

## pGK-BI ank

Cat. No. GP0126

Protocol No. PT161214-3

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](http://www.genloci.com)



### 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: <a href="http://www.genloci.com">www.genloci.com</a>	Web: <a href="http://www.genloci.com">www.genloci.com</a>
E-mail: <a href="mailto:sales@genloci.com">sales@genloci.com</a>	E-mail: <a href="mailto:service@genloci.com">service@genloci.com</a>

## 目 录

I. 规格与贮存条件.....	2
II. 附加产品推荐 .....	2
III. 产品概要.....	3-4
IV. 操作步骤.....	5
1.设计 Oligo DNA 序列.....	5
2.pGK-Blank 线性化处理.....	6
3.T4 DNA Ligase 连接.....	6
4.电转染靶细胞.....	6
5.Cruiser <sup>®</sup> 基因敲除检测错配酶筛选阳性克隆.....	6
V. FAQ.....	7
VI. 附录.....	8
VII. 参考文献.....	9

### 图

Figure 1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

Figure 2. CRISPR/Cas9 基因编辑实验流程

Figure 3. pGK-Blank

Figure 4. pGK-Blank质粒图谱

## I. 规格与贮存条件

在收到货后，请您先瞬时离心后再置于-20℃保存，且避免污染；

Cat. No.	产品名称	规格
GP0126	pGK-Blank	4 µg

## II. 附加产品推荐

本试剂盒不包含以下所需试剂和仪器，您可以购买指定产品或购买替代产品进行实验。

- Genloci TNA 抽提试剂盒 (Cat.No.:GP0155,GP0156)
- Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测试剂盒(Cat.No.:GP0102,GP0103)
- Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测错配酶 (Cat. No.:GP0104,GP0105,GP0106)
- Cell Plaza<sup>®</sup>单细胞培养板(Cat.No.:GP5036)
- (10X)(Cat.No.:GP0124,GP0125)

### III. 产品概要

pGK-Blank 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。pGK-Blank 能够适用于几乎所有哺乳动物细胞的基因修饰研究。

pGK-Blank 包含2个重要组件，分别为 Cas9 核酸酶表达框和 Guide RNA(gRNA)克隆框，gRNA 克隆框能够快速高效的克隆编码靶标特异的 CRISPRRNA(crRNA)的DNA片段。该载体能够让您仅靠单个载体就可以轻松的完成基因组 DNA 的编辑，实现精准、低 off-target 的基因编辑体验。

Genloci 公司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 蛋白无特异性，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 系统的两大功能组件于一个载体上，转染效率更高。

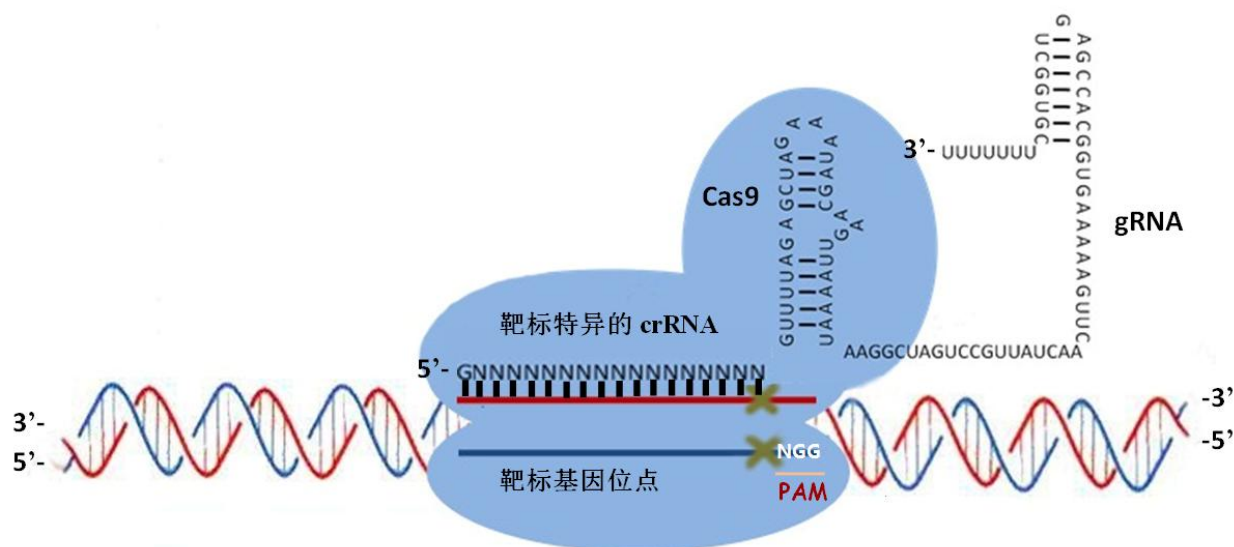
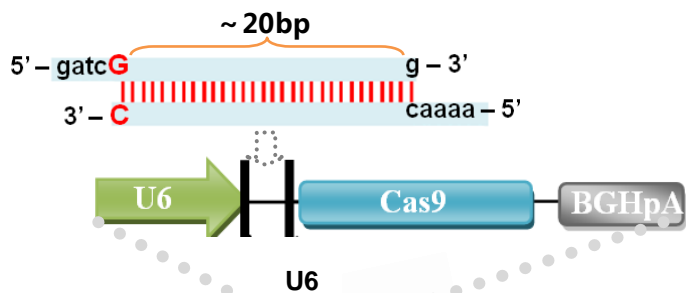


Figure1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

CRISPR/Cas9 基因编辑实验流程图如下：

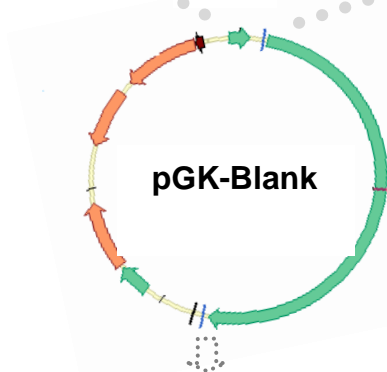
1

设计 2 条单链 oligo 序列；退火形成双链 DNA。



2

将双链 DNA 连接到敲除载体中。



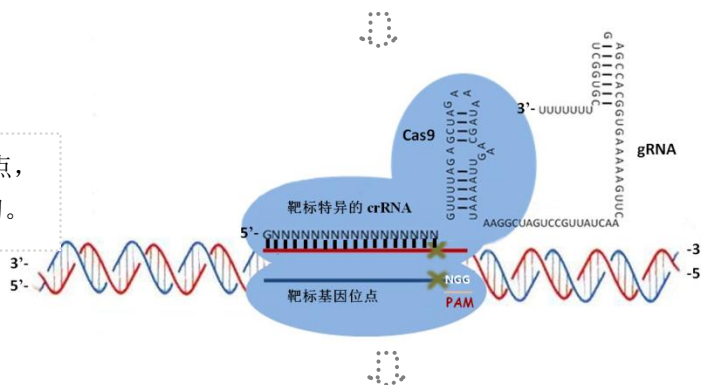
3

转化大肠杆菌细胞；筛选阳性克隆；测序验证序列；质粒大提去内毒素；电转染靶细胞。



4

在细胞内 crRNA 识别靶位点，Cas9 对靶位点进行随机剪切。



5

Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测错配酶酶切细胞池，计算突变率；Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测错配酶酶切初筛阳性克隆；阳性克隆测序验证；TA克隆；敲除结果分析。

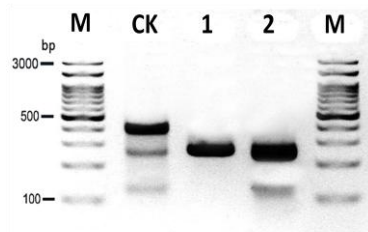


Figure 2. CRISPR/Cas9 基因编辑实验流程

## IV. 操作步骤

实验前，请您务必做好以下验证实验：

- 单细胞生长情况，确保单个细胞可以正常生长形成单克隆，即，低密度的细胞在培养皿中可以形成单克隆。
- 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。

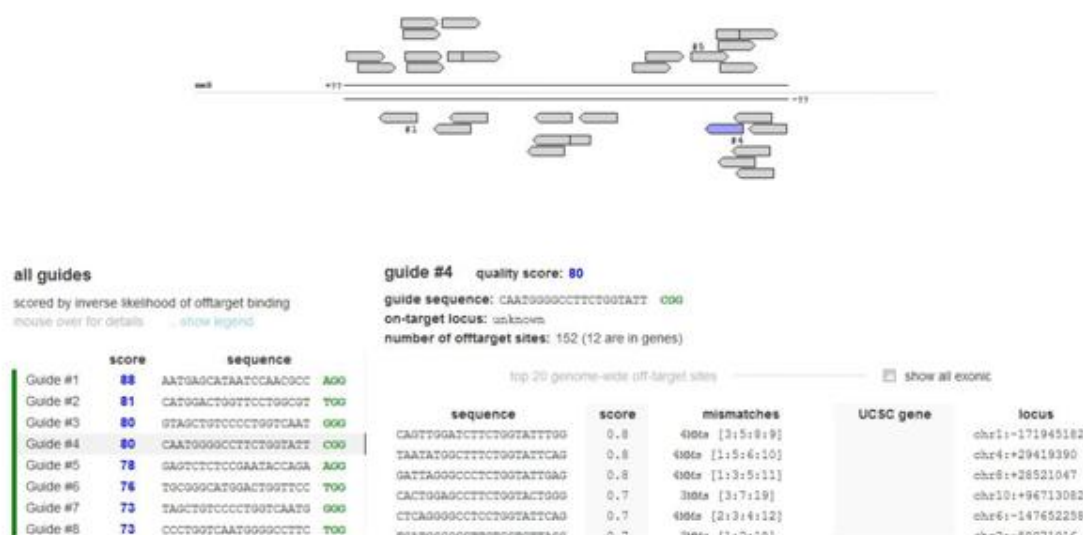
### 1. 设计 Oligo DNA 序列

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：

- 麻省理工学院的 CRISPR Design: <http://crispr.mit.edu/>
- 德国癌症研究中心的 E-Crisp: [www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html](http://www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html)

下面我们选择麻省理工学院的 CRISPR Design 工具来做设计举例，以 human *Fut8* 基因为例，一次只能输入大小为 23~250bp 的基因片段，最好一次只输入一个外显子，避免 Guide 序列跨内含子的。

点击“Download as genbank”按钮，出现以下界面：



根据左边的 score 的高低选取合适的 Guide 序列，score 的高低并不代表敲除效率的高低，所以为提高敲除的成功率，一般选择 2~3 个 Guide 序列，构建 2~3 个敲除载体。后续先在 pool 细胞的基础上验证出有效的位点，再拿此位点做正式电转，筛选单克隆。以 Guide#1 序列为例，2 条单链 oligo 的序列如下（小写字母部分是要分别与 *Bam*HI 和 *Bsm*BI 酶切后的载体相互补的部分）：

Fut8-F: gatcGAATGAGCATAATCCAACGCCg

Fut8-R: aaaaGGCGTTGGATTATGCTCATTc

※注意：设计 oligo DNA 序列时 Guide 序列第一个碱基必须是 G，如果你选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 G，应自行加一个 G 上去，相应的下游引物序列互补的位置为 C（如绿色标注碱基 G/C）。

## pGK-Blank

另外,需在位点上下游各设计一条引物,用于后续 PCR 或测序检测阳性克隆,引物能扩增约 300-500bp 的 DNA 片段,上下游引物距突变位点约 100-400bp。

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. pGK-Blank

*Bam*HI 和 *Bsm*BI 双酶切 pGK-Blank , 胶回收约 8kb 的条带。

### 3. T4 DNA Ligase 连接

将合成后的 2 条单链 oligo DNA 稀释成 10  $\mu$ M, 先变性再退火形成 dsDNA, 后与载体连接, 反应体系如下:

正链 Oligo(10 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
负链 Oligo(10 $\mu$ M)	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	8 $\mu$ L
(10X)	2 $\mu$ L
<b>Total Volume</b>	<b>20<math>\mu</math>L</b>

将以上体系瞬时离心后,置于 PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 孵育 3min, 孵育后自然冷却 20min。进行 DNA Ligase 连接反应, 10 $\mu$ L 反应体系载体的添加量为 40ng, 杂交后的 dsDNA 添加量为 1 $\mu$ L。

连接产物可以直接转化大肠杆菌高效感受态细胞,转化和筛选阳性克隆的实验步骤请您参考《分子克隆实验指南》, pGK-Blank 的抗性为氨苄霉素抗性,使用上游引物正链 Oligo 与下游 VSP-blank Primer 引物进行菌落 PCR 筛选,阳性克隆 PCR 片段正确大小约为 330bp,筛选到的阳性克隆后,再使用 VSP-blank Primer 测序验证序列的正确性。

※注意: VSP-blank Primer: 5'-AAAGTCCCTATTGGCGTTAC-3' (本试剂盒中不提供,请自行合成)。

### 4. 电转染靶细胞(推荐)

转染前进行质粒大提(去内毒素),确保质粒浓度 $\geq 1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度,再按照转染仪器或转染试剂说明书取合适的量进行转染操作,推荐使用 Celetrix 细胞电转仪(型号: CTX-1500A),贴壁细胞需  $3 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$  数量,悬浮细胞需  $5 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$  数量,转染体积 120 $\mu$ L,需质粒量 6-8 $\mu$ g。

### 5. Cruiser<sup>®</sup>基因敲除检测错配酶筛选阳性克隆

将靶 pool 细胞经过有限或梯度稀释后,在 96 孔板中进行单克隆培养,如果靶细胞是悬浮细胞,推荐使用 CellPlaza<sup>®</sup> (Cat.No.:GP5036) 培养细胞,待 96 孔板长至 10 倍镜下视野 1/4 面积时,可转移至 48 孔板扩大培养,待 48 孔板长满后,可取 48 孔板一半的细胞提基因组,推荐使用 TNA 抽提试剂盒 (Cat.No.:GP0155,GP0156)。然后通过 PCR 和核酸内切酶初步筛选阳性克隆,推荐使用 Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测错配酶 (Cat.No.:GP0104,GP0105,GP0106) 或 Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测试剂盒 (Cat.No.:GP0102,GP0103) 对 Cruiser<sup>®</sup> 基因敲除检测错配酶筛选后的阳性克隆进行测序分析,对于两个亲本不同 KO 情况的再进行 TA 克隆检测。



## V. FAQ

### Q-1: 靶位点设计有哪些注意事项

**A-1:** 目前有几个在线设计软件，我们推荐使用 Zhang Feng lab: <http://crispr.mit.edu/>，该软件会对每一个潜在的靶位点打分，并告知是否存在脱靶现象。在设计 oligo 序列时，需要特别注意 Guide 序列第一个碱基必须是 G，如果您选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 G，需自行加上一个 G，因为这个 G 对于起始转录非常重要。且 score 的高低并不代表敲除效率的高低，所以为提高敲除的成功率，一般选择 2~3 个 Guide 序列，构建 2~3 个敲除载体。后续先在 pool 细胞的基础上验证出有效的位点，再拿此位点做正式电转，筛选单克隆。

### Q-2: 转染效率低，怎么办？

**A-2:** 因为 Cas9 蛋白比较大，就导致整个敲除质粒较大（10kb 左右），如此大的质粒很容易导致转化效率低下，尤其是使用脂质体等化学试剂转染时，转染效率会比较低些。所以，我们推荐使用电转的方法进行转染。Bio-Rad 的电转仪器需要根据不同的细胞单独配制转染 buffer，所以不推荐使用；Life 的 Neon 系统不错，但是因为耗材是镀金的，所以非常贵；而 Genloci 的细胞电转仪，转染效率高，一次成本投入，后续转染耗材便宜，操作也方便，尤其适用于难转染的细胞系。

### Q-3: 单个细胞不生长，怎么办？

**A-3:** 对于单细胞不长的细胞进行敲除，首先建议采用共培养的方法看看能否促进单个细胞的生长。共培养可以采用培养过同种细胞的培养基培养单细胞；也可以使用 Cell Plaza<sup>®</sup>单细胞培养板，可以把细胞的存活率提高三倍以上。如果以上方法都不行，建议对细胞进行改造，加快其分裂速度，让单细胞可以很容易生长后，再对目的基因进行敲除。具体方法可以联系 Genloci 的客服做进一步的了解。

### Q-4: 在做高通量样本时，如何才能快速筛选得到阳性克隆？

**A-4:** 建议使用错配酶进行筛选，可加快筛选的流程。目前市面上主要有三种错配酶：Cruiser<sup>®</sup>基因敲除检测错配酶、T7E1 和 Surveyor 酶。其中，Cruiser<sup>®</sup>基因敲除检测错配酶和 Surveyor 酶属于 Cell 家族，这两种酶的筛选特异性比 T7E1 高。在酶切筛选过程中，T7E1 的特异性较差，容易出现假阳性的结果，这在一定程度上阻碍了阳性克隆的筛选进度；Surveyor 酶较贵，并且货期较长，所以我们推荐 Cruiser<sup>®</sup>基因敲除检测错配酶，它特异性高且价格合理。

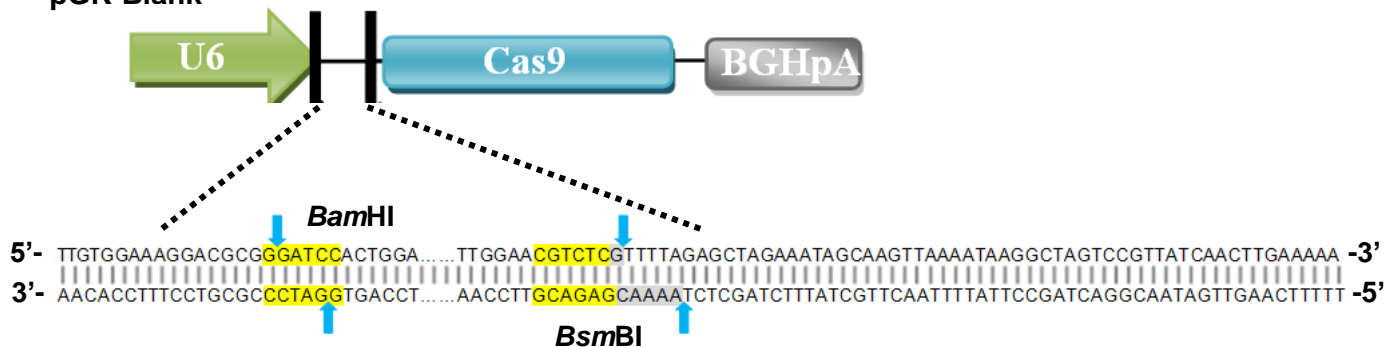


## VI. 附录

### 附录A pGK-Blank

以下为pGK-Blank 的插入位点示意图和质粒图谱，线性化pGK-Blank 所用的酶为*Bam*HI和*Bsm*BI。

#### pGK-Blank



#### Guide RNA:



Figure 3. pGK-Blank

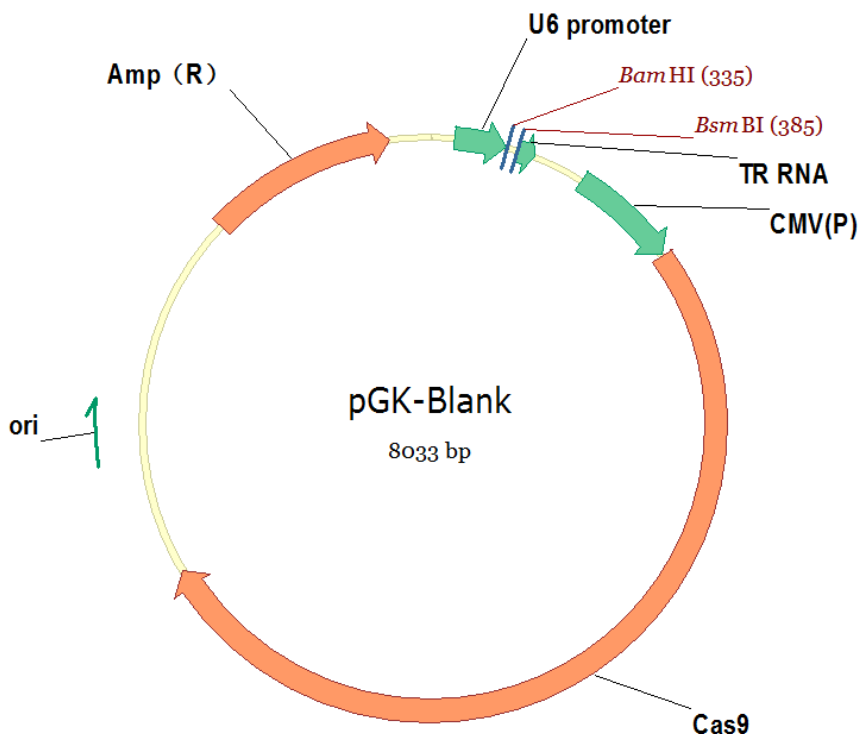


Figure 4. pGK-Blank 质粒图谱

## VII. 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. Hwang WY., Fu Y., Reyon D., Maeder ML., Tsai SQ., Sander JD., Peterson RT., Yeh JR., Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31:227~229
9. Liu P, Long L, Xiong K, Yu B, Chang N, Xiong JW, Zhu Z, Liu D. Heritable/conditional genome editing in *C. elegans* using a CRISPR/Cas9 feeding system. *Cell Research*. 2014, 24(7):886~889.
10. Barrangou R. RNA events. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*. 2014, 344(6185):707~708.
11. Nishimasu H., *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5)935~949.