



## 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。

UP : 5' -TGTGTGCCCCTCGGACCTCTCCTCC

LOW: 5' -AAACGGAGGAGAGGTCCGAGGGCA

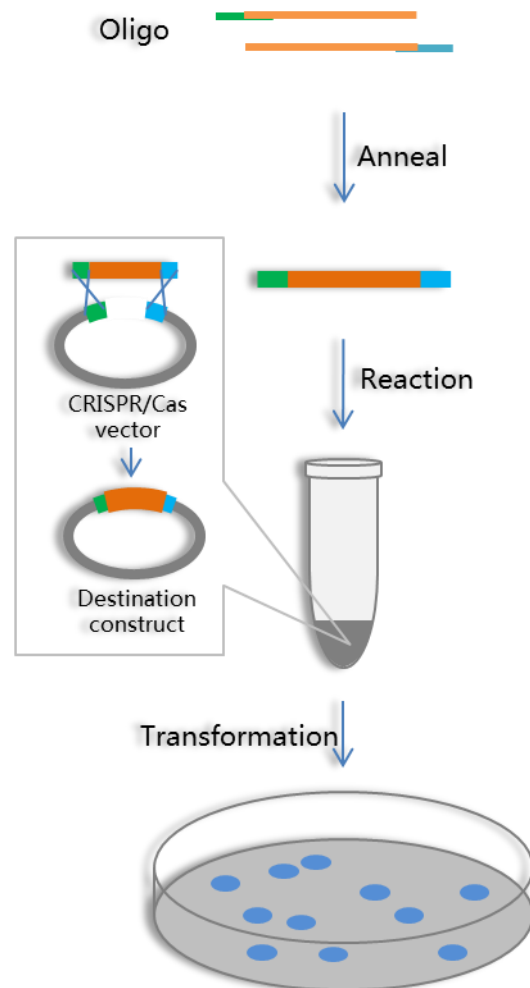
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10 μM, 按下列反应体系混合后, 95°C 加热 3 分钟, 然后以约 0.2°C/秒缓慢降至 20°C (推荐采用 PCR 仪)。

Buffer Aneal	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°C) 反应 1 小时。

H <sub>2</sub> 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°C 热激 60 秒, 立即置于冰上 2 分钟; 加入 500 μl SOB/LB, 37°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°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，可参考使用该测序引物 5' -TCCCAGTCACGACGTTGTAA-3' 。

```
AAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
TGCCAAGCTTGGATCATGAACCAACGGCCTGGCTGTATTTGGTGGTTGTGTAGGGAGATGGG
GAGAAGAAAAGCCCGATTCTCTTCGCTGTGATGGGCTGGATGCATGCGGGGGAGCGGGA
GGCCCAAGTACGTGCACGGTGAGCGGCCACAGGGCGAGTGTGAGCGCGAGAGGCCG
GGAGGAACAGTTTAGTACCACATTGCCAGCTAACTCGAACGCGACCAACTTATAAACCC
GCGCGCTGTCGCTTGTGTG-----19bp-Target-Sequence-----
GTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGGC
ACCGAGTCGGTGCTTTTTT
```

绿色序列: OsU6 Promoter      蓝色序列: SG-RNA Sequence      黄色: 测序引物

注意:

- 1、靶点序列是 20bp，但是第一个碱基强制改为 G，所以在载体上的 19bp 靶点序列是 19 个 bp 而不是 20bp。
- 2、构建的载体均为 DNA 质粒，菌落抗性为 kana，植株筛选抗性为潮霉素。