

CRISPR/Cas 载体构建试剂盒使用说明书

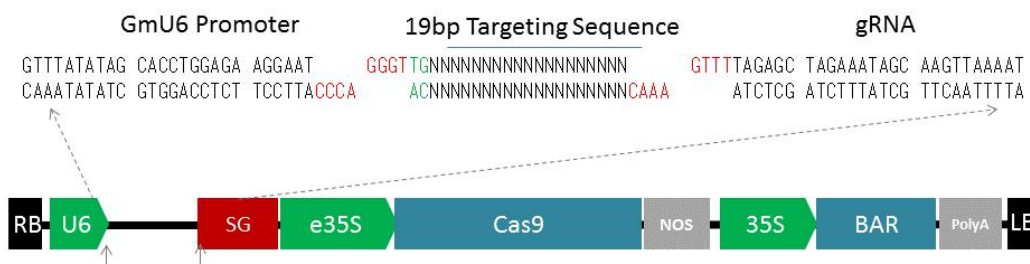
货号：BGK041 规格：10 次/盒

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	NOS terminator
U6	Soybean U6 promoter	35S	CaMV 35S promoter
SG	sgRNA	BAR	Bar selection marker 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

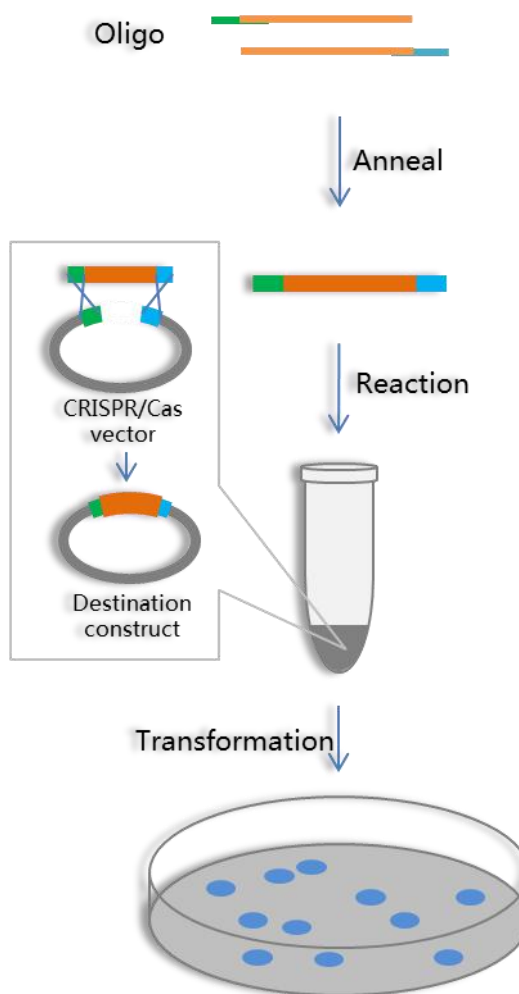
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10 μM, 按下列反应体系混合后, 95°C 加热 3 分钟, 然后以约 0.2°C/秒缓慢降至 20°C (推荐采用 PCR 仪)。

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
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，植株抗性为草铵膦。