

Cat. No.: CR3010-S

E.coli. CRISPR/Cas9 基因编辑试剂盒（单靶点）

产品简介：

本试剂盒采用 CRISPR/Cas9 系统对大肠杆菌基因组进行编辑。可以实现对基因的敲除、敲入、点突变等。也可以同时对基因组的多个位点进行编辑。试剂盒中配备了实验过程所需要全部载体、酶及反应试剂，客户仅需合成数条引物即可完成整个实验。整个实验周期仅需一周，基因敲除成功率高达 90%。

该系统转入的质粒均可以在敲除完成后很方便的清除，恢复对抗生素的敏感性。在清除转入 pFG-sgRNA 载体后可以再次转入新的 pFG-sgRNA 载体，仅需 3 天即可完成新一轮的基因编辑。

产品特点：

- 无痕基因编辑
- 不残留抗性基因
- 可反复编辑多个基因
- 表达单靶点

产品内容：

pFN-Cas9-K 质粒 (50ng/μl)	15μl
pFG-sgRNA 质粒(50ng/μl)	25μl
sgRNA-F primer(10μM)	50μl
sgRNA-R primer(10μM)	50μl
PCR template(10ng/μl)	20μl
SL Enzyme Mix	25μl
5×SL Buffer	50μl
pFN-Cas9-K Inducer	550μl
SCV Primer Mix	200μl
Clone Direct PCR Mix	1.5ml

相关产品

品名	货号
E.coli. CRISPR/Cas9 基因编辑试剂盒 (双靶点)	CR3010-D
Clone Direct PCR mix	P3001
pFN-Cas9 Inducer	CR3012

相关服务

服务名称	货号
大肠杆菌基因编辑服务	SC1020
pFG-sgRNA 载体构建服务	SC1021

产品应用：

单点切割，基因删除：



单点切割，基因插入/突变：



单点切割，同时构建多个突变体：



试剂盒组分:

pFN-Cas9-K 质粒

pFN-Cas9-K 的功能为可诱导启动子严格控制表达 *Streptococcus pyogenes* Cas9 蛋白。在 pFN-Cas9-K 转入大肠杆菌后，Cas9 蛋白不表达，以避免 Cas9 蛋白的存在对大肠杆菌的生长产生影响。当加入诱导剂后，Cas9 蛋白表达出来，实现基因组 DNA 的定点切割。pFN-Cas9-K 同时表达同源重组修复 E.coli.基因组所需的 λ -Red 重组酶。

pFN-Cas9-K 质粒有卡那抗性基因，可用 kan 抗生素进行筛选。

pFN-Cas9-K 质粒为热不稳定质粒，37°C 过夜培养可以使大肠杆菌中的 pFN-Cas9-K 质粒丢失，从而恢复基因编辑成功的菌种对卡那抗生素的敏感性。

pFG-sgRNA 质粒

pFG-sgRNA 为 sgRNA 表达质粒，具有链霉素抗性基因。构建完成的 pFG-sgRNA 质粒转入大肠杆菌后将持续表达 sgRNA，与 pFN-Cas9-K 质粒表达出的 Cas9 蛋白结合后实现对大肠杆菌基因组的定点切割。

重组模板（自备）

大肠杆菌需要重组模板对 Cas9 切割后产生的基因组断裂点进行修复。重组模板可以直接采用引物合成。

SL Enzyme Mix

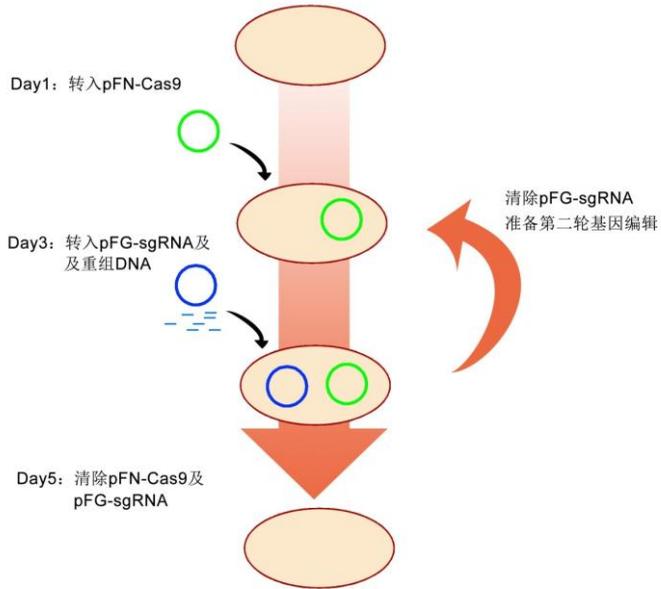
重组连接 pFG-sgRNA 载体。

Clone Direct PCR mix

用于 sgRNA 克隆片段的 PCR 扩增及构建 pFG-sgRNA 载体时的克隆鉴定。2×Clone Direct PCR mix 中含有特别优化的缓冲液组分和高效 Taq/Pfu 混合酶，对常见 PCR 抑制剂均有很好的耐受性，非常适合从各种菌体、菌液和组织培养物中直接扩增目的基因。

Clone Direct PCR mix 的保真性足以胜任常规分子生物学的基因克隆实验要求。

实验流程:



基因编辑设计原则：

1. 设计的靶点和重组片段所依据的基因组序列要非常精确。最好在实验开始前对菌种的目标基因及其附近序列进行测序，而不是采用数据库中序列进行设计。
2. 初步选择数个靶点，并通过 Blast 比对删除特异性不高的靶点。
3. 需要保证重组修复完成后 sgRNA 靶点被破坏。也就是说在重组修复片段上没有靶点序列。否则将严重影响成功率。
4. 重组臂上下游各 40-100bp。5' 磷酸化可以增加重组效率。在进行大片段删除、插入时，采用 5' 磷酸化的引物扩增重组片段可以提高成功率。
5. 删除片段大于 1kb 时，推荐采用双靶点切割。

推荐靶点设计网站：<http://crispor.tefor.net/>

需要准备但不包含在试剂盒中的试剂：

- 1、 大肠杆菌菌种
- 2、 LB 培养基
- 3、 卡那抗性琼脂糖平板
- 4、 链霉素抗性琼脂糖平板
- 5、 IPTG IM， 溶于水
- 6、 超纯水（冰冷的）
- 7、 10%甘油， 超纯水配制（冰冷的）

仪器：

- 1、 恒温培养箱
- 2、 恒温空气浴震荡培养箱
- 3、 分光光度计
- 4、 PCR 仪
- 5、 电转化仪
- 6、 超净工作台等实验室常用仪器

第一部分：制备 Cas9 表达感受态细胞

试剂准备：

含 Kan 的 LB 琼脂糖平板

LB 培养基

含 Kan 的 LB 培养基

转化液

超纯水

10%甘油（超纯水配制）

仪器准备：

冷冻离心机

恒温培养箱等

1 pFN-Cas9-K 转化目标菌种

1.1 按照实验室中常用方法制备化学或者电转化感受态细胞。化学转化感受态细胞制备方法可以参考附录中的方法。

1.2 化学转化：

- 1) 冰上融化感受态细胞。
- 2) 取 pFN-Cas9-K 质粒 0.5 μ l，加入到 50 μ l 感受态细胞中，混匀。
- 3) 42 $^{\circ}$ C 热激 90sec。立即放置冰上。
- 4) 将菌液均匀涂布含 Kan 的 LB 平板。30 $^{\circ}$ C 培养 12-16h。

1.3 电转化：

- 1) 冰上融化感受态细胞。
- 2) 取 pFN-Cas9-K 质粒 1 μ l，加入到 50 μ l 感受态细胞中，混匀。
- 3) 将感受态细胞加入电击杯。
- 4) 按照电转仪推荐的参数进行电击转化。
- 5) 加入 1ml LB 培养基，30 $^{\circ}$ C 培养 1h。
- 6) 取 100 μ l 菌液均匀涂布含 Kan 的 LB 平板。30 $^{\circ}$ C 培养 12-16h。

2 制备表达 Cas9 蛋白的感受态细胞。

！含 pFN-Cas9-K 质粒的菌种需在 30 $^{\circ}$ C 培养。

- 2.1 挑取单个克隆，接种到 2ml 含 Kan 的 LB 培养基中，30℃培养过夜。第二天将培养的菌种按 1:100 接种到 50ml 含 Kan 的 LB 培养基，30℃震荡培养至 OD600≈0.5。
- 2.2 加入 50μl 诱导剂，继续培养至 OD600≈0.6（大概需要 1~2h）。不同菌种生长速度不同，注意及时测量 OD 值，避免 OD 值过高。
- 2.3 将培养物转移至 50ml 离心管，冰浴降温。**以后的步骤中均需保持感受态细胞接近 0℃。**所有离心管在加入细胞前需要在冰上预冷。
- 2.4 4℃ 3000g 离心 10min，弃上清。
！尽量将液体去除干净，去除过程中可以损失部分细胞。
- 2.5 加入 10ml 冰冷的超纯水，冰上重悬菌体。补加 40ml 超纯水，混匀。4℃ 3000g 离心 10min，弃上清。
- 2.6 加入冰冷的 10%甘油 2ml，冰上重悬菌体。4℃ 3000g 离心 10min，弃上清。
- 2.7 加入冰冷的 10%甘油 200μl，冰上重悬菌体。-70℃保存或立即使用。-70℃冻存的感受态细胞转化效率可以保持 6 个月左右。

第二部分 构建 pFG-sgRNA 载体

试剂准备:

含 Str 的 LB 琼脂糖平板

含 Str 的 LB 培养基

DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒

合成 sgRNA 靶点引物

大肠杆菌感受态细胞 (dh5a、Top10 等常规克隆菌种均可)

仪器准备:

PCR 仪

台式离心机

恒温培养箱等

一、PCR 扩增 sgRNA 表达框

1 设计合成 sgRNA 靶点, 合成引物。

根据需要编辑的基因序列设计 sgRNA 靶点。靶点的结构为 (N)₂₀NGG, 除 NGG 以外的前 20 个碱基序列需要克隆到 pFN-sgRNA 载体中。

除了在合适的位置中挑选

按照以下例子设计合成引物:

靶点: AAGCAGGGGACTAACATGTGTGG

Target primer:

5'-TCCTAGGTATAATACTAGTAAGCAGGGGACTAACATGTGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'

合成后加水溶解为 10 μ M 浓度。

2 PCR 扩增 sgRNA 表达片段。

靶点合成反应体系：

sgRNA-F primer	1μl
sgRNA-R primer	1μl
Target primer	0.5μl
PCR template	0.5μl
Clone Direct PCR Mix	25μl
H2O	Xμl
Total	50μl

反应程序：

95°C	2min	
95°C	10sec	} 10 cycles
60°C	15sec	
72°C	30sec	
95°C	10sec	} 15 cycles
58°C	15sec	
72°C	30sec	

3 琼脂糖凝胶回收 PCR 产物并定量。产物大小为 170bp。

二、 pFG-sgRNA 载体连接及转化

1 连接 pFG-sgRNA 载体

按照下表在冰上配制反应体系。

单靶点连接体系

靶点合成产物	10ng
pFG-sgRNA 载体	1μl
SL Enzyme Mix	1μl
5×SL Buffer	2μl
H2O	Xμl
Total	10μl

吹吸混匀，37℃孵育 0.5h。完成后-20℃保存或者立即转化。

注意：延长反应时间或者在室温保存反应产物均会造成克隆效率下降。

三、 pFG-sgRNA 转化及克隆鉴定

- 1 将 pFG-sgRNA 载体连接产物转化大肠杆菌感受态（化学转化及电转化均可。菌种可以用 dh5a、Top10 等常见克隆菌种）。转化后菌种涂布含 Str 的 LB 平板，37℃培养过夜。
- 2 挑取 pFG-sgRNA 转化克隆接种到含 Str 的 LB 培养基，37℃震荡培养 5-6h。
- 3 按照下表配制 PCR 体系：

SCV Primer Mix	0.4 × (X+2) μl
Clone Direct PCR Mix	5 × (X+2) μl
H2O	4.6 × (X+2) μl
<hr/>	
Total	10 × (X+2) μl

*X 代表需鉴定的克隆数量。一般鉴定 10 个克隆即可。

混匀，按照 10μl/管分装到 PCR 管中，标记编号。

- 4 取培养克隆的菌液 0.5μl 至准备好的 PCR 管，混匀。并进行 PCR 反应。

反应程序：

95℃	2min	} 30 cycles
95℃	10sec	
58℃	15sec	
72℃	30sec	

- 5 琼脂糖凝胶电泳检测克隆扩增产物。阳性克隆 415bp，阴性克隆 275bp。
- 6 将鉴定正确的克隆接种到含 Str 的 LB 培养基，37℃过夜震荡培养。提取质粒并定量。

！用高纯水溶解质粒，切勿用 TE。

第三部分 重组模板制备

基因删除突变的重组模板仅几十 bp，可以采用引物合成，合成的 Oligo 可以是双链或者单链。推荐正反链同时转入。

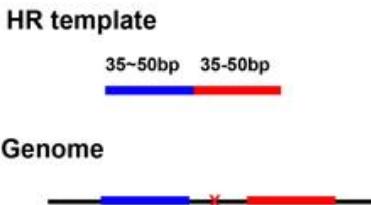
基因敲入的重组模板一般较长，可以采用 PCR 扩增获得。

准备 500ng~1 μ g 重组模板，采用可靠的试剂盒进行纯化，溶于高纯水。（切勿用 TE 溶解）

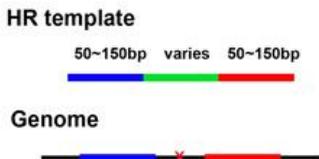
*英茂盛业重组模板合成服务——SV1802

几种参考设计方案（X 代表靶点）：

单靶点敲除：



单靶点敲入：



第四部分 转化目标菌种及鉴定

- 1 冰上融化 Cas9 表达感受态细胞（来自第一部分）。
- 2 重组模板为 PCR 产物：取 500ng 重组模板 DNA，95℃加热 3min。立即冰浴速冷备用。
重组模板为合成的 oligo：取正反链各 50ng，冰上混匀。
- 3 将 100ng pFG-sgRNA 质粒（来自第二部分）加入准备好的重组模板。混匀。总体积应小于 5 μ l。
- 4 加入 50 μ l 感受态细胞，混匀。
- 5 按照电转化仪推荐的条件进行转化。
- 6 加入 1ml LB 培养基，30℃复苏培养 1h。取 100 μ l 涂布 Kan/Str LB 平板。
- 7 取 100 μ l 涂布 Kan/Str LB 平板。30℃培养 14~16h。
- 8 挑取克隆进行 PCR 鉴定。

鉴定方案设计：为避免重组模板扩增产生假阳性，至少保证一条鉴定引物不能与重组模板结合。

参考设计方案：

编辑后基因与原基因大小有明显区别：



编辑后基因与原基因大小相似或者插入基因太大不容易扩增：



第五部分 清除质粒，恢复抗性

鉴定成功的转化子中含有卡那抗性的 pFN-Cas9-K 质粒和链霉素抗性的 pFG-sgRNA 质粒。

1、清除 pFG-sgRNA 质粒：

将菌种接种到 Kan 抗性的 LB 培养基，加入 IPTG 至终浓度为 1mM，30℃ 震荡培养过夜。

在含 Kan 的 LB 平板划线分离单克隆，挑取单克隆验证 str 抗性是否丢失。

确认 pFG-sgRNA 已经清除后，可以重新制备新的感受态，转入新的 pFG-sgRNA 质粒，进行新一轮基因编辑。或者进一步清除 pFN-Cas9-K 质粒。

2、清除 pFN-Cas9-K 质粒：

将已经清除 pFG-sgRNA 质粒的菌种接种到 LB 培养基，37℃ 培养 16h。在 LB 平板划线分离单克隆。挑取单克隆验证 Kan 抗性是否丢失。

附录一 试剂配方

LB 培养基:

10g 胰蛋白胨

5g 酵母粉

5g NaCl

用 1L 水溶解，高压灭菌。

含 Kanamycin 的 LB 培养基:

在 LB 培养基中加入 Kanamycin 至终浓度为 50 μ g/ml。

含 Streptomycin 的 LB 培养基:

在 LB 培养基中加入 Streptomycin 至终浓度为 50 μ g/ml。

1M IPTG:

称取 2.3g IPTG，加水溶解，定容到 10ml。过滤除菌。

10% (V/V) 甘油:

12.6g 甘油溶解于 90ml 超纯水，高压灭菌。

附录二 缩写表

Kan: Kanamycin

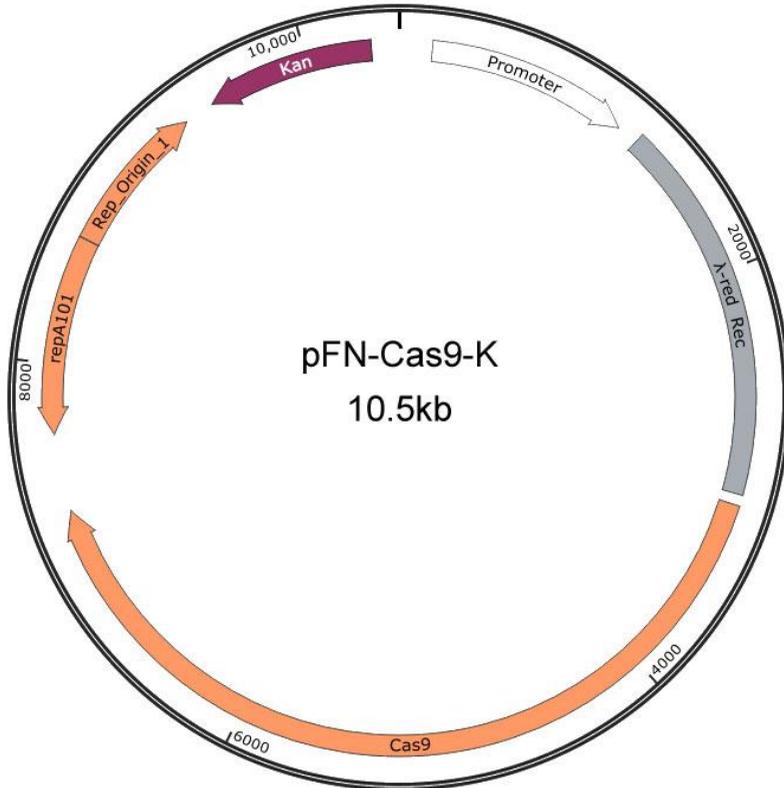
Str: Streptomycin

IPTG: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

HR: Homologous Recombination

附录三 载体图谱

pFN-Cas9-K



载体功能：可诱导表达 Cas9 蛋白抗性：Kan

大小：10.5kb

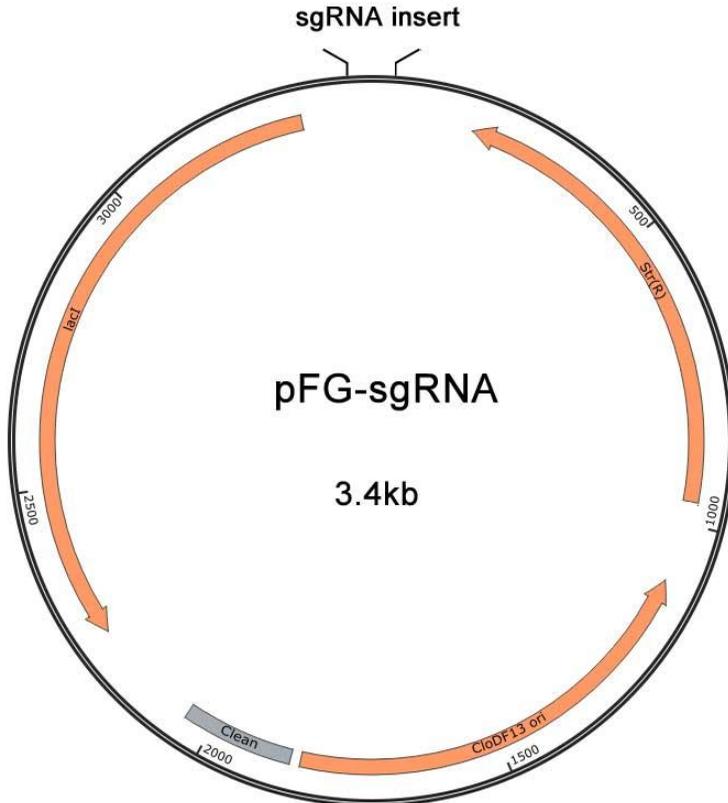
鉴定引物：

FN-F: AACTGAAATGCCCGTTTACCTC

FN-R: CGATTCTTTCTGCGGGTATATCT

产物大小：528bp

pFG-sgRNA



载体功能: 表达 sgRNA

抗性: Str

大小: 3.4kb

鉴定/测序引物:

SCV-F: TCACCACCCTGAATTGACTCT

SCV-R: CTTATGTCTATTGCTGGTTTACC

附录四 化学感受态细胞制备方法

高效转化液:

MnCl ₂	55mM
CaCl ₂	15mM
KCl	250mM
PIPES	10mM

用 KOH 调节 pH 值至 6.7, 0.22 μ M 滤器过滤除菌。

- 1 将大肠杆菌菌种接种到 100ml LB 培养基, 18 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。菌液 OD600 达到 0.55 左右时停止培养。
- 2 培养瓶放冰上冰浴 10min。
- 3 4 $^{\circ}$ C 2500g 离心 10min 收集菌体, 弃上清。将离心管倒置吸水纸上 2min, 滴尽剩余液体。
- 4 加入 32ml 转化液, 冰上摩擦离心管重悬菌体。切勿移液枪吹吸或者用漩涡振荡器重悬。
- 5 4 $^{\circ}$ C 2500g 离心 10min 收集菌体, 弃上清。将离心管倒置吸水纸上 2min, 用移液枪吸干剩余液体。
- 6 用 8ml 转化液冰上轻柔重悬沉淀。
- 7 加 0.6ml DMSO, 轻柔颠倒混匀。冰上放置 10min。
- 8 分装为 150 μ l/管, -80 $^{\circ}$ C 冻存。

附录四 引物表

引物名称	序列 (5' -3')	用途
FN-F	AACTGAAATGCCCGTTACCTC	PCR 鉴定 pFN-Cas9 载体, 正确大小 525bp
FN-R	CGATTCTTTCTGCGGGTATATCT	
SCV-F	TCACCACCCTGAATTGACTCT	target 克隆鉴定
SCV-R	CTTATGTCTATTGCTGGTTACC	
FG-seq	GCATACTCTGCGACATCGTATA	target 测序引物

附录五 sgRNA 表达框

Promoter

target

TTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGGTATAATACTAGTNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

N

GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTG

AAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTT