

CRISPR Cas9 基因敲除试剂盒

产品说明书

本说明书适用于以下产品：

货号	货号
Cas9 基因敲除试剂盒	CR0001
pCas9/gRNA1 载体	CR1001
pTYNE 验证载体	CR1011

北京英茂盛业生物科技有限公司
北京市昌平区沙河镇青年创业大厦 B-916
Tel: 010-62495135
Email: order@inovogen.com
Web site: <http://www.inovogen.com>

产品内容

Cas9 基因敲除试剂盒 货号 CR0001

内容	包装
pCas9/gRNA1 载体	3ug in TE Buffer
pTYNE 验证载体	3ug in TE Buffer
pCas9-P 阳性对照载体	3ug in TE Buffer
pCas9-N 阴性对照载体	3ug in TE Buffer

pCas9/gRNA1 载体 货号 CR1001

内容	包装
pCas9/gRNA1 载体	3ug in TE Buffer

ppTYNE 验证载体 货号 CR1011

内容	包装
pTYNE 验证载体	3ug in TE Buffer

保存条件:

-20℃冻存

所需其他材料

- EcoRV 限制性内切酶。T4 DNA ligase。
- dH5a、Top10 或其他常用感受态细胞。
- 细胞培养基及其他细胞培养相关试剂。
- HEK293T 细胞或 293V 细胞 ([货号 C1201](#))。
- 转染试剂 (Polyfect-V [货号 P2010-1](#))。

CRISPR Cas9 基因敲除原理

CRISPR (clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats)是一种来自细菌降解入侵的病毒 DNA 或其他外源 DNA 的免疫机制。在该机制中, Cas 蛋白 (CRISPR-associated protein) 含有两个核酸酶结构域, 可以分别切割两条 DNA 链。一旦与 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA 结合形成复合物, Cas 蛋白中的核酸酶即可对与复合物结合的 DNA 进行切割。切割后 DNA 双链断裂从而使入侵的外源 DNA 降解。

来自 *Streptococcus pyogenes* 的 Cas9 由于 PAM 识别序列仅为 2 个碱基 (GG), 几乎可以在所有的基因中找到大量靶点, 因此得到广泛的应用。Cas9 蛋白在目前测试过的几乎所有生物和细胞中均有活性, 包括细菌、酵母、植物、鱼、以及哺乳动物细胞。识别 RNA (gRNA) 可以通过载体表达或者化学合成后与 Cas9 蛋白共同进入细胞, 对特异 DNA 序列剪切, 从而促使 DNA 发生 NHEJ (nonhomologous end-joining) 导致的基因缺失或同源重组, 实现基因敲除。

操作说明

CRISPR/Cas9 基因敲除载体构建

引物列表:

引物名称	序列 (5' -3')	用途
gRNA-F	GACTATCATATGCTTACCGTAACT	pCas9/gRNA1 载体鉴定和测序
gRNA-R	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA	pCas9/gRNA1 载体鉴定

所需试剂:

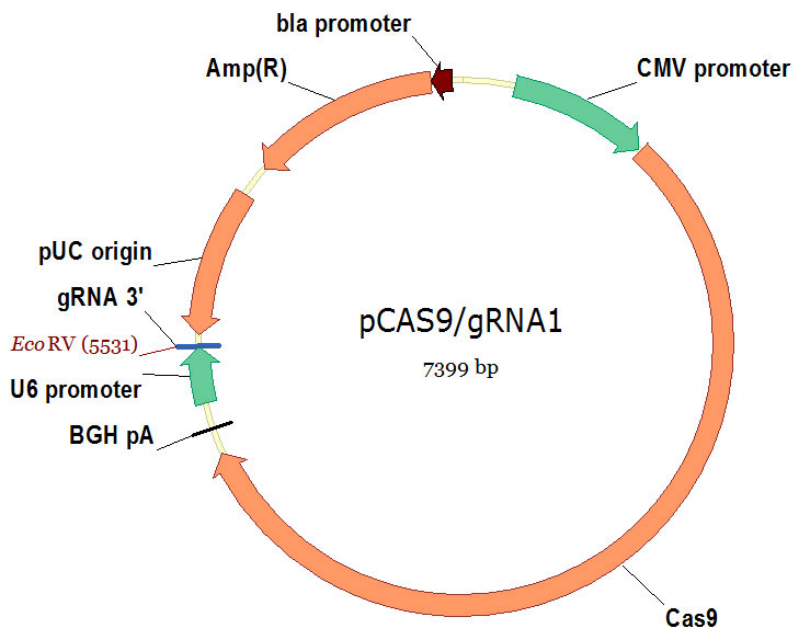
EcoRV 核酸内切酶;

T4 DNA 连接酶;

dH5a、Top10 或其他常用感受态细胞;

DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒。

pCas9/gRNA1 载体



pCas9/gRNA1 载体可在哺乳动物细胞内同时表达人源化 Cas9 蛋白和 gRNA，只需转染一个质粒就能实现对靶基因的切割。

载体中的 CMV 启动子可在绝大多数哺乳动物细胞中高效表达。人源化的 Cas9 蛋白现已证实在人，大鼠和小鼠细胞中表达良好。U6 启动子属于 III 类 RNA 启动子，有精确地转录起始位点和终止位点，可以准确的

转录出 gRNA，并且在各种动物细胞中都表达良好。识别的靶序列由 U6 启动子起始信号 G，19nt 靶点以及 PAM 序列 NGG 构成，因此识别靶点为 GN₂₀GG。

简要步骤

- 1、设计合成寡核苷酸链。
- 2、将寡核苷酸链退火为双链。
- 3、EcoRV 酶切线性化 pCas9/gRNA1 载体。
- 4、寡核苷酸链与 pCas9/gRNA1 载体连接并转化感受态细胞。
- 5、PCR 鉴定阳性克隆并测序。

注：

对于实验中的很多步骤，您可以使用您实验室中常用的方法，或者您的实验经验证实有效的方法。对于酶切、DNA 纯化以及转化等步骤，您可以参照《分子克隆实验指南》进行，也可以参照您购买的试剂盒中生产商提供的使用说明进行。

1 基因敲除靶点和寡核苷酸设计

1.1 基因靶点选择

CRISPR/Cas9 基因敲除系统的靶点由 19 个碱基构成。靶点前面为转录起始信号 G。靶点后面为 PAM 序列 NGG。因此可作为靶点的序列为 GN₂₀GG。

在设计基因敲除时，在基因的起始密码子附近及下游查找 GN₂₀GG 序列作为靶点。以人的 MET 基因(GeneID: 4233)为例，可选的靶点如下：

Start Codon	靶点 1
ATAAACCTCTCATA	<u>AATGAAGGCCCCCGCTGTGCTTGCACCTGG</u> CATCCTCGTGCTCCTGTTTACCTTGGTGCAGAGGAGC
靶点 2	<u>AATGGGGAGTGTAAGAGG</u> CACTAGCAAAGTCCGAGATGAATGTGAATATGAAGTATCAGCTTCCCAACTTCACCGCGGA AACACCCATCCAGAATGTCATTCTACATGAGCATCACATTTTCCTTGGTGCCACTAACTACATTTATGTTTTAAATGAGG AAGACCTTCAGAAGGTTGCTGAGTACAAGACTGGGC

靶点挑选要点：

- a)：Cas9/gRNA 基因敲除原理是对基因组 DNA 序列切割后引发 DNA 修复，产生 DNA 序列缺失突变。因此基因敲除靶点应设计在起始密码子附近（包括起始密码子）或者起始密码子下游的外显子范围内。
- b)：现有的研究显示不同 Cas9/gRNA 靶点在基因敲除效率上有较大差异，但对其原因尚不清楚。因此同时设计构建 2-3 个靶点的基因敲除载体再从中选出敲减效果较佳的靶点是必要的。
- c)：现在的研究表明靠近 PAM 的碱基对靶点的特异性很重要，前 7-12 个碱基的错配对 Cas9 切割效率影响较小。而碱基错配的影响在不同靶序列中差别很大，有的靶序列特异性较高而有的较差。将设计好的靶点序列在基因库中进行 BLAST 检测是必要的。同时多设计构建 2-3 个靶点并且在检测敲除效率的同时检测非特异性切割也有助于获得理想的基因敲除效果。

1.2 pCas9/gRNA1 基因敲除载体插入片段设计

干扰靶点序列通过 EcoRV 位点插入 pCas9/gRNA1 载体中。

插入完成后完整的 gRNA 表达框序列如下：

U6 promoter

TGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCC
TATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGT
AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTA

gRNA-F primer

TGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA

Targeting sequence

gRNA sequence

gRNA-R primer

AAGGACGATACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCG
TTATCAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

插入前的 gRNA 表达框序列如下：

U6 promoter

TGTACAAAAAGCAGGCTTTAAAGGAACCAATTCAGTCGACTGGATCCGGTACCAAGGTCGGGCAGGAAGAGGGCC
TATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGATAATTAGAATTAATTTGACTGT
AAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTA

gRNA-F primer

TGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGA

EcoRV

AAGGACGATCAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTT

插入寡核苷酸序列设计：

正向序列

5' GAAACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT3'

反向序列

3' CTTTGTGGCNNNNNNNNNNNNNNNNNNNCAAAATCTCGATCTTTATCGTTCAATTTATTCCGATCAGGCAA5'

设计时将 19nt 的基因敲除靶点序列替换上面序列中的 N 即可。

以前面 MET 基因的靶点 1 为例，设计插入寡核苷酸序列方法如下：

1、基因敲除 19nt 靶序列为：CCCCGCTGTGCTTGACC。

2、需合成的正向寡核苷酸序列为：

5' GAAACACCGCCCCGCTGTGCTTGACCCTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTT3'

3、根据正向寡核苷酸序列生成反向互补序列，即为反向寡核苷酸序列：

5' AACGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAACGGTGCAAGCACAGCGGGGGCGGTGTTTC3'

合成寡核苷酸注意事项：

- 合成的寡核苷酸质量对于能否成功构建载体至关重要。请务必委托值得信赖的公司进行合成。
- 必须 PAGE 纯化寡核苷酸。

2 pCas9/gRNA 基因敲除载体连接和鉴定

2.1 寡核苷酸退火

用水将寡核苷酸稀释为 100 μM 。按以下体系配制退火反应体系：

正义寡核苷酸 (100 μM)	5 μl
反义寡核苷酸 (100 μM)	5 μl
NaCl	100 mM
Tris-Cl pH7.4	50mM
加水补足	50 μl

将配制好的退火反应缓冲液重复混合，短暂离心后放置 PCR 仪上，运行以下程序：90 $^{\circ}\text{C}$ 4min, 70 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 40 $^{\circ}\text{C}$ 10min, 25 $^{\circ}\text{C}$ 10min。退火后的寡核苷酸可以立刻使用或者在-20 $^{\circ}\text{C}$ 长期保存。

2.2 酶切线性化载体

用 EcoRV 酶切 2 μg pCas9/gRNA1 载体。酶切方法和体系参照您购买的内切酶说明书或者按照您的实验室习惯的方法进行。

通常情况下用大约 20-30 单位的酶大约 3 小时可以酶切完全。

酶切后我们建议用琼脂糖凝胶回收线性化载体。将回收后的线性化载体定量，通常线性化载体的工作浓度为 50-100ng/ μl 。

注意事项：

- 1、在后面的连接体系中，我们使用的载体浓度为 50-100ng/ μl 。如果您回收后的载体浓度不在该范围，请调整连接体系中的载体体积，确保载体用量和推荐用量一致。
- 2、EcoRV 酶切后的载体为平末端，有可能发生载体自连。对回收的线性化载体进行去磷酸化处理可以减少载体自连发生。但载体去磷酸化也会降低连接效率，我们一般不推荐进行去磷酸化处理。

2.3 连接

用水将退火后双链寡核苷酸(10 μM)稀释 100 倍备用。按照以下体系配制连接反应体系：

T4 DNA 连接酶	5U
EcoRV	5U
线性化载体	2 μl
稀释 100 倍后双链寡核苷酸	1 μl
10 \times 连接酶 Buffer	1 μl
50%PEG4000	1 μl
加水补足	10 μl

反应条件：22 $^{\circ}\text{C}$ 30min, 37 $^{\circ}\text{C}$ 15min。

注：

*平末端连接效率较低，在连接体系中添加 PEG4000 可以提高连接效率。

*在连接体系中添加 EcoRV 酶可以显著提高阳性率。

2.4 转化感受态细胞及 PCR 鉴定阳性克隆

用连接后产物转化大肠杆菌感受态细胞。市场上常见的大肠杆菌感受态细胞（例如 Top10, DH5 α ）均可以使用，您也可以按照分子克隆中的方法自己制备感受态细胞。转化方法按照供应商的说明书或者您实验室中常用的方法进行。

在氨苄抗性的琼脂平板上 37 $^{\circ}$ C 培养转化后细菌，大约 14-16 小时后，平板上出现单个细菌菌落。挑取多个菌落至氨苄抗性的培养基中培养后进行鉴定。

鉴定方法可以采用 PCR 鉴定。

克隆 PCR 鉴定：

鉴定引物：

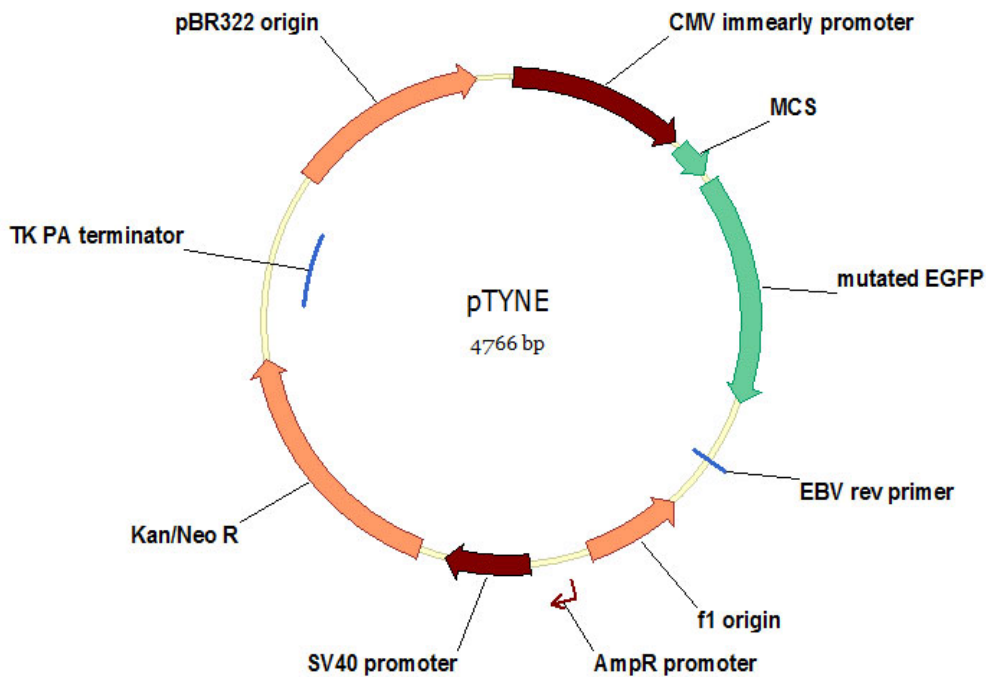
gRNA-F GACTATCATATGCTTACCGTAACT

gRNA-R CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA

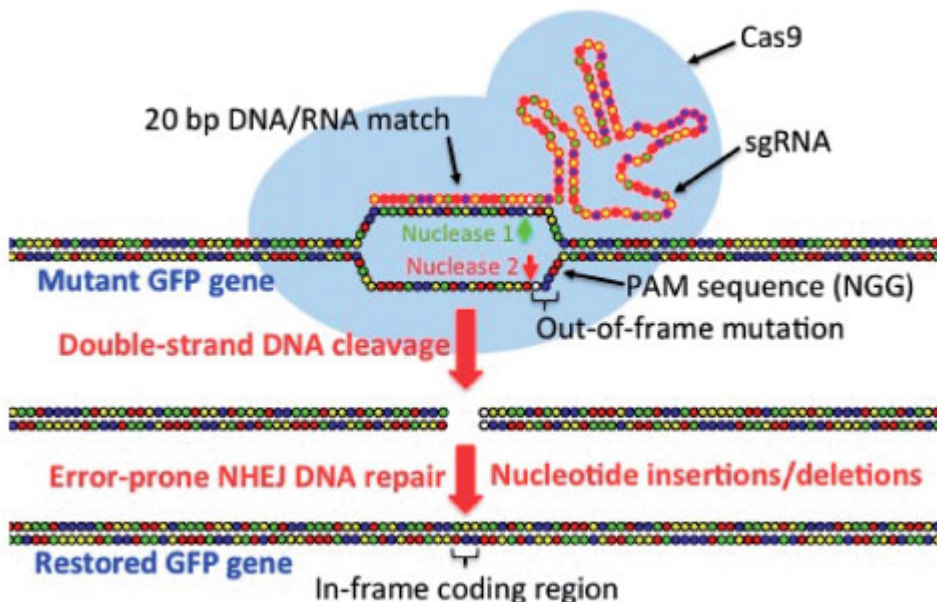
阳性克隆鉴定产物大小为 190bp，阴性克隆无条带。鉴定的阳性克隆用引物 gRNA-F 测序。

构建好的 pCas9/gRNA 载体直接转染细胞，进行基因敲除。

3 基因敲除验证载体 pTYNE 构建



为了方便验证基因敲除靶点的效率及特异性，我们设计了验证载体 pTYNE。该载体中含有起始密码子移位突变，在未发生 DNA 剪切和突变时不能有效表达 EGFP 蛋白，不出现荧光。当 pCas9/gRNA1 载体表达出的 Cas9/gRNA 复合物实现对 pTYNE 质粒的切割后，DNA 断裂引发的 NHEJ 作用即可实现对 EGFP 蛋白的修复，从而产生荧光。通过荧光细胞数量多少，可以反映基因敲除效率的高低。pTYNE 载体也可以用于 TALEN 或 ZNF 基因敲除载体的验证。



原理示意图：Cas9/gRNA 复合物修复 pTYNE 载体上的 GFP 基因

3.1 基因敲除靶点克隆到 pTYNE 载体

pTYNE 载体多克隆位点序列:

```

...CMV promoter→
...GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTGTGAACCGTCAGATC

      NheI           Start codon           SacI           PstI           KpnI
      CGCTAGC      CGAAGATGCCACCATGGGCCACCATGGCTCGAGCTCAAGCTTGAATTCGCAAGTCGACGGTACCG
      Apal      BamHI
      Sacl      SmaI
CGGGCCCCGGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATAGAAGCGGTGGGTCTGGCGCGGAGGATCTGGGGCCGCAT
      NotI
  
```

EGFP coding sequence→

```

GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC
GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC
TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG
CCC...
  
```

pTYNE 验证载体构建设计方法:

- 1、将含有基因敲除靶点的序列通过载体上的酶切位点插入到 pTYNE 载体中。
- 2、插入序列中可以含有或者不含启动密码子 ATG。当插入序列中由 ATG 时，应仔细核对 EGFP 基因的读码框，避免插入序列中的 ATG 与 EGFP 基因的读码框一致，从而不能实现 pTYNE 载体的验证功能。
- 3、一般插入含有基因敲除靶点的几十个碱基对的序列即可对基因敲除效率进行验证，也可以是包含几个敲除靶点的 100-200bp 序列。插入序列可以人工合成或者 PCR 扩增获得。
- 4、载体的酶切和连接方法与一般的载体构建无异，请按照您的实验室常规操作方法进行即可。

3.2 pTYNE 载体阳性克隆 PCR 鉴定

鉴定引物:

TY-F TGGGAGGTCTATATAAGCAGAG

TY-R CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG

阴性克隆 PCR 产物大小: 254bp。阳性克隆 PCR 产物大小: 254bp+插入序列大小。

测序引物: TY-F。

4 检测 pCas9/gRNA1 载体基因敲除效果

pCas9/gRNA1 载体基因敲除的效果可以通过对靶点的测序或者 T7 内切酶进行检测(1)。也可以用 pTYNE 载体进行直观的检测。

我们用 293T 细胞为例，检测 pCas9/gRNA1 阳性对照载体的基因敲除效果。

pCas9/gRNA1 阳性对照载体 (pCas9-P) 靶序列: CTTCGAATTCTGCAGTCGA。该靶点位于 pTYNE EGFP 基因上游。

pCas9/gRNA1 阴性对照载体 (pCas9-N) 靶序列: ATCGACTAGCCACTCAGAC。该序列为随机序列。

实验步骤:

1、293T 细胞在转染前 24 小时铺到 6 孔板，共设 3 个组。

2、转染分组如下:

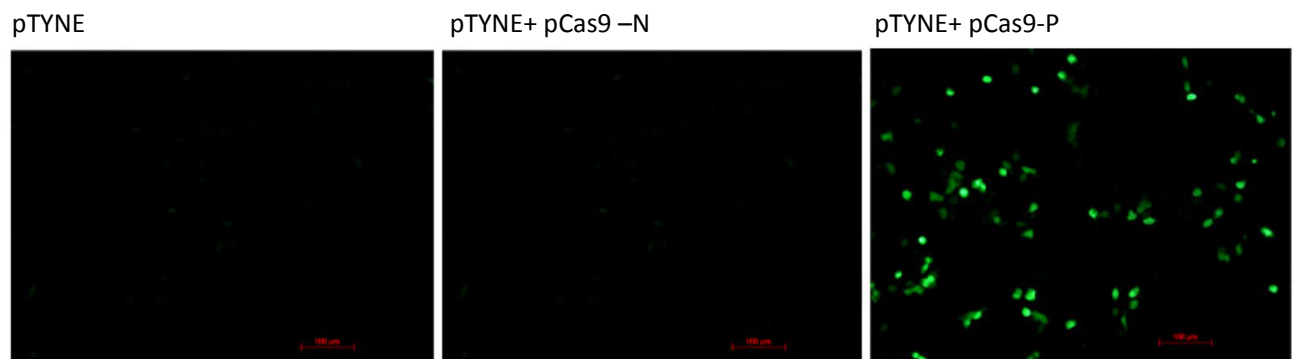
1: pTYNE

2: pTYNE+ pCas9 -N

3: pTYNE+ pCas9 -P

用 Polyfect-V 转染试剂按照说明书进行转染。

3、转后 48-72 小时进行观察，如果基因敲除成功，第 3 组应该出现荧光。第 1、2 组不出现荧光。



1. Kim,H.J., Lee,H.J., Kim,H., Cho,S.W. and Kim,J.S. (2009). Targeted genome editing in human cells with zinc finger nucleases constructed via modular assembly. *Genome Res.*, 19, 1279–1288.

5 问题指南

pCas9/gRNA1 载体构建问题	
转化后克隆很少或没有	<ol style="list-style-type: none"> 1、合成引物质量差。解决方法：重新合成引物。 2、退火不成功。解决方法：严格按照说明书退火。 3、纯化后载体浓度过低。解决方法：重新酶切纯化载体，连接前对载体定量。 4、连接效率低。解决方法：设立阳性对照组，排除连接体系中酶、Buffer 及其它成分的问题。 5、转化效率低。解决方法：设立阳性对照组，检测转化效率，必要时更换感受态细胞。
转化后克隆很多但没有阳性克隆	<ol style="list-style-type: none"> 1、载体酶切线性化不完全。解决方法：重新酶切载体，琼脂糖凝胶回收酶切载体。 2、载体自连过多。解决方法：降低连接体系中的载体量；用磷酸酶对载体进行去磷酸化处理。
测序没有正确的克隆	<ol style="list-style-type: none"> 1、合成引物质量差。解决方法：重新合成引物。
pTYNE 载体验证问题	
构建的 pTYNE 载体转染后有荧光	<ol style="list-style-type: none"> 1、构建的 pTYNE 载体在 EGFP 基因上游有匹配的启动密码子。解决方法：重新设计插入片段，确保 ATG 与 EGFP 基因的读码框不一致。
pTYNE+ pCas9-P 共转染组无荧光	<ol style="list-style-type: none"> 1、转染效率低。解决方法：设立阳性对照组确定转染效率。重新提取转染质粒或更换转染试剂。 2、基因敲除效率低。解决方法：重新设计敲除靶点。