

Lenti-V™ CRISPR-Cas9 System (Neo^r)说明书

Cat. No. GP0203

Protocol No. PT140802-1

出版日期 Aug. 2014

南京市汉中门大街 301 号
南京国际服务外包产业园 01 栋 13 层 A 座
电话: +86-25-66776700/66776718
传真: +86-25-66776701
邮编: 210036
网址: www.genloci.com



订购&技术咨询

订购&技术咨询	
客服/订购	技术支持
Telephone: +86-25-66776730	Telephone: +86-25-66776718
Fax: +86-25-66776701	Fax: +86-25-66776701
Web: www.genloci.com	Web: www.genloci.com
E-mail: sales@genloci.com	E-mail: service@genloci.com

目 录

I. 组份列表.....	2
II. 附加产品推荐	2
III. 产品概要.....	3-4
IV. 操作步骤.....	5
1. 设计 Oligo DNA 序列.....	5
2. T4 DNA Ligase 连接.....	6
3. 慢病毒包装.....	6
4. 慢病毒收获与储存.....	7
5. 慢病毒侵染靶细胞.....	7
6. Cruiser™ 筛选阳性克隆.....	7
V. FAQ.....	8
VI. 附录.....	9
附录 A pGLKO linear Vector.....	9
VII. 参考文献.....	10

图

Figure 1. CRISPR-Cas9 工作原理示意图

Figure 2. CRISPR-Cas9 基因编辑实验流程

Figure 3. pGLKO 插入位点图示

Figure 4. pGLKO 质粒图谱

表

Table 1. Lenti-V™ CRISPR-Cas9 System (Neo^r) 试剂盒组份列表

I. 组份列表

Lenti-V™ CRISPR-Cas9 System (Neo^r)组份如下:

Table1. Lenti-V™ CRISPR-Cas9 System (Neo^r)组份列表

组分列表	含量
pGLKO linear Vector	11μl
Packaging Mix	40μl
T4 DNA Ligase(350U/μl)	5μl
10xT4 DNA Ligase Buffer	100μl
Annealing Buffer(20x)	100μl

贮存条件

※注意: 在收到货后, 请您将 pGLKO linear Vector、Packaging Mix 和 T4 DNA Ligase 瞬时离心后再保存。

将 pGLKO linear Vector、Packaging Mix、T4 DNA Ligase 置于-20℃保存, 且避免污染;
将 10xT4 DNA Ligase Buffer、Annealing Buffer 置于 2~8℃保存;

II. 附加产品推荐

本试剂盒不包含以下所需试剂和仪器, 您可以购买指定产品或购买替代产品进行实验。

- Genloci Cruiser™ 基因敲除检测试剂盒(Cat.Nos.: GP0102, GP0103)
- Celetrix 细胞电转仪(型号: GP7901)
- Cell Plaza™单细胞培养板(Cat.No.: GP5036)
- Genloci TNA 抽提试剂盒 (Cat.Nos.: GP0155, GP0156)
- Heck 293T 细胞 (Cat.No.: GP5045)

III. 产品概要

Lenti-V™ CRISPR-Cas9 System (Neo^r)是一款高效、精准的基因编辑试剂盒，它是基于最新代的人工核酸内切酶 CRISPR-Cas9 而研发的，相对于传统敲除技术和 TALENs/ZFNs 技术而言，其操作更加简便，敲除效率最高，基因的编辑更加的精准，大大降低了脱靶机率。Lenti-V™ CRISPR-Cas9 System (Neo^r)能够适用于几乎所有哺乳动物细胞的基因修饰研究。

该试剂盒中的 pGLKO 线性化载体包含 2 个重要组件，分别为 Cas9 核酸酶表达框和 Guide RNA(gRNA) 克隆框，gRNA 克隆框能够快速高效的克隆编码靶标特异的 CRISPR RNA(crRNA)的 DNA 片段。Packaging Mix 包含慢病毒包装所需的辅助质粒（其包含能表达慢病毒包装所需的全部反式激活蛋白，以及 VSV-G 等元件），该试剂盒能够让您仅靠单个载体就可以轻松的完成基因组 DNA 的编辑，实现精准、低 off-target 的基因编辑体验。

Genloci 公司为您提供完整的基因敲除解决方案，从敲除方案设计→敲除位点设计→载体构建→转染→敲除检测→结果分析，让您的实验一次成功！

产品特点

精准的修饰

Cas9 蛋白无特异性，降低脱靶效应，实现精准的基因编辑

敲除效率高

较传统技术和 TALENs/ZFNs 技术，敲除效率最高；

CRISPR-Cas9 系统集两大功能组件于一个载体上，转染效率更高

操作简便

编码 sgRNA 的 DNA 片段小于 100bp，使操作更加简便

配套试剂全

包含基因编辑实验所需的全套试剂，方便实验

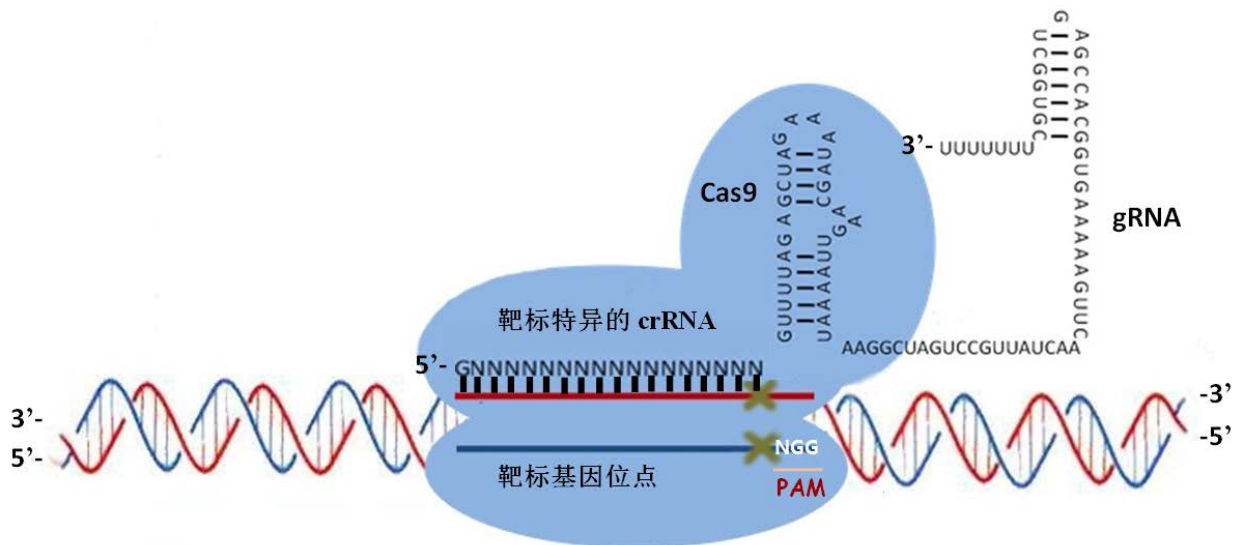


Figure1. CRISPR-Cas9 工作原理示意图

CRISPR-Cas9 基因编辑实验流程图如下：

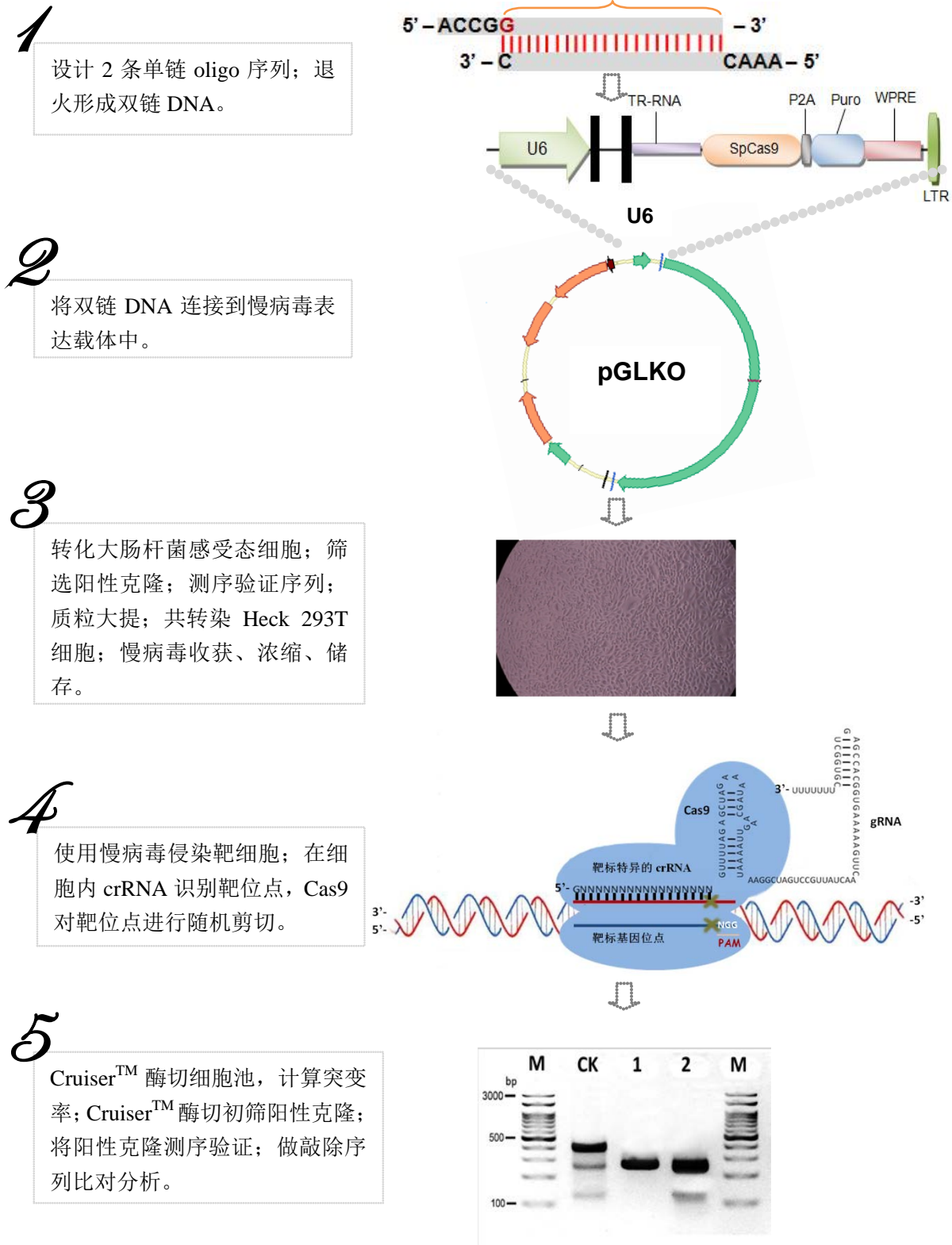


Figure 2. CRISPR-Cas9 基因编辑实验流程

IV. 操作步骤

实验前，请您务必做好以下验证实验：

- 单细胞生长情况，确保单个细胞可以正常生长形成单克隆，低细胞密度的培养皿中可以形成单克隆。
- 目的基因的表达情况分析，为防止因染色体缺失等情况导致靶基因缺失，首先需要 PCR 扩增靶基因，并对 PCR 结果进行测序，确保靶基因的完整存在；其次，您还可以用 RT-PCR 分析靶基因的活跃度。

1. 设计 Oligo DNA 序列

首先，您需要在靶标 DNA 区域中设计一对 20bp 左右的 oligo DNA，您可以通过以下在线工具设计：

- 麻省理工学院的 CRISPR Design: <http://crispr.mit.edu/>
- 德国癌症研究中心的 E-Crisp: www.e-crisp.org/E-CRISP/designcrispr.html

下面我们选择麻省理工学院的 CRISPR Design 工具来做设计举例，以 *Fut8* 基因为例，一次只能输入大小为 23~250bp 的基因片段，最好一次只输入一个外显子，避免 Guide 序列跨内含子的。

点击“Download as genbank”按钮，出现以下界面：“Fut8”



根据左边的 score 的高低选取合适的 Guide 序列，以 Guide#1 序列为例，2 条单链 oligo 的序列如下（红色字体部分是要与 *BsmBI* 酶切后的载体互补的部分）：

Fut8-F: 5'...**accgG**AATGAGCATAATCCAACGCC...3'

Fut8-R: 5'...**aaac**GGCGTTGGATTATGCTCATTC...3'

※注意：oligo DNA 设计序列的第一个碱基必须是 G，如果你选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 G，可自行加一个 G 上去。

另外，需在位点上下游各设计一条引物，用于后续 PCR 或测序检测阳性克隆，引物能扩增约 300bp 的 DNA 片段，上游引物距突变位点约 100bp，下游引物距突变位点约 200bp。

将设计后的序列送到值得信赖的公司合成，纯化级别为 PAGE。

Genloci Classic CRISPR-Cas9 试剂盒

2. T4 DNA Ligase 连接

将合成的 2 条单链 Oligo DNA 稀释至 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 后，退火形成双链 DNA，再与载体连接。pGLKO linear vector 是线性化载体，无需酶切处理，可直接用于 T4 DNA Ligase 连接反应，退火反应体系如下：

正链 Oligo($100\mu\text{M}$)	0.5 μl
负链 Oligo($100\mu\text{M}$)	0.5 μl
ddH ₂ O	18 μl
Annealing buffer(20x)	1 μl
<hr/>	
	20 μl

将以上体系瞬时离心后，置于 PCR 仪中 95°C 孵育 3min，孵育后自然冷却 20min。取 1.75 μl 的杂交后的双链 DNA 进行 T4 DNA Ligase 连接反应，反应体系如下：

pGLKO linear vector	2 μl
双链 DNA	1.75 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
10xT4 DNA Ligase Buffer	1 μl
ddH ₂ O	4.25 μl
<hr/>	
	10 μl

※注意：请您根据步骤 1 自行设计正链 Oligo 序列和负链 Oligo 序列，合成后的 2 条单链 oligo DNA 退火复性成双链 DNA，再进行 T4 DNA Ligase 连接反应。

连接产物可以直接转化大肠杆菌感受态细胞，转化和筛选阳性克隆的实验步骤请您参考《分子克隆实验指南》，pGLKO 的抗性为卡那霉素抗性，筛选后的阳性克隆，需测序验证序列的正确性。

3. 慢病毒包装

3.1 293T 细胞的培养

1) 第 1~2 天内复苏 293T (较低代次) 的细胞，从液氮罐中取出冻存的细胞并迅速放入 37°C 水中，轻轻晃动使细胞快速解冻。然后用 70% 的酒精擦拭细胞冻存管，拿入超净台中操作。以后所有步骤都应注意无菌操作。

2) 第 4~5 天进行细胞传代，传代至 10cm 培养皿中。

3) 第 7~8 天，按照相应的接种密度接种至欲使用包装生产病毒的孔板或培养皿中并转移到无菌的细胞培养皿中。

※注意：293T 细胞的生长状态影响病毒的生产，应使用较低代次的细胞，并于复苏后传代培养至少两代以上的 293T 细胞来进行包装慢病毒，但不能使用超过 20 代的细胞。

3.2 转染

共转染前进行质粒大提，稀释至质粒浓度为 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ，转染前 48 小时，接种细胞至备用生产慢病毒的孔板或是培养皿中，转染时，细胞汇合度约为 70%-80% 为最佳感染状态，活力 $\geq 95\%$ 以上。电转染靶细胞，推荐使用 Celetrix 细胞电转仪 (型号: GP7901)，贴壁细胞的数量需 $1 \times 10^6 \sim 3 \times 10^6$ ，悬浮细胞的数量需 $3 \times 10^6 \sim$

5×10^6 (另外, 您也可以使用转染试剂转染)。

a) 加入 800ul 0.25%胰酶消化大概 30s, 随时观察细胞形态, 消化结束, 加入 2 倍胰酶体积的完全培养基终止消化, 吹打均匀;

b) 25 °C900rpm, 离心 5min, 去上清;

c) 加入 1ml PBS, 重悬后, 25 °C900rpm, 离心 5min, 去上清, 重复此步骤 1~2 次;

d) 加入 200 ul 无血清的培养基, 重悬细胞, 各加入 5 μ l pGLKO linear vector 和 Packaging Mix;

e) 离心过程中, 可准备电转设备, 开通电源, 移液枪吸取 200ul 的细胞悬液至电极管中 (保证不要出现起泡), 按照 1200V, 20ms, 2/pluses 电转条件进行电转;

f) 电转结束, 放入预先准备好的孔板或是培养皿中, 加入适量的含血清浓度为 2%~10%的 DMEM 培养基, 细胞培养箱培养。

※注意: 293T细胞的生长状态影响病毒的生产, 应使用较低代次的细胞, 并于复苏后代培养至少两代以上的293T细胞来进行包装慢病毒, 但不能使用超过20代的细胞。

4. 慢病毒收获与储存

以电转时间为起始点, 一次收获时间为 24hr 后收获上清, 保存于 4°C下, 并补足适量培养基。二次收获时间为 36~48hr 间, 收获上清, 可以与一次收获病毒合在一起, 并补足适量培养基。三次收获 (此次可需要也可不需要, 时间超过 72hr, 细胞活力严重下降, 生产病毒能力减弱, 病毒量较低) 时间为 72hr, 收获上清, 与前两次收获可合在一起。

※注意: 若短时间内不使用慢病毒进行实验, 请放置于-80 °C保存 (病毒置于冻存管, 并使用封口膜封口)。

5. 慢病毒侵染靶细胞

接种适量靶细胞, 可加入 4-8ug/ml 的 polybrene 以提高感染效率, 混匀。于 25 °C800g 下, 贴壁细胞离心 30min~1h, 悬浮细胞离心 1.5~2.5h, 离心结束后, 放于 37 °C5%CO₂ 培养箱, 24 小时后, 更换新鲜的完全培养基。

6. Cruiser™ 筛选阳性克隆

将靶细胞有限稀释后, 分到 96 孔板中进行单克隆培养, 如果靶细胞是悬浮细胞, 推荐使用 Cell Plaza™(Cat.No.: GP5036)培养细胞, 待细胞长好后, 取 1000 个左右的细胞, 提基因组, 推荐使用 Genloci TNA 抽提试剂盒 (Cat.No.: GP0155)。

然后使用核酸内切酶初步筛选阳性克隆, 推荐使用 Genloci Cruiser™ 突变检测试剂盒(Cat.Nos.: GP0102, GP0103), 对 Cruiser™ 筛选后的阳性克隆进行测序分析, 并对碱基缺失结果进行比对分析。

V. FAQ

Q-1: 靶位点设计有哪些注意事项

A-1: 目前有几个在线设计软件, 我们推荐使用 Zhang Feng lab: <http://crispr.mit.edu/>, 该软件会对每一个潜在的靶位点打分, 并告知是否存在脱靶现象。在设计 Guide 序列时, 需要特别注意第一个碱基必须是 G, 如果您选取的 Guide 序列的第一个碱基不是 G, 需要自行加上一个 G, 因为这个 G 对于起始转录非常重要。

Q-2: 慢病毒包装时转染效率低, 怎么办?

A-2: 因为 Cas9 蛋白比较大, 就导致整个质粒较大 (8kb 左右), 如此大的质粒很容易导致转化效率低下, 尤其是使用脂质体等化学试剂转染时, 转染效率会比较低些。所以, 我们推荐使用电转的方法进行转染。Bio-Rad 的电转仪器需要根据不同的细胞单独配制转染 buffer, 所以不推荐使用; Life 的 Neon 系统不错, 但是因为耗材是镀金的, 所以非常贵; 而 Genloci 的 Celetrix 电转仪, 转化效率高, 不需要单独配制 buffer, 只需使用无血清的培养基就行, 而且该电转仪的耗材也是相对比较便宜的。其次, 建议使用较易转染的细胞, 如 293T 细胞进行共转染

Q-3: 慢病毒保存时应注意哪些

A-3: 收获的慢病毒液后若在很短时间内即使用慢病毒进行实验, 可以将病毒暂时放置于 4 °C 保存; 若长时间不适用, 可以存放于 -80 °C 6 个月以上; 但如果病毒储存时间超过 6 个月, 我们建议在使用前需要重新滴定病毒滴度。反复冻融会降低病毒滴度: 每次冻融会降低病毒滴度 10%; 因此在病毒使用过程中应仅尽量避免反复冻融, 为避免反复冻融我们强烈建议客户收到病毒后按照每次的使用量进行分装。

Q-4: 单个细胞不生长, 怎么办?

A-4: 对于单细胞不长的细胞进行敲除, 首先建议采用共培养的方法看看能否促进单个细胞的生长。共培养可以采用培养过同种细胞的培养基培养单细胞; 也可以使用 Cell Plaza™ (单细胞培养板), 可以把细胞的存活率提高三倍以上。如果以上方法都不行, 建议对细胞进行改造, 加快其分裂速度, 让单细胞可以很容易生长后, 再对目的基因进行敲除。具体方法可以联系 Genloci 的客服做进一步的了解。

Q-5: 在做高通量样本时, 如何才能快速筛选得到阳性克隆?

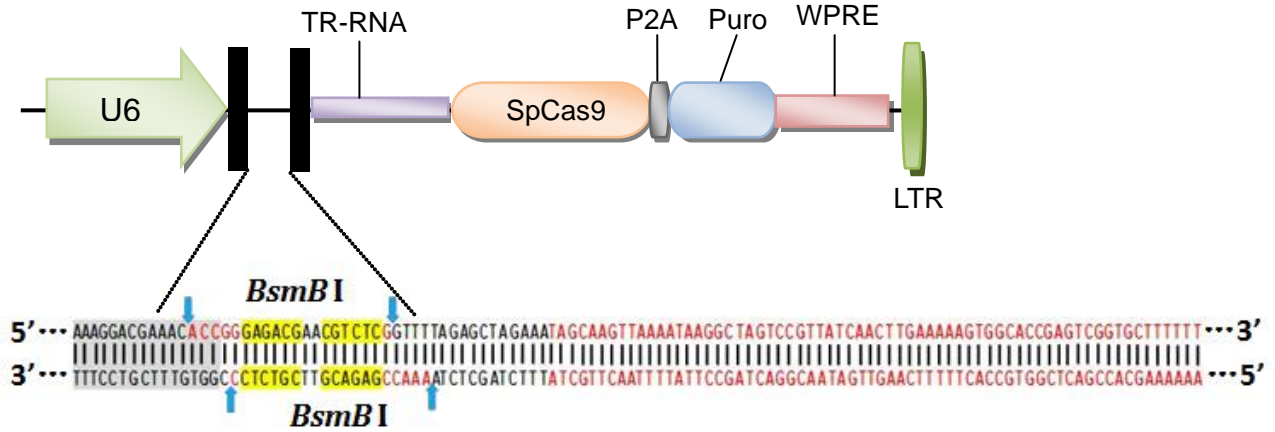
A-5: 建议使用错配酶进行筛选, 可加快筛选的流程。目前市面上主要有三种错配酶: Cruiser™ 酶、T7E1 和 Surveyor 酶。其中, Cruiser™ 酶和 Surveyor 酶属于 CelI 家族, 这两种酶的筛选特异性比 T7E1 高。在酶切筛选过程中, T7E1 的特异性较差, 容易出现假阳性的结果, 这在一定程度上阻碍了阳性克隆的筛选进度; Surveyor 酶较贵, 并且货期较长, 所以我们推荐 Cruiser™ 酶, 它特异性高且价格合理。

VI. 附录

附录A pGLKO linear Vector

以下为pGLKO的插入位点示意图和质粒图谱，线性化pGLKO所用的酶为*BsmBI*。

pGLKO:



Guide RNA:

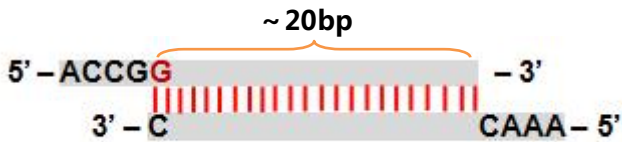


Figure 3. pGLKO插入位点图示

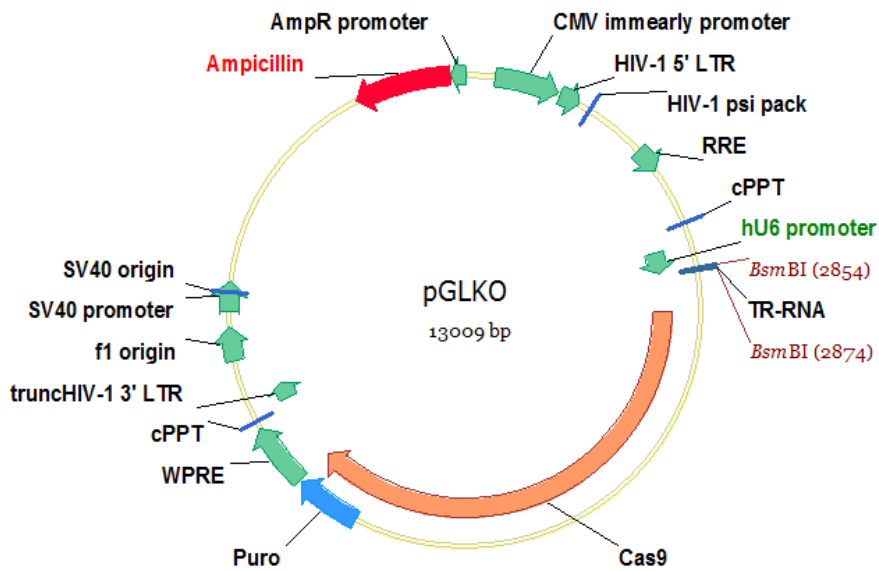


Figure 4. pGLKO 质粒图谱

VII. 参考文献

1. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptiv bacterial immunity. *Science*, 2012,337: 816~821.
2. Horvath P., Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science*, 2010, 327 (5962): 167~170.
3. Hale CR, Zhao P., Olson S., *et al.* RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex. *Cell*, 2009, 139 (5): 945~956.
4. Zhang F., *et al.* Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science* , 2013, 339(6121): 819~823
5. Westra ER., Swarts DC., Staals RH., Jore MM., Brouns SJ., van der Oost J. The CRISPRs, they are a-changin': how prokaryotes generate adaptive immunity. *Annu Rev Genet*, 2012, 46: 311~339.
6. Marraffini LA., Sontheimer EJ. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nature Rev Genet*, 2010, 11 (3): 181~190.
7. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L.A. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature Biotechnology*, 2013, 31: 233~239.
8. Hwang WY., Fu Y., Reyon D., Maeder ML., Tsai SQ., Sander JD., Peterson RT., Yeh JR., Joung JK. Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system. *Nature Biotechnology*, 2013, 31:227~229
9. Liu P, Long L, Xiong K, Yu B, Chang N, Xiong JW, Zhu Z, Liu D. Heritable/conditional genome editing in *C. elegans* using a CRISPR-Cas9 feeding system. *Cell Research*. 2014, 24(7):886~889.
10. Barrangou R. RNA events. Cas9 targeting and the CRISPR revolution. *Science*. 2014, 344(6185):707~708.
11. Nishimasu H., *et al.* Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5)935~949.
12. Wang WS., Guo FJ., Li CJ., Zhang ZD., Shi CH. Construction and verification of the targeted uPA-shRNA lentiviral vector and evaluation of the transfection and silencing rate. *Exp Ther Med*, 2014, 8(2):435-441.
13. Adam S. Cockrell, Hong Ma, Kailing Fu, Thomas J. McCown & Tal Kafri. A Trans-Lentiviral Packaging Cell Line for High-Titer Conditional Self-Inactivating HIV-1 Vectors. *Molecular Therapy*, 2005, 10:276-284
14. S Bobadilla, N Sunseri , N R Landau. Efficient transduction of myeloid cells by an HIV-1-derived lentiviral vector that packages the Vpx accessory protein. *Gene Therapy*. 2012, 10: 514~520
15. Mohamed R. Ahmed, Amandine Berthet, Evgeny Bychkov, Gregory Porras, Qin Li, Bernard H. Bioulac, *et al.* Lentiviral Overexpression of GRK6 Alleviates L-Dopa–Induced Dyskinesia in Experimental Parkinson's Disease. *Sci Transl Med*,2010, 2(28):28~28