



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

pU6-gRNA

产品编号	产品名称	包装
D8416-1μg	pU6-gRNA	1μg
D8416-100μg	pU6-gRNA	100μg

产品简介:

- 碧云天生产的pU6-gRNA, 是基于CRISPR/Cas9基因编辑技术而研发的用于构建表达特定guide RNA (gRNA)的哺乳动物表达质粒的载体质粒。用户仅需按照使用说明设计并合成靶基因特异性的寡核苷酸(Target-specific DNA oligos), 然后经过退火形成双链后, 按照使用说明进行操作, 即可构建用于CRISPR基因编辑的特异性sgRNA的完整表达质粒。质粒构建成功后与Cas9表达质粒或dCas9 (dead Cas9)转录激活或转录抑制表达质粒共转染哺乳动物细胞后, 可以通过Zeocin抗性基因进行gRNA表达阳性细胞的筛选, 阳性细胞中通常就会出现预期的目的基因的基因编辑或基因表达调控。
- CRISPR/Cas9是一项突破性的基因组编辑技术, 操作便捷, 应用广泛。CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是一种原核生物利用RNA引导的DNA核酸酶Cas9对外源的噬菌体或病毒核酸进行基因沉默的获得性免疫系统(Adaptive immune system), 后续在此基础上逐渐发展为广泛应用于原核和真核生物的越来越成熟的基因编辑技术。该技术能够在gRNA引导下通过Cas9对原核和真核生物的基因组DNA的靶向序列进行位点特异性的切割, 然后通过易错修复(Error-prone repair)或同源重组(Homologous recombination)在切割位点改变或插入序列来产生移码突变, 从而实现基因敲除。其中gRNA确保识别位点的特异性。随着CRISPR技术的发展, 该技术目前不仅可以实现基因敲除, 还可以实现基因的点突变、插入突变等多种突变方式, 特别是在临床应用方面可以用于修复不良突变等[1, 2]。
- CRISPR/Cas9系统由Cas9 Nuclease和gRNA复合物所组成。gRNA, 也称sgRNA (Single guide RNA), 由18-20bp与靶基因序列互补的CRISPR RNA (crRNA)序列以及能与Cas9特异性结合的Trans-activating crRNA (tracrRNA)序列组成。gRNA通过与靶序列之间的互补配对, 将Cas9 Nuclease引导至靶DNA, Cas9 Nuclease C端的与PAM (Proto-spacer adjacent motif)相互作用的结构域(PAM-interacting domain)识别富含G碱基(5'-NGG-3')的PAM序列, 在HNH和RuvC两个结构域的协同作用下, 在PAM序列NGG上游大约三个碱基处产生DNA的双链断裂(Double-strand break, DSB)。如果该双链DNA断裂发生在细胞内, 在细胞DNA修复过程中会导致基因靶位点处的插入、删除或替换, 从而可能产生移码突变, 导致目的基因的缺失突变(图1) [1]。
- 将Cas9 Nuclease的HNH和RuvC两个结构域进行突变, 即可得到无核酸酶活性的dCas9。dCas9虽不能切割DNA, 但仍可与sgRNA结合, 并在sgRNA引导下特异性识别并结合至靶DNA。利用dCas9直接融合表达或间接招募转录调控因子, 即可实现对sgRNA靶向基因的转录激活或转录抑制; 而将dCas9与表观遗传修饰因子融合表达, 则可对sgRNA靶向基因进行表观遗传修饰, 如甲基化/去甲基化或乙酰化/去乙酰化等, 从而实现对目的基因的表达调控[3]。

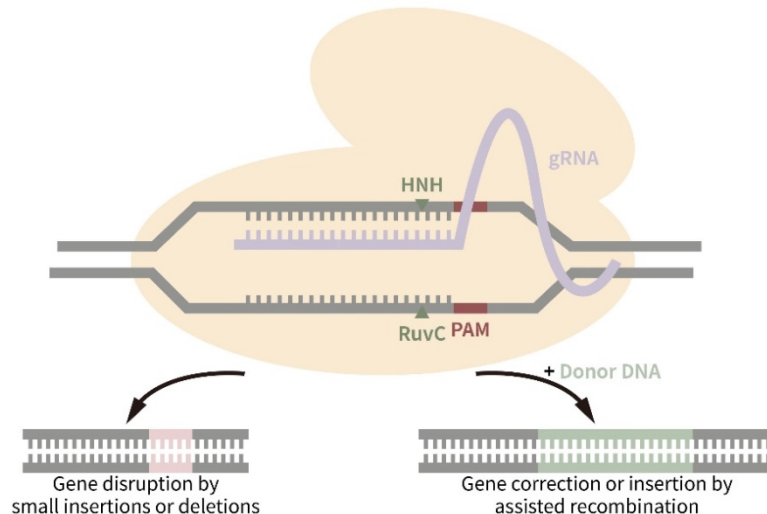


图1. CRISPR/Cas9基因编辑示意图。

- 碧云天同时提供可用于CRISPR-Cas9基因编辑的Cas9系列慢病毒、稳转细胞株及基因编辑相关检测试剂盒, 为用户进行快速基因编辑提供全面解决方案。如需获取相应产品请在碧云天网站查询或在本产品网页点击相关产品。
- 碧云天还提供基于CRISPR-dCas9的可用于基因表达调控如转录调控及表观遗传修饰的质粒体系, 用户可根据研究需要自行选购。利用本载体质粒构建靶向目的基因的sgRNA表达质粒, 与上述dCas9相关表达调控质粒共转染, 即可实现对靶基因的精准表

达调控。具体请在碧云天网站查询或在本产品网页点及相关产品。

- pU6-gRNA载体质粒中含有双BsaI IIS型限制性内切酶识别位点，方便用户借助Golden Gate Assembly进行sgRNA质粒的快速构建。
- pU6-gRNA质粒为卡那霉素抗性。
- pU6-gRNA质粒图谱如下。

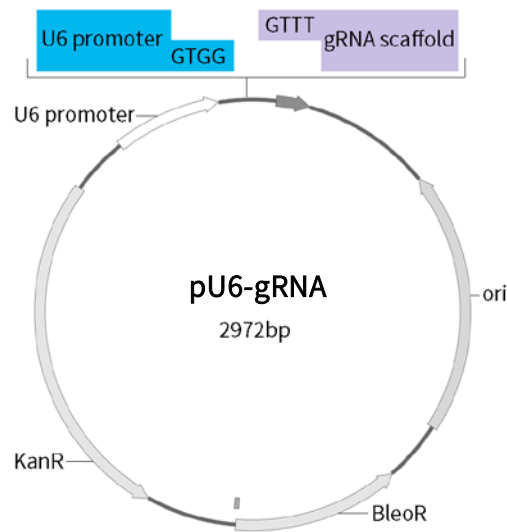


图2. pU6-gRNA (D8416)质粒图谱。

- 碧云天pU6-gRNA的重组克隆效果如图3所示。

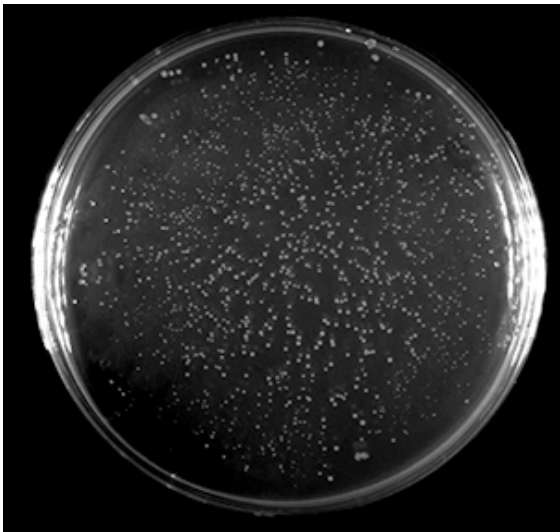


图3. 碧云天pU6-gRNA (D8416)的重组克隆实测效果图。按照本质粒使用说明进行操作，在1-2小时内即可完成sgRNA质粒的重组构建，且无需额外的载体酶切及凝胶回收步骤。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- pU6-gRNA质粒的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。
- pU6-gRNA质粒可使用的测序引物序列如下：
hU6-F Primer: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3'

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D8416-1μg	pU6-gRNA	1μg
D8416-100μg	pU6-gRNA	100μg
—	说明书	1份

保存条件：

-20℃保存，两年有效。

注意事项：

- 100μg包装的本产品质粒浓度为0.5μg/μl，共200μl。
- 对于普通的转化大肠杆菌的操作，不必对连接产物进行纯化，连接产物可以直接用于转化。但用电转方法转化大肠杆菌时，通常宜先用DNA纯化试剂盒或酚氯仿抽提方法等纯化DNA，然后再进行电转。
- 普通连接反应不必进行凝胶电泳观察。如果需要对于连接产物进行凝胶电泳观察，推荐先在65°C孵育10分钟使T4 DNA Ligase失活，以避免T4 DNA Ligase和DNA结合导致的条带位置迁移(Band shift)。
- 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：

1. 靶DNA序列的选择和单链DNA oligos的设计。

a. 靶DNA序列的选择，请参考图4。

- (a) 长度：靶DNA序列一般长度为20个核苷酸，其3'端必须紧邻着PAM序列(NGG)。
- (b) 同源性：确保靶DNA序列与其它序列没有显著的同源性，以避免脱靶效应。
- (c) 方向：靶DNA序列的正义链或反义链均可选择。



图4. DNA序列示例。

b. 单链DNA oligos的设计，请参考图5。

为了将双链oligo连接至pU6-gRNA载体中，必须按照以下原则设计oligos。

Forward: 5'-CACCG-20bp-3'

Reverse: 5'-AAAC-20bp (Copy bottom strand 5'→3')-C-3'

注：如果靶序列的第一个碱基不是G，则必须在5'的overhangs后加一个G以供U6启动子转录起始。



图5. 单链DNA oligo示例。

2. 合成双链oligo。

a. 退火oligos。

- (a) 把待退火的DNA oligos用Ultrapure Water或ddH₂O配制成100μM。
- (b) 参考下表设置反应体系。

Reagent	Volume
sgRNA oligo forward (100μM)	1μl
sgRNA oligo reverse (100μM)	1μl
Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)	2μl
Ultrapure Water	6μl
Total volume	10μl

按照上述加入各种试剂，混匀。如果所用的PCR仪没有热盖，滴加矿物油(Mineral oil)以防止蒸发。

注：此时oligos的浓度为10μM。推荐使用碧云天的Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)进行退火。

(c) 参考下表设置PCR仪进行退火反应。

Step	Temperature	Time	Note
1	95°C	5min	让oligo充分变性
2	-0.1°C/sec, to 25°C	About 15min	退火
3	4°C	Hold	暂时存放

注1：每秒下降0.1°C，降至25°C的程序设置，以Bio-Rad的T100为例：1. 95°C, 5:00; 2. 95°C, 0:01, -0.1°C per cycle; 3. GOTO step 2, 700X; 4. 4°C, ∞。

注2：如果所用的PCR仪不具备下降0.1°C的功能，也可以设置为每60秒下降1°C。程序设置以Bio-Rad的T100为例：1. 95°C, 5:00; 2. 95°C, 1:00, -1°C per cycle; 3. GOTO step 2, 70X; 4. 4°C, ∞。

注3：如果条件有限，也可以将水浴锅加热至95°C，把PCR管放在水浴锅中，或者把煮沸的热水加入到保温杯或保温瓶中，待水温降到95°C时放入PCR管。所用水量控制在1-2小时内自然降温至25°C左右。此方法的退火效果可能会比使用PCR仪略差一些。

(d) 退火结束后可以稀释后直接用于Golden Gate重组反应，也可以在-20°C冻存备用。

- b. 制备50nM双链oligo工作液。
 将步骤2a中所获得产物10μM的双链oligo用Ultrapure Water稀释20倍至500nM, Vortex充分混匀。如需长期储存, 可将500nM的双链oligo原液储存于-20°C。将500nM双链oligo原液稀释10倍, 制备成50nM双链oligo工作液。
 注1: 冷冻的双链oligo需要放在冰上解冻。
 注2: 50nM双链oligo工作液不适合长期存放, 建议现用现配。
 注3: 如果双链oligo的温度高于室温, 则会导致部分DNA变性, 克隆效率降低, 建议重新制备。

3. Golden Gate重组反应。

- a. 参考下表设置连接反应体系。

Reagent	Volume
pU6-gRNA	100ng
BsaI	1μl
10X Ligation Buffer	2μl
T4 DNA Ligase	1μl
Diluted annealed oligos (50nM)	2μl
Ultrapure Water	To 20μl

注: 推荐使用碧云天的BeyoFast™ BsaI (D5649)、T4 DNA Ligase (D7006/D7008)。

- b. 用移液器轻轻吹打混匀或轻微Vortex混匀, 室温离心数秒, 使液体积聚于管底。

- c. 参考下表设置PCR仪进行Golden Gate Assembly反应。

Temperature	Time
37°C	1h
55°C	5min
4°C	∞

- d. 反应完毕后, 将反应体系置于冰上, 然后就可以转化至感受态。

4. 转化至DH5α超级感受态细胞(D1031)。

- a. 解冻感受态细胞。取感受态细胞放置冰浴或冰水浴中融化, 通常需要5分钟以上的时间。解冻后须尽量在10分钟内使用, 放置时间过长会影响转化效率。
 b. 取一管感受态细胞, 加入步骤3中获得的连接产物, 轻轻弹击管底约2-3次或轻轻晃动约2-3次以混匀, 立即冰浴静置30分钟。
 注: 所用DNA体积通常不宜超过感受态细胞体积的10%, 混合时不得使用移液器进行吹打。
 c. 热激处理。将冰浴放置的离心管快速置于42°C水浴中, 静置热激45秒。随后立即转移至冰水浴中静置2分钟以快速冷却至接近零度。热激及转移至冰浴过程中切勿晃动离心管。
 d. 复苏培养。加入900μl不含抗生素的LB培养基, 颠倒数次混匀, 37°C摇床约150rpm复苏培养1小时。
 e. 收菌涂板。约5000×g室温离心1分钟, 沉淀细菌, 吸除约900-950μl上清, 余下约50-100μl上清。用移液器轻轻吹打并重悬菌体, 随后涂布到含氨苄抗生素的LB平板上。
 f. 将LB平板倒置放于37°C培养箱培养过夜。

5. 克隆分析。

- a. 选取5-10个菌落, 在含卡那霉素的LB培养基中37°C培养过夜。
 b. 抽提质粒DNA, 推荐使用质粒小量抽提试剂盒(D0003/D0005)。
 c. 使用试剂盒中提供的hU6-F Primer对重组载体进行测序, 通过测序确定双链oligo是否成功插入至载体及其方向是否正确。
 d. 也可通过菌落PCR鉴定, 引物设计可以一端为hU6-F Primer, 另一端为您自己的sgRNA oligo reverse primer, 片段大小约为274bp。
 e. 不建议使用限制性内切酶进行分析, 因为插入的双链oligo较小。
 f. 最终通过测序验证插入片段是否正确。

6. 哺乳动物细胞系的转染。

推荐使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)或Lipo6000™转染试剂(C0526)。对于基因编辑实验, 碧云天提供丰富的Cas9稳转细胞株, 将单个或多个构建成功的sgRNA表达质粒构建转染进Cas9稳转细胞株中, 即可实现单靶向或多靶向的基因编辑; 对于表达调控实验, 碧云天提供可用于靶基因表达调控的dCas9质粒体系, 与构建成功的靶向目的基因的sgRNA表达质粒共转染, 即可实现对靶基因的转录调控(转录激活/抑制)或表观遗传修饰(甲基化/去甲基化/乙酰化/去乙酰化等)。如需获取相关产品请在碧云天网站查询或在本产品网页点及相关产品。

7. 基因编辑效率/表达调控效率检测。

- a. 对于基因编辑效率检测: 推荐使用基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)检测靶基因DNA片段的突变, 也可以通过目的基因的抗体进行检测。
 注: 由于CRISPR基因敲除通常是仅若干个碱基的缺失突变, 不适合通过qRT-PCR对目的基因的mRNA进行定量检测来判断是否实现了目的基因的敲除。
 b. 对于表达调控效率检测: 用户可根据具体实验选择合适的细胞裂解液, 对靶DNA/mRNA进行定量检测或利用抗体检测靶基因的表达水平。

参考文献：

1. Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, et al. Cell. 2014. 156(5):935-949.
2. Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.
3. Hsu PD, Lander ES, Zhang F. Cell. 2014. 157(6):1262-1278.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0526	Lipo6000™转染试剂	0.5/1.5/5×1.5ml
C0533	Lipo8000™转染试剂	0.5/1.5/5×1.5ml
D0251	Annealing Buffer for DNA Oligos (5X)	1ml
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
D1031	DH5α超级感受态细胞	20×100/100×100μl
D5649-50μl	BeyoFast™ BsaI	50μl
D7006	T4 DNA Ligase	40,000U
D7008	T4 DNA Ligase	200,000U
D7080	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250/1250/5000U
D7168	BeyoRT™ II cDNA第一链合成试剂盒(RNase H-)	20/100/500次
D7170	BeyoRT™ II cDNA合成试剂盒(with gDNA Eraser)	20/100/500次
D7178	BeyoRT™ III cDNA第一链合成试剂盒	20/100/500次
D7180	BeyoRT™ III cDNA合成试剂盒(with gDNA EZeraser)	20/100/500次
D7182	BeyoRT™ III cDNA第一链合成预混液(5X)	20/100/500次
D7185	BeyoRT™ III cDNA合成预混液(5X) (with gDNA EZeraser)	20/100/500次
D7260	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7262	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7265	BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7268	BeyoFast™ SYBR Green One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7271	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X)	1/5/25ml
D7272	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, Low ROX)	1/5/25ml
D7273	BeyoFast™ Probe qPCR Mix (2X, High ROX)	1/5/25ml
D7277	BeyoFast™ Probe One-Step qRT-PCR Kit	100/500次
D7280	菌落直接PCR试剂盒	100/400/2000次
D8403S	BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒	10次
D8407	BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法)	5μg/each
D8414	pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)	1/100μg
D8416	pU6-gRNA	1/100μg
P0013B	RIPA裂解液(强)	100ml
R0011	Beyozol (总RNA抽提试剂)	100ml
R0016	Trizol (总RNA抽提试剂)	100ml
ST102	Kanamycin (10mg/ml, 1000X)	5ml
ST1450-20mg	Zeocin (博莱霉素)	20mg
ST1450-100mg	Zeocin (博莱霉素)	100mg
ST1450-0.25ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml×0.25ml
ST1450-1ml	Zeocin (博莱霉素)	20mg/ml×1ml