

pGK2.0

Cat. No. GP0127
Protocol No. PT161215-1
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. 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.pGK2.0 线性化处理.....	6
3.获得双 gRNA 克隆框.....	6
4.片段的胶回收和酶切.....	6
5.T4 DNA Ligase 连接和筛选.....	6-7
6.电转染靶细胞.....	7
7.Cruiser [®] 筛选阳性克隆.....	7
V. FAQ.....	8
VI. 附录.....	9
VII. 参考文献.....	10

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. pGK2.0
- Figure 4. pGK2.0

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
GP0127	pGK2.0	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[®]基因敲除检测试剂盒(Cat.No.:GP0102,GP0103)
- Cruiser[®] (Cat. No.:GP0104,GP0105,GP0106)
- Cell Plaza[®]单细胞培养板(Cat.No.:GP5036)
- (10X)(Cat.No.:GP0124,GP0125)

III. 产品概要

pGK2.0 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。pGK2.0 能够适用于几乎所有哺乳动物细胞的基因修饰研究。

pGK2.0 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 克隆框含有两个敲除插入位点，能够快速高效的克隆编码靶标特异的CRISPRRNA(crRNA)的 DNA 片段，实现同基因大片的缺失或同时敲除两个不同基因。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。

双敲除：gRNA 克隆框含有两个敲除插入位点，可以实现同基因大片的缺失或同时敲除两个不同基因。

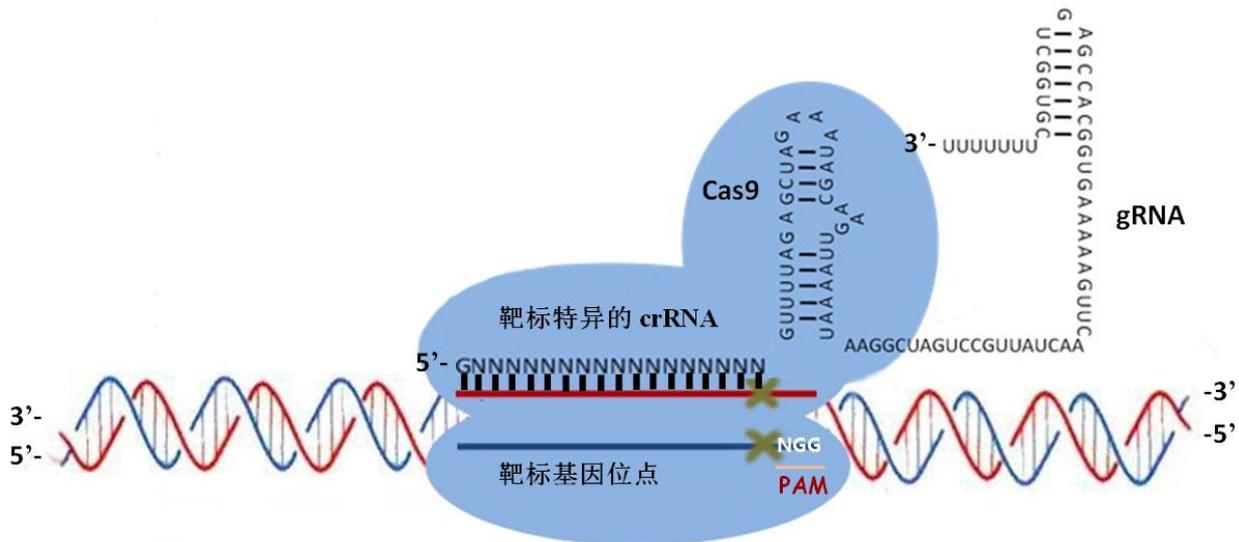


Figure1. CRISPR/Cas9 工作原理示意图

CRISPR/Cas9 基因编辑实验流程图如下：

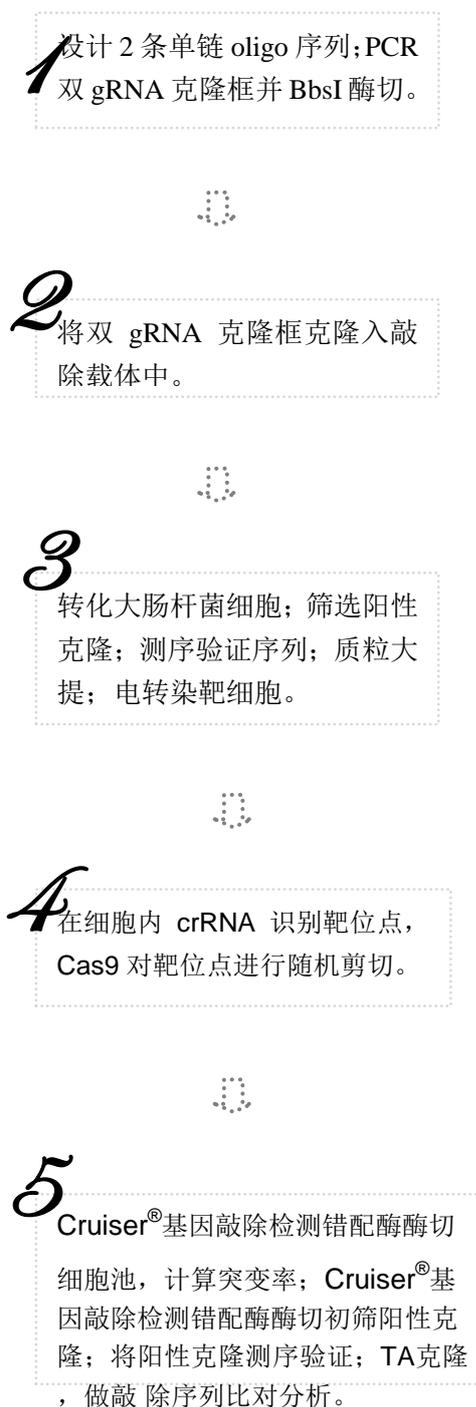


Figure 2. CRISPR/Cas9 基因编辑实验流程

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 oligo DNA，敲除位点的选择您可以通过以下在线工具选择：

- 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

根据您选择好的两个 Guide 序列（20bp 左右），按下列原则设计您的引物。

Primer-F: 5' **GAGAAGAC**GGAAAC-(20bp 靶位点反向+T)-CCTAGATCTGTGGTCTCATAC_3'

Primer-R: 5' **GAGAAGAC**GGAAAC-(20bp 靶位点反向+C)-CCGGTGTTCGTCCTTCCAC_3'

※注意：a. GAAGAC 为 *BbsI* 酶切位点

b. 由于 H1 promoter 的转录起始位点为 A，如果你选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 A，应在设计上游引物时加上一个 T，见上方红色加粗字体，但有研究表明：将 H1 启动子的+1 位腺苷酸更换为尿苷酸、胞苷酸、鸟苷酸，似乎并不影响启动子的转录活性。

c. 由于 U6 promoter 的转录起始位点为 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，见上方红色加粗字体。

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 3~5 个 Guide 序列，先构建 3~5 个单敲除载体。后续先在 pool 细胞的基础上验证出有效的位点，再拿有效的两个位点构建双敲载体，做正式电转，筛选单克隆。以 Guide#1 和 Guide#2 序列为例(Guide#1:AATGAGCATAATCCAACGCC AGG、Guide#2:CATGGACTGGTTCCTGGCGT TGG)，2 条单链 oligo

pGK2.0

的序列如下:

Primer-F: 5'-GAG**GAAGAC**GGAAAC**GGCGTTGGATTATGCTCATT**CCTAGATCTGTGGTCTCATAC-3'

Primer-R: 5'-GAG**GAAGAC**GGAAAC**ACGCCAGGAACCACTCCATG**CCCGGTGTTTCGTCTTTCCAC-3'

另外, 您需要在敲除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. pGK2.0

BbsI 或 *BpiI* 酶切 pGK2.0 , 胶回收约 9kb 多的条带, 约 600bp 的条带无需回收。

3. 获得双 gRNA 克隆框

在灭菌 PCR 管中配制如下反应体系:

pGK2.0		1~5ng
5DNA	(5X)	10 μ L
DNA		0.5 μ L
dNTP (10mM each)		1 μ L
Primer-F (10 μ M)		2 μ L
Primer-R (10 μ M)		2 μ L
Add ddH ₂ O		to 50 μ L

PCR 反应程序推荐如下:

95°C (预变性)	1min	} 25 cycles
95°C (变性)	10 s	
55~62* (退火)	10 s	
72°C (延伸)	20 s	
72°C (彻底延伸)	5 min	
4°C (保存)	hold	

4. 片段的胶回收和酶切

琼脂糖凝胶回收约 600bp 的条带, 再 *BbsI* 或 *BpiI* 酶切后回收。

5. T4 DNA Ligase 连接和筛选

将 2 步骤得到的线性化载体和 4 步骤得到的酶切片段按照摩尔比 1:5-1:10 进行连接反应。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》, pGK2.0 的抗性为卡那霉素抗性。对重组子进行 *BbsI* 酶切筛选, 阳性克隆无法被 *BbsI* 切开, 并对筛选到的阳性克隆进行测序验证。

※注意: a. 宿主菌株: 在普通感受态中都可以扩增, 如: DH5 α 、TOP10、DH10B 等;

b. 原核筛选标记: Kan 抗性 (卡那霉素用量为 30 μ g/mL);

c. 测序引物: VSP primer: 5'_CATATGCTTACCGTAACTTGAAAG_3'

H1F primer: 5'_ATTCTGAACGCTGACGTCATCAACCCG_3'

d. 真核细胞中筛选标记: Neo 抗性;

e. pGK2.0 在原核中是呈现卡那霉素抗性的, 卡那霉素抗性基因编码的是新霉素磷酸转移酶 II, 基因记做 Neo, 能通过降解 G418、新霉素和卡那霉素来实现真核和原核细胞的相应抗性, 所以其既可以在原核生物中表达使大肠杆菌等表现出卡那霉素抗性, 也可以在真核生物中表达使动植物细胞表现出 G418 抗性。

6. 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 μL , 需质粒量 6-8 μg 。

7. Cruiser[®]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[®] (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 GenlociTNA 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[®] (Cat.No.:GP0104,GP0105,GP0106) 或 Cruiser[®] 基因敲除检测试剂盒(Cat.No.:GP0102,GP0103) 对 Cruiser 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，需要特别注意由于 H1 promoter 的转录起始位点为 A，如果你选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 A，应在设计上游引物时加上一个 T。由于 U6 promoter 的转录起始位点为 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。另外 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 3~5 个 Guide 序列，先构建 3~5 个单敲除载体。后续先在 pool 细胞的基础上验证出有效的位点，再拿有效的两个位点构建双敲载体，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[®]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[®]基因敲除检测错配酶、T7E1 和 Surveyor 酶。其中，Cruiser[®]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[®]酶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 pGK2.0

^{BbsI 敲除插入位点}
 5'.....ctctaaaacagGTCTTCcGAAGACccTAGATCTGTGGTCTCATACAGAACTTATAAGATTCCCAAATCCAAAGACATTTACGTTTATGG
 H1 promoter
 TGATTCCCAGAACACATAGCGACATGCAAATATTGCAGGGCGCCACTCCCCTGTCCCTCACAGCCATCTTCTGCCAGGGCGCACGCGC
 GCTGGGTGTTCCCGCCTAGTGACACTGGGCCCGGATTCTTGGAGCGGGTTGATGACGTCAGCGTTCGAATGGCGCGCCGGCCTTTTG
 CTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCATGCATTAGTTATTACTATTTCCCATG
 ATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACG
 U6 promoter
 TGACGTAGAAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTAT
^{BbsI 敲除插入位点}
 TTCGATTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGaacaccggGTCTTCgaGAAGACctgttttaga....-3'

Figure 3. pGK2.0

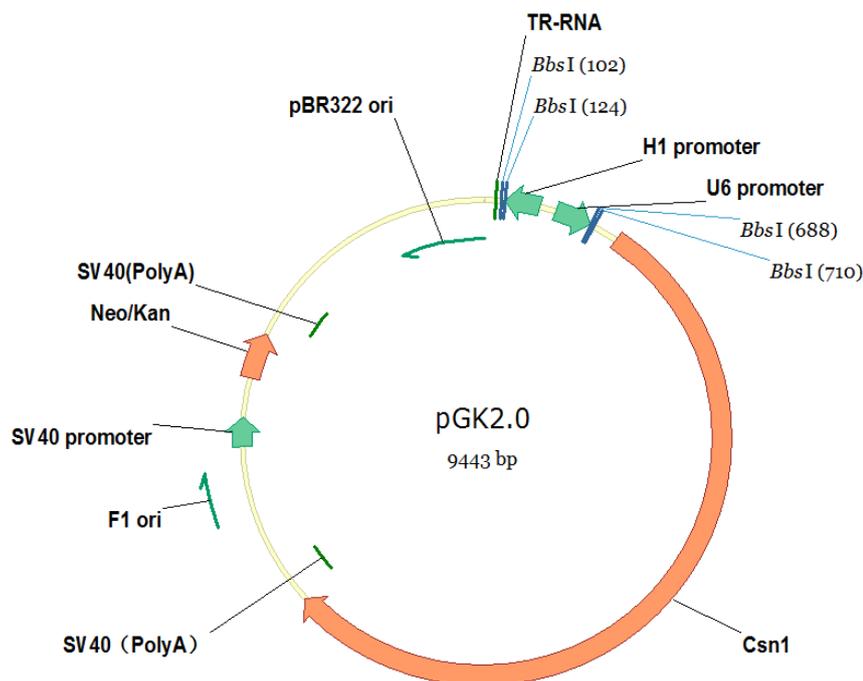


Figure 4. pGK2.0

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.