

# 百格 CRISPR/Cas 载体构建试剂盒使用说明书

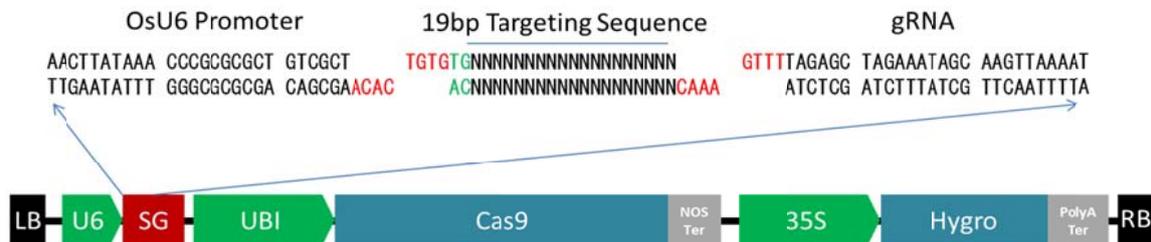
Cat# BGK03 单子叶植物（水稻），潮霉素筛选标记

百格 CRISPR/Cas 载体构建试剂盒能够将 gRNA 靶点序列，通过一步反应，快速高效地构建至 Cas9/gRNA 质粒中，构建的质粒能够直接用于植物遗传转化。该载体的 Cas9 蛋白经密码子优化改造，采用水稻 U6 启动子表达 gRNA 序列。上百次的实验表明，该 CRISPR/Cas 载体能够非常高效的用于单子叶植物，特别是水稻的基因敲除和编辑。

## 产品特性

- 采用水稻 U6 启动子，能够高效的用于单子叶植物，特别是水稻
- 采用加强型玉米 UBI 启动子，高效表达 Cas9 蛋白
- CaMV 35S 启动子表达潮霉素抗性基因
- 300 多次水稻基因敲除实验验证

## 质粒图谱



## Feature of plasmid

<b>LB</b>	Left border of T-DNA	<b>Cas9</b>	Optimized Cas9
<b>RB</b>	Right border of T-DNA	<b>NOS Ter</b>	NOS terminator
<b>U6</b>	Rice U6 promoter	<b>35S</b>	CaMV 35S promoter
<b>SG</b>	sgRNA	<b>Hygro</b>	Hygromycin selection marker
<b>UBI</b>	UBI promoter	<b>PolyA Ter</b>	PolyA terminator

## 产品组成 (放置于-20°C 保存，避免反复冻融)

产品包装	10 次, 货号: BGK03
Buffer Anneal	300 μl
Vector-BGK03	20 μl
Enzyme Mix	10 μl

## 使用步骤

1. **设计 gRNA 靶点序列。**例如选择靶点序列 CCCCTCGGACCTCTCCTCCAGG, (识别序列一般选择 19bp, 红色 AGG 为 PAM 序列), 按照下列合成 Oligo。您也可以访问百格网站([www.biogle.cn](http://www.biogle.cn)) 在线生成 Oligo 序列。

UP : 5' -TGTGTGCCCTCGGACCTCTCCTCC

LOW : 5' -AAACGGAGGAGAGGTCCGAGGGCA

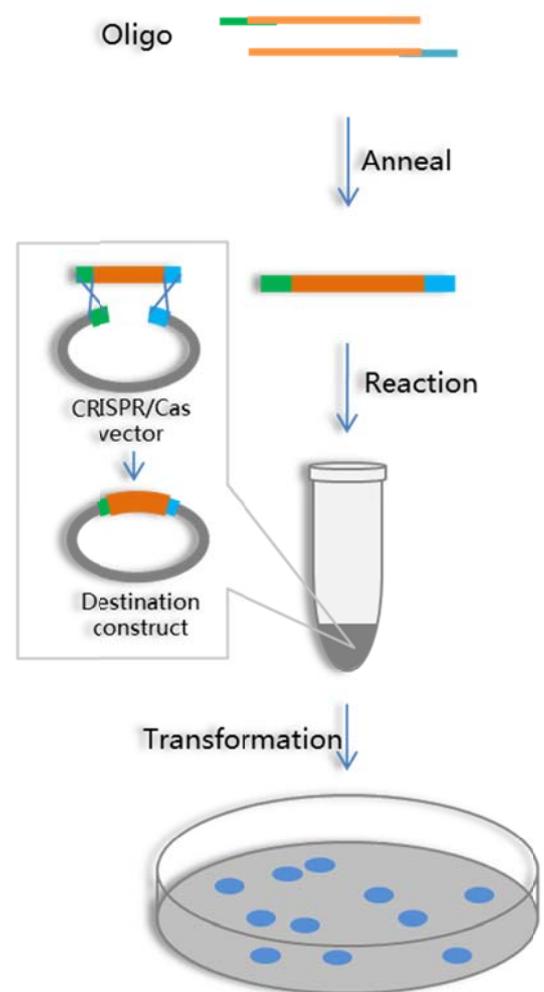
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10  $\mu\text{M}$ , 按下列反应体系混合后, 95 $^{\circ}\text{C}$  加热 3 分钟, 然后以约 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ 缓慢降至 20 $^{\circ}\text{C}$  (推荐采用 PCR 仪)。

Buffer Aneal	18 $\mu\text{l}$
UP Oligo	1 $\mu\text{l}$
Low Oligo	1 $\mu\text{l}$
Total	20 $\mu\text{l}$

3. **将 Oligo 二聚体构建至 CRISPR/Cas 载体。**按下列反应体系在冰上混合各个组分, 混匀后室温 (20 $^{\circ}\text{C}$ ) 反应 1 小时。

H <sub>2</sub> O	6 $\mu\text{l}$
CRISPR/Cas Vector	2 $\mu\text{l}$
Oligo 二聚体	1 $\mu\text{l}$
Enzyme Mix	1 $\mu\text{l}$
Total	10 $\mu\text{l}$

4. **参考标准步骤转化大肠杆菌。**取 5  $\mu\text{l}$  反应液加到至少 50  $\mu\text{l}$  的感受态细胞中, 混匀后冰浴静置 30 分钟 (期间切勿晃动, 严格保持静置); 轻轻取出, 42 $^{\circ}\text{C}$  热激 60 秒, 立即置于冰上 2 分钟; 加入 500  $\mu\text{l}$  SOB/LB, 37 $^{\circ}\text{C}$  200 rpm 培养 1 小时; 取适量菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 平板上, 37 $^{\circ}\text{C}$  倒置过夜培养。



## 测序参考序列

根据下列序列合成测序引物测序，可参考使用该测序引物 5' -CCCAGTCACGACGTTGTAAA-3' 。

AAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT**CCCAGTCACGACGTTGTAAA**ACGACGGCCAGTGCCAAGCTTGGATCATGAACCAACGGCC  
TGGCTGTATTTGGTGGTTGTGTAGGGAGATGGGGAGAAGAAAAGCCCGATTCTCTTCGCTGTGATGGGCTGGATGCATGCGGGGGAGCGGGA  
GGCCCAAGTACGTGCACGGTGAGCGGCCACAGGGCGAGTGTGAGCGCGAGAGGCGGGAGGAACAGTTTAGTACCACATTGCCAGCTAACT  
CGAACGCGACCAACTTATAACCCGCGCGCTGTCGCTTGTGTG-----19bp-Target-Sequence-----GTTTTAGAGCTAGAAATAG  
CAAGTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTT

绿色序列: OsU6 Promoter

蓝色序列: SG-RNA Sequence

黄色: 测序引物