

riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系使用说明

RN : R12001.2

产品简介

锐博生物自主开发的 riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系是采用天然复合物系统（crRNA 和 tracrRNA）进行基因编辑。锐博提供基于 Cas9 mRNA 的全 RNA 体系和基于 Cas9 蛋白的 RNP 体系，tracrRNA 可实现大规模合成，靶向 DNA 目的序列的 crRNA 可以高通量合成，针对哺乳动物细胞可简单通过化学转染或电转方式进行基因编辑实验。该体系为即用型体系，不需要自行构建 gRNA 表达载体，无需在病毒级实验室中操作，无 DNA 组分，并且可实现多个 crRNA 指导下的多靶点编辑，大大简化前期实验准备与操作步骤。该体系更适合于高通量细胞水平的基因敲除筛选。锐博生物还提供业界领先的编辑效率保证 CRISPR-Cas9 套装产品，为您的基因编辑实验提供方便、省时、可靠和高效的解决方案。

设计合成 crRNA

riboEDIT™ Designed crRNA 采用锐博生物优化的生物信息学设计，客户无需具备 crRNA/sgRNA 设计经验，riboEDIT™ crRNA 包含 20 个与目标 DNA 片段互补配对的核苷酸（原间隔序列）和与 tracrRNA 互补配对的重复序列。涵盖人类和小鼠基因，每个基因设计合成 3-6 段单独的 sgRNA，其他物种 crRNA 设计需另行评估。

阳性对照 crRNA 套装

阳性对照 crRNA 套装用于检测基因剪切体系的正确性，该套装包括阳性对照 crRNA、正向引物和反向引物。

Cas9 mRNA

riboEDIT™ Cas9 mRNA 是体外转录生成的 Cas9 mRNA，具有帽子和 polyA 尾巴结构。编码载体为人源密码子优化的 *S. pyogenes* Cas9，带有核定位信号（NLS），C 端的一个 1XFLAG 标签，5'非翻译区（5'UTR）及 3'非翻译区（3'UTR），以促进 mRNA 的翻译和提高 mRNA 的稳定性，经过严格的质量控制，保证质量和纯度，适用于哺乳动物细胞的基因编辑。

化学合成 tracrRNA

riboEDIT™ tracrRNA 采用化学合成 tracrRNA，经 PAGE 纯化，能够抗核酸酶，能与 crRNA 结合形成 crRNA/tracrRNA 复合物，共同指导 Cas9 蛋白切割双链 DNA。

运输保存

所有产品均需按照具体产品指定的条件运输和保存，运输无异常且保存得当可稳定保存 1 年。为避免外界因素（极端 pH 或者温度条件等）导致产品降解，实验过程中产品置于冰上放置。

实验方法

1. riboEDIT™ CRISPR/Cas9 mRNA 操作说明

由于不存在 DNA 插入的风险，Cas9 mRNA 是一种更安全的基因组编辑工具。riboEDIT™ Cas9 mRNA 是体外转录生成的 Cas9 mRNA，具有帽子和 polyA 尾巴结构。编码载体为人源密码子优化的 *S. pyogenes* Cas9，带有核定位信号（NLS），C 端的一个 1XFLAG 标签，5' 非翻译区（5'UTR）及 3' 非翻译区（3'UTR），以促进 mRNA 的翻译和提高 mRNA 的稳定性，适用于哺乳动物细胞的基因编辑。

1.1 实验准备（以转染 24 孔板为例）

- (1) 将 riboEDIT™ tracrRNA (5nmol) 和 riboEDIT™ crRNA (5nmol) 加入 250μL RNase-free H₂O，稀释至 20μM，作为储存溶液。使用前，用 RNase-free H₂O 进一步稀释至 10μM，置于冰上备用。
- (2) riboEDIT™ Cas9 mRNA (500ng/μL)，置于冰上备用。

1.2 实验步骤

- (1) 准备细胞：转染前 18-24h，取对数生长期细胞接种于 24 孔板中，实验前细胞密度达到 50%~70% 为宜。
- (2) 取一支 1.5mL EP 管，加入 25μL Opti-MEM™ 减血清培养基，再加入 2μL riboFECT™ mRNA Transfection Reagent 转染试剂，室温孵育 10min。
- (3) 另取一支 1.5mL EP 管，加入 25μL Opti-MEM™ 减血清培养基，然后加入 2μL riboEDIT™ Cas9 mRNA (500ng/μL)。
- (4) 然后分别加入 1μL tracrRNA (10μM) 和 1μL crRNA (10μM)，crRNA 和 tracrRNA 按 1:1 加入。不同孔板转染体系可按照 表 1 自行优化。
- (5) 将 crRNA、tracrRNA、Cas9 mRNA 混合物加入到稀释的转染试剂中，室温孵育 5min。
- (6) 孵育结束后，将上述制备好的转染复合物加入到细胞培养基中，继续培养 48~72h。
- (7) 提取基因组，使用 riboEDIT™ T7EI Enzyme 进行基因编辑效率检测。

表 1. riboEDIT™ Cas9 mRNA 转染体系

组分	96-well	24-well	6-well
Opti-MEM™ Medium	5μL	25μL	125μL
riboFECT™ mRNA Transfection Reagent	0.4-0.6μL	2-3μL	10-15μL
稀释的 riboFECT™ mRNA Transfection Reagent 置于室温孵育 10min。			
Opti-MEM™ Medium	5μL	25μL	125μL
riboEDIT™ Cas9 mRNA (500ng/μL)	0.2-0.4μL	1-2μL	5-10μL
tracrRNA	2-8 pmol	10-40 pmol	50-200 pmol
crRNA	2-8 pmol	10-40 pmol	50-200 pmol
与稀释的 riboFECT™ mRNA Transfection Reagent 混合，室温孵育 5min，孵育结束后加入细胞培养基中。			

2. riboEDIT™ CRISPR/Cas9 RNP 使用说明

riboEDIT™ CRISPR/Cas9 RNP（核糖核蛋白复合物）由化学合成的 crRNA，tracrRNA 及 Cas9 蛋白组成。化学合成的 crRNA 和 tracrRNA 与 Cas9 蛋白混合后转染细胞，可快速实现靶基因的编辑。与传统 Cas9/gRNA 质粒转染相比，基因编辑效率更高，脱靶效应更低，且无 DNA 整合的风险，是更加理想的基因编辑系统。

2.1 实验准备（以转染 24 孔板为例）

- (1) 将 riboEDIT™ tracrRNA(5nmol)和 riboEDIT™ crRNA(5nmol)加入 250μL RNase-free H₂O，稀释至 20μM，作为储存溶液。使用前，用 RNase-free H₂O 进一步稀释至 5μM，置于冰上备用。
- (2) riboEDIT™ Cas9 Protein (20μM)用 Opti-MEM™ 减血清培养基或 PBS 稀释至 6μM，置于冰上备用。

2.2 实验步骤

- (1) 准备细胞：转染前 18-24h，取对数生长期细胞接种于 24 孔板中，实验前细胞密度达到 50%~70% 为宜。
- (2) 取一支 1.5mL EP 管，加入 25μL Opti-MEM™ 减血清培养基，然后加入 1μL riboEDIT™ Cas9 Protein (6μM)。

(3) 在以上 EP 管中再加入 1.2 μ L tracrRNA (5 μ M) 和 1.2 μ L crRNA (5 μ M)，crRNA 和 tracrRNA 按 1:1 加入。

注：推荐 crRNA：tracrRNA：Cas9 Protein 使用比例 1：1：1-5：5：1，最佳比例可按照表 2 自行优化。

(4) 室温孵育 10min，形成 Cas9 RNP 复合物。

(5) 用 25 μ L Opti-MEM™ 减血清培养基稀释 3 μ L Lipofectamine 3000 转染试剂。

(6) 将 Cas9 RNP 复合物加入到转染试剂中，室温孵育 15min。

(7) 孵育结束后，将上述制备好的转染复合物加入到细胞培养基中，继续培养 48~72h。

(8) 提取基因组，使用 riboEDIT™ T7E1 Enzyme 进行基因编辑效率检测。

表 2. riboEDIT™ Cas9 RNP 转染体系

组分	96-well	24-well	6-well
Opti-MEM™ Medium	5 μ L	25 μ L	125 μ L
riboEDIT™ Cas9 Protein	1.5-2.5 μ mol	6-12 μ mol	30-60 μ mol
tracrRNA	1.5-12.5 μ mol	6~60 μ mol	30-300 μ mol
crRNA	1.5-12.5 μ mol	6~60 μ mol	30-300 μ mol
室温孵育 5-10min，形成 Cas9 RNP 复合物。			
Opti-MEM™ Medium	5 μ L	25 μ L	125 μ L
Lipofectamine 3000 Transfection Reagent	0.6 μ L	3 μ L	15 μ L
与 Cas9 RNP 复合物混合，置于室温孵育 15min，孵育结束后加入细胞中。			

3.T7E1 酶切检测靶位点编辑效率操作说明

在细胞转染后，建议使用 T7E1 酶切法筛选编辑效率高的 crRNA 进行下游实验。

实验步骤

(1) 提取基因组：细胞转染后 48-72h 后，收集细胞抽提基因组，并用微量紫外分光光度计定量。

(2) PCR 扩增靶基因片段：将纯化得到的基因组 DNA 稀释至合适的浓度范围，吸取 100ng-500ng 基因组 DNA 用高保真 DNA 聚合酶进行 PCR 扩增，阳性对照组使用 riboEDIT™ Positive Control crRNA Validation Set 的引物进行扩增，引物信息见表 3。

注：基因组 DNA 模板用量及 PCR 条件需根据反应体系自行优化。

表 3. riboEDIT Positive Control crRNA Validation Set 引物序列

crRNA 阳性对照	靶位点	Forward primer	Reverse primer	剪切片段
riboEDIT TM Positive Control crRNA	h-SLX4IP	5'-TTATCCGGCACTG TGAAAGCT-3'	5'-CCTGATGTTTAGC AACTTTTGG-3'	332bp/441bp

- (3) DNA 片段退火: DNA 片段按照表 4 退火体系进行混合, 充分混匀后置于 PCR 中运行退火程序 (表 5)。或 95°C 加热 5min, 然后自然冷却至室温。

表 4.退火体系

组分	体积
ddH ₂ O (双蒸水)	补充到 20 μL
10 × riboEDIT TM T7E1 Reaction Buffer	2 μL
DNA 产物	5-8 μL

表 5.DNA 双链退火程序

95°C	5 min
95°C-85 °C	-2°C/s
85°C-25°C	-0.1°C/s
25°C	5min

- (4) T7E1 酶切: 退火完成后, 每管加入 0.5μL riboEDITTM T7E1 Enzyme (10U/μL), 37°C 温育 30min。
- (5) 电泳检测: T7E1 酶切后, 产物进行纯化, 然后使用 2%-3% 琼脂糖凝胶电泳或 Agilent 2200 Tape Station 检测酶切条带和编辑效率。

关于编辑效率和免责声明

编辑效率售后说明: 我司针对“效率保证装”提供编辑效率承诺, 即按说明书操作且使用锐博生物的 Cas9 mRNA, T7E1 酶切效率至少 1 条达到 30% 以上。在细胞水平, 推荐客户使用 MHCC97H 细胞检测 riboEDITTM CRISPR-Cas9 基因编辑系统的靶位点剪切效率。若 5 条 crRNA 编辑效率均低于 30%, 须客户提供 MHCC97H 转染效率与检测方法具体步骤, 经我司技术分析确认, 允许免费重新设计合成 crRNA 并提供技术指导, 若重合之后编辑效率仍低于 30%, 建议客户采用其他基因编辑方法, 我司将不再受理或承担任何责任。

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 5 条 crRNA;
- (2) 对于无法转染的细胞;
- (3) 对于非人源物种;
- (4) 除了 MHCC97H 以外的细胞类型;
- (5) 客户自行提供 crRNA 合成序列;
- (6) crRNA 未搭配我司说明书中制定的 mRNA

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。

产品订购

riboEDIT™ CRISPR-Cas9 套装产品

产品名称	效率保证套装	标准套装
riboEDIT™ CRISPR-Cas9 mRNA Set, 20T	crG00001	crS00001

*效率保证装: 按说明书操作条件下, T7E1 酶切效率可实现至少 1 条达到 30% 以上, 若 5 条均低于 30%, 须客户提供 MHCC97H 转染效率与检测方法具体步骤, 经技术分析确认, 免费重新设计挑选合成 5 条 crRNA, 标准套装不提供编辑效率有效性保证和免费重台服务。

套装体系	效率保证套装	标准套装
riboEDIT™ CRISPR-Cas9 mRNA Set, 20T (基于 mRNA 的全 RNA 体系, 针对人源 细胞)	riboEDIT™ Designed crRNA (设计合成 5 条 crRNA, 每条 5nmol)	5*5nmol
	riboEDIT™ tracrRNA	5nmol
	riboEDIT™ Positive Control crRNA Validation Set for Human (验证用阳性对照 crRNA 及正反引物)*	1 set
	riboEDIT™ mRNA Transfection Kit	75ul
	riboEDIT™ Cas9 mRNA (0.5ug/ul)	20ug
	riboEDIT™ T7E1 Enzyme (10U/ul)	100U

*Positive Control crRNA Validation Set 包括阳性对照 crRNA 5nmol, 正向引物 5nmol 和反向引物 5nmol

riboEDIT CRISPR-Cas9 其他订购信息

产品编号	产品名称
crRXXXXX-5	riboEDIT™ Designed crRNA, Set of X, 5nmol for each crRNA
crRXXXXX-20	riboEDIT™ Designed crRNA, Set of X, 20nmol for each crRNA
crRXXXXX-X	riboEDIT™ Synthetic crRNA - Sequence Provided (客户提供序列合成)
crRP0001VS	riboEDIT™ Positive Control crRNA Validation Set for Human (验证用阳性对照crRNA及正反引物)
crT00001-5	riboEDIT™ tracrRNA, 5nmol
crT00001-20	riboEDIT™ tracrRNA, 20nmol
C11055-1	riboFECT™ mRNA Transfection Reagent, 75ul
C11057-1	riboEDIT™ Cas9 mRNA (0.5ug/ul), 20ug
C11053-1	riboEDIT™ Cas9 Protein, S.pyogenes(20uM), 500pmol
C11054-1	riboEDIT™ T7EI Enzyme (10U/ul), 100U

*请登录官网 www.ribobio.com 查询目录价格，定制产品、大规格产品需在线提交订单报价

*仅提供人和小鼠物种的 crRNA 设计，其他物种需另行评估

*定制型 crRNA 筛选文库 (0.25nmol, 0.5nmol, 1nmol) 10 个基因起订，请在线提交定制订单

常见问题解答

1. riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系相比于载体表达 Cas9 和 Cas9 稳定表达细胞株或慢病毒有什么优势？

答：

(1) riboEDIT™ CRISPR-Cas9 的全 RNA 体系或 Cas9 蛋白体系相比质粒载体或 Cas9 稳定表达细胞株而言，Cas9 蛋白为瞬时表达，脱靶效率低、无 DNA 整合风险和启动子兼容性问题，大大提高应用安全性。

(2) 即用型体系，通过一步转染，5-6 个工作日即可完成编辑效率检测，操作简便，显著缩短实验周期。

(3) 不需要自行构建载体或包装慢病毒，不需要病毒级的实验室环境。

(4) 在大部分细胞中，比质粒表达载体具体更高的基因编辑效率。

2. 如何快速确定 crRNA 的有效性？

答：crRNA/ tracrRNA 剪切效率与 crRNA 识别的靶序列有关，不同的 crRNA 剪切活性不同，推荐通过体外酶切实验，在体外酶切靶 DNA 片段，快速筛选有效的 crRNA，获得高编辑效率的 crRNA 再进行后续的实验。

3. riboEDIT™ CRISPR-Cas9 基因编辑系统识别的 PAM 序列是什么？

答：riboEDIT™ Cas9 mRNA 和 riboEDIT™ Cas9 Protein S. pyogenes Cas9 为 S. pyogenes Cas9，识别 PAM 序列 NGG，N 代表 A，T，C，G。

4. riboEDIT™ Pre-designed crRNA 如何保证低的脱靶效率?

答: 从 crRNA 的设计角度, 使用更严格的序列比对分析。

5. T7E1 酶切检测编辑效率发现无剪切条带是什么原因?

答: 可能原因如下:

- (1) 细胞转染效率低, 建议优化转染步骤或换用容易转染的细胞类型。
- (2) Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白降解, 可通过设置阳性对照组排除 Cas9 mRNA 或 Cas9 蛋白降解的问题。
- (3) 在细胞内, Cas9 核酸酶无法接近靶位点或无法剪切靶位点, 建议重新设计 crRNA。
- (4) 没有进行 DNA 片段的变性、退火步骤。可通过设置阳性对照组确认实验操作是否有误。

6. 琼脂糖凝胶电泳分析剪切效率时非特异性条带多, 无法分析剪切效率怎么办?

答: 可通过设置阴性对照组来区分目标剪切条带和非目标条带。必要时, 需重新设计引物, 或通过优化 PCR 条件, 来降低非特异性扩增。建议采用巢式 PCR, 提高扩增片段的特异性。

7. T7E1 突变检测时, 出现条带弥散的现象, 应该如何解决?

答: 由于 T7E1 本身具有弱的非特异切割 DNA 链的能力, 所以遇到这种情况, 可以增加 DNA 用量, 降低酶的用量, 减少酶切时间来降低非特异切割现象。

8. 对于从事诸如干细胞、原代细胞或悬浮细胞, riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系选择哪一种?

答: 干细胞、原代细胞或悬浮细胞等难转染细胞, 转染试剂一般很难达到理想的转染效果, 电转方式更适合这类细胞的转染, 根据目前文献支持, Cas9 RNP 体系用于电转具有更高的基因编辑效率, 对于上述难转染的细胞推荐用 riboEDIT™ CRISPR/Cas9 RNP 体系, 具体实验条件需要自行优化。