

CRISPR/Cas 载体构建试剂盒使用说明书

货号：BGK012B 规格：10 次/盒

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，构建的质粒可直接用于植物遗传转化。

产品特性

- 采用拟南芥 U6 启动子，能够高效的用于双子叶植物
- 采用 YAO 启动子，高效表达 Cas9 蛋白
- CaMV 35S 启动子表达潮霉素抗性基因
- 上千次 100 多次双子叶植物基因敲除实验验证

质粒图谱



Feature of plasmid

| | | | |
|-------------|-------------------------|--------------|-----------------------------|
| LB | Left border of T-DNA | Cas9 | Optimized Cas9 |
| RB | Right border of T-DNA | e35S | CaMV 35S promoter |
| U6 | Arabidopsis U6 promoter | HYG | Hygromycin selection marker |
| gRNA | gRNA of CRISPR/Cas9 | PolyA | PolyA terminator |
| pYAO | YAO promoter | | |

产品组成

| 组成 | 体积 |
|---------------|-------------|
| Buffer Anneal | 300 μ l |
| Vector-BGK01 | 20 μ l |
| Enzyme Mix | 10 μ l |

储存条件：放置于-20℃保存；有效期：12 个月，避免反复冻融

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)在线生成 Oligo 序列。

UP : 5' -TGATTGCCCTCGGACCTCTCCTCC

LOW: 5' -AAACGGAGGAGAGGTCCGAGGGCA

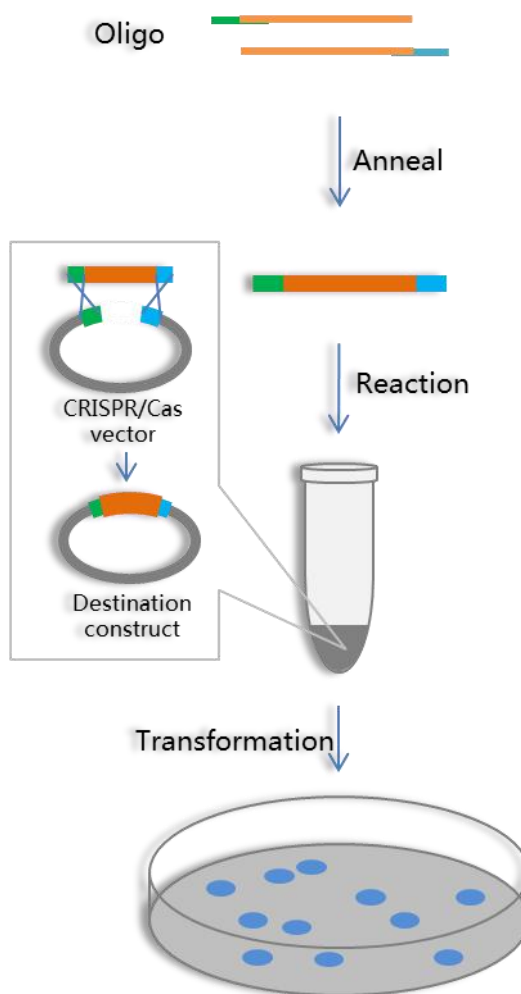
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10 μM, 按下列反应体系混合后, 95°C 加热 3 分钟, 然后以约 0.2°C/秒缓慢降至 20°C (推荐采用 PCR 仪)。

| 组份 | 体积 |
|--------------|-------|
| 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份, 混匀后室温 (20°C) 反应 1 小时。

| 组份 | 体积 |
|-------------------|-------|
| 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°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
TGCCAAGCTTCATTCGGAGTTTTGTATCTTGTTTCATAGTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGCATC
GAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAGGC
CCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCATTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTAT
ATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGC
TGAGTTTATATACAGCTAGAGTCGAAGTAGTGATTG-----19bp-Target-Sequence-----GTTTAGAGCT
AGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTG
CTTTTT
```

绿色序列：AtU6 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 个碱基而不是 20。
- 2.所构建的载体均为 DNA 质粒，如载体骨架信息所示：菌落抗性为 kana，植株抗性为潮霉素。