

# CRISPR/Cas 载体构建试剂盒使用说明书

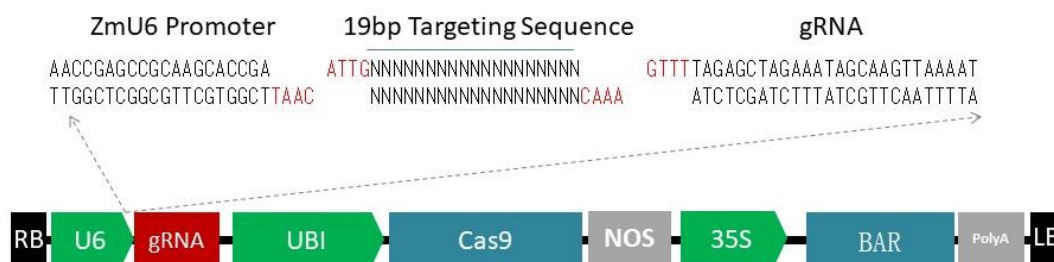
货号：BGK053 规格：10 次/盒

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 U6 启动子，能够高效的用于单子叶植物，特别是玉米
- 采用加强型玉米 UBI 启动子，高效表达 Cas9 蛋白
- CaMV 35S 启动子表达草铵膦抗性基因
- 300 多次单子叶植物基因敲除实验验证

## 质粒图谱



### Feature of plasmid

<b>LB</b>	Left border of T-DNA	<b>Cas9</b>	Optimized Cas9
<b>RB</b>	Right border of T-DNA	<b>UBI</b>	UBI promoter
<b>U6</b>	Zea mays U6 promoter	<b>35S</b>	CaMV 35S promoter
<b>gRNA</b>	gRNA of CRISPR/Cas9	<b>BAR</b>	BAR selection marker gene
<b>NOS</b>	NOS terminator	<b>PolyA</b>	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](http://www.biogle.cn))在线生成 Oligo 序列。

UP : 5' -TGATTGCCCTCGGACCTCTCCTCC

LOW: 5' -AAACGGAGGAGAGGTCCGAGGGCA

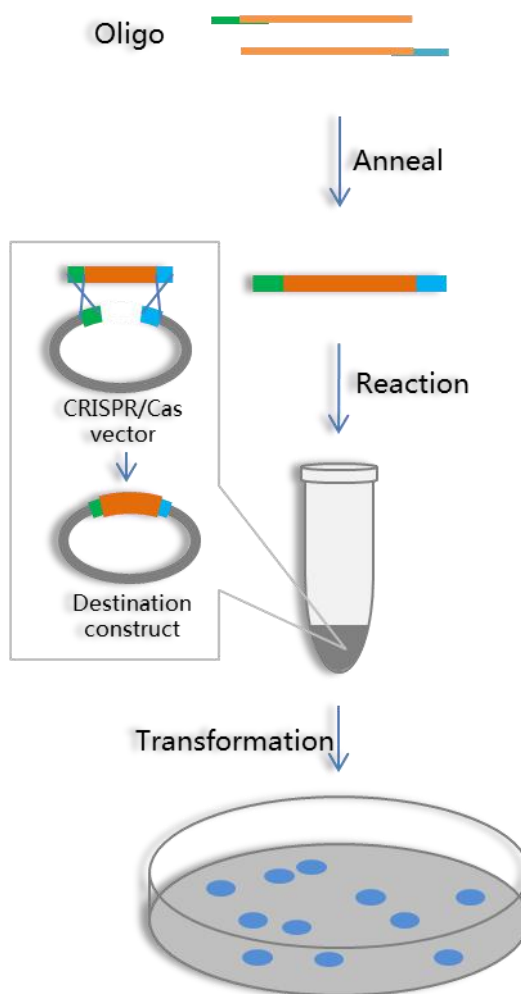
2. **制备 Oligo 二聚体。**将合成的 Oligo 加水溶解至 10 μM, 按下列反应体系混合后, 95°C 加热 3 分钟, 然后以约 0.2°C/秒缓慢降至 20°C (推荐采用 PCR 仪)。

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 <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
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。