



碧云天生物技术/Beyotime Biotechnology
 订货热线: 400-1683301或800-8283301
 订货e-mail: order@beyotime.com
 技术咨询: info@beyotime.com
 网址: http://www.beyotime.com

BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法)

产品编号	产品名称	包装
D8407S	BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法)	5μg/each

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法), 英文名称为BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit with Surrogate Reporter, 是基于CRISPR/Cas9基因编辑技术及替身报告基因(Surrogate Reporter)方法研发的, 用于快速、有效、可视化筛选高效sgRNA的试剂盒。本试剂盒包含sgRNA筛选实验时构建相关sgRNA质粒及替身报告基因质粒所需的各种载体质粒及阳性和阴性对照质粒。
- 对于CRISPR/Cas9介导的基因编辑, 由于细胞环境的复杂性如染色质可及性等, sgRNA的靶向识别和基因编辑的效率通常会受到一定影响[1], 因此所选择使用的sgRNA的高效性及特异性至关重要。通常在基因编辑之前, 需要对候选的sgRNA的基因编辑效率进行快速、准确的评估是非常必要的。本试剂盒基于替身报告基因(Surrogate Reporter)技术[2], 将与靶基因序列一致的外源片段定向非移码非终止性插入至替身报告基因质粒的RFP及GFP之间, 并且确保仅在发生基因编辑并且导致移码时才能使GFP报告基因表达, 由此构建的替身报告质粒与能表达Cas9和sgRNA的质粒共转染时, 可通过绿色荧光直观显示发生基因编辑的细胞, 因此把这类报告基因命名为替身报告基因(Surrogate Reporter)。通常情况下, sgRNA靶向效率越高, GFP阳性的细胞占比越高, 由此可对不同sgRNA的基因编辑效率进行评估及筛选。
- 本试剂盒包含替身报告基因质粒、sgRNA质粒及Cas9表达质粒和3个对照质粒, 用户仅需按照说明设计并构建相应质粒, 并转染HEK293T或HEK293细胞, 就可以根据GFP的表达差异快速评估候选sgRNA的基因编辑效率, 从而筛选出高效的sgRNA。本试剂盒同时提供了对照替身报告基因质粒, 以及相应的阳性对照sgRNA质粒及阴性对照sgRNA质粒, 方便设置阳性对照与阴性对照以验证试剂盒的工作效果。
- 本试剂盒中提供的替身报告基因载体质粒pCMV-RFP-STOP-GFP经过EcoRI (GAATTC (1/5)^)和BamHI (GGATCC (1/5)^)限制性核酸内切酶消化后, 切除图谱中标示的‘filler’, 把设计好的sgRNA对应的靶向基因组DNA序列经退火后形成的双链寡核苷酸片段连接到载体中, 即可构建相应的用于基因编辑的替身报告基因质粒。
- 本试剂盒提供的sgRNA质粒pU6-gRNA含两个BsaI内切酶位点, 方便借助Golden Gate Assembly进行sgRNA质粒的快速构建。
- 本试剂盒中的质粒均为卡那霉素抗性。
- BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法)中的6个质粒相关信息如下表所示。

Cat No.	Product Name	Backbone	Inserted Gene	Application
D8407-1	pCMV-RFP-STOP-GFP	pCMV	RFP, GFP	Surrogate reporter
D8407-2	pU6-BsaI-gRNA scaffold	pU6	-	sgRNA vector
D8407-3	pCMV-Cas9-NLS	pCMV	Cas9-NLS	Cas9 expression
D8407-4	pCMV-RFP-PCS-STOP-GFP	pCMV	RFP, GFP	Positive Surrogate reporter
D8407-5	Surrogate-Positive-Control-sgRNA	pU6	Positive sgRNA	Positive sgRNA vector
D8407-6	Surrogate-Negative-Control-sgRNA	pU6	Negative sgRNA	Negative sgRNA vector

- 注1: 对照替身报告质粒pCMV-RFP-PCS-STOP-GFP (D8407-4)中插入的靶向序列为: AGGAAACATGTAATGATAGCGG, CGG为对应的PAM序列。
- 注2: 阳性对照sgRNA质粒Surrogate-Positive-Control-sgRNA (D8407-5)插入的sgRNA编码序列为: AGGAAACATGTAATGATAGG; 阴性对照sgRNA质粒Surrogate-Negative-Control-sgRNA (D8407-6)插入的sgRNA编码序列为: GGCTCTAATCAATCGACTCC。阳性对照sgRNA质粒还可用于human BRCA1基因的敲除。
- pCMV-RFP-STOP-GFP和pU6-gRNA的图谱如下。

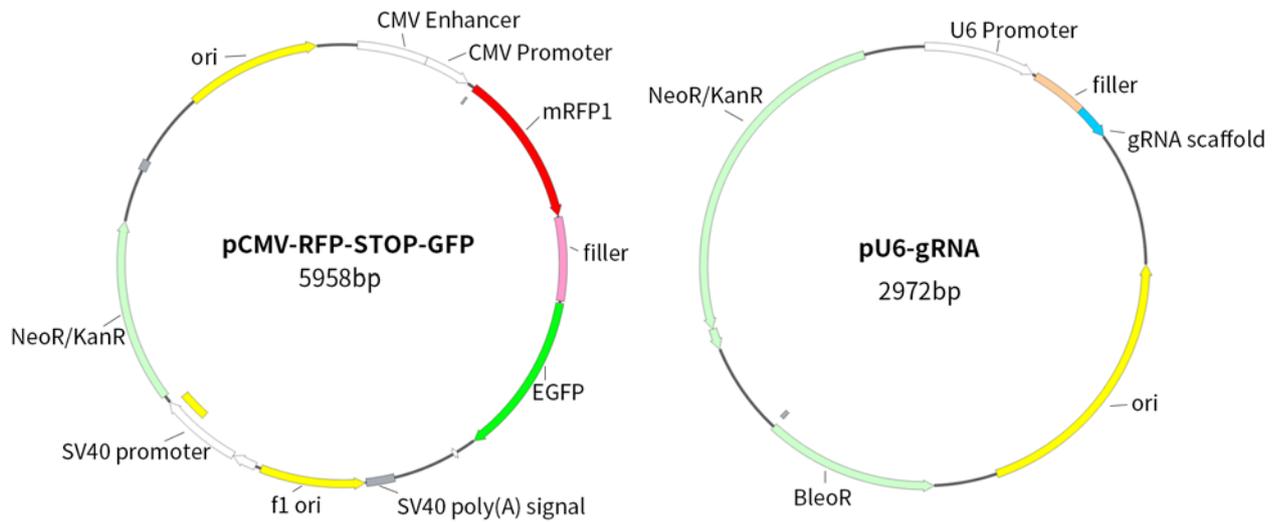


图1. 碧云天BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法) (D8407)中两个载体质粒pCMV-RFP-STOP-GFP和pU6-BsaI-gRNA scaffold的图谱。

➤ 本试剂盒可快速、可视化的检测细胞基因组的编辑效率。使用本试剂盒进行sgRNA筛选的效果如图2所示，相对于基于T7 Endonuclease I (T7EI)的基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)，本试剂盒更高效、更直观。

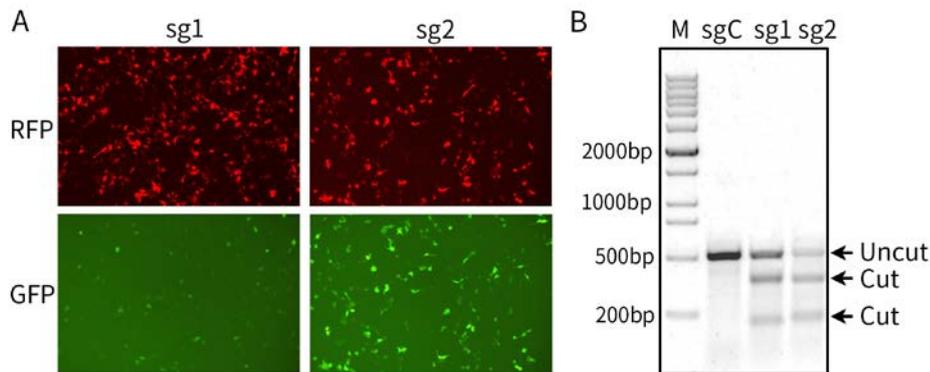


图2. 碧云天BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法) (D8407)用于sgRNA筛选与细胞内基因编辑效率T7EI法检测对比图。图A为使用本试剂盒的替身报告基因法进行sgRNA筛选的效果图。使用pCMV-RFP-STOP-GFP (D8407-1)构建替代报告基因质粒，并使用pU6-BsaI-gRNA scaffold (D8407-2)分别构建两个sgRNA表达质粒分别表达sgRNA1及sgRNA2，然后将100ng替身报告基因质粒与300ng表达sgRNA1或sgRNA2质粒共转染入稳定表达Cas9的HEK293T细胞中。转染约30小时后，表达sgRNA2的细胞中GFP阳性细胞数量显著高于表达sgRNA1的细胞，表明sgRNA2的基因编辑效率更高。图B为使用上述两个sgRNA进行基因编辑效率的T7EI法检测。转染48小时后使用碧云天基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)进行T7EI法检测以评估基因组编辑效率。泳道sgC：无靶向的sgRNA阴性对照，即无基因编辑的对照样品，扩增获得的DNA片段大小为543bp；泳道sg1：sgRNA1对应的基因编辑细胞样品，经T7EI酶切后产生的DNA片段大小分别为380bp和170bp；泳道sg2：sgRNA2对应的基因编辑样品，经T7EI酶切后产生的DNA片段大小分别为380bp和170bp。经公式计算[3]，sgRNA1对应的样品的编辑效率约为30.7%，sgRNA2对应的样品的编辑效率约为48.8%。该检测结果与本试剂盒筛选结果(图A)基本一致。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D8407S-1	pCMV-RFP-STOP-GFP	5μg
D8407S-2	pU6-BsaI-gRNA scaffold	5μg
D8407S-3	pCMV-Cas9-NLS	5μg
D8407S-4	pCMV-RFP-PCS-STOP-GFP	5μg
D8407S-5	Surrogate-Positive-Control-sgRNA	5μg
D8407S-6	Surrogate-Negative-Control-sgRNA	5μg
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存。

注意事项：

➤ 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。

- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

- 首次使用时请先取少量本质粒转化大肠杆菌，进行质粒小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。抽提获得的质粒可以通过酶切电泳进行鉴定，或通过测序进行鉴定。
- 5 μ g包装的本产品质粒浓度为0.2 μ g/ μ l，共25 μ l，可以直接用于酶切或者转染细胞。
- 替身报告基因质粒的构建。根据设计的sgRNA靶向的基因组DNA序列，合成相应DNA oligos，注意确保最终的质粒仅在发生基因编辑且导致移码时才能使GFP报告基因表达。详细的实验步骤请参考碧云天pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter) (D8414)中的质粒构建方案。
- sgRNA质粒的构建。靶DNA序列的选择、对应DNA oligos的设计及详细的实验步骤请参考碧云天pU6-gRNA (D8416)中的质粒构建方案。
- 哺乳动物细胞的转染。
 - 转染前一天，将HEK293T细胞按照10-15万/孔的密度接种于24孔板。
 - 将构建的sgRNA质粒分别与对应的替身报告质粒及Cas9质粒共转染，推荐转染质粒质量比例为Reporter:sgRNA:Cas9=1:2:2。推荐使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)或Lipo6000™转染试剂(C0526)进行细胞转染。首次实验建议使用本试剂盒中包含对照替身报告基因质粒pCMV-RFP-PCS-STOP-GFP (D8407-4)及阳性对照sgRNA质粒Surrogate-Positive-Control-sgRNA (D8407-5)及阴性对照sgRNA质粒Surrogate-Negative-Control-sgRNA (D8407-6)，设置阳性对照与阴性对照。
注：也可以将替身报告质粒与sgRNA质粒按照1:2的质量比共转染入过表达Cas9的稳转细胞株中，筛选效果更佳。碧云天提供多种Cas9稳转细胞株及相应慢病毒产品，如有需要请在碧云天网站查询或参考相关产品。
- sgRNA靶向效率分析。
 - 转染后约48-60小时，即可通过荧光显微镜对候选sgRNA的基因效率进行分析和评估。通常情况下，具有较高GFP阳性率的细胞对应的sgRNA序列具有较高的基因编辑效率，而GFP阳性率较低或无GFP阳性的细胞对应的sgRNA的基因编辑效率较低或几乎没有基因编辑发生。可通过直接观察细胞样品中GFP的表达情况快速筛选出基因编辑效率较高的sgRNA序列，然后进行后续的基因编辑实验。
 - 如需进一步进行sgRNA基因编辑效率的定量分析，可在转染后约48-60小时，收集细胞进行流式细胞实验。由于替身报告基因中包含正常表达的RFP，因此可选择RFP阳性细胞，然后再分析其中的GFP阳性细胞的占比及荧光强度等参数，以消除实验中转染效率不一致带来的影响。

参考文献：

- Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, et al. Nat Biotechnol. 2011. 29(2):143-148.
- Ramakrishna S, Cho SW, Kim S, Song M, Gopalappa R, et al. Nat Commun. 2014. 5:3378.
- Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, et al. Science. 2013. 339(6121):819-23.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0526	Lipo6000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0533	Lipo8000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
D0508	基因组编辑突变检测试剂盒	25/100次
D0510	FnCas12a (Cpf1)	100/500/2000pmol
D0511	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50/250/1000pmol
D1031S	DH5 α 超级感受态细胞	20 \times 100 μ l
D1031M	DH5 α 超级感受态细胞	100 \times 100 μ l
D7080	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250/1250/5000U
D7085	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)	10次
D7086	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (CD4 Enrichment)	10次
D7087	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro)	10次
D7280	菌落直接PCR试剂盒	100/400/1000次
D8403S	BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒	10次
D8407S	BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法)	5 μ g/each
D8414	pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)	1/100 μ g
D8416	pU6-gRNA	1/100 μ g