

百格 CRISPR/Cas 载体构建试剂盒使用说明书

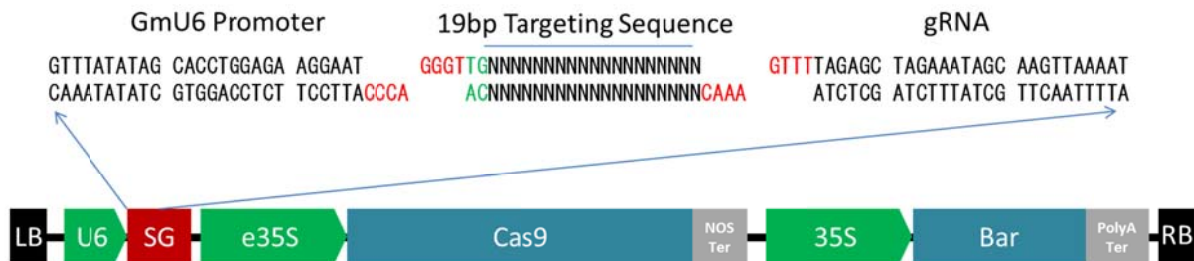
Cat# BGK041 双子叶植物（大豆），草铵膦筛选标记

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，采用大豆 U6 启动子表达 gRNA 序列。数十次的大豆遗传转化实验表明，该 CRISPR/Cas 载体能够非常高效的用于双子叶植物，特别是大豆的基因敲除和编辑。

产品特性

- 采用大豆 U6 启动子，能够高效的用于双子叶植物，特别是大豆
- 采用加强型 CaMV 35S 启动子，高效表达 Cas9 蛋白
- CaMV 35S 启动子表达草铵膦抗性基因
- 数十次大豆基因敲除实验验证

质粒图谱



Feature of plasmid

LB	Left border of T-DNA	Cas9	Optimized Cas9
RB	Right border of T-DNA	NOS Ter	NOS terminator
U6	Soybean U6 promoter	35S	CaMV 35S promoter
SG	sgRNA	Bar	Bar selection marker gene
e35S	Enhanced 35S promoter	PolyA Ter	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：BGK041
Buffer Anneal	300 μl
Vector-BGK41	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。您也可以访问佰格网站(www.biogle.cn)在线生成 Oligo 序列。

UP : 5' -GGGTTGCCCTCGGACCTCTCCTCC

LOW: 5' -AAACGGAGGAGAGGTCCGAGGGCA

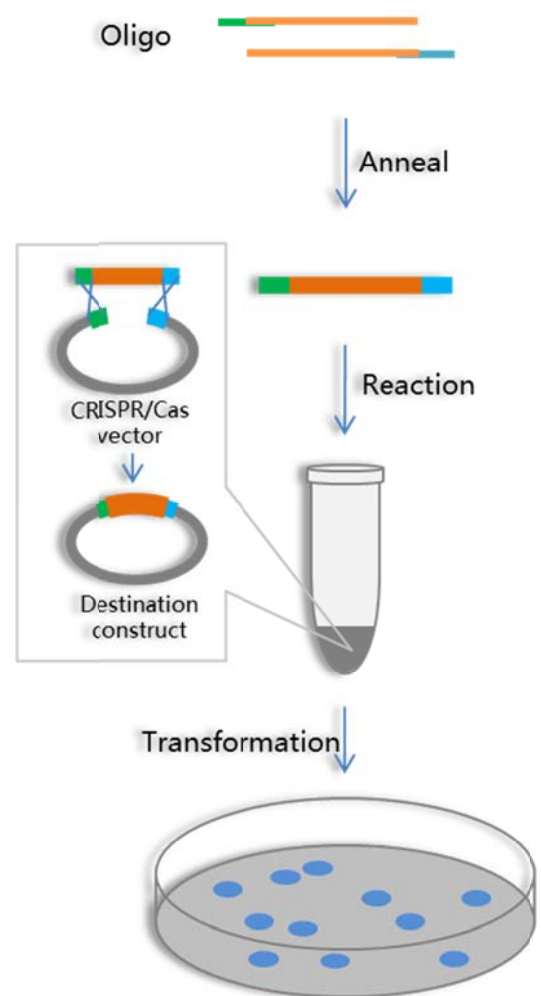
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10 μM , 按下列反应体系混合后, 95 $^{\circ}\text{C}$ 加热 3 分钟, 然后以约 0.2 $^{\circ}\text{C}/\text{秒}$ 缓慢降至 20 $^{\circ}\text{C}$ (推荐采用 PCR 仪)。

Buffer Anneal	18 μl
UP Oligo	1 μl
Low Oligo	1 μl
Total	20 μl

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 ₂ O	6 μl
CRISPR/Cas Vector	2 μl
Oligo 二聚体	1 μl
Enzyme Mix	1 μl
Total	10 μl

4. **参考标准步骤转化大肠杆菌。**取 5 μl 反应液加到至少 50 μl 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 μl 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' -CCCAGTCACGACGTTGAAA-3' 。

```
AAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTTATCACATATTGATAAAGTT
TTAGTGTTTGAAAAAAAAAGTATAGATAAATATAAAATGTTTTATAAAATATAAACGATAAAAATGTTTTAAACGATATATATTAAAAA
AAAACGTTTCAAAAATAAATACAAAATGTTTTAAATATATATAATTTAACTCATTAAAGAAAATAAAAATGCAAGTGCGGTGACAAGACA
AGCTAAAAGTTGAAAAGAAATGGCAGGGCTATAAGGCTCACCTACTCCTGGATTACCAAATTTGGTTCGTCCCTATACTCGAAAAATAA
AACAAAATAAATTTCAAGTATCTTCGTTTTGTATGCTTTGACTGTGAGGCGAGGCCAACTTTCTTCTGTCTGAGATGAATTTTGTTC
CTCCTGTGAAGGATGTATCATTCAAAGTGAATGTTTTGCAACTGCCAGTAGTCCACATCGACCAAATATTCTTATTACAGTGTGTTTATAT
AGCACCTGGAGAAGGAATGGGTTG-----19bp-Target-Sequence-----GTTTATAGCTAGAAATAGCAAGTAAAATAAGGCTAG
TCCGTTATCAACTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT
```

绿色序列: GmU6 Promoter

蓝色序列: SG-RNA Sequence

黄色: 测序引物