



# Genome-CRISP™ CRISPR-Cas9 产品及服务

## 用户手册

广州高新技术产业开发区  
广州科学城掬泉路3号  
广州国际企业孵化器F区8楼  
510663

电话: 4006-020-200; 020-32068595  
传真: 020-32052877

网址: [www.igenebio.com](http://www.igenebio.com)

## 用户手册

### Genome-TALER™ CRISPR-Cas9 产品和服务

- I. CRISPR-Cas9 技术简介
- II. 相关服务
- III. CRISPR-Cas9 基因组编辑流程概览
- IV. 关键步骤
- V. 参考文献
- VI. 附录
  - A. 克隆产品及服务
  - B. 其他产品及服务
- VII. 使用许可及质保声明

## I. 技术简介

### CRISPR-Cas9 体系技术背景

CRISPR-Cas 系统（clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats-associated protein systems）是细菌及古细菌进化出来用以抵御病毒和质粒入侵的适应性机制。CRISPR-Cas 系统的高效基因组编辑功能已被应用于多种生物，包括斑马鱼、小鼠、大鼠、秀丽隐杆线虫、植物及细菌。多个科研小组的研究都显示，与锌指核酸酶（ZFNs）和转录激活样效应核酸酶（Transcription activator-like effector nucleases, TALEN）相比较，CRISPR-Cas 系统介导的基因组靶向实验在细胞或斑马鱼中显示出相似甚至更高的效率。

### 高效灵活的基因组靶向操作

在 CRISPR-Cas9 系统中，CRISPR RNA（crRNA）与转录激活 crRNA（Trans-activating crRNA, tracrRNA）退火形成的复合物能特异识别基因组序列，并引导 Cas9 核酸内切酶在靶生成 DNA 双链断裂（DSB），诱导基因敲除、基因敲入（配合供体克隆）、序列修饰等基因组编辑操作。识别复合物可以通过融合 crRNA 与 tracrRNA 形成 sgRNA（single-guided RNA）进行简化。基因组靶点序列上上长有约 20bp 与 sgRNA 识别区序列一致。该序列末端紧接着三核苷酸区域 PAM（5' -NGG-3'）为 Cas9 识别位点，是实现剪切功能的关键。sgRNA 识别并结合该序列的互补链；随后 Cas9 核酸酶剪切被识别的靶点 DNA 双链。

CRISPR-Cas9 体系的 RNA-DNA 识别机制为选择性基因组编辑提供了一个简便而强大的工具。该体系其中一个最重要的优势是 Cas9 蛋白可在多个不同的 sgRNA 的引导下同时修饰多个基因组靶点。

### 优势

- RNA 导向的基因组 DNA 特异识别，无需考虑 DNA 甲基化
- 设计简单快速，无需重复构建核酸内切酶
- 较 ZFN 和 TALEN，有相同或更高的基因编辑效率
- 灵活高效的多重靶向编辑设计，可同时编辑多个基因

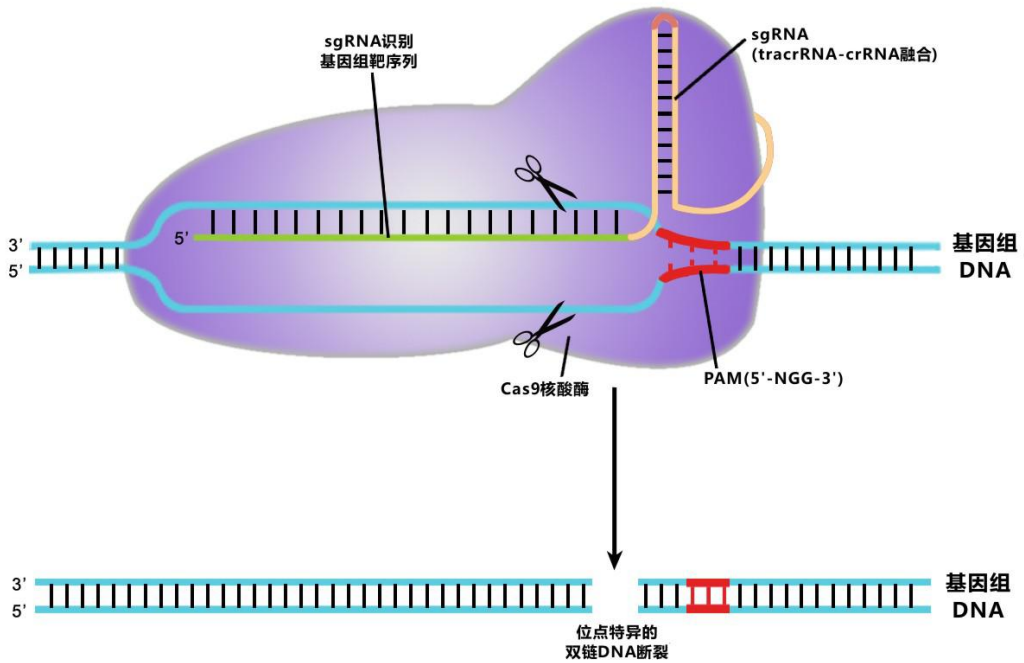


图 1. CRISPR-Cas9介导基因组编辑原理图

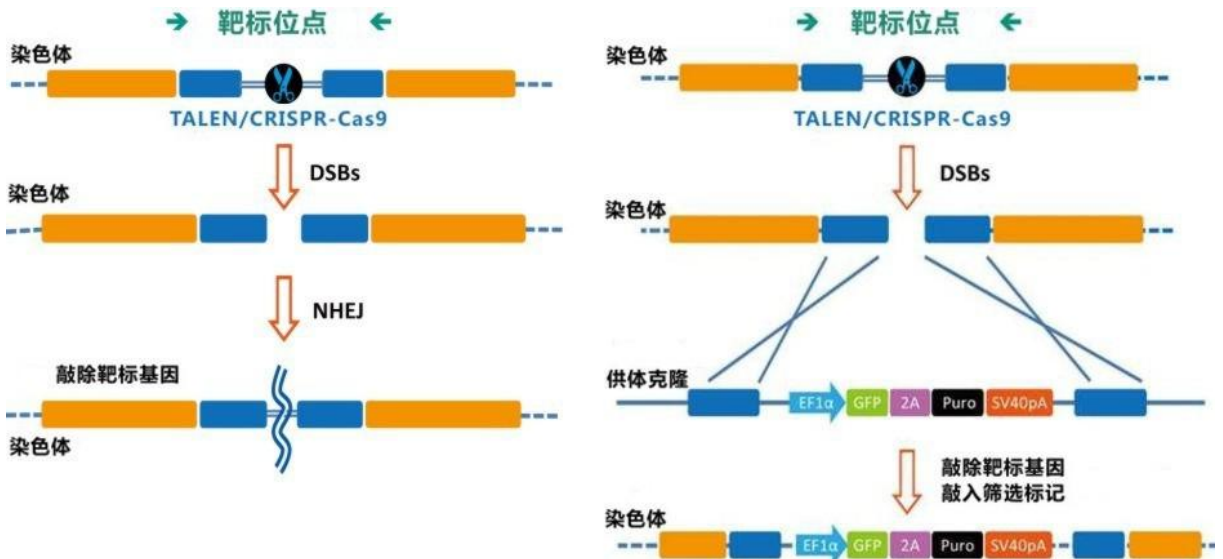
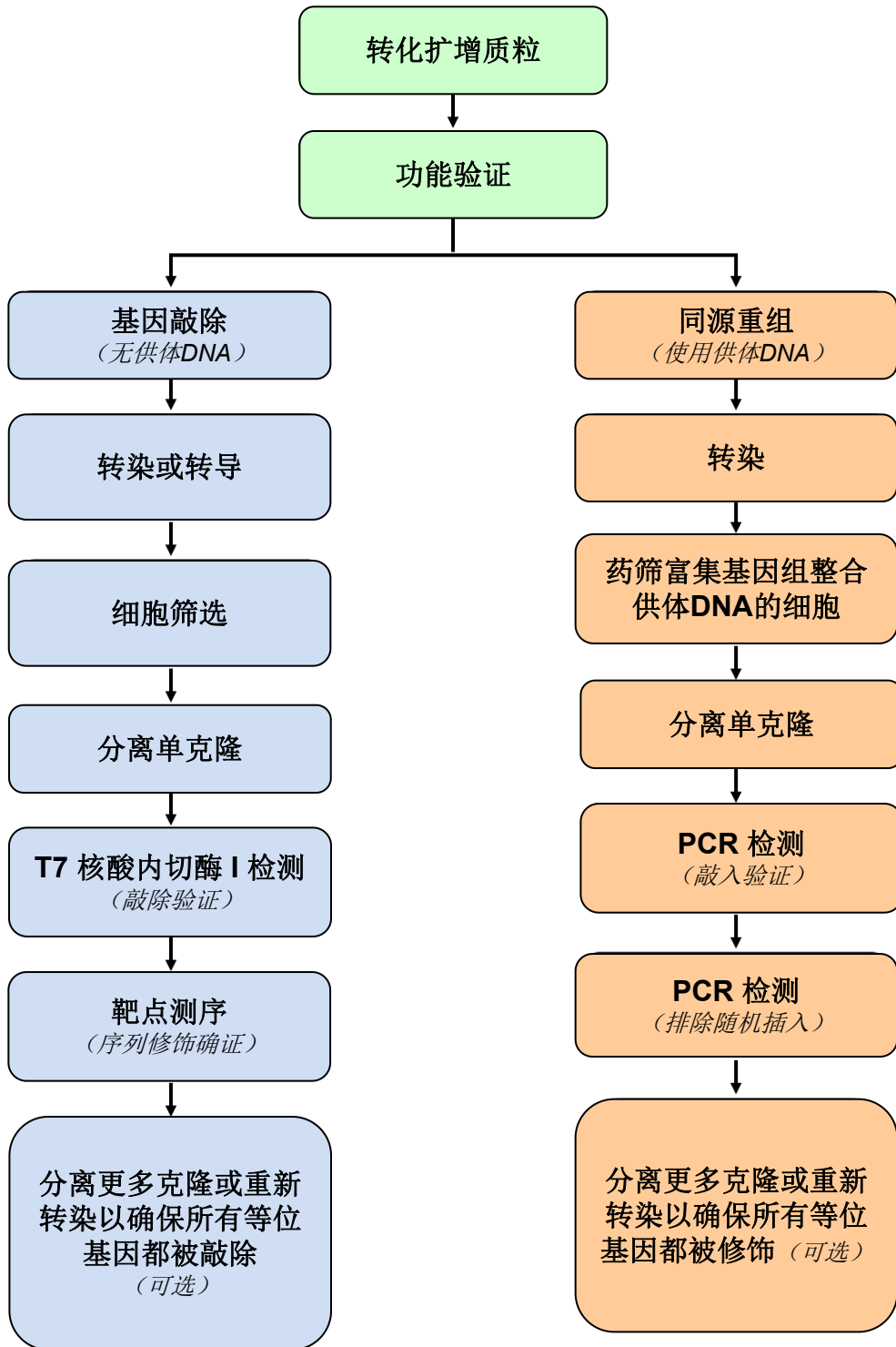


图 2. sgRNA介导的基因组编辑。左图：sgRNA引导Cas9核酸酶生成DSB，诱发NHEJ修复；右图：通过HR反应利用供体质粒在基因组序列上插入目的基因及筛选标记（或其他遗传因子），修复DSB。

## II. 相关服务

服务		描述
验证服务	错配酶切检测	染色体水平功能验证。通过检测CRISPR-Cas9介导的非同源末端连接（NHEJ）在染色体靶点上生成的插入缺失突变验证其功能。
供体克隆服务 (详见附录)	供体克隆设计与构建	我们会依据您的实验需求，提供供体克隆客户定制服务。供体克隆能将您的目的基因、筛选标记或遗传因子通过CRISPR-Cas9介导的同源重组（HR）整合到宿主细胞的基因组靶点。我们提供一系列含有不同筛选标记及遗传因子的供体载体设计以满足您的实验需求。
稳转细胞株服务 (详见附录)	单克隆细胞株	含有CRISPR-Cas9介导的基因组修饰的单克隆细胞系。
	细胞库	为含有CRISPR-Cas9介导的基因组修饰的单克隆细胞系建库。
转基因小鼠服务	转基因小鼠	含有CRISPR-Cas9介导的基因组修饰的转基因小鼠。

### III. CRISPR-Cas9 基因组编辑流程概览



## IV. 关键步骤

### A. 质粒扩增

我们建议客户在基因靶向实验前先对基因组编辑工具质粒进行扩增。质粒转化可使用RecA-和EndA-型E.coli感受态细胞以及适用于该感受态的标准实验条件。

在进行CRISPR-Cas9体系质粒的转化时，建议使用新制的氨苄霉素抗性（50µg/mL）LB固体培养基平板，用 50-200µL 已转化的感受态细胞涂板。将平板在37°C下孵育过夜，所得菌落接种到约200mL的含50µg/mL氨苄青霉素的LB培养基，在37°C下摇菌过夜。过夜培养后，使用去内毒素质粒DNA大量提取试剂盒提取质粒DNA。

如需确证扩增质粒的完整性，我们建议推荐客户使用限制性内切酶酶切或直接测序进行验证。

### B. CRISPR染色体水平验证

CRISPR-Cas9介导的NHEJ反应常会在Cas9的剪切位点附近引入数个碱基的插入缺失突变。我们推荐使用 GeneCopoeia 推出的 IndelCheck™ CRISPR/TALEN 插入缺失检测体系（ICPE-050, ICPE-200）对这类突变进行检测。替代选择包括Cel1、绿豆酶及 S1核酸酶。

T7 核酸内切酶 I 检测实验在 [IndelCheck™ 检测体系的用户手册](#) 中有更详细的叙述。我们在此提供一个简要的概述。

1. 转染24或48小时后，收集细胞使用 Lysis Buffer 进行裂解（推荐）或提取细胞的基因组DNA。
2. 使用靶点 PCR 试剂盒扩增sgRNA靶点附近的序列。
3. 用 5 µL PCR产物跑2%凝胶电泳进行检测。对任意模板，都应确保至少有一条产物带对应引物的预期扩增产物，且条带大小符合基因组上引物结合位点之间的距离。

*关键步骤：如PCR出现多个扩增子条带，应重设引物并优化PCR条件，避免脱靶扩增。如碰上特殊情况无法获得单一条带，可先胶回收长度正确的条带，再进行杂合双链重退火及Surveyor核酸酶消化。*

4. DNA杂合双链形成。此时，PCR产物中包括含有CRISPR-Cas9介导修饰的和不含修饰的基因组DNA。取300ng产物，在PCR仪中设定解链-退火程序中进行杂交。
5. T7 核酸内切酶 I 消化。用T7 核酸内切酶 I 检测试剂盒消化杂交后的同源或杂合DNA双链，验证CRISPR-Cas9的酶切效率。

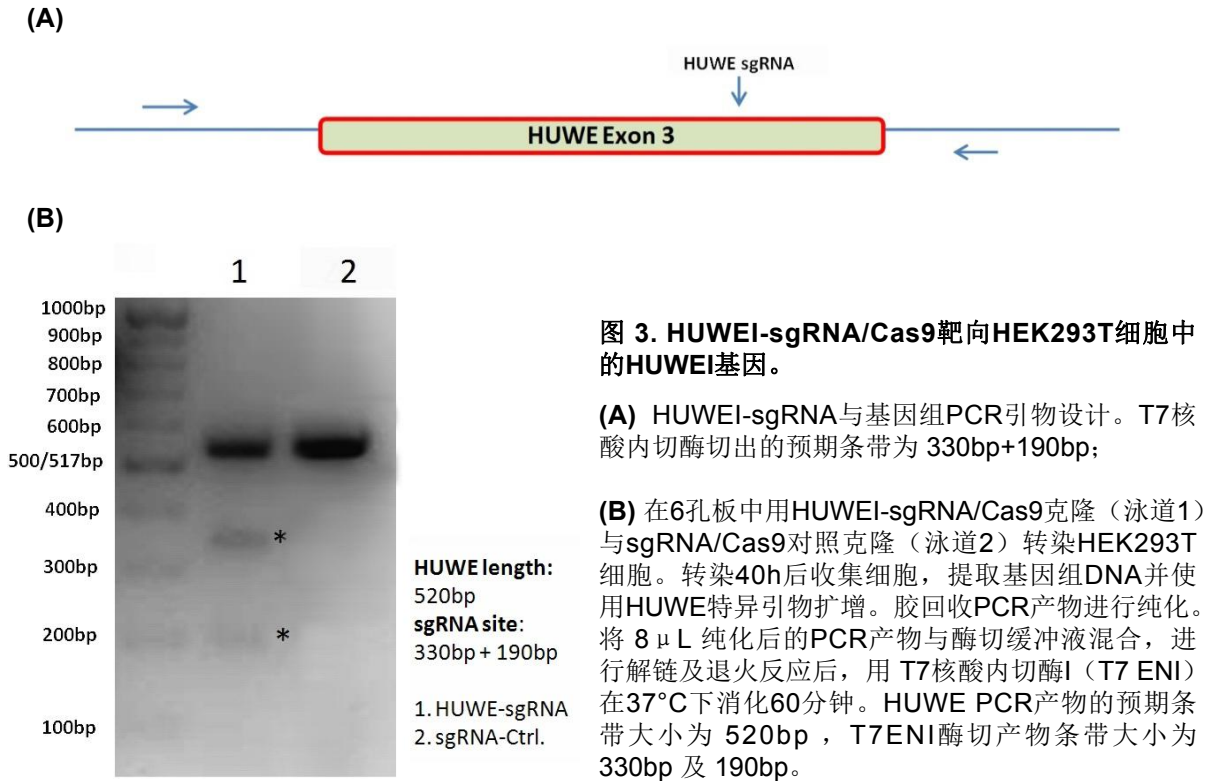


图 3. HUWEI-sgRNA/Cas9 靶向 HEK293T 细胞中的 HUWEI 基因。

(A) HUWEI-sgRNA 与基因组 PCR 引物设计。T7 核酸内切酶切出的预期条带为 330bp+190bp；

(B) 在 6 孔板中用 HUWEI-sgRNA/Cas9 克隆（泳道 1）与 sgRNA/Cas9 对照克隆（泳道 2）转染 HEK293T 细胞。转染 40h 后收集细胞，提取基因组 DNA 并使用 HUWE 特异引物扩增。胶回收 PCR 产物进行纯化。将 8  $\mu$ L 纯化后的 PCR 产物与酶切缓冲液混合，进行解链及退火反应后，用 T7 核酸内切酶 I（T7 ENI）在 37°C 下消化 60 分钟。HUWE PCR 产物的预期条带大小为 520bp，T7 ENI 酶切产物条带大小为 330bp 及 190bp。

### C. 共转染（或转染）靶细胞

1. 按照目的细胞类型的推荐实验条件，在六孔细胞培养板每孔接种约 100,000 到 300,000 个待转染细胞。视需要调整培养体积。转染前一日，用胰蛋白酶进行消化并计算细胞数目。决定每孔接种的细胞数，以使它们在转染时达到 70-80% 的融合率。
2. 次日，根据厂商提供的说明，使用适合的转染试剂制备 CRISPR-Cas9 体系质粒转染混合物。让转染混合物在细胞上反应超过 6 小时。

#### 技术说明：

- 1) 因为不同细胞系的转染效率有所不同，我们建议客户优化质粒与转染试剂用量直至取得最佳效果。
- 2) 为取得最优的转染效果，我们建议将质粒 DNA 与转染试剂、无血清无抗性培养基及完全培养基（如 DMEM/F12+10% FBS 无抗性培养基）内生长的细胞预混合。
- 3) 对于难转染细胞（如原代细胞、干细胞或造血干细胞），利用非被动的转染方法也许更为明智。请按照该细胞类型的供应商提供的实验准则操作。
3. 转染 24 小时后，弃去转染培养基，加入含抗生素的完全生长培养基，取 1/10 或 1/20 细胞接种 6 孔板，保留 1 组板用作重组位点 PCR 检测鉴定样品（见后文）。让细胞回复 24 小时。
4. 转染 48 小时后开始进行药筛。我们建议对抗生素浓度进行优化，以取得最佳效果。
5. 对于同源重组（HR）介导的基因敲入实验，建议进行另一轮药筛富集基因组整合了供体 DNA 序列的细胞。

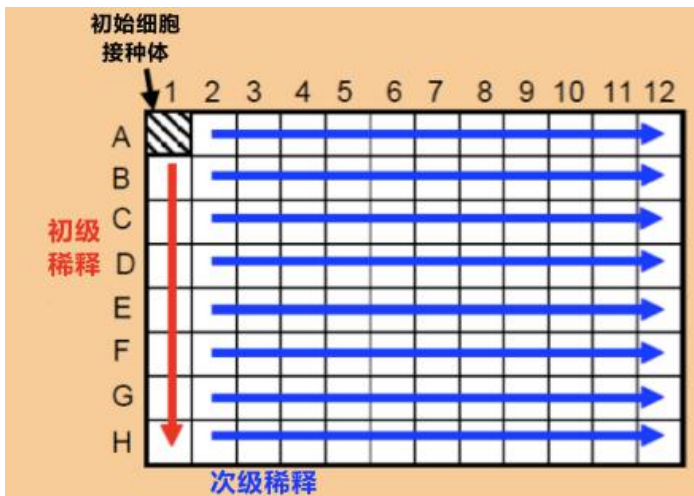
技术说明：

通过用未转染细胞确立致死曲线，可以确定抗生素对靶细胞系的有效浓度。药筛48小时候能杀死超过90%细胞的抗生素浓度（一般有效范围为0.5 $\mu$ g-5 $\mu$ g/mL）即为该靶细胞系筛选的正确剂量。

**D. 分离单克隆细胞系**

连续稀释法被广泛用于分离含有目的修饰的单细胞，以进行扩增培养构建新的单克隆细胞系。像大多数单克隆分离方法，该方法也不能保证所选的细胞群落源自单一细胞。建议的做法是进行第二轮分离增大筛选到单克隆系的概率。此外值得一提的是，不同细胞类型在连续稀释法中的表现也有很大区别，因此实验时应针对目的细胞类型查阅相关的文献资料。

1. 在灭菌的 96 孔板每孔加入100 $\mu$ L 培养基，留空 A 1孔。



2. 在 A1 孔加入 200 $\mu$ L 细胞悬浮液，取其中 100 $\mu$ L 与 B1 孔中的培养基混匀，混匀过程中避免产生气泡。继续在第1列进行同样的 1:2 稀释至 H1 孔，并用培养基将第 1 列每孔体积定容至 200 $\mu$ L。
3. 混匀第 1 列的细胞悬浮液，各取其中 100 $\mu$ L 加至第 2 列孔中。用移液器轻柔混匀，避免产生气泡。重复此 1:2 稀释至第 12 列，并用培养基将每孔体积定容至 200 $\mu$ L。
4. 将培养板放在 37 $^{\circ}$ C 培养，避免扰动。
5. 培养 3 天后可通过显微镜观察到细胞；至 5-8 天左右，视细胞生长情况，可开始进行标记。在培养板盖上对含单群落的孔进行标记。这些群落其后可转移至更大的容器进行扩大培养。

技术说明：

- 1) 在 A1 孔加入4000个细胞（2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/mL）是较理想的起始浓度。对难生长的细胞系，可增加起始浓度。
- 2) 如有荧光报告基因，应观察哪些细胞群落有荧光表达。如果报告基因不是能直接观察的类型，则需等到其后的培养步骤再进行相关测量。
- 3) 每一个有单细胞群落的孔都应用独特的标识号标记，并在对应的培养板和实验笔记上使用同样的标识号。



## E. CRISPR-Cas9修饰及同源重组 (HR) 细胞验证

1. 通过设计引物对 5 端或 3 端重组臂的进行重组位点PCR扩增，可以确证供体 DNA 特异整合到基因组上的靶点。

### 2. 重组位点验证 PCR 实验步骤

1) 使用前，验证引物应被稀释至 10  $\mu$ M。验证 5 端或 3 端重组臂已足以证明供体片段整合，但也可以选择同时验证两端重组臂作为额外的确证。

2) 重组位点验证 PCR 标准流程细节：

a) 用合适的基因组 DNA 少量提取试剂盒从阳性对照细胞或实验组细胞中分离基因组 DNA。请按照试剂盒制造商提供的实验说明操作。

b) 重组位点验证 PCR (反应体系如下)

试剂	CRISPR-Cas9 + 供体克隆	对照组 (供体克隆)
基因组DNA(60~100ng/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
10 $\mu$ M 5' (or 3') AAVS1 PCR Primer Mix	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
5 $\times$ UltraPFTM Buffer (Mg <sup>2+</sup> free)	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
10 mM dNTPs	0.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ L
20mM MgSO <sub>4</sub>	2.5 $\mu$ L	2.5 $\mu$ L
UltraPF(5U/ $\mu$ l)	0.25 $\mu$ L	0.25 $\mu$ L
PCR级蒸馏水	14.75 $\mu$ L	14.75 $\mu$ L
<b>总体积</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>	<b>25 <math>\mu</math>L</b>

98°C, 5min

98°C, 20sec

55°C, 30sec

72°C, 1min

} 35 cycles

72°C, 7min

Hold at 4~16°C

PCR产物用1X TAE缓冲液和1% Agarose/EtBr 凝胶电泳，确认重组位点验证PCR结果

样品的 5 端及 3 端重组位点验证 PCR 结果因引物设计而异。

技术说明：

1) 3 端与 5 端重组位点的 PCR 结果条带强弱可能会有所差异。原因有可能是两端重组位点的染色体结构、修饰和该区域的序列影响了 PCR 的扩增效率。

2) 一端重组位点的验证 PCR 结果为阳性就足以确证整合成功。

3) 虽然不常见，但供体克隆同时与非靶标位点发生随机整合的情况也有可能发生。负筛选方法可检出基因组同时带有随机整合的克隆。

## V. 参考文献

1. Horvath P, Barrangou R (January 2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea". *Science* 327 (5962): 167–70.
2. Marraffini LA, Sontheimer EJ (February 2010). "CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea". *Nat Rev Genet* 11 (3): 181–190.
3. Hale CR, Zhao P, Olson S, et al. (November 2009). "RNA-Guided RNA Cleavage by a CRISPR RNA-Cas Protein Complex". *Cell* 139 (5): 945–56.
4. van der Oost J, Brouns SJ (November 2009). "RNAi: prokaryotes get in on the act". *Cell* 139 (5): 863–5. doi:10.1016/j.cell.2009.11.018.
5. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816–821.
6. Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., and Marraffini, L.A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nat. Biotechnol.* 31, 233–239.
7. Hsu, P.D., Scott, D.A., Weinstein, J.A., Ran, F.A., Konermann, S., Agarwala, V., Li, Y., Fine, E.J., Wu, X., Shalem, O., et al. (2013). DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* Published online July 21, 2013.

## VI. 附录

### A. 克隆产品及服务

#### Genome-CRISP™ Cas9 核酸酶及 D10A 切口酶表达克隆

Cas9 核酸酶表达克隆表达经过人类密码子优化的Cas9核酸酶基因（来源为*Streptococcus pyogenes*）。Cas9 切口酶表达克隆表达 Cas9 的 D10A突变体（第10位的天冬氨酸被丙氨酸替换）。

Cas9核酸酶与sgRNA协同作用，能特异地识别3端紧随PAM序列N-G-G的20bp靶点上，并在其上生成DNA双链断裂（DSB）。DSB可由细胞的非同源末端连接（NHEJ）机制修复，该机制易于在修复断裂位点时引入插入缺失导致移码突变；DSB也可在细胞内有修复模板存在时通过同源重组机制（HR）修复。CRISPR生成DSB的强大能力已被利用到众多实验系统，进行基因敲除或在基因组敲入点突变、报告基因及其他修饰。

Cas9 D10A 切口酶与野生型的Cas9使用同样的识别体系，区别只是它在DNA上生成的是单链“切口”而非双链断裂。单链切口一般不引发NHEJ或HR修复，但当一对sgRNA定位正确并分别靶向靶点两侧的双链，生成的两个单链切口能构成一个双链断裂（DSB），诱发NHEJ或HR修复。这样的双切口策略常被用于需要低脱靶率的基因组修饰实验设计。

货号	产品	启动子	报告基因/筛选标记
CP-C9NU-01	Cas9 核酸酶表达克隆	CMV	mCherry / Neomycin
CP-LvC9NU-01	Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆	CMV	Neomycin
CP-LvC9NU-02	Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆	CMV	eGFP / Neomycin
CP-C9NI-01	Cas9 D10A 切口酶表达克隆	CBh	N/A
CP-C9NI-02	Cas9 D10A 切口酶表达克隆	CMV	mCherry / Neomycin

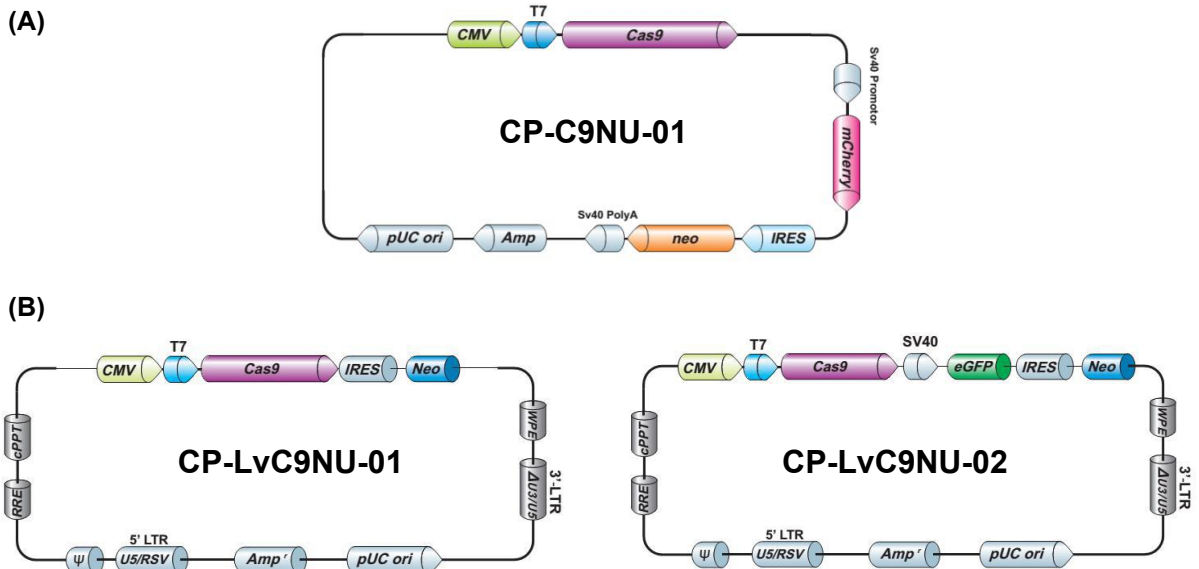


图 4: (A) Cas9 核酸酶表达克隆质粒图谱；(B) Cas9 核酸酶慢病毒表达克隆质粒图谱。

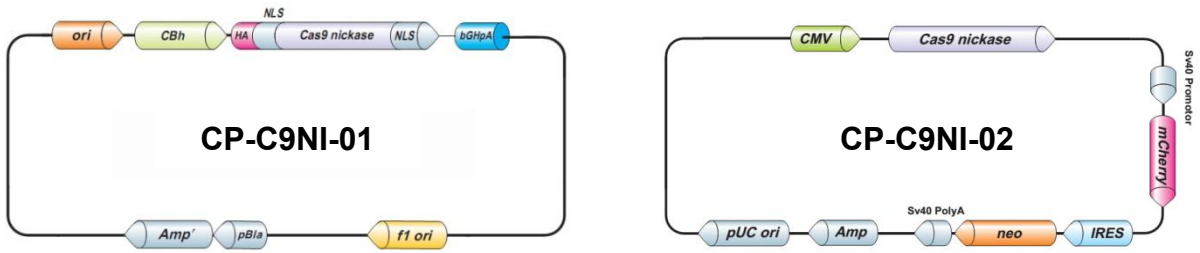


图 5: Cas9 切口酶表达克隆质粒图谱。

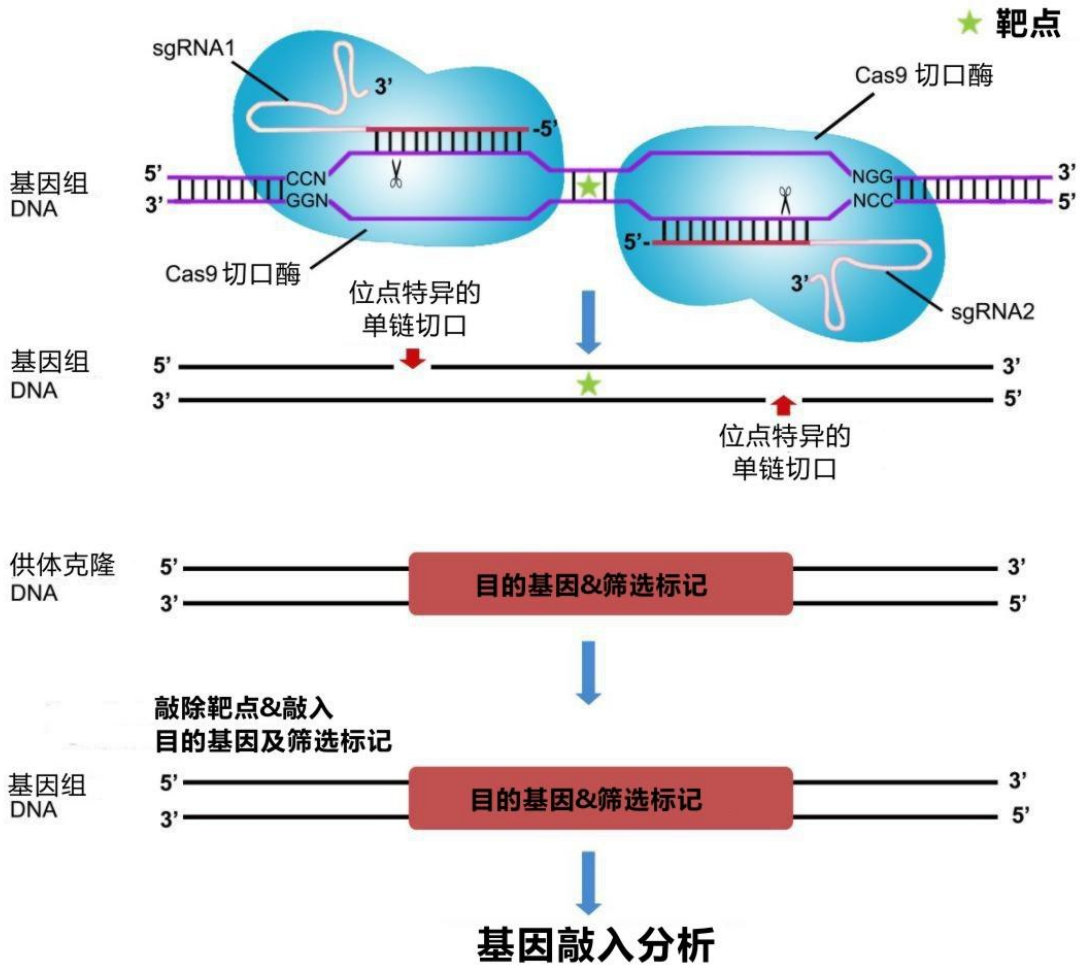


图 6: Cas9 D10A切口酶的“双切口”设计原理图

**Genome-CRISPR™ sgRNA 设计与克隆定制服务**

GeneCopoeia为客户的目的基因提供sgRNA（single-guide RNA）设计与克隆定制服务。sgRNA克隆表达一个单链的融合sgRNA（由crRNA和tracrRNA融合而成）。当Cas9核酸内切酶存在时，sgRNA能识别靶标DNA序列并引导Cas9核酸酶剪切靶标位点，形成DNA双链断裂（DSBs），进而实现基因敲除、敲入及突变等基因组编辑。多个sgRNA克隆与一个Cas9克隆共转染可同时在基因组中编辑多个位点，使实验设计更高效、更灵活。

载体	启动子	sgRNA 及 Cas9	筛选标记/报告基因
pCRISPR-SG01	U6	只表达 sgRNA*	Hygromycin
pCRISPR-LvSG03	U6	只表达 sgRNA*	Puromycin/mCherry
pCRISPR-CG01	U6	载体含有CMV启动子启动表达的Cas9核酸酶基因	Neomycin / mCherry
pCRISPR-CG02	U6	载体含有CBh启动子启动表达的Cas9核酸酶基因	N/A
pCRISPR-CG04	U6	载体含有CMV启动子启动表达的Cas9核酸酶基因	Neomycin / copGFP
pCRISPR-CG07	U6	载体含有CBh启动子启动表达的Cas9核酸酶基因	GFP
pCRISPR-CG08	U6	载体含有CBh启动子启动表达的Cas9核酸酶基因	mCherry

\*配合 Cas9 核酸酶 (Cat.No. CP-C9NU-01, CP-LvC9NU-01, CP-LvC9NU-02) 或 Cas9 D10A 切口酶 (Cat.No.CP-C9NI-01, Cat.No.CP-C9NI-02) 表达克隆使用。

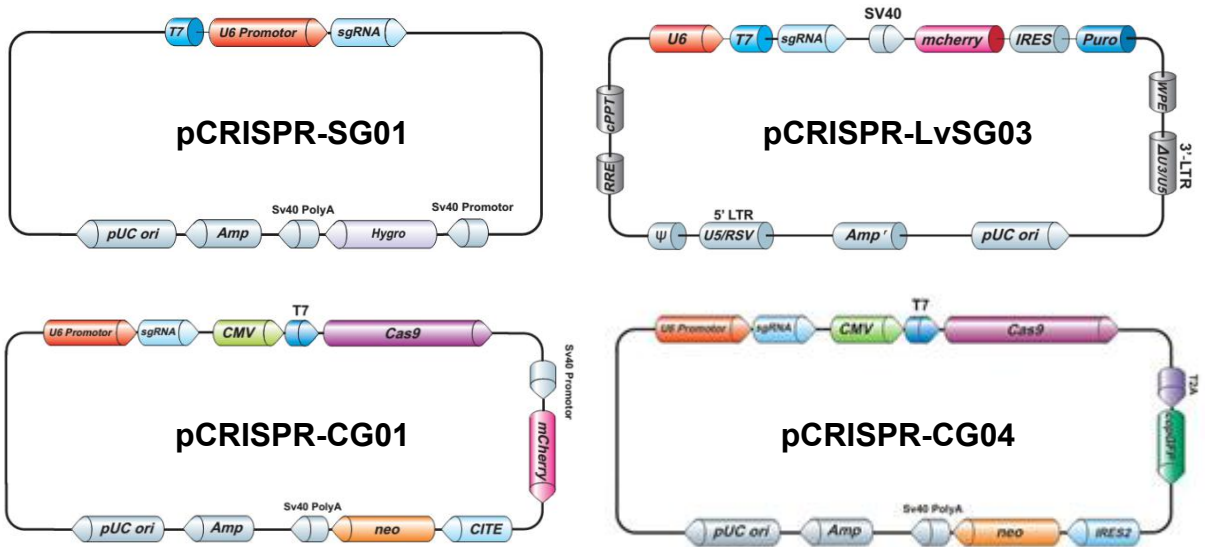


图 7. sgRNA 载体图谱

## B. 其他产品及服务

### 供体克隆设计与构建服务

GeneCopoeia提供供体克隆设计及构建服务。供体克隆装载客户定制的目的基因、筛选标记及其他遗传因子，通过位点特异性的基因组编辑工具介导的同源重组（HR）将所装载的片段整合到基因组上的靶点。GeneCopoeia提供含有不同筛选标记及遗传因子的多种供体载体供客户选择。

### 供体载体类型

载体	启动子	报告基因	筛选标记	LoxP 位点
pDonor-D01	EF1a	copGFP	Puromycin	N/A
pDonor-D02	CMV	copGFP	Neomycin	N/A
pDonor-D03	CMV	N/A	Neomycin	N/A
pDonor-D04	CMV	N/A	Puromycin	N/A
pDonor-D05	EF1a	N/A	Neomycin	N/A
pDonor-D07	EF1a	copGFP	Puromycin/TK	Loxp
pDonor-D08	CMV	copGFP	Neomycin/TK	Loxp
pDonor-D09	EF1a	N/A	Puromycin/TK	Loxp
pDonor-D10	CMV	N/A	Neomycin/TK	Loxp
pDonor-D11	PGK	copGFP	Puromycin/TK	Loxp
pDonor-D12	EF1a	copGFP	Hygromycin/TK	Loxp
pDonor-D13	PGK	copGFP	Neomycin/TK	Loxp
pDonor-D14	PGK	N/A	Puromycin/TK	Loxp

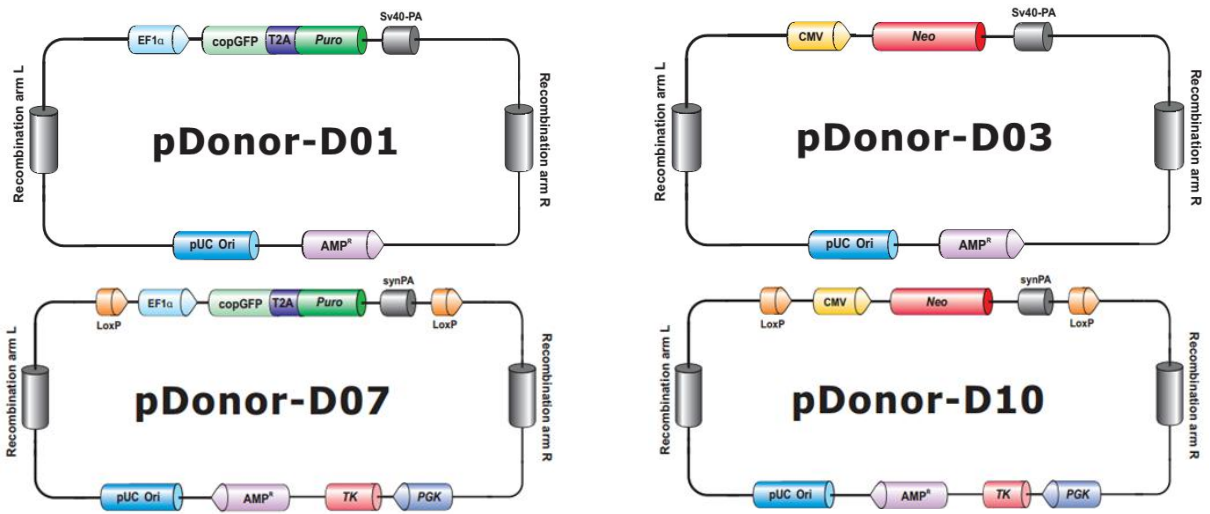
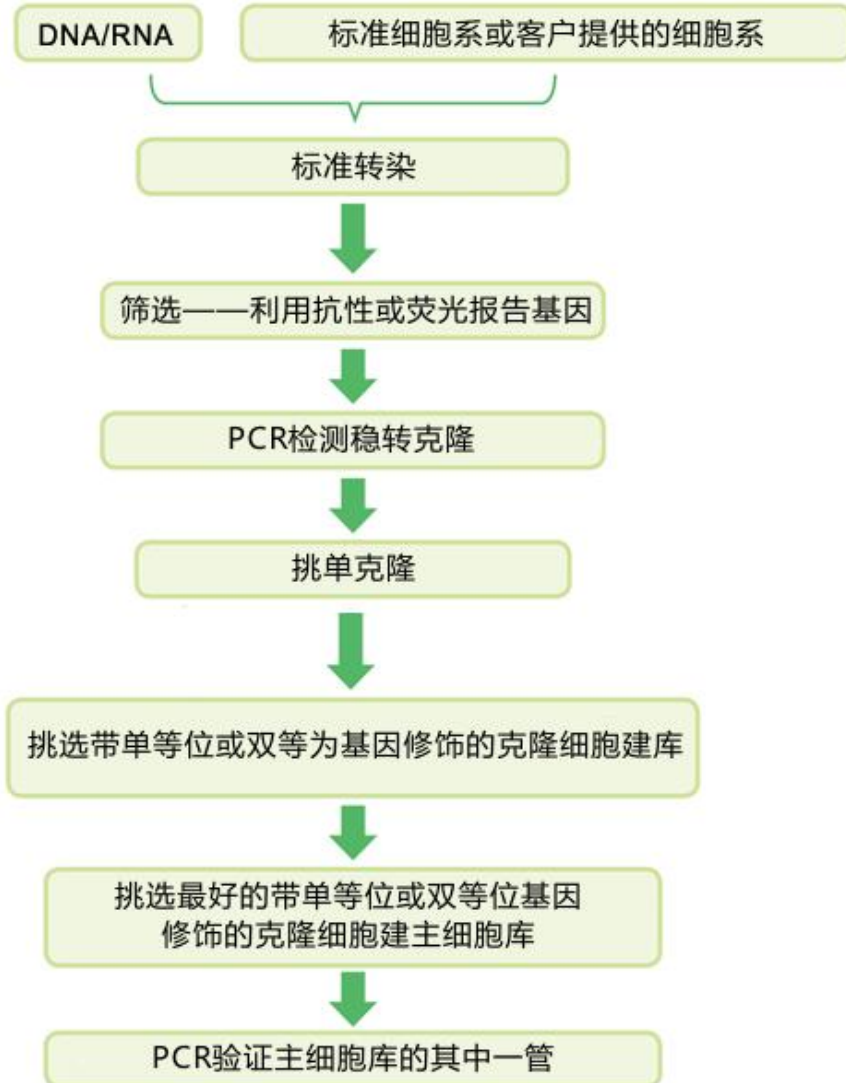


图6. 部分供体载体图谱

### 稳转细胞株服务

GeneCopoeia 为含有TALEN或CRISPR-Cas9介导的基因组修饰的细胞提供单克隆稳转细胞株构建服务及细胞建库服务。

#### TALEN/CRISPR稳转细胞系构建服务



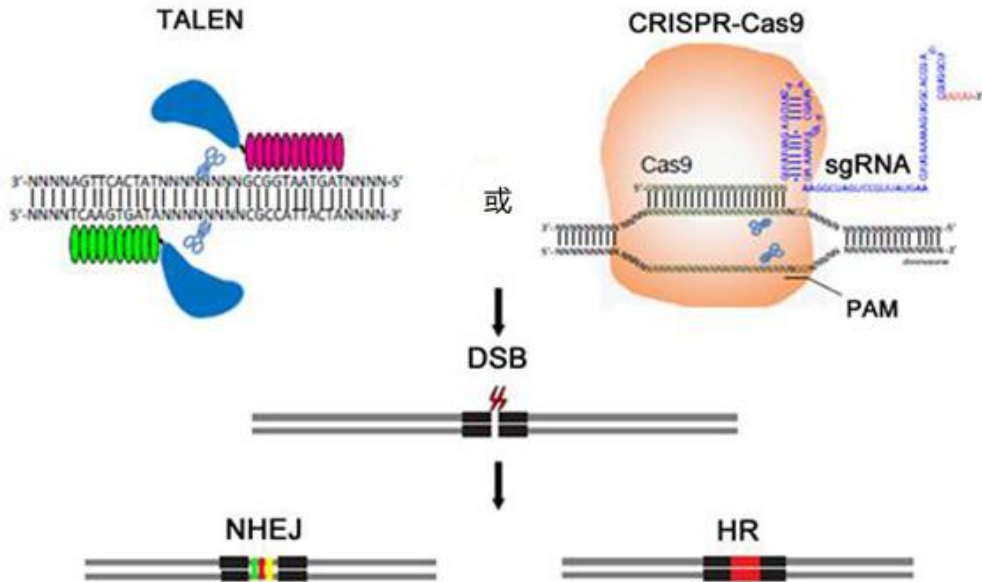


### 转基因小鼠服务

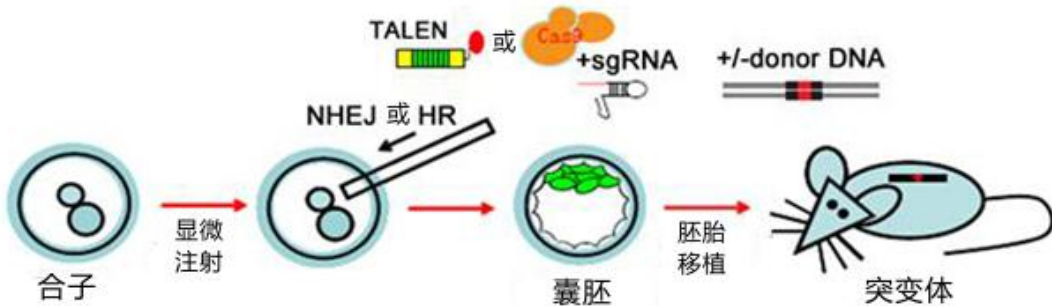
转基因小鼠模型是研究基因产物的分子机制、其相互作用以及对细胞进程影响的理想工具。GeneCopia 能为客户定制带有TALEN 或 CRISPR-Cas9 介导的基因组修饰的转基因小鼠。

## TALEN/CRISPR-Cas9介导基因组修饰

### TALEN和CRISPR-Cas9基因组编辑概述



### 一步法构建带基因组修饰的小鼠





## VII. 使用许可及质保声明

### 有限使用许可

Following terms and conditions apply to use of the Genome-TALERTM Human AAVS1 Safe Harbor Gene Targeting Kit (the Product). If the terms and conditions are not acceptable, the Product in its entirety must be returned to GeneCopoeia within 5 calendar days. A limited End-User license is granted to the purchaser of the Product. The Product shall be used by the purchaser for internal research purposes only. The Product is expressly not designed, intended, or warranted for use in humans or for therapeutic or diagnostic use. The Product must not be resold, repackaged or modified for resale, or used to manufacture commercial products or deliver information obtained in service without prior written consent from GeneCopoeia. This Product should be used in accordance with the NIH guidelines developed for recombinant DNA and genetic research. Use of any part of the Product constitutes acceptance of the above terms.

### 有限质量保证

GeneCopoeia warrants that the Product meets the specifications described in the accompanying Product Datasheet. If it is proven to the satisfaction of GeneCopoeia that the Product fails to meet these specifications, GeneCopoeia will replace the Product. In the event a replacement cannot be provided, GeneCopoeia will provide the purchaser with a refund. This limited warranty shall not extend to anyone other than the original purchaser of the Product. Notice of nonconforming products must be made to GeneCopoeia within 30 days of receipt of the Product. GeneCopoeia's liability is expressly limited to replacement of Product or a refund limited to the actual purchase price. GeneCopoeia's liability does not extend to any damages arising from use or improper use of the Product, or losses associated with the use of additional materials or reagents. This limited warranty is the sole and exclusive warranty. GeneCopoeia does not provide any other warranties of any kind, expressed or implied, including the merchantability or fitness of the Product for a particular purpose.

GeneCopoeia is committed to providing our customers with high-quality products. If you should have any questions or concerns about any GeneCopoeia products, please contact us at 301-762-0888.

© 2016 GeneCopoeia, Inc.