

BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)

产品编号	产品名称	包装
D7085	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)	10次

产品简介:

- 碧云天生产的BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter), 即BeyoCRISPR™快速构建试剂盒(橙红色荧光蛋白报告基因), 是基于CRISPR/Cas9基因编辑技术而研发的用于构建表达Cas9和特定guide RNA (gRNA)的哺乳动物表达质粒的快速构建试剂盒。用户仅需按照使用说明设计并合成靶基因特异性的寡核苷酸(Target-specific DNA oligos), 然后经过退火形成双链后, 连接至本试剂盒提供的线性化载体中, 即可构建用于目的基因编辑的完整质粒。质粒构建成功并转染哺乳动物细胞后, 可以通过mOrange2的橙红色荧光进行Cas9和gRNA表达阳性细胞的筛选, 阳性细胞中通常就会出现预期的目的基因的基因编辑。
- CRISPR/Cas9是一项突破性的基因组编辑技术, 操作便捷, 应用广泛。CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种原核生物利用RNA引导的DNA核酸酶Cas9对外源的噬菌体或病毒核酸进行基因沉默的获得性免疫系统(Adaptive immune system), 后续在此基础上逐渐发展为广泛应用于原核和真核生物的越来越成熟的基因编辑技术。该技术能够在gRNA引导下通过Cas9对原核和真核生物的基因组DNA的靶向序列进行位点特异性的切割, 然后通过易错修复(Error-prone repair)或同源重组(Homologous recombination)在切割位点改变或插入序列来产生移码突变, 从而实现基因编辑而实现基因敲除。其中gRNA确保识别位点的特异性。随着CRISPR技术的发展, 该技术目前不仅可以实现基因敲除, 还可以实现基因的点突变、插入突变等多种突变方式, 特别是在临床应用方面可以用于修复不良突变等[1,2]。同时通过构建没有内切酶活性的Cas9突变体dCas9, 通过与dCas9直接融合表达或间接招募转录激活或转录抑制因子, 可以实现sgRNA靶向基因的转录激活或转录抑制。
- CRISPR/Cas9系统由Cas9 Nuclease和gRNA复合物所组成。gRNA, 也称sgRNA (Single guide RNA), 由18-20bp与靶基因序列互补的CRISPR RNA (crRNA)序列以及能与Cas9特异性结合的Trans-activating crRNA (tracrRNA)序列组成。gRNA通过与靶序列之间的互补配对, 将Cas9 Nuclease引导至靶DNA, Cas9 Nuclease C端的与PAM (Proto-spacer adjacent motif)相互作用的结构域(PAM-interacting domain)识别富含G碱基(5'-NGG-3')的PAM序列, 在HNH和RuvC两个结构域的协同作用下, 在PAM序列NGG上游大约三个碱基处产生DNA的双链断裂(Double-strand break, DSB)。如果该双链DNA断裂发生在细胞内, 在细胞DNA修复过程中会导致基因靶位点处的插入、删除或替换, 从而可能产生移码突变, 导致目的基因的缺失突变(图1) [1]。

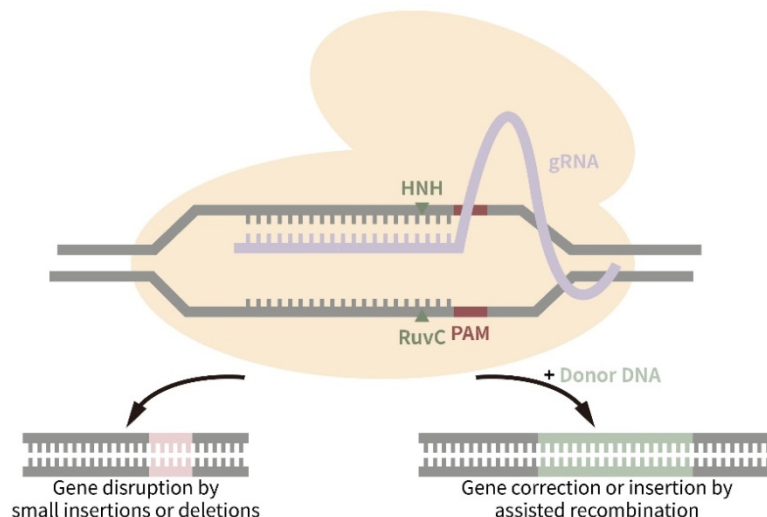


图1. CRISPR/Cas9基因编辑示意图。

- 本试剂盒中提供的Linearized pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2同时表达靶向目的基因的gRNA、Cas9, 以及荧光蛋白mOrange2。mOrange2是一种极其明亮的橙红色荧光蛋白, 与mOrange蛋白相比, 其蛋白稳定性更高, 可以利用mOrange2对表达Cas9和gRNA的细胞进行流式细胞分选或单细胞克隆筛选。本质粒在Cas9和mOrange2的编码序列之间含有T2A肽序列。T2A是一个可以被理解为含有18个氨基酸残基(EGRGSLTCTGDEENPGP)的‘自剪切’小肽, 但实际的过程并不是发生自剪切, 而是使核糖体跳过T2A等2A元件C端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用, 最终导致2A序列末端和下游产物分离。上游Cas9蛋白的C端将会添加一些额外的T2A残基(GSGEGRGSLTCTGDEENPG), 而下游mOrange2蛋白的N端将会有额外的脯

氨酸。在T2A肽的N端加入GSG序列，可提高剪切效率。

- pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2质粒为氨苄青霉素抗性。
- pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2质粒图谱如下。

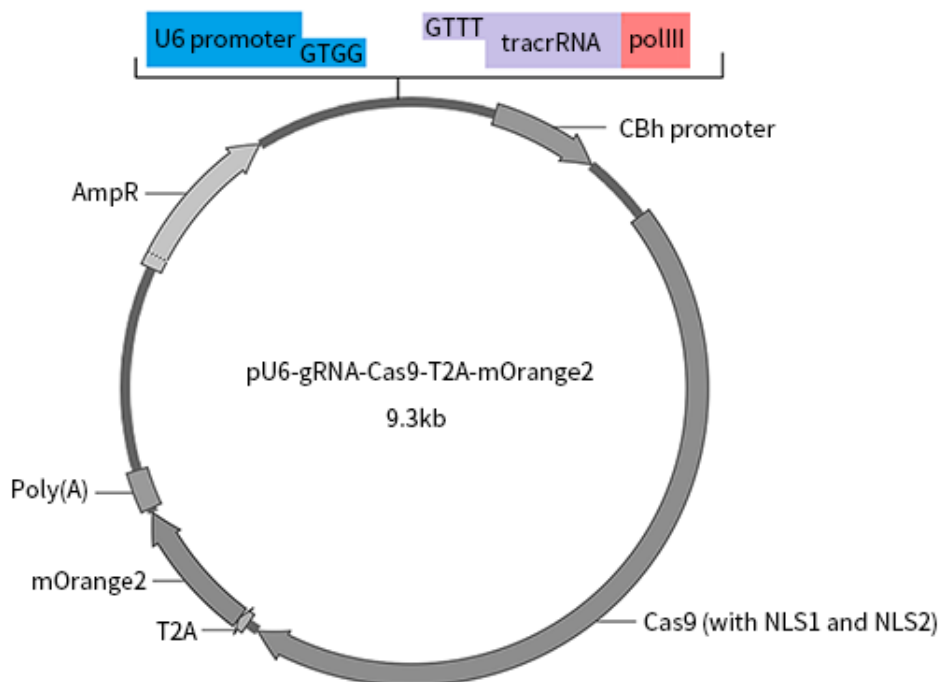


图2. pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2质粒图谱。

- 碧云天BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)的连接效果如图3所示。

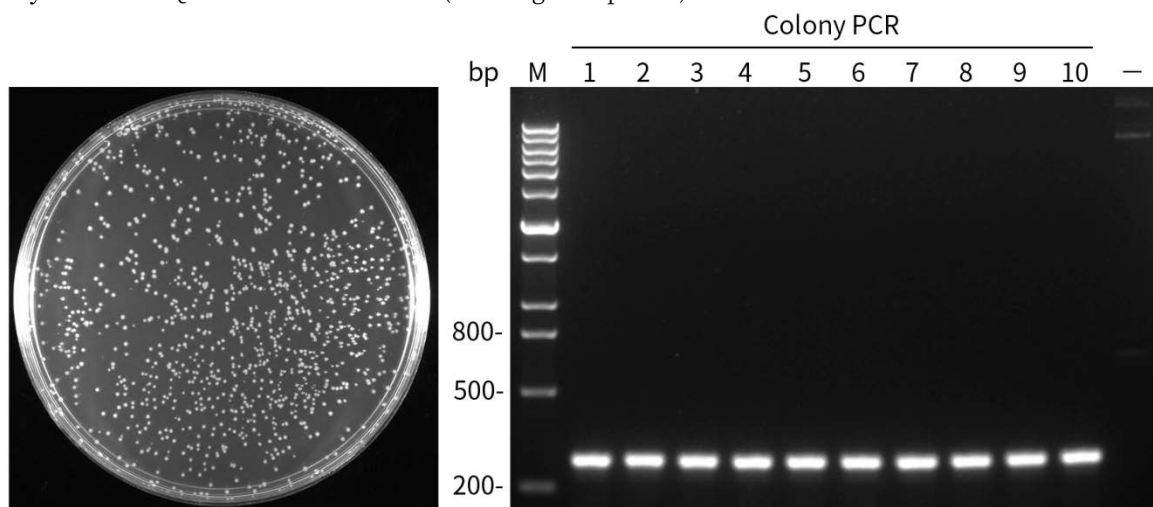


图3. 碧云天BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter) (D7085)的连接实测效果图。如图所示，左侧为使用本试剂盒连接后转化DH5α感受态细胞后涂板获得的LB平板的实测效果图，右侧为菌落PCR鉴定的结果。在10μl反应体系中，将2μl Linearized pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2 (15ng/μl)和1μl ds Control Oligo (50nM) (试剂盒中提供的为10μM，需事先用超纯水或ddH₂O稀释)混合，然后加入1μl的10X Quick Construction Buffer，0.5μl的Quick Ligase，并用超纯水或ddH₂O补足至10μl，在室温下孵育10分钟后，取10μl转化至100μl的DH5α感受态细胞中。实验结果表明，使用本试剂盒在室温下连接10分钟即可得到较多的克隆数，且阳性率可达100%。菌落PCR引物为hU6-F Primer和sgRNA oligo reverse primer，PCR扩增片段大小为274bp。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2质粒可使用的测序引物序列如下：
hU6-F Primer: 5'-GAGGGCCTATTCCCATGATT-3'

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D7085-1	Linearized pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2 (15ng/μl)	20μl
D7085-2	Ultrapure Water	2ml
D7085-3	10X Quick Construction Buffer	100μl

D7085-4	Quick Ligase	20μl
D7085-5	ds Control Oligo (1μM)	10μl
D7085-6	hU6-F Primer (10μM)	50μl
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存，两年有效。

注意事项：

- 对于普通的转化大肠杆菌的操作，不必对连接产物进行纯化，连接产物可以直接用于转化。但用电转方法转化大肠杆菌时，通常宜先用DNA纯化试剂盒或酚氯仿抽提方法等纯化DNA，然后再进行电转。
- 普通连接反应不必进行凝胶电泳观察。如果需要对于连接产物进行凝胶电泳观察，推荐先在65°C孵育10分钟使T4 DNA Ligase失活，以避免T4 DNA Ligase和DNA结合导致的条带位置迁移(Band shift)。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 靶DNA序列的选择和单链DNA oligos的设计。

a. 靶DNA序列的选择，请参考图4。

- 长度：靶DNA序列一般长度为20个核苷酸，其3'端必须紧邻着PAM序列(NGG)。
- 同源性：确保靶DNA序列与其他序列没有显著的同源性，以避免脱靶效应。
- 方向：靶DNA序列的正义链或反义链均可选择。

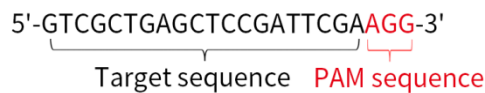


图4. DNA序列示例。

b. 单链DNA oligos的设计，请参考图5。

为了将双链oligo连接至Linearized pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2载体中，必须按照以下原则设计oligos。

Forward: 5'-CACCG-20bp-3'

Reverse: 5'-AAAC-20bp (Copy bottom strand 5'→3')-C-3'

注：如果靶序列的第一个碱基不是G，则必须在5'的overhangs后加一个G以供U6启动子转录起始。



图5. 单链DNA oligo示例。

2. 合成双链oligo。

a. 退火oligos。

- 把待退火的DNA oligos用Ultrapure Water或ddH₂O配制成100μM。
- 参考下表设置反应体系。

Reagent	Volume
sgRNA oligo forward (100μM)	1μl
sgRNA oligo reverse (100μM)	1μl
10X Quick Construction Buffer	1μl
Ultrapure Water	7μl
Total volume	10μl

按照上述加入各种试剂，混匀。如果所用的PCR仪没有热盖，滴加矿物油(Mineral oil)以防止蒸发。

注：此时oligos的浓度为10μM。

(c) 参考下表设置PCR仪进行退火反应。

Step	Temperature	Time	Note
1	95°C	2min	让oligos充分变性
2	-0.1°C/8sec, to 25°C	About 90min	退火
3	4°C	Hold	暂时存放

注1：每8秒下降0.1°C，降至25°C的程序设置，以Bio-Rad的T100为例：1. 95°C, 2:00; 2. 95°C, 0:08, -0.1°C per cycle;

3. GOTO step 2, 700X; 4. 4°C, ∞。

注2: 如果所用的PCR仪不具备下降0.1°C的功能, 也可以设置为每90秒下降1°C。程序设置以Bio-Rad的T100为例: 1. 95°C, 2:00; 2. 95°C, 1:30, -1°C per cycle; 3. GOTO step 2, 70X; 4. 4°C, ∞。

注3: 如果条件有限, 也可以将水浴锅加热至95°C, 把PCR管放在水浴锅中, 或者把煮沸的热水加入到保温杯或保温瓶中, 待水温降到95°C时放入PCR管。所用水量控制在1-2小时内自然降温至25°C左右。此方法的退火效果可能会比使用PCR仪略差一些。

(d) 退火结束后可以稀释后直接用于连接反应, 也可以在-20°C冻存备用。

b. 制备50nM双链oligo工作液。

将步骤2a中所获得产物10μM的双链oligo用Ultrapure Water稀释20倍至500nM, Vortex充分混匀。如需长期储存, 可将500nM的双链oligo原液储存于-20°C。将500nM双链oligo原液稀释10倍, 制备成50nM双链oligo工作液。

注1: 冷冻的双链oligo需要放在冰上解冻。

注2: 50nM双链oligo工作液不适合长期存放, 建议现用现配。

注3: 如果双链oligo的温度高于室温, 则会导致部分DNA变性, 克隆效率降低, 建议重新制备。

3. 连接反应。

a. 参考下表设置连接反应体系。

Reagent	Volume
Linearized pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2 (15ng/μl)	2μl
50nM ds oligo	1μl
10X Quick Construction Buffer	1μl
Ultrapure Water	5.5μl
Quick Ligase	0.5μl
Total Volume	10μl

b. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

c. 室温(20-25°C)孵育连接5-10分钟。

d. 反应完毕后, 将反应体系置于冰上, 然后就可以转化至感受态。

4. 转化至DH5α超级感受态细胞(D1031)。

a. 解冻感受态细胞。取感受态细胞放置冰浴或冰水浴中融化, 通常需要5分钟以上的时间。解冻后须尽量在10分钟内使用, 放置时间过长会影响转化效率。

b. 取一管感受态细胞, 加入步骤3中获得的连接产物, 轻轻弹击管底约2-3次或轻轻晃动约2-3次以混匀, 立即冰浴静置30分钟。

注: 所用DNA体积通常不宜超过感受态细胞体积的10%, 混合时不得使用移液器进行吹打。

c. 热激处理。将冰浴放置的离心管快速置于42°C水浴中, 静置热激45秒。随后立即转移至冰水浴中静置2分钟以快速冷却至接近零度。热激及转移至冰浴过程中切勿晃动离心管。

d. 复苏培养。加入900μl不含抗生素的LB培养基, 颠倒数次混匀, 37°C摇床约150rpm复苏培养1小时。

e. 收菌涂板。约5000×g室温离心1分钟, 沉淀细菌, 吸除约900-950μl上清, 余下约50-100μl上清。用移液器轻轻吹打并重悬菌体, 随后涂布到含氨苄抗生素的LB平板上。

f. 将LB平板倒置放于37°C培养箱培养过夜。

5. 克隆分析。

a. 选取5-10个菌落, 在含100μg/ml氨苄抗生素的LB培养基中37°C培养过夜。

b. 抽提质粒DNA, 推荐使用质粒小量抽提试剂盒(D0003/D0005)。

c. 使用试剂盒中提供的hU6-F Primer对重组载体进行测序, 通过测序确定双链oligo是否成功插入至载体及其方向是否正确。

d. 也可通过菌落PCR鉴定, 引物设计可以一端为hU6-F Primer, 另一端为您自己的sgRNA oligo reverse primer, 片段大小约为274bp。

e. 不建议使用限制性内切酶进行分析, 因为插入的双链oligo较小。

f. 最终通过测序验证插入片段是否正确。

6. 哺乳动物细胞系的转染。

推荐使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)或Lipo6000™转染试剂(C0526)。转染24-48小时后, 即可观察到细胞mOrange2荧光。

按照前文所述, 我们将ds Control Oligo克隆至Linearized pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2, 得到了pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2-Control, 转染后表达效果请参考图6。

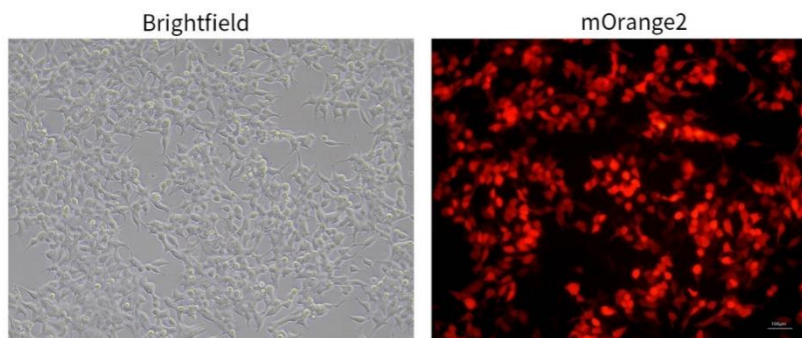


图6. pU6-gRNA-Cas9-T2A-mOrange2-Control质粒使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片，右侧为荧光照片。

7. 基因组编辑突变检测。

推荐使用基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)。

参考文献：

1. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, et al. Cell. 2014. 156(5):935-49.
2. Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0526-0.5ml	Lipo6000™转染试剂	0.5ml
C0526-1.5ml	Lipo6000™转染试剂	1.5ml
C0526-7.5ml	Lipo6000™转染试剂	5×1.5ml
C0533-0.5ml	Lipo8000™转染试剂	0.5ml
C0533-1.5ml	Lipo8000™转染试剂	1.5ml
C0533-7.5ml	Lipo8000™转染试剂	5×1.5ml
D0508S	基因组编辑突变检测试剂盒	25次
D0508M	基因组编辑突变检测试剂盒	100次
D0510S	FnCas12a (Cpf1)	100pmol
D0510M	FnCas12a (Cpf1)	500pmol
D0510L	FnCas12a (Cpf1)	2000pmol
D0511S	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50pmol
D0511M	Cas9 Nuclease (SpCas9)	250pmol
D0511L	Cas9 Nuclease (SpCas9)	1000pmol
D1031S	DH5α超级感受态细胞	20×100μl
D1031M	DH5α超级感受态细胞	100×100μl
D7006	T4 DNA ligase	40,000U
D7008	T4 DNA ligase	200,000U
D7028	Antarctic Phosphatase (Thermosensitive)	1000/5000U
D7080S	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250U
D7080M	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	1250U
D7080L	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	5000U
D7081S	BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit	20次
D7081M	BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit	100次
D7083S	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	20次
D7083M	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	100次
D7085	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)	10次
D7086	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (CD4 Enrichment)	10次
D7087	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro)	10次
D7280S	菌落直接PCR试剂盒	100次
D7280M	菌落直接PCR试剂盒	400次
D7280L	菌落直接PCR试剂盒	2000次

D8301-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Neo	1μg
D8301-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Neo	100μg
D8302-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo	1μg
D8302-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo	100μg
D8303-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Puro&Zeocin	1μg
D8303-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Puro&Zeocin	100μg
D8304-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Puro&Zeocin	1μg
D8304-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Puro&Zeocin	100μg
D8305-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Zeocin	1μg
D8305-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Zeocin	100μg
D8306-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Zeocin	1μg
D8306-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Zeocin	100μg
D8307-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Bla	1μg
D8307-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Bla	100μg
D8308-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Bla	1μg
D8308-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Bla	100μg
D8309-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Hygro	1μg
D8309-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Hygro	100μg
D8310-1μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Hygro	1μg
D8310-100μg	pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Hygro	100μg
ST007	Ampicillin	5g
ST008	Ampicillin (100mg/ml,1000X)	5ml

Version 2024.01.31