

Cat. No.: CR3011

E.coli. CRISPR/Cas9 基因编辑试剂盒 V1.1

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的载体及相关试剂,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%。

该系统中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,不残留抗性基因,实现无痕编辑。

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-K2 质粒 (50ng/μl)	20μl
pFG-sgRNA 线性化质粒(50ng/μl)	25μl
SL Enzyme Mix	25μl
5×SL Buffer	50μl
SCV Primer Mix1	200μl
SCV Primer Mix2	200μl
SCV Primer Mix3	200μl
诱导剂 1	2ml
诱导剂 2	250μl

相关产品

品名	货号
sgRNA 体外转录试剂盒	PC1380
Cas9 体外酶切试剂盒	PC1400

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-K2 质粒

pFN-Cas9-K2 是在原 pFN-Cas9-K 的改进而来。通过改进质粒表达结构，我们实现了更加可靠的 spCas9 诱导表达系统。该质粒功能为诱导表达 *spCas9* 蛋白以及-Red 重组酶，实现可控的基因组 DNA 定点切割和重组修复。

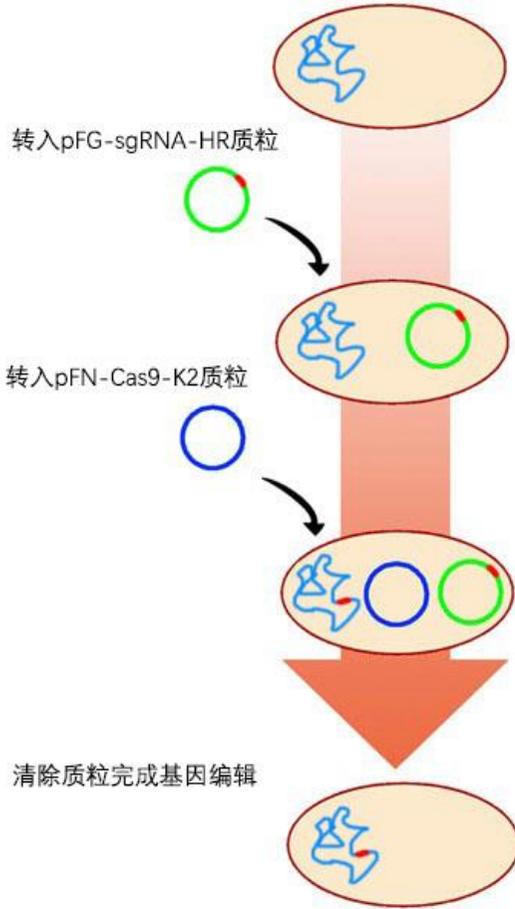
pFG-sgRNA-HR 质粒

pFG-sgRNA-HR 表达 sgRNA 并提供重组修复所需的重组模板。

SL Enzyme Mix

重组连接 pFG-sgRNA-HR 载体。

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. 最好多设计几个靶点并用体外酶切实实验验证 sgRNA 靶点切割效率。选择效率高的靶点进行实验。
4. 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。
5. 重组臂上下游各 100-250bp。
6. 重组臂距离切割位点越近越好。
7. 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/>

设计重组臂设计举例：

gDNA 序列：

```
GCCAAAGCCACCGGCAGATACAACCTGATCAGCCCCAAGAAGGACCTGGAAAAAGGCGTG  
GTGCTGAGCGACCTGTGCAACTTCTGGTGTCCAGACCATCAAGGCTGGAAGGTGTACT  
GGGCCGGCATCGAGTTTGACGTGACCCACAAAGGCATGGCCCTGCTGCACCGGCTGAAAA  
CAAACGACTTTGCCCTGCTGTCTATGACCCGGAATCTGTTCCCTCACCTGTTTCAGAAC  
CCAACTCTACCATCGAGAGCCCTCTGTGGGCCCTGAGAGTGATTCTGGCCGCTGGAATCC
```

切割位点

```
AGGACCAGCTGATCGAACAGAGCCTGATCGAACCTCTGGCTGGTGCCTGGGCCCTGATCT  
CTG ATTGGCTGCTGACCACCAACCAACCACTTCAACATGCGGACCCAGAGAGTGAAAG  
AGCAGCTGAGCCTGAAGATGCTGTCCCTGATCAGAAGCAACATCCTGAAGTTCATCAACAA  
GCTGGACGCCCTGCACGTGGTCAACTACAATGGCCTGCTGAGCAGCATCGAGATCGGCAC  
CCAGAACCACACCATCATCATCACCCGGACCAATATGGGCTTTCTGGTGAAGTGAAGAG  
CCCGACAAGAGCGCCATGAACAGAATGAAGCCCGACCTGCCAAGTTCCTCTGCTGCAC  
GAGAGCACCCCTGAAGGCTTTTACACAGGGCAGCAGCACCCGGATGCGAGTCTCTGATCCTG
```

HR 序列：

```
GGGCCGGCATCGAGTTTGACGTGACCCACAAAGGCATGGCCCTGCTGCACCGGCTGAAAA  
CAAACGACTTTGCCCTGCTGTCTATGACCCGGAATCTGTTCCCTCACCTGTTTCAGAAC  
CCAACTCTACCATCGAGAGCCCTCTGTGGGCCCTGAGAGTGATTCTGGCCGCTGGAATCC
```

需插入的序列

```
AGGACCAGCTGATCGAACAGAGCCTGATCGAAC.....CTCTGGCTGGTGCCTGGGCC  
TGATCTCTGATTGGCTGCTGACCACCAACCAACCACTTCAACATGCGGACCCAGAGAGTGA
```

AAGAGCAGCTGAGCCTGAAGATGCTGTCCCTGATCAGAAGCAACATCCTGAAGTTCATCAAC
AA GCTGGACGCCCTGCACGTGGTCAACTACAATGGCCTGCTGAGCAGCATCGAGATCGGCAC
CCAGAACCACACCATCATCATCACCCGGACCAATATGGGCTTTCTGGTGGAAGTCAAGAG

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、 SOC 培养基
- 4、 卡那抗性琼脂糖平板
- 5、 链霉素抗性琼脂糖平板
- 6、 卡那+链霉素琼脂糖平板
- 7、 超纯水（冰冷的）
- 8、 10%甘油，超纯水配制（冰冷的）
- 9、 2×Taq PCR Mix 和 2×pfu PCR Mix 或者类似的 DNA 聚合酶
- 10、 sgRNA 表达框和重组修复片断 HR 合成
- 11、 PCR 扩增引物一对：
HR-PCR-F gactcctgcattaggctcga
HR-PCR-R gtgtgcttctcaatgcctga

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

2 × pfu PCR Mix	25 μl
H ₂ O	X μl
Total	50 μl

反应程序：

95 °C	5min	} 25 个循环
95 °C	30sec	
55 °C	30sec	
72 °C	1Kb/min	

琼脂糖凝胶回收 PCR 产物并定量。产物大小为基因合成大小。

二、 pFG-sgRNA-HR 载体连接及转化

连接 pFG-sgRNA-HR 载体

按照下表在冰上配制反应体系。

连接片段 sgRNA-HR	100ng
pFG-sgRNA 线性化载体	1 μl
SL Enzyme Mix	1 μl
5×SL Buffer	2 μl
H ₂ O	至 10 μl

吹吸混匀，42 °C 孵育 30min。完成后 -20 °C 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-HR 转化及克隆鉴定

- 1 将 pFG-sgRNA-HR 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 DH5 α、JM109 等常见克隆菌种）。转化后菌种涂布含 Str 的 LB 平板，37 °C 培养过夜。
- 2 挑取 pFG-sgRNA-HR 转化克隆接种到含 Str 的 LB 培养基，37 °C 震荡培养 5-6h。
- 3 按照下表配制 PCR 体系：

SCV Primer Mix1	0.4 × (X+2) μl
2 × Taq PCR Mix	5 × (X+2) μl

H2O	$4.6 \times (X+2) \mu\text{l}$
Total	$10 \times (X+2) \mu\text{l}$

*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 10 μl /管分装到 PCR 管中，标记编号。

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

反应程序：

95 $^{\circ}\text{C}$ 5min

95 $^{\circ}\text{C}$ 30sec

55 $^{\circ}\text{C}$ 30sec

5 72 $^{\circ}\text{C}$ 1Kb/min

} 30 个循环

- 6 琼脂糖凝胶电泳检测阳性克隆扩增产物大小：284+基因合成大小（阴性克隆 284bp）。
- 7 将鉴定正确的克隆接种到含 Str 的 LB 培养基，37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜震荡培养。提取质粒并定量。

★用超纯水溶解质粒，切勿用 TE。

第二部分：制备 pFG-sgRNA-HR 感受态

试剂准备：

含 Str 的 SOC 琼脂糖平板

SOC 培养基

含 Str 的 SOC 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 pFG-sgRNA-HR 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 pFG-sgRNA-HR 质粒 1 μ l，加入到 50 μ l 感受态细胞中，混匀。
- 3) 42 $^{\circ}$ C 热激 90s。立即放置冰上。
- 4) 将菌液均匀涂布含 Str 的 LB 平板。37 $^{\circ}$ C 培养 12-16h。

1.3 电转化：

- 1) 冰上融化感受态细胞。
- 2) 取 pFG-sgRNA-HR 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 SOC 培养基，37 $^{\circ}$ C 培养 1h。
- 6) 取 100 μ l 菌液均匀涂布含 Str 的 SOC 平板。37 $^{\circ}$ C 培养 12-16h。

2 制备表达 sgRNA 的感受态细胞。

2.1 挑取单个克隆，接种到 2ml 含 Str 的 SOC 培养基中，37 $^{\circ}$ C 培养过夜。第二天

- 将培养的菌种按 1:100 接种到 50ml 含 str 的 SOC 培养基, 37°C 震荡培养至 OD₆₀₀ ≈ 0.5。不同菌种生长速度不同, 注意及时测量 OD 值, 避免 OD 值过高。
- 2.2 将培养物转移至 50ml 离心管, 冰浴 20min 降温。以后的步骤中均需保持感受态细胞接近 0°C。所有离心管在加入细胞前需要在冰上预冷。
 - 2.3 4°C 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。**
 - 2.4 加入 10ml 冰冷的超纯水, 冰上重悬菌体。补加 40ml 超纯水, 混匀。4°C 3000g 离心 10min, 弃上清。
 - 2.5 加入冰冷的 10%甘油 2ml, 冰上重悬菌体。4°C 3000g 离心 10min, 弃上清。
 - 2.6 加入冰冷的 10%甘油 200μl, 冰上重悬菌体。-80°C 保存或立即使用。-80°C 冻存的感受态细胞转化效率可以保持 6 个月左右。

★关键步骤:

转化效率是决定基因编辑实验能否成功的关键。基因编辑实验需要较高的转化效率。

制备感受态注意事项:

- 1、 细菌状态。严格按照操作步骤扩增大肠杆菌。采用合适的培养瓶进行培养 (50ml 培养物应采用 200-250ml 三角瓶培养), 充分震荡, 确保细菌生长旺盛。切勿过度培养。
- 2、 低温。在感受态制备的全过程, 保持感受态细胞处于低温状态。所有使用的试剂均需预冷, 在冰上保存。
- 3、 超纯水。试剂中的杂质将严重影响转化效率。使用可靠的超纯水配置试剂。

第三部分：pFN-Cas9-K2 转化目标菌种及鉴定

试剂准备：

含 Kan+Str 的 LB 琼脂糖平板

含 Kan 的 LB 琼脂糖平板

无抗性 SOC 培养基

含 Kan+Str 的 SOC 培养基

含 Kan+Str 的 LB 培养基

1 pFN-Cas9-K2 转化

1.1 预冷电击杯。

1.2 冰上融化 pFG-sgRNA-HR 感受态细胞（来自第二部分）。

1.3 将 1 μ l pFN-Cas9-K2 质粒加入 50 μ l 感受态细胞，轻轻吹吸混匀，转入电击杯。

1.4 按照电转化仪推荐的条件进行转化。或者按照以下条件转化：

1.5 1.5KV，1mm 电击杯，电击 1 次。电击后电转仪显示电击时间大于 5ms 较为理想，电击时间小于 4.5ms 一般是感受态制备质量不高，需要重新制备感受态细胞。

1.6 加入 1ml SOC 培养基，30 $^{\circ}$ C 复苏培养 1h。

1.7 取 20 μ l 涂布 Kan+Str SOC 平板。30 $^{\circ}$ C 培养 14~16h。

*务必 30 $^{\circ}$ C 培养，高温将导致实验失败！

1.8 挑取单克隆，在 Kan+Str SOC 培养基中培养 12~14h。

2 克隆鉴定

在进行下一步前，我们推荐对挑取的克隆进行 PCR 鉴定，确定 2 个质粒均已转入细菌。您也可以跳过这步，直接挑取克隆进行基因编辑。

鉴定体系 1（pFG-sgRNA-HR 质粒鉴定）：

菌液 0.5 μ l

SCV Primer2 Mix 1 μ l

2 \times Taq PCR Mix 10 μ l

加水补足 20 μ l

鉴定体系 2 (pFN-Cas9-K2 质粒鉴定):

菌液 0.5 μ l

SCV Primer3 Mix 1 μ l

2 \times Taq PCR Mix 10 μ l

加水补足 20 μ l

反应程序:

95 $^{\circ}$ C 5min

95 $^{\circ}$ C 30sec

55 $^{\circ}$ C 30sec

72 $^{\circ}$ C 30sec

} 30 个循环

pFG-sgRNA-HR 质粒鉴定产物大小: 507bp

pFN-Cas9-K2 质粒鉴定产物大小: 503bp

第四部分：基因编辑及阳性克隆鉴定

试剂准备：

含 Kan+Str 的 LB 琼脂糖平板

含 Kan+Str 的 LB 培养基

- 1 取第三部分获得的克隆菌液 5 μ l 接种到 2ml Kan+Str LB 培养基中，接种上一步中的菌液 5ul，添加 30ul 诱导剂 1，30 $^{\circ}$ C 振荡培养约 18h。
- 2 取 5-10 μ l 诱导产物在含 Kan+Str 的 LB 琼脂糖平板上划线，30 $^{\circ}$ C 培养 14~16h。
- 3 挑取单克隆进行 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

基因编辑成功的转化子中含有卡那抗性的 pFN-Cas9-K2 质粒和链霉素抗性的 pFG-sgRNA-HR 质粒。

5.1 清除 pFG-sgRNA-HR 质粒：

(1) 将菌种 1:1000 接种到 2ml Kan 抗性的 LB 培养基，诱导剂 1 添加 30ul，诱导剂 2 添加 5 μ l，30 $^{\circ}$ C 震荡培养 12-16 小时。

(2) 在含 Kan 的 LB 平板划线分离单克隆，挑取单克隆接种到含 Kan 的 LB 培养基中，30 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时。

(3) 取菌液接种到含 Str 的 LB 平板，30 $^{\circ}$ C 培养 12-16 小时，不生长则清除质粒成功，反之则清除失败。

5.2 清除 pFN-Cas9-K2 质粒：

(1) 将已经清除 pFG-sgRNA-HR 质粒的菌种按 1:1000 接种到 2ml 无抗性 LB 培养基，37 $^{\circ}$ C 培养 16h。

(2) 在 LB 平板划线分离单克隆。

(3) 取菌液接种到含 Kan 的 LB 平板，30 $^{\circ}$ C 培养 20 小时，不生长则清除质粒成功，反之则清除失败。

(4) 保存已清除完成的菌种。

附录一 试剂配方

LB 培养基 (1L):

10g 胰蛋白胨

5g 酵母粉

5g NaCl

用 1L 水溶解, 高压灭菌。

SOC 培养基 (1L):

1. 20g 胰蛋白胨

5g 酵母粉

0.5g NaCl

加 950ml 水溶解。

2. 加 10ml 250mmol/L KCl 溶液。

3. 用 NaOH 调 pH 值至 7.0。

4. 用去离子水定容至 1L。

5. 高压灭菌。

6. 溶液在使用前, 加入 5ml 灭菌的 2 mol/L MgCl₂

7. 高压灭菌后冷却至 60°C 或 60°C 以下, 加 20ml 除菌的 1mol/L 的葡萄糖溶液混匀。

含 Kanamycin 的 LB 培养基:

在 LB 培养基中加入 Kanamycin 至终浓度为 50μg/ml。

含 Streptomycin 的 LB 培养基:

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

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

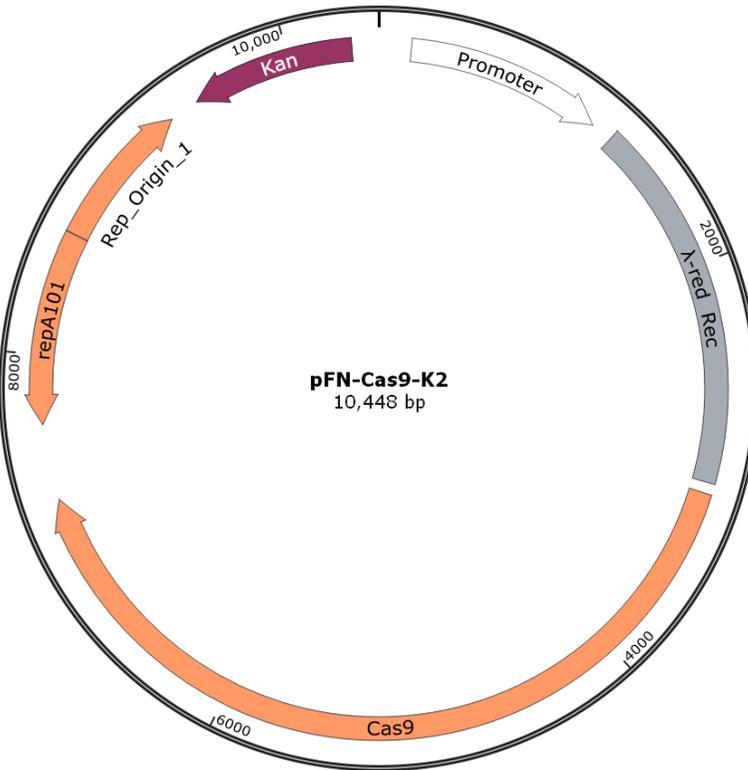
Str: Streptomycin

HR: Homologous Recombination

附录三 载体图谱

pFN-Cas9-K2

Created with SnapGene®



载体功能：可诱导表达 Cas9 蛋白， λ -Red 重组酶。

抗性：Kan

大小：10.448kb

鉴定引物：

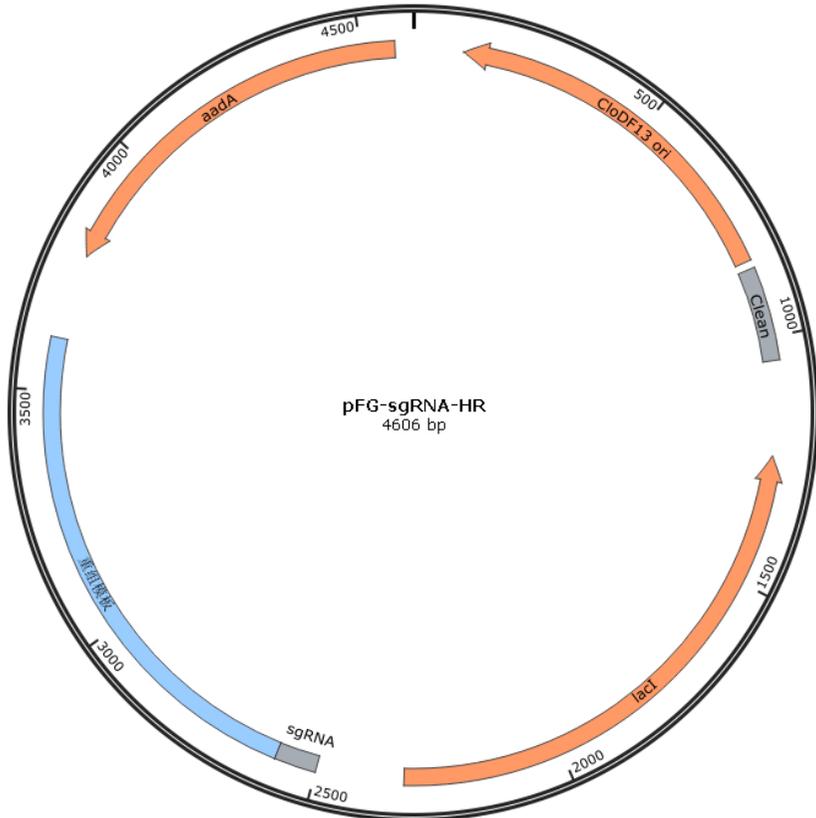
SCV-F3: cgccacactgattcatcagt

SCV-R3: aaatacgaaggatctgaggt

产物大小：503bp

pFG-sgRNA-HR

Created with SnapGene®



载体功能：表达 sgRNA，扩增重组模板

抗性：Str

大小：3.446kb（大约）

鉴定引物：

SCV-F2: cttctacagcgcggagaa

SCV-R2: agcctatggaaaaaccca

产物大小：507bp

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。

附录五 引物表

引物名称	序列 (5' -3')	用途
SCV-F1	ctatcatgccataccgcga	PCR 鉴定 pFG-sgRNA-HR 载体 克隆
SCV-R1	caccaaggtagtctggcaaa	
SCV-F2	cttctacagcgcggagaa	PCR 鉴定 pFG-sgRNA-HR 载体, 正确大小 507bp
SCV-R2	cctaggactgagctagctgt	
SCV-F3	cgccacactgattcatcagt	PCR 鉴定 pFN-Cas9-K2 载体, 正确大小 503bp
SCV-R3	aaatacggaggatctgaggt	

问题指南

<p>pFG-sgRNA-HR 载体构建鉴定都是阴性的。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、检查使用的琼脂糖凝胶是否是 2%的。凝胶浓度过低可能难以分辨阳性和阴性条带。 2、电泳检测扩增的重组片段大小是否正确。 3、重复一次看是否是同样的结果。 4、联系技术支持。
<p>pFG-sgRNA-HR 测序有突变。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、PCR 扩增法有可能出现这个问题。可能是因为 PCR 扩增法本身是一个 over-lap PCR 反应，也有可能产生突变。
<p>pFN-Cas9-K2 和重组模板转化感受态后不长克隆或克隆极少</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、检测感受态转化效率。转化效率过低将导致基因编辑失败。 2、检查重组模板设计是否正确。 3、联系技术支持。
<p>pFN-Cas9-K2 和重组模板转化感受态后克隆很多，没有阳性克隆。</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、检测两种抗生素是否足量、有效。 2、检测 sgRNA 靶点的切割活性。切割活性低的靶点会导致大量阴性克隆出现。可参考 PC1380 和 PC1400 试剂盒检测靶点切割效率。 3、联系技术支持。
<p>抗性清除失败</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1、清除 pFG-sgRNA 质粒需要在 30℃进行。否则可能导致 pFG-sgRNA 质粒不能清除。 2、务必首先清除 pFG-sgRNA 质粒。

技术支持联系方式:

电话: 023-67630383

邮箱: tech@inovogen.com

微信下载电子
说明书



重庆英茂盛业生物科技有限公司

网址: www.inovogen.com

邮箱: order@inovogen.com

电话: 023-62495135