

riboEDIT™ Cas9 mRNA 产品使用说明

RN: R12004.1

产品简介

riboEDIT™ Cas9 mRNA 是锐博生物自主研发生产的 Cas9 mRNA，经体外转录制备，具有 5'-cap 和 3'-polyA 结构。序列中同时带有核定位信号（NLS），C 端的一个 1X FLAG 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 CRISPR/Cas9 系统介导的哺乳动物细胞的基因编辑。

表 1 试剂盒组分清单

Reagent	Conc.	C11057-1	C11057-2	C11057-3
riboEDIT™ Cas9 mRNA	0.5μg/μL	40μL	200μL	1mL
Nuclease-free Water	-	1mL	1mL	1mL

运输保存

产品为**低温运输**。

产品请避免反复冻融，长期保存需**-80℃**存放，可稳定保存 1 年。短期保存可于**-20℃**存放，可稳定保存 1 个月。

使用前请**瞬时离心**。

产品应用

CRISPR/Cas9 系统介导的基因敲除、基因敲入。

为了介导 DNA 位点特异性双链断裂，建议与 riboEDIT™ crRNA/ tracrRNA 或合成的 sgRNA 配套使用。

实验方法以转染贴壁细胞于24孔板为例

客户自备试剂

- 1) riboEDIT™ tracrRNA
- 2) riboEDIT™ crRNA
- 3) riboFECT™ mRNA Transfection Kit
- 4) riboEDIT™ T7EI Enzyme

1.1 实验准备

- 1) 将 riboEDIT™ tracrRNA (5nmol) 和 riboEDIT™ crRNA (5nmol) 各加入 500 μ L Nuclease-free H₂O, 稀释至 10 μ M 储存溶液。使用前置于冰上备用。
- 2) riboEDIT™ Cas9 mRNA (0.5 μ g/ μ L), 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 25 μ L Opti-MEM™ 减血清培养基, 再加入 2 μ L riboFECT™ mRNA Transfection Reagent 转染试剂, 室温孵育 10min。
- 3) 另取一支 1.5mL EP 管, 加入 25 μ L Opti-MEM™ 减血清培养基, 然后加入 2 μ L riboEDIT™ Cas9 mRNA (0.5 μ g/ μ L)。
- 4) 然后分别加入 1 μ L tracrRNA (10 μ M) 和 1 μ L crRNA (10 μ M), 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	6-well	24-well	96-well
Opti-MEM™ Medium	125 μ L	25 μ L	5 μ L
riboFECT™ mRNA Transfection Reagent	10-15 μ L	2-3 μ L	0.4-0.6 μ L
稀释的 riboFECT™ mRNA Transfection Reagent 置于室温孵育 10min			
Opti-MEM™ Medium	125 μ L	25 μ L	5 μ L
riboEDIT™ Cas9 mRNA (0.5 μ g/ μ L)	5-10 μ L	1-2 μ L	0.2-0.4 μ L
riboEDIT™ tracrRNA (10 μ M)	5-20 μ L	1-4 μ L	0.2-0.8 μ L
riboEDIT™ crRNA (10 μ M)	5-20 μ L	1-4 μ L	0.2-0.8 μ L
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。			

FAQ

1. 使用 *riboEDIT*TM Cas9 mRNA 进行细胞基因编辑，如何确定细胞的转染效率？

答：高转染效率是获得高效基因编辑效率的必要条件，可通过转染 EGFP mRNA 或其它荧光蛋白 mRNA 来确定细胞的转染效率。*riboFECT*TM mRNA Transfection Reagent 转染试剂可实现各种细胞类型，包括干细胞和原代细胞的高效率、低毒性转染，从而提高 Cas9 蛋白剪切和基因重组效率。对于转染试剂难以达到理想转染效果的细胞，推荐使用电转方式，具体实验条件需要自行优化。

2. *riboEDIT*TM Cas9 mRNA 是否可以用于显微注射？

答：可以，*riboEDIT*TM Cas9 mRNA 浓度为 0.5 μ g/ μ L，建议显微注射前调整浓度到 20-200ng/ μ L 范围，并采用 0.22 μ L 针式过滤器确保去除所有可能堵塞显微注射针头的颗粒物。

3. 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，建议优化该细胞的转染条件或换用容易转染的细胞类型。
- (2) *riboEDIT*TM Cas9 mRNA 降解，可通过与 *riboEDIT*TM Positive Control crRNA #1 共转染，排除 Cas9 mRNA 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。

4. *riboEDIT*TM Cas9 mRNA 是否可以用于多个靶点或基因的编辑？

答：可以，通过混合多条 crRNA，与 tracrRNA 和 *riboEDIT*TM Cas9 mRNA 共转染可实现对多个靶点或基因的编辑，最佳共转染体系需自行优化，请保证 crRNA 和 tracrRNA 按 1:1 加入。