

BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒

产品编号	产品名称	包装
D8403S	BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒	10次

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒，英文名称为BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter Construction Kit，也称BeyoCRISPR™基因编辑GFP替身报告基因构建试剂盒或BeyoCRISPR™ Gene-editing Surrogate GFP Reporter Construction Kit，是基于替身报告基因(Surrogate Reporter)研发的，用于构建能有效示踪或富集发生有效基因编辑的GFP替身报告质粒的试剂盒。
- 通常对细胞进行基因编辑的时候效率不会太高，仅部分细胞发生基因编辑，但哪些细胞发生基因编辑缺乏有效的活细胞示踪方法。本试剂盒通过替身报告基因(Surrogate Reporter)技术，用户仅需按照使用说明设计并合成gRNA靶向的基因组DNA序列(合成单链DNA后退火而成)，连接至本试剂盒提供的线性化载体中，就可构建可用于基因编辑细胞示踪或富集的替身报告质粒。替身报告基因质粒与表达Cas9及sgRNA的质粒共转染哺乳动物细胞后，可以直接通过检测细胞中的GFP荧光信号来确定该细胞中是否发生了有效的基因编辑。后续也可以通过流式细胞仪分选出GFP阳性细胞，从而获得高比例的基因编辑细胞，并用于下一步实验。由于替身报告基因质粒上含有和靶基因组相同的DNA序列，因此当替身报告基因发生基因的移码突变从而到GFP表达时，通常该细胞中也会发生基因组DNA的基因编辑，这样就可以根据GFP荧光信号有无来判定该细胞是否发生了基因编辑，同时也能初步判定该细胞的基因组DNA是否存在较高概率发生基因编辑。
- 本试剂盒基于替身报告基因(Surrogate Reporter)技术，将与靶基因序列一致的外源片段定向非移码非终止性插入至预先设计的本试剂盒提供的载体中，而载体中包含仅在发生基因编辑并且导致移码时才可表达的GFP报告基因，由此构建的替身报告质粒与能表达Cas9和sgRNA的质粒共转染时，可通过绿色荧光直观显示发生基因编辑的细胞，因此把这类报告基因命名为替身报告基因(Surrogate Reporter)。有研究表明，当细胞中某一染色体上的目标序列被CRISPR/Cas9、TALEN或ZFN等核酸酶突变时，同一细胞中另一条同源染色体上的相同目标序列发生突变的频率更高[1,2]。基于这一原理，可进一步通过流式细胞技术富集GFP阳性细胞，从而大幅提升获得基因编辑细胞的概率。
- 本试剂盒中提供的Linearized pCMV-RFP-STOP-GFP由编码两种荧光蛋白(RFP和GFP)的基因组成，RFP和GFP中间包含了待插入的sgRNA的靶向序列、PAM序列以及一个终止密码子连接(图1)。
- pCMV-RFP-STOP-GFP质粒图谱如下。

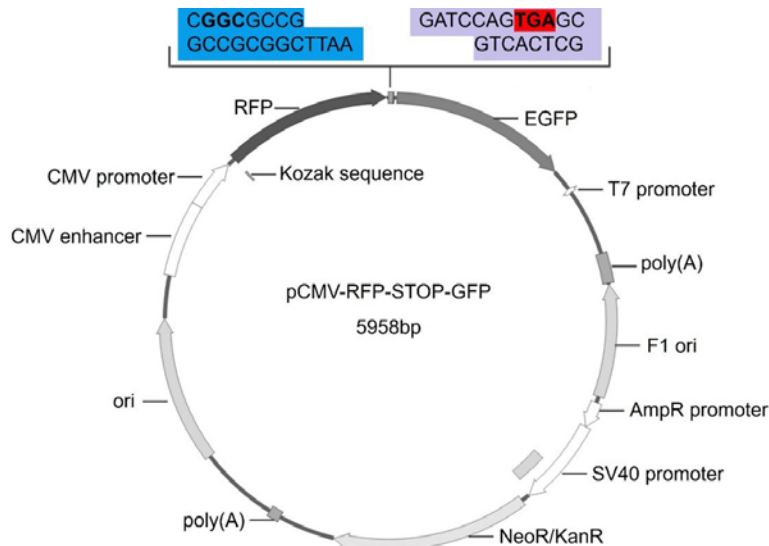


图1. 碧云天BeyoCRISPR™基因编辑Surrogate GFP Reporter构建试剂盒(D8403)中pCMV-RFP-STOP-GFP质粒图谱。

- pCMV-RFP-STOP-GFP质粒为卡那霉素抗性。
- pCMV-RFP-STOP-GFP质粒推荐的测序引物为: 5'-AGATCAAGATGAGGCTGAAG-3'
- 在未发生基因编辑的情况下，GFP基因序列处于表达框外，细胞仅表达处于表达框内的红色荧光蛋白。当Cas9及相应sgRNA一起表达，并且发生基因编辑时，Cas9通过sgRNA靶向识别两个荧光蛋白之间插入的特异性替身序列，诱导靶位点双链断裂，并在修复后发生移码突变，使终止密码子因为移码而失效，导致原本处于表达框外的GFP移码至与RFP同一表达框内，从而导致细胞中红色荧光蛋白和绿色荧光蛋白的双重表达，实现基因编辑的示踪检测(图2)。后续可以通过流式细胞仪进一步富集RFP/GFP

双阳性细胞，从而大幅提升基因敲除细胞的获得效率，实现相应的基因编辑细胞的快速富集。

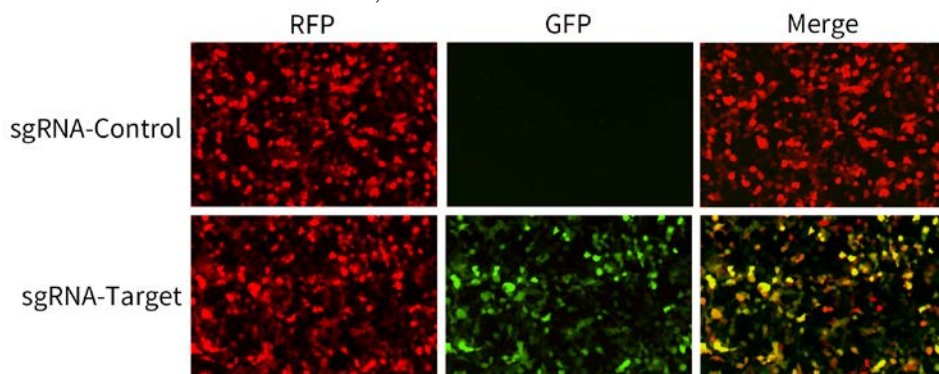


图2. 碧云天BeyoCRISPR™基因编辑Surrogate GFP Reporter构建试剂盒(D8403)构建的替身报告质粒的基因编辑示踪效果图。转染前一天，将稳定过表达Cas9的HEK293T细胞接种至24孔板中。细胞密度70%左右时，使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)将150ng带有特异性靶向序列的替身报告基因质粒分别与300ng非靶向的对照sgRNA (sgRNA-Control)或编码靶向sgRNA (sgRNA-Target)的质粒进行共转染。转染约48小时后，仅在转染靶向sgRNA质粒的细胞中同时观察到RFP及GFP荧光信号，GFP荧光信号的产生来自发生基因编辑的细胞。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。

- 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[3,4]。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3) [4]。

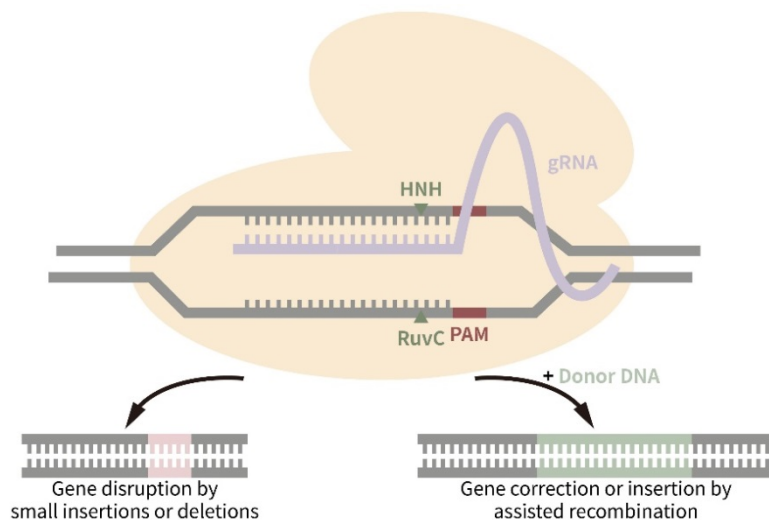


图3. CRISPR/Cas9基因编辑示意图。

- **本试剂盒特别高效。**本试剂盒提供超快速DNA连接酶，在25℃条件下连接5分钟即可在后续实验中获得较多克隆菌落，且克隆阳性率可达100%。本试剂盒的连接效果如图4所示。
- **本试剂盒使用便捷。**本试剂盒提供线性化的载体，用户仅需将设计的Target-specific DNA oligos按照说明进行退火及连接即可进行转化涂板，无需额外的载体处理步骤，快速便捷。
- 本试剂盒仅用于替身报告质粒的快速构建，不包含任何编码Cas9及sgRNA的质粒。推荐使用碧云天BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro) (D7087)进行Cas9/sgRNA编码质粒的快速构建。如需额外获取更多Cas9及sgRNA相关质粒或稳定表达Cas9的细胞株，请在碧云天网站查询或参考相关产品。

- 碧云天同时提供未线性化的替身报告基因载体质粒pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter) (D8414)及基于替身报告基因的可用于sgRNA效率快速筛选的完整质粒试剂盒BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法) (D8407)。

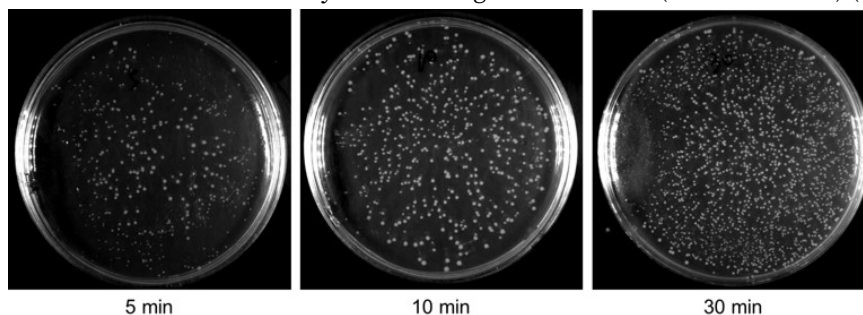


图4. 使用碧云天BeyoCRISPR™基因编辑Surrogate GFP Reporter构建试剂盒(D8403)连接ds Oligo后转化DH5α感受态细胞后涂板获得的LB平板的效果图。结果表明, 使用本试剂盒在25°C连接5分钟即可得到较多的克隆数, 且测序结果表明克隆阳性率几乎为100%。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异, 图中效果仅供参考。

- 按推荐的体系进行操作, 每个小包装本产品可以用于10次GFP替身报告质粒的构建。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
D8403S-1	Linearized pCMV-RFP-STOP-GFP (30ng/μl)	20μl
D8403S-2	Ultrapure Water	2ml
D8403S-3	Quick Ligase	20μl
D8403S-4	10X Quick Ligation Buffer	100μl
D8403S-5	Primer-F (10μM)	50μl
—	说明书	1份

保存条件:

-20°C保存, 两年有效。

注意事项:

- 本试剂盒构建的替身报告质粒中包含RFP及GFP, 其中GFP为报告基因, 因此与其共转染的Cas9或sgRNA编码质粒中不能带有GFP或其它具有相近激发/发射光谱的荧光蛋白如YFP等。
- 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Quick Ligase失活, 以避免Quick 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。

- 构建替身报告质粒时使用的靶DNA序列须与sgRNA序列相对应。靶DNA序列的选择, 请参考图5。

- 长度: 靶DNA序列一般长度为23个核苷酸, 其3'端必须包含PAM序列(NGG)。
- 同源性: 确保靶DNA序列与其它序列没有显著的同源性, 以避免脱靶效应。
- 方向: 处于正义链或反义链的靶DNA序列均可选择。

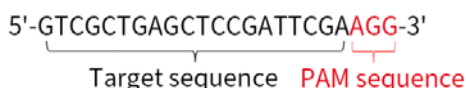


图5. 靶DNA序列示例。

- 单链DNA oligos的设计, 请参考图6。

为了将双链oligo连接至Linearized pCMV-RFP-STOP-GFP载体中, 必须按照以下原则设计oligos。

Forward: 5'-AATT-23bp (Target sequence with PAM)-A-3'

Reverse: 5'-GATCT-23bp (Copy bottom strand 5'→3')-3'

注: 如果靶序列长度不是23bp, 注意设计oligo时需要增减碱基数使oligos碱基数满足 $3n+1$ (n为整数; oligos碱基数为Forward或Reverse的全长), 否则将导致移码。

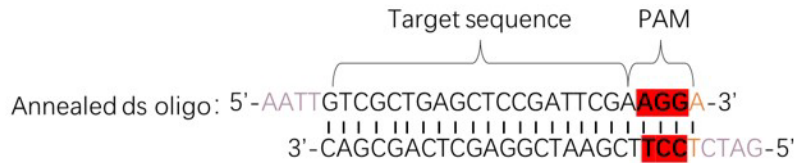


图6. 单链DNA oligo示例(退火后形成两端带有4nt粘性末端的dsDNA oligo)。

2. 双链oligo的制备。

- a. DNA oligos退火。推荐使用Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)进行退火或自行按照常规方法进行退火。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. 取适量退火后的ds oligo，稀释至50nM备用。
 注1：冷冻的退火后的双链oligo溶解后需要放在冰上。
 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的温度过高，则会导致部分DNA变性，克隆效率降低，此时建议重新制备。

3. 连接反应。

- a. 参考下表设置连接反应体系。

Reagent	Volume
Linearized pCMV-RFP-STOP-GFP (30ng/μl)	2μl
ds oligo (50nM)	1μl
10X Quick Ligation 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。如果希望进一步提高连接产物得率，也可延长孵育时间至30分钟。
- d. 反应完毕后，将反应体系置于冰上，随后进行转化。

4. 转化至DH5α超级感受态细胞(D1031)。

- a. 请参考DH5α超级感受态细胞(D1031)产品说明书进行操作，或自行参考常规的感受态转化步骤进行操作。
- b. 涂布至含卡那霉素抗性的LB平板，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50μg/ml卡那抗生素的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. 对构建的载体进行测序，通过测序确定双链oligo是否按照预定的序列和方向成功插入至载体。
- d. 也可通过菌落PCR鉴定，引物设计可以一端为Primer-F (D8403S-5)，另一端为您自己的target oligo reverse primer (按图6示例为：5'-GATCTCCTTCGAATCGGAGCTCAGCGAC-3')，片段大小约为226bp。

6. 哺乳动物细胞的转染和基因编辑效率的示踪。

- a. **哺乳动物细胞的转染。**上述构建的替身报告质粒须与编码Cas9及sgRNA的质粒共转染，推荐转染质粒质量比例为Cas9:sgRNA:Reporter=2:2:1。推荐使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)或Lipo6000™转染试剂(C0526)进行细胞转染。也可将本报告质粒与编码sgRNA的质粒按照1:2的质量比共转染过表达Cas9的稳转细胞株中。首次实验建议同时设置阳性对照与阴性对照。碧云天同时提供包含阴性及阳性对照相关质粒的可用于sgRNA效率快速筛选的完整质粒试剂盒(BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法) (D8407))。

注1：共转染的Cas9及sgRNA的编码质粒不能表达GFP，或其它与GFP有相近激发/发射光谱的荧光蛋白。

注2：推荐使用碧云天BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro) (D7087)进行Cas9/sgRNA编码质粒的快速构建。此外，碧云天还提供可用于sgRNA质粒快速构建的试剂盒及多种常见细胞的Cas9稳转细胞株，具体可在碧云天网站查询或参考相关产品。

- b. **基因编辑的示踪。**转染后约48-60小时，即可通过荧光显微镜或流式细胞仪对细胞样品的基因编辑情况进行快速检测。通常情况下，未发生基因编辑的细胞只能观察到RFP的红色荧光，而发生基因编辑的细胞会出现RFP和GFP的红色和绿色荧光，其中GFP阳性的细胞是发生了基因编辑的细胞，这部分细胞的基因组发生有效编辑的可能性会高很多。此时可以富集GFP阳性细胞直接进行下一步实验，也可根据基因编辑效率选择最优的sgRNA序列后进一步包装成病毒，然后用于后续实验。

7. 流式细胞仪分选基因编辑细胞(选做)。

转染后约48-60小时，收集细胞进行流式细胞分选，分选RFP/GFP双阳性细胞。进行流式分选前，推荐使用BeyoGold™细胞过滤器(40μm孔径，独立纸塑包装，无菌) (FSTR040)、BeyoGold™细胞过滤器(70μm孔径，独立纸塑包装，无菌) (FSTR070)或BeyoGold™细胞过滤器(100μm孔径，独立纸塑包装，无菌) (FSTR100)处理细胞悬液。收集到的细胞可继续培养或直接用于下一步实验。

8. 基因组编辑突变检测。

经流式分选后的RFP/GFP双阳性细胞中，通常含有较高比例的基因敲除细胞，推荐使用基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)进行基因敲除效率检测。如果希望进一步获得基因敲除的单克隆细胞，可将细胞稀释至2.5个/ml，然后按照每孔200μl接种到96孔板

中(每孔平均0.5个细胞), 筛选单克隆细胞株, 或委托碧云天进行单克隆细胞株的筛选服务(service@beyotime.com)。

参考文献:

1. Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. Genome Res. 2009. 19(7):1279-1288.
2. Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, et al. Nat Biotechnol. 2008. 26(7):808-816.
3. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, et al. Cell. 2014. 156(5):935-949.
4. Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
C0526	Lipo6000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0533	Lipo8000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
D0508	基因组编辑突变检测试剂盒	25/100次
D0510	FnCas12a (Cpf1)	100-2000pmol
D0511	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50/250/1000pmol
D1031	DH5α超级感受态细胞	20/100×100μl
D7080	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250/1250/5000U
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
D7280	菌落直接PCR试剂盒	100/400/1000次
D8403S	BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒	10次
D8414	pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)	1μg/100μg

Version 2024.08.18