

CRISPR/Cas 载体构建试剂盒使用说明书

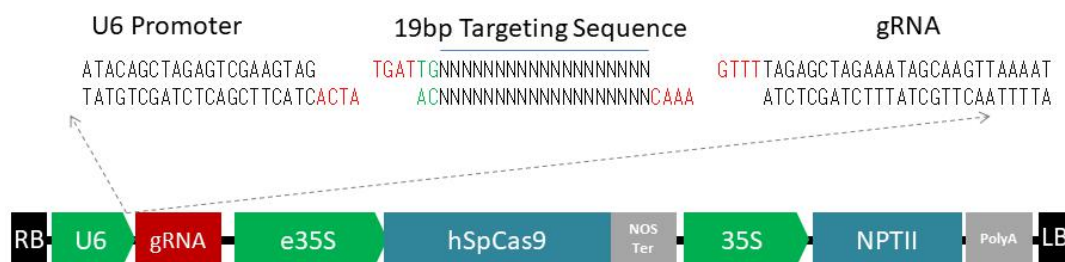
货号：BGK013 规格：10 次/盒

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
- 采用加强型 CaMV 35S 启动子，高效表达 Cas9 蛋白
- CaMV 35S 启动子表达 NPTII 抗性基因
- 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	hSpCas9	Optimized Cas9
RB	Right border of T-DNA	NOS Ter	NOS terminator
U6	Arabidopsis U6 promoter	35S	CaMV 35S promoter
gRNA	gRNA of CRISPR/Cas9	NPTII	Neomycin Phosphotransferase 2 gene
e35S	Enhanced 35S promoter	PolyA	PolyA terminator

产品组成

组成	体积
Buffer Anneal	300 μl
Vector-BGK01	20 μl
Enzyme Mix	10 μl

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

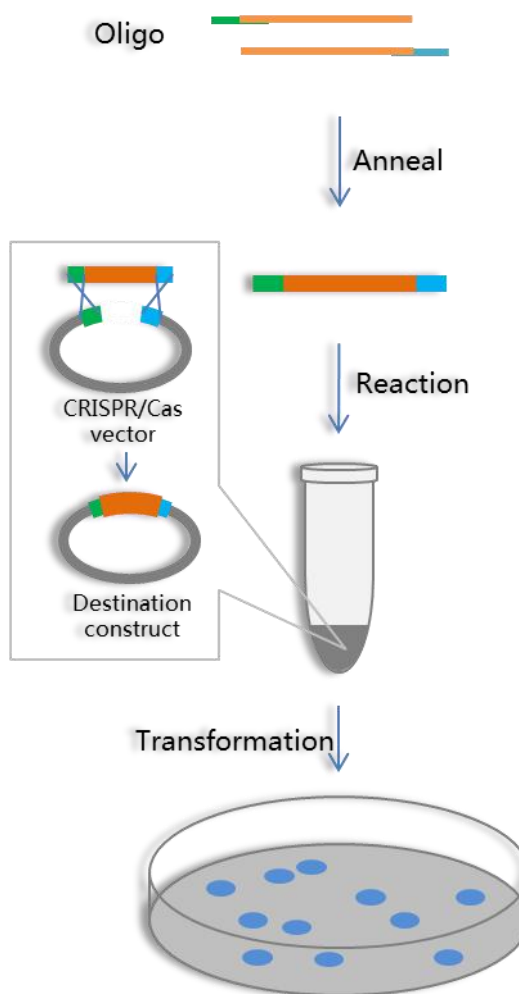
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10 μM, 按下列反应体系混合后, 95°C 加热 3 分钟, 然后以约 0.2°C/秒缓慢降至 20°C (推荐采用 PCR 仪)。

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
TGCCAAGCTTCATTCGGAGTTTTGTATCTTGTTTCATAGTTTGTCCCAGGATTAGAATGATTAGGCATC
GAACCTTCAAGAATTTGATTGAATAAAACATCTTCATTCTTAAGATATGAAGATAATCTTCAAAAAGGC
CCCTGGGAATCTGAAAGAAGAGAAGCAGGCCCATTTATATGGGAAAGAACAATAGTATTTCTTAT
ATAGGCCCATTTAAGTTGAAAACAATCTTCAAAAAGTCCCACATCGCTTAGATAAGAAAACGAAGC
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 G418/Kana。