

BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit

产品编号	产品名称	包装
D8412S	BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit	20次
D8412M	BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit	100次

产品简介:

- 碧云天研发生产的BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit, 即BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒, 也称BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(BeyoCRISPR™ In Vitro sgRNA Screening Kit), 是基于CRISPR/Cas9基因编辑技术而研发的、用于体外筛选高效的基因编辑用sgRNA的试剂盒。本试剂盒利用Cas9核酸酶在sgRNA介导下对靶DNA序列的体外切割特性, 可以简单、可靠、快速地在体外检测sgRNA的效率, 并筛选出高效的sgRNA。
- 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sgRNA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sgRNA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]。同时通过构建没有内切酶活性的Cas9突变体dCas9, 通过与dCas9直接融合表达或间接招募转录激活或转录抑制因子, 可以实现sgRNA靶向基因的转录激活或转录抑制。
- sgRNA (Single guide RNA), 也称gRNA, 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。在细胞内, Cas9核酸酶可以特异性地结合sgRNA, 同时sgRNA也能特异性地与相应的靶基因序列配对结合, 这样就可以导致Cas9核酸酶在靶基因位点的PAM (Proto-spacer adjacent motif)序列NGG上游大约三个碱基的位置对靶基因进行切割。随后在细胞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[1]。sgRNA的设计依赖于PAM位点附近的区域, 但在通常情况下, 即使满足上述所有要求的靶序列, 其对应的sgRNA的特异性和活性也具有不可预测性。因此在实验中通常需要设计多个不同的sgRNA来靶向目的基因, 并进行相应的筛选。
- 本试剂盒提供高活性的Cas9核酸酶(Cas9 Nuclease), 按照使用说明将待测试的体外转录的sgRNA与Cas9核酸酶结合后体外切割靶基因的DNA片段, 通过凝胶电泳即可对多条sgRNA的靶向基因编辑效率进行有效评估, 使用本试剂盒体外检测sgRNA靶向基因编辑效率的效果请参考图1。根据凝胶电泳形成的条带灰度比例可评估对应sgRNA的靶向基因编辑效率, 体外(In vitro)筛选与进行体内(In vivo)细胞内实验后所测得的基因编辑效率规律基本一致, 具体效果可参考图1。

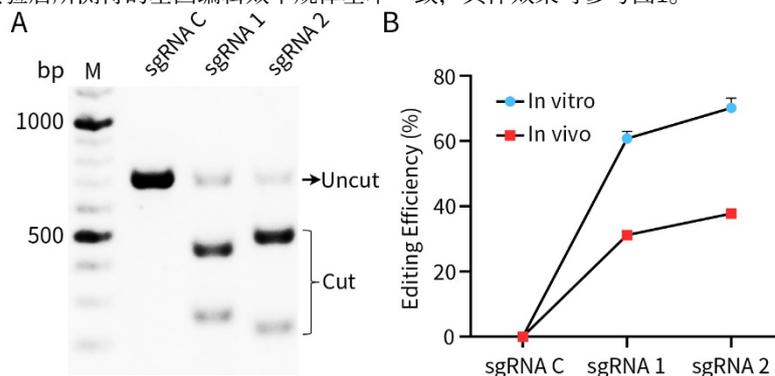


图1. 碧云天BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit (D8412)体外筛选结果和细胞内实际基因编辑效果对比图。图A为本试剂盒体外筛选sgRNA靶向基因编辑效率的效果图。靶DNA片段大小约为720bp。sgRNA C为非靶向sgRNA的阴性对照; sgRNA 1为靶向GFP基因的, 切割产生的DNA片段大小分别为451bp和269bp; sgRNA 2也是靶向GFP基因的, 切割产生的DNA片段大小分别为490bp和230bp。图B为体外筛选结果和细胞内实际基因编辑效率对比图。体外(In vitro)筛选实验中sgRNA的靶向效率通过使用本试剂盒后进行凝胶电泳(如图A), 再由凝胶分析软件计算每个条带灰度值及比例所确定(具体请参考使用说明书的步骤3)。对于体内(In vivo)细胞基因编辑实验, 将HEK293T-EGFP报告细胞(EF1 α -EGFP-IRES-Hygro HEK293T Cells (C7993))接种于六孔板中, 待细胞融合度约为80%时, 使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)分别将上述靶向GFP的sgRNA 1或sgRNA 2的编码质粒与Cas9蛋白的编码质粒(pCMV-Cas9-NLS (D8335))共转染至细胞中, 同时转染编码非靶向GFP的sgRNA质粒(sgRNA C)作为阴性对照。转染5天后消化细胞进行流式细胞检测, 根据GFP报告基因的平均荧光强度计算细胞基因编辑效率。由图中结果可以

看出，使用本试剂盒进行sgRNA体外筛选的结果与实际基因编辑实验结果规律基本一致。实际效果会因样品种类、检测条件等的不同而存在差异，本图仅供参考。

- 本试剂盒不包含sgRNA的体外转录试剂，推荐使用BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit (D7081)或BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit (D7083)进行sgRNA的体外转录。
- 本试剂盒提供阳性对照靶DNA片段，大小约为823bp，经Cas9及阳性对照sgRNA切割后产生的DNA片段大小分别为525bp和298bp。
- 按使用说明操作，本试剂盒的小包装和中包装分别可用于20个或100个sgRNA样品的体外筛选。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D8412S-1	Cas9 Nuclease (1μM)	10μl
D8412S-2	10X Reaction Buffer	40μl
D8412S-3	Positive Control sgRNA	250ng
D8412S-4	Positive Control DNA (25ng/μl)	8μl
D8412S-5	Proteinase K	10μl
D8412S-6	Ultrapure Water	400μl
—	说明书	—

产品编号	产品名称	包装
D8412M-1	Cas9 Nuclease (1μM)	50μl
D8412M-2	10X Reaction Buffer	200μl
D8412M-3	Positive Control sgRNA	1.25μg
D8412M-4	Positive Control DNA (25ng/μl)	40μl
D8412M-5	Proteinase K	50μl
D8412M-6	Ultrapure Water	2ml
—	说明书	—

保存条件：

-20°C保存，一年有效。

注意事项：

- 酶使用时宜存放在冰盒内或冰浴上，使用完毕后宜立即放置于-20°C保存。
- Positive Control sgRNA以冻干粉形式提供，首次使用在4°C，12,000g离心5分钟后按照每250ng加入10μl Ultrapure Water的体积完全溶解，溶解后的浓度为25ng/μl，适当分装并置于-80°C保存，使用过程中须避免反复冻融。
- 本试剂盒使用时会涉及gRNA和DNA的操作，必须注意RNase-free和DNase-free的相关操作。所有自行准备的试剂和耗材也应是Nuclease-free的。如果可能有核酸酶污染，可考虑用0.01%的DEPC处理过夜，然后高温高压处理后使用。操作时建议戴一次性口罩操作。
- 对于操作环境中核酸酶的去除，推荐使用碧云天生产的RNase and DNase Away (R0123)以去除实验桌、仪器设备等表面或其它接触面上的核酸酶。反应体系中推荐加入RNase Inhibitor以保护RNA不被降解。
- 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. 制备靶DNA片段。

- 引物设计。**设计引物扩增Cas9/sgRNA复合物靶向的基因组DNA区域。引物长度通常宜在18-22bp左右，GC含量宜在45%-60%之间，T_m>55°C，引物扩增的片段长度宜在500-1000bp之间，且sgRNA靶向序列不宜处于扩增片段正中央。Cas9/sgRNA复合物切割后宜形成两个大小相差至少100bp的片段，以便于进行后续的电泳分析鉴定，具体请参考图2。

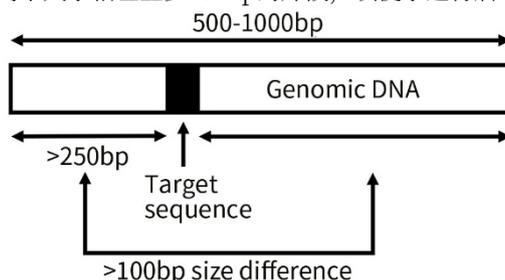


图2. PCR扩增靶DNA片段设计。

- b. 推荐使用碧云天相关PCR产品BeyoFusion™ PCR Master Mix (2X) (D7250)、Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X) (D7255)或Easy-Load™ PCR SuperMix (Green, 2X) (D7256)进行PCR扩增实验。扩增模板可以是线性化的质粒、PCR产物或合成的寡核苷酸。PCR扩增产物即为体外筛选实验中的Cas9/sgRNA复合物的切割底物。
- c. PCR结束后，如果扩增产物含有非特异性条带则需将PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳，并回收目的条带，推荐使用BeyoMag™ 磁珠法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)或DNA凝胶回收试剂盒(D0056)进行DNA凝胶回收。
- 注：请确认回收的切割底物DNA无乙醇残余或其它污染。

2. sgRNA靶向基因编辑效率检测。

- a. 参考下表在冰浴上配制如下反应体系。

Reagent	Sample	Positive Control
Candidate sgRNA (50ng)	x μ l	-
Positive Control sgRNA (25ng/ μ l)	-	2 μ l
Cas9 Nuclease (1 μ M)	0.5 μ l	0.5 μ l
10X Reaction Buffer	1.5 μ l	1.5 μ l
Ultrapure Water	(11-x) μ l	10 μ l
Mix well and incubate at 25°C for 10min		
Target DNA (50ng)	y μ l (0<y \leq 2)	-
Positive Control DNA (25ng/ μ l)	-	2 μ l
Ultrapure Water	(2-y) μ l	μ l
Total Volume	15μl	15μl

- b. 用移液器轻轻吹打混匀，37°C孵育15分钟进行切割反应。也可适当延长反应时间至30分钟，通常反应30分钟就可获得较好切割效果，无需进一步延长反应时间。
- c. 终止反应。加入0.5 μ l Proteinase K，混匀，室温孵育10分钟。
- d. 电泳检测。加入3 μ l BeyoRed DNA上样缓冲液(6X) (D0072)，取出10-15 μ l反应产物，进行1-2%琼脂糖凝胶电泳，同时取约50ng未被切割的底物DNA作为阴性对照。电泳结束后使用凝胶成像系统观察实验结果。
- 注：本试剂盒提供的Positive Control DNA大小约为720bp，经过Positive Control sgRNA反应后的切割条带分别约为490bp和230bp。

3. sgRNA靶向效率计算。

使用凝胶图像分析软件确定每个条带的灰度值，评估各个sgRNA的靶向基因编辑效率，挑选效率较高的一个或多个sgRNA进行后续实验。sgRNA靶向效率的计算公式如下[3]。

$$\% \text{indel} = \left(1 - \sqrt{1 - (a + b) / (a + b + c)} \right) \times 100$$

a, b为被切割产生的两个小条带(Cut)的灰度值；c为未被切割条带(Uncut)的灰度值。按照此方法计算的靶向基因编辑效率可作为体外研究的评估参考，与实际体内基因编辑研究中的编辑效率不完全相同但通常会基本一致。

图1A中sgRNA 2靶向效率计算示例如下：

- 通过Image J或其它凝胶分析软件对被切割条带和未切割条带进行灰度分析得出a=16880.61 (约490bp)，b=4615.15 (约230bp)，c=2150.33 (约720bp)。
- 根据上述公式将数值代入计算得出sgRNA 2靶向效率为69.84%。

常见问题：

1. 为什么未观察到目的DNA的切割？

- 合成的sgRNA质量有问题，可以通过凝胶电泳验证sgRNA的完整性。
- 实验操作时有DNase/RNase酶污染，使sgRNA降解，实验过程中请严格遵守无酶操作要求。
- 可能是缓冲液或者酶活性有问题，建议每次实验同时进行阳性对照。
- 可能是切割底物DNA不纯或缓冲液中存在其他污染，建议实验前对切割底物DNA的质量进行检测。

参考文献：

- Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, Konermann S, Shehata SI, et al. Cell. 2014. 156(5):935-49.
- Marangi M, Pistritto G. Front Pharmacol. 2018. 9:396.
- 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
D0071	DNA上样缓冲液(6X)	2ml
D0072	BeyoRed DNA上样缓冲液(6X)	2ml
D0508	基因组编辑突变检测试剂盒	25/100次
D7080	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250/1250/5000U

D7081	BeyoCRISPR™ One-Step sgRNA Synthesis Kit	20/100次
D7083	BeyoCRISPR™ Two-Step sgRNA Synthesis Kit	20/100次
D7250	BeyoFusion™ PCR Master Mix (2X)	1/5ml
D7255	Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2X)	100/400/2000/10000次
D7256	Easy-Load™ PCR SuperMix (Green, 2X)	100/400/2000次
D8411	BeyoCRISPR™ Genotype Confirmation Kit	20次
D8412	BeyoCRISPR™ sgRNA Screening Kit	20次
ST876	BeyoPure™ Ultrapure Water (DNase/RNase-Free, Sterile)	100/500ml

Version 2025.01.02