



吉玛基因  
www.genepharma.com

# CRISPR-Cas9-RNP基因编辑 (KO) 试剂盒 (20T) 使用说明书

上海电话: 021-51320195    E-mail: support@genepharma.com  
苏州电话: 0512-86668828    E-mail: szsupport@genepharma.com  
官网网址: www.genepharma.com



B068-V001-20240724

## 一、产品简介

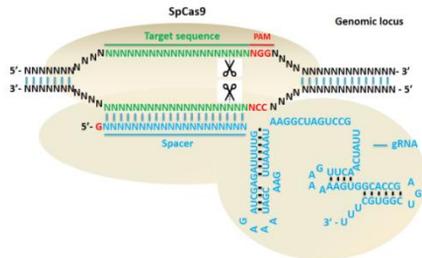
CRISPR-Cas9基因编辑技术，通过向导RNA（gRNA）将Cas9酶靶向目标DNA序列，Cas9酶切割目标DNA双链，造成DNA双链断裂，DNA在非同源末端连接（NHEJ）修复时出错，从而实现基因敲除。

传统构建CRISPR-Cas9质粒的方法，质粒大小高达6-10 kb，很难转染，而如使用原代细胞等难转染的细胞，转染效率更低。且质粒不断产生CRISPR-Cas9，使脱靶率显著增加。化学合成sgRNA转染RNP蛋白复合体的方法，通过优化CRISPR-Cas9组件，在提升剪切精确性的基础上，提高转染效率、减少细胞毒性、降低脱靶率，进而提高了基因编辑效率。

CRISPR-Cas9-RNP基因编辑（KO）试剂盒（20T）规格

目录号	编辑模式	靶点数目	sgRNA条数	规格
I05001	单sgRNA	3个靶点	3条	20T
I05002	单sgRNA	5个靶点	5条	20T
I05003	双sgRNA	3个靶点	6条	20T

SpCas9系统能够通过gRNA定向识别靶向PAM序列上游含有5'-NGG-3'的DNA序列，它可以由指定靶标的crRNA和tracrRNA引导，这两种RNA也可以组合成嵌合的单导RNA（sgRNA）。2013年1月，在Science上发表了两篇以链球菌CRISPR/Cas9系统为基础对哺乳动物细胞进行基因组编辑新方法，利用一条sgRNA（guide RNA）模拟成熟的crRNA-tracrRNA复合体与Cas9共同作用切割靶基因组（如下图），由此揭开了该技术的运用高潮。



上海电话：021-51320195      E-mail: support@genepharma.com  
 苏州电话：0512-86668828      E-mail: szsupport@genepharma.com  
 官网网址：www.genepharma.com



B068-V001-20240724

## 二、试剂盒组成 (20T)

模块	序号	组分	规格
原料模块	1	SpCas9 蛋白	50 µg (1 µg/µL) *1管
	2	目标sgRNA	1 OD (干粉~33 µg)管 *2 /靶点 (3条/5条/3对)
	3	DEPC水	1 mL*1管
阳参模块	4	sgRNA-PC	0.5 OD (干粉~16 µg)
	5	sgRNA-PC验证底物 (PCR产物)	20 µL*1管
	6	10 × Cleavage buffer	20 µL*1管
转染模块	7	RNP transmate转染试剂	100 µL *1管
鉴定模块	8	T7E1突变检测试剂盒	20 T*1盒
	9	鉴定引物序列	≤ 3 对 / ≤ 5对 (电子版)
文本模块	10	说明书	1份
	11	质量报告	1份 (sgRNA质谱, Cas9质量报告)

### ■ 运输条件

Cas9 蛋白、T7E1突变检测试剂盒：干冰  
其余组分：冰袋

### ■ 储存条件

RNP transmate转染试剂：2-8°C，切勿冷冻！  
其他试剂请置于-20°C低温冻存，避免反复冻融；  
如需长期使用请分装后置于-80°C保存。

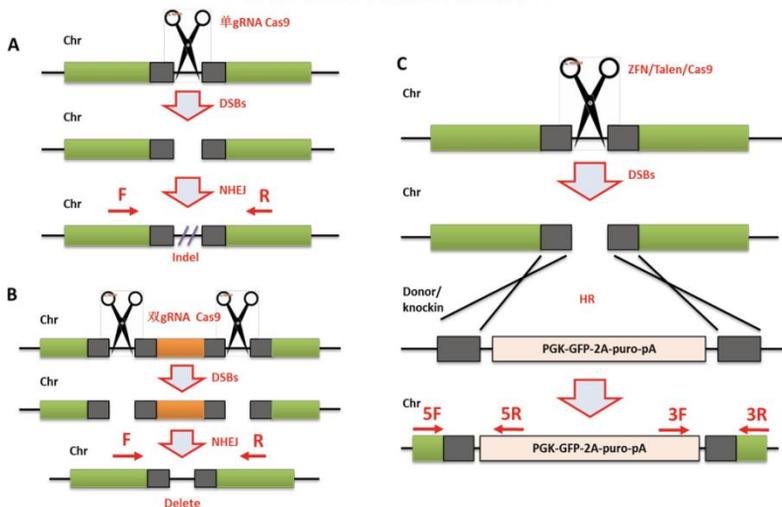
上海电话：021-51320195    E-mail: support@genepharma.com  
苏州电话：0512-86668828    E-mail: szsupport@genepharma.com  
官网网址：www.genepharma.com



B068-V001-20240724

### 三、基因编辑原理

各种类型基因编辑基因检测方法



非同源性末端接合 (Non-homologous end joining, NHEJ)

同源性重组 (Homologous recombination, HR)

不管是 CRISPR/Cas9 还是TALENs或ZFNs技术, 其基本原理都是对特异基因组序列造成双链断裂, 利用细胞本身具有的非同源直接结合 (NHEJ) 和同源重组 (HDR) 修复机制, 可实现特定基因的基因编辑。运用CRISPR/Cas9 基因编辑技术可实现基因敲除, 基因敲入, 基因修饰, 点突变, 还有大量基因编辑以外的运用。

**注意: 本试剂盒主要针对单sgRNA和双sgRNA敲除方案!**



## 四、CRISPR/Cas9 基因编辑(KO) 流程

### 4.1 确定目标基因

对基因组进行基因编辑，首先需要确定基因ID。

### 4.2 sgRNA靶点设计

根据实验目的，设计sgRNA靶点（用于识别切割靶点）。

吉玛基因提供免费的sgRNA靶点设计服务。

请咨询公司技术支持（上海技术邮箱：support@genepharma.com;苏州技术邮箱：szsupport@genepharma.com）。客户也可自行设计靶点，常用的设计网站有CRISPOR、CHOPCHOP、E-CRISP等。

### 4.3 选择基因编辑方法

CRISPR/Cas9基因编辑需要在细胞核内存在含有靶点sgRNA及 Cas9蛋白形成的Cas9蛋白/sgRNA核糖核蛋白复合物（Cas9 RNPs）。可以根据需要使用化学转染或者电转的方式将其导入细胞。

### 4.4 sgRNA与Cas9蛋白（RNP）转染细胞方法

#### ■ RNP transmate 转染试剂法

此方法仅针对容易转染的细胞。以下以HEK-293T细胞为例，通过反向转染法使用RNP transmate转染试剂在 HEK-293T 细胞中转染 Cas9蛋白和sgRNA形成的RNP复合体。建议用户先在HEK-293T细胞中测试sgRNA敲除效率，再到目的细胞中实施敲除。如果目的细胞不易转染，则推荐电转法（详见后文）。

#### A. 制备RNP：

- 1) 将 sgRNA（1OD≈33μg）用DEPC 水稀释到1 μg/μL；
- 2) 配置RNP反应

组分	96孔/well	24孔/well	6孔/well
sgRNA 1（1 μg/μL）	0.4 μL	2 μL	8 μL
sgRNA 2（1 μg/μL）（optional）	0.4 μL	2 μL	8 μL
Cas9蛋白（1 μg/μL）	0.4 μL	2 μL	8 μL
Opti-MEM	8.8 μL	19 μL	176 μL
总计	10 μL	25 μL	200 μL

轻轻混合后室温放置25分钟；



3) 配置 RNP transmate 复合体

组分	96孔单孔	24孔单孔	6孔单孔
Opti-MEM	9 $\mu$ L	21 $\mu$ L	192 $\mu$ L
RNP transmate	1 $\mu$ L	4 $\mu$ L	8 $\mu$ L
总计	10 $\mu$ L	25 $\mu$ L	200 $\mu$ L

轻柔混合，室温放置5分钟后，加入已孵育25分钟的RNP反应中，混匀后再共孵育25分钟。

**B. 准备转染的 HEK-293T 细胞：**

- 1) 请尽量使用状态良好、传代次数较低的细胞；
- 2) 在 RNP/RNP transmate 室温放置25分钟期间，使用胰酶消化细胞，并清洗一次细胞，去除迹量胰酶（防止其对 Cas9蛋白的降解），重悬细胞到适量培养基中并计数；
- 3) 加入培养基时使细胞终密度在  $5 \times 10^5$  cells/mL，每孔需要80  $\mu$ L（96孔板）、450  $\mu$ L（24孔板）、1600  $\mu$ L（6孔板）细胞。

**C. 转染实验：**

- 1) 向每孔培养板中加入20  $\mu$ L（96孔板）、50  $\mu$ L（24孔板）、400  $\mu$ L（6孔板）A步骤中已孵育好的RNP复合体；
- 2) 孔内分别加入所需体积细胞，轻轻晃动细胞培养板，使其混匀；
- 3) 将细胞放入细胞培养箱中培养48~72小时后，收集细胞，使用T7E1突变检测试剂盒进行基因型鉴定。

**■ 电转细胞实验**

- 1) 细胞铺板，使细胞在电转当天有70~90%汇合率；
- 2) 配置RNP反应体系

试剂	体积
电转液（EL buffer）	30 $\mu$ L
Cas9蛋白（1 $\mu$ g/ $\mu$ L）	2 $\mu$ L
sgRNA（1 $\mu$ g/ $\mu$ L）	2 $\mu$ L

（如果是两种sgRNA各加2  $\mu$ g）使用无RNase EP管加入各组分，混合后，室温放置20分钟（不超过30分钟）；



- 3) 20分钟之内，用胰酶消化细胞，使用D-PBS洗去迹量的胰酶（胰酶残留会造成其对Cas9蛋白的降解），重悬细胞到10 mL培养基中，并计数；
- 4) 取 $0.2\sim 1\times 10^6$  细胞量到新的EP管中， $500\times g$ 离心5分钟收集细胞，并用D-PBS清洗一次细胞，重新离心；
- 5) 30  $\mu$ L电转液重悬细胞；
- 6) 准备预先在24孔（0.5 mL）或6孔（2 mL）板中加入适量预热培养基，用于后期电转细胞培养；
- 7) 将30  $\mu$ L电转液重悬细胞加入到各RNP反应EP管中，并轻轻混合；
- 8) 取60  $\mu$ L RNP 和细胞混合液到吉玛电转仪（96孔电转），使用300V，电击6次；
- 9) 立即将电转后细胞转移到培养板中，在细胞培养箱中培养48~72小时。

**注：用户使用其他品牌的电转仪，请根据仪器使用说明，按需调整电转方案！**

## 五、基因型（KO）鉴定方法

CRISPR组分导入细胞后，要确定基因编辑效果，需要对细胞进行基因型鉴定（genotyping），整个过程包括提取细胞基因组，含靶点基因组片段的PCR，T7E1突变检测，测序，TIDE分析等。确定细胞基因突变效率及突变情况。

**单sgRNA/Cas9（NHEJ修复）造成的Indel突变：**检测方法是提取细胞/组织基因组，PCR，T7E1突变检测，测序，TIDE分析。由于单sgRNA Cas9造成的基因突变都是小片段的插入或缺失（一般都在20 bp以内），通过PCR无法判断基因是否发生突变，利用T7E1可对不完全匹配DNA进行切割的特点，将PCR产物完全变性后复性，如果PCR产物靶点处发生Indel突变，就会形成两侧匹配，靶点处不匹配的DNA结构，T7E1会识别不匹配位点并切断DNA。通过统计切割条带与未切割条带光密度，计算突变效率。PCR产物测序可进一步分析确认突变类型及突变效率。

**双sgRNA/Cas9造成的缺失突变：**检测办法是提取细胞/组织基因组，PCR，T7E1突变检测（可选），测序，TIDE分析可以通过目的基因片段PCR，确认缺失片段的编辑效率，最后经测序确认具体的缺失序列。

### T7E1 突变检测流程：

- 1、待检测DNA片段一般采用PCR方法得到待检测DNA片段。

本试剂盒内自带①阴性对照:野生型DNA-NC；②阳性对照:突变体DNA-PC。

- 2、制备待测DNA PCR片段，按下列组分分别配置待测DNA、PC、NC退火反应液：

上海电话：021-51320195      E-mail: support@genepharma.com  
苏州电话：0512-86668828      E-mail: szsupport@genepharma.com  
官网网址：www.genepharma.com



B068-V001-20240724

编号	PC	NC	待测DNA
突变体DNA-PC	2 μL (200 ng)	0	0
野生型DNA-PC	0	2 μL (200 ng)	0
待测DNA PCR产物	0	0	300-500 ng
10× T7E1 buffer	2 μL	2 μL	2 μL
ddH2O	To 19 μL	To 19 μL	To 19 μL

**充分混匀后退火**

建议退火反应条件:

95°C	5 min
95°C	2 sec
-0.1°C/cycle	200 times
75°C	1 sec
-0.1°C/cycle	600 times
16°C	2 min

### 3、T7E1处理

体系	体积
退火后产物	19 μL
T7E1	1 μL

反应温度: 37°C  
反应时间: 30 min

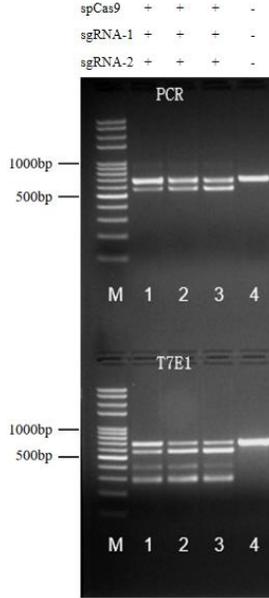
4、电泳分析一般使用2%浓度的琼脂糖凝胶电泳分析检测产物，小片段使用1×TAE buffer 电泳效果更好，阴性对照结果得到与PCR产物一样大小的产物，阳性对照除有PCR产物大小条带（灰度为a）外，还存在2个小的剪切条带（灰度为b和c），表明基因含有突变。

5、酶切片段比例:  $f_{cut} = (b+c) / (a+b+c)$

突变效率:  $indel(\%) = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{cut}})$



图例:



上图为使用双sgRNA敲除细胞后，T7E1突变检测试剂盒检测的人类某基因突变结果。M：Fermentas SM0331 DNA marker；1/2/3泳道为实验组目的基因PCR及T7E1胶图；4泳道为实验阴性对照组目的基因PCR及T7E1胶图。野生型目的基因PCR片段约700 bp，使用双sgRNA进行编辑后PCR片段约600 bp。被单sgRNA编辑的目的基因PCR片段经T7E1切割后，产生300和400 bp左右两条片段。

6、注意事项：T7E1具有底物结构选择性，能慢速切割或切割双链DNA，检测突变时必须控制好酶量和反应时间，如果酶切后产物出现弥散，降低酶的用量再进行检测。更多使用细节请参考《T7E1突变检测试剂盒》使用说明书。



## 六、关于编辑效率和免责声明

**编辑效率售后说明：**对于人类基因，优先推荐客户使用293T细胞检测CRISPR-Cas9-RNP基因编辑系统的靶位点剪切效率。对于以下情形出现编辑效率不理想的情况，我司不予提供编辑效率有效性承诺与售后服务：

- (1) 一次设计合成少于3条sgRNA
- (2) 对于难转染或无法转染的细胞
- (3) 对于非人源物种
- (4) 客户自行提供sgRNA合成序列
- (5) sgRNA未搭配我司的Cas9蛋白

**免责声明：**由于CRISPR编辑效率受多种因素影响，包括靶基因在基因组上的位置（genomic locus of the target）、DNA的可接近性（chromatin accessibility）、核小体（nucleosomes）、靶位点附近的其他组件（other components around crRNA-binding sites）等，不同的基因位点基因靶向性的有效性是不同的，而且依赖每种细胞的转染效率，我司不承诺细胞水平有效则一定在体内编辑有效。我司郑重提示，基因编辑实验必须在严格遵循技术标准和伦理规范的前提下慎重开展，必须严格遵守科学伦理相关法律法规。

### 试剂盒有效性验证：Cas9体外切割实验

sgRNA-PC和SpCas9蛋白形成RNP复合物，体外切割含靶点PCR产物实验。按以下表格混合各组分：

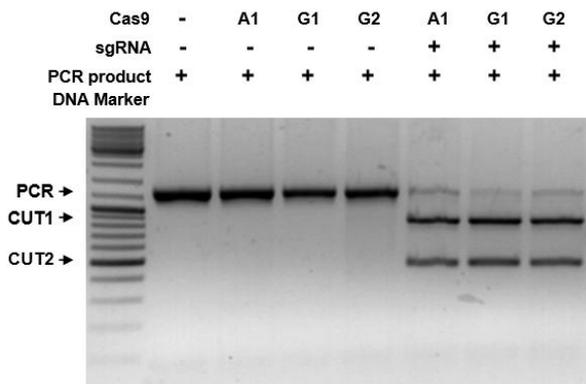
试剂	加样体积
10 × Cleavage buffer	3 μL
SpCas9 (1 μg/μL)	1 μL
sgRNA-PC (1 μg/μL)	0.5 μL
DEPC-H2O	To 25 μL
混合后室温5-10分钟	
底物（PCR产物）	5 μL
<b>总计</b>	<b>30 μL</b>

注:使用无RNase枪尖及EP管。



- (1) 加入5  $\mu\text{L}$  PCR产物，混合后37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1个小时；
- (2) 加入1  $\mu\text{L}$  (20 mg/mL) 蛋白酶K，0.5  $\mu\text{L}$  (10 mg/mL) RNaseA室温反应20分钟（过量的RNP复合体会使DNA条带电泳速度降低,使用蛋白酶K及RNase消化后DNA条带更准确）；
- (3) 加入DNA loading buffer混合，跑胶分析检测结果，加入5  $\mu\text{L}$  PCR产物作为对照。

### ■ 体外切割案例实例



上图为Cas9蛋白体外切割活性验证结果。A1为某知名公司Cas9蛋白，G1和G2为吉玛基因表达纯化的两批SpCas9蛋白。当阳参sgRNA+Cas9与底物PCR产物共同孵育后，底物片段被充分切割，说明试剂盒组分有效！

