGATTTCTTTGCTT-TGCCACGGATCATCTGC_3'

②若设计的靶序列 1（长度 20bp），第一个碱基不为 A，则正向引物 Oligo1-U3 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-(20bp 靶序列反向+T)-TGCCACGGATCATCTGC_3'

示例：

靶序列为：GGCCATGGAAGAATCGTTCCG

则 Oligo1-U3 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-CGAACGATTCTTCCATGGCCT-TGCCACGGATCATCTGC_3'

B. 反向引物设计方法

① 若设计的靶序列 2（长度 20bp），第一个碱基为 G，则反向引物 Oligo2-U6 为：

Oligo2-U6: 5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-(20bp 靶序列反向)-AAGCTGACTACAGCGCG_3'

示例：

靶序列为：GGCCATGGAAGAATCGTTCCG

则 Oligo2-U6 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-CGAACGATTCTTCCATGGCC-AAGCTGACTACAGCGCG_3'

② 若设计的靶序列 2（长度 20bp），第一个碱基不为 G，则反向引物 Oligo2-U6 为：

Oligo2-U6: 5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-(20bp 靶序列反向+C)-AAGCTGACTACAGCGCG_3'

示例：

靶序列为：AAGCAAAGAAATCAGGGACC

则 Oligo2-U6 为：

5'_GCTATTTCTAGCTCTAAAAC-GGTCCCTGATTTCTTTGCTTC-AAGCTGACTACAGCGCG_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，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（回收约 1kb）；要求 PCR 的目的条带要单一明亮无弥散，回收产物 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0。

3. 线性化载体制备

使用 *EcoRI*-HF、*XbaI* 双酶切 pP1C.7 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 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0；

※注：

- 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。
- 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	(5X)	2μL
G-force		1μL
线性化 pP1C 载体		100ng
扩增片段产物		5~10ng
Add ddH ₂ O		to 10μL

反应条件：37℃，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.7 在原核中抗性为卡纳霉素抗性。

重组后 U3p 和 U6p 可能出现反向的情况，但并不影响 gRNA 的工作；重组后检测使用启动子引物以防载体自重组的可能。

※注：载体构建中，因目标载体较大，整合效率相应下降，若多次整合中菌斑都极少，可以考虑以下措施：（1）使用高效价的感受态；（2）使用 *KpnI*-HF、*HindIII*-HF 将整个核心区（即 gRNA 表达区域）移植到 pUC19 等中间载体上，再进行靶点插入操作

阳性克隆推荐采用菌液 PCR 进行，分别设计针对靶点的引物，引物序列为靶点的反向互补序列，扩增的目的片段长度约 1000bp。

例如，分别选定靶点 1: GGCCATGGAAGAATCGTTCG，靶点 2: AAGCAAAGAAATCAGGGACC，则检测用引物可以分别设为：Oligo-F:CGAACGATTCTTCCATGGCC，Oligo-R: GGTCCCTGATTTCTTTGCTT（以上引物设计仅用于示意）。这类引物仅用于 PCR 鉴定，推荐使用具有较高特异性的引物。

pP1C.7

除以上方法外，用户也可使用通用引物 gRNA-R 进行菌液 PCR 筛选，若使用此方法则只需一条引物即可完成 PCR 过程，预期目的片段长度为 1000bp 左右，但这一方法仅能区分酶切后意外自连的空载与含 U3、U6 启动子的载体。若有其他鉴定需求，用户可根据给定序列自行设计引物。

构建后的转化子需要使用测序验证序列的正确性，采用通用引物 M13F、M13F(-47)。阳性克隆验证完毕后，再使用引物 Hygjc2-F/R，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：

a. gRNA-R: 5'_AGCACCGACTCGGTGCCAC_3'

b. Hygjc2-F: 5'_GTCCGTCAGGACATTGTTGGAGCC_3'

Hygjc2-R: 5'_GTCTCCGACCTGATGCAGCTCTCGG_3'

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，但应保障靶点去匹配碱基大于 19bp。

V. 附录二: pP1C.7

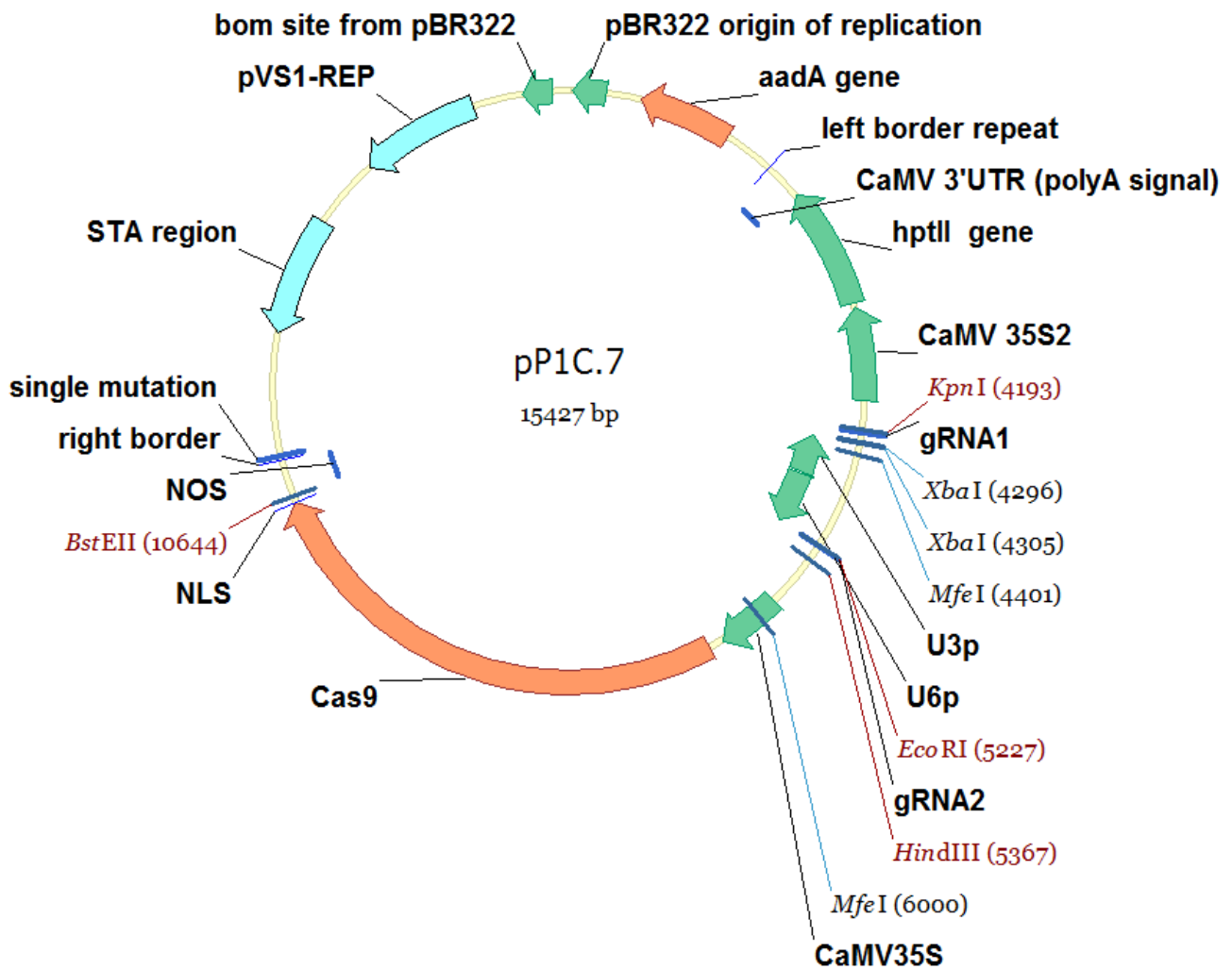


Figure 2. pP1C.7

pP1C.7 部分序列 (U3 Promoter、U6 Promoter 及靶点部分)

```

5'_AAACAGCTATGACATGATGGTACC GGTTCACTAAACCAGCTCTAAAAAAGCACCGACTCGGTGCC
ACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC TCTAGAggcTC
TAGA T TGCCACGGATCATCTGCACA ACTCTTTTAAATCAGCTTTGATCTATGTGGATAGCCGAGGTGG
TACTAATACTAGTCTTTGTTGTCGTCCAATTGCGTAATGGGCCGGCCATACTGCAATACATGTCCTGA
AAGGCTTCATGGCCACTACGAAATGCTTTTCTCCTACAGTTTATCTTACTTCTTCACATCACGTGGTT
TCCAACGTACCCAGTGTTCCTCGCTTCCAGCATTTGCTGGTAGCACCAGTAGTAGTCGCCTGTCTTG
TGCTATGGTCCCTGACTGCACATCTGATTCCCTCCAAGATCCATGCATGCCTGATAACTTTAAGTTGCTT
CAGAAGA ACTTTAAGTGATCTGTTTCGTATGTTTAAAGATCCCTTCATGGTCATAGGCGCGCCTTGTGA
AAGTTGAATTACGGCATAGCCGAAGGAATAACAGAATCGTTTCACACTTTCGTAACAAAGGTCTTCTTA
TCATGTTTCAGACGATGGAGGCAAGGCTGATCAAAGTGATCAAGCACATAAACGCATTTTTTTTACCAT
GTTTCACTCCATAAGCGTCTGAGATTATCACAAGTCACGTCTAGTAGTTTGATGGTACACTAGTGACAA
TCAGTTCGTGCAGACAGAGCTCATACTTGACTACTTGAGCGATTACAGGCGAAAGTGTAACGCAT
    
```

GTGATGTGGGCTGGGAGGAGGAGAATATATACTAATGGGCCGTATCCTGATTTGGGCTGCGTCGGAA
GGTGCAGCCCACGCGCGCCGTACCGCGCGGGTGGCGCTGCTACCCACTTTAGTCCGTTGGATGGG
GATCCGATGGTTTTCGCGGGTGGCGTTGCGGGGGATGTTTAGTACCACATCGGAAACCGAAAGACGA
TGGAACCAGCTTATAAACCCGCGCGCTGTAGTCAGCTT**G**GAATTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAA
GTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTAGAGCTGG
TTTAGTGAACCGTCAGATCC**GCTAGA**GTCGACCTGCAGGCATGC**AAGCTT**GGCACTGGCCGT_3'

Kpn I 位点: GGTACC

灰色底纹标示的序列: 分别为 gRNA1、gRNA2

Xba I 切割位点: 黑色方框 TCTAGAggcTCTAGA

OsU3 转录起始位点 A 的互补碱基: **T**

蓝色底纹标示的序列: OsU3 启动子反向互补序列

绿色底纹标示的序列: OsU6 启动子序列

OsU6 转录起始位点: **G**

EcoR I -HF 切割位点: 黑色方框 GAATTC

*Hind*III 位点: AAGCTT

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 adaptiv 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.