

# riboEDIT™ CRISPR-Cas9 基因编辑体系技术手册

用于提高哺乳动物细胞基因编辑效率  
提供编辑效率保证套装及完整技术工具



## ► 关于锐博

广州市锐博生物科技有限公司（锐博生物）2004年成立于广州开发区，是一家以核酸技术为核心的国家火炬计划重点高新技术企业，是中国核酸行业的领军企业之一。拥有国家级博士后科研工作站，获得了广东省核酸药物工程实验室、广东省核酸医药工程技术研究中心、广东省企业技术中心等资质。由国家重大人才工程入选者和诺贝尔生理 / 医学奖获得者领衔的国际一流水平研发团队，以国际化视野，致力于新一代核酸技术与药物研发。

锐博生物建立了多条国内领先和国际先进的寡核苷酸产品生产线，可完成从微克到克级的科研用寡核苷酸产品生产、以及从十克到千克级的药物开发与临床研究用寡核苷酸产品生产。建立了与国际接轨的cGMP生产基地，正在建设的多条大规模核酸药物生产线进入最后验收阶段，将打造国际领先的核酸药物CMO基地。

锐博生物致力于提供高品质的各类寡核苷酸合成、siRNA、非编码RNA、细胞分析、外泌体提取、CRISPR-Cas9及各种核酸检测试剂盒等，专业提供高内涵细胞成像及筛选、RNAi动物实验、高通量测序、生信分析、RNA体外转录、外泌体检测等技术服务，提供核酸药物GMP生产的CDMO和CMO服务。通过跨学科、多平台、上下游贯通的综合技术优势，赢得了国内外客户的信赖和赞誉。“锐博生物RiboBio”是中国高品质核酸产品代名词之一，为国内外超过5000家机构提供产品或服务，客户SCI文章累计超过20,000多篇，合作客户包括诺贝尔奖得主实验室、知名科研机构和全球制药公司，锐博生物是亚洲知名的寡核苷酸原料药生产企业之一，2016年获得政府药监局颁发的寡核苷酸原料药生产许可证，现已跻身于全球核酸药CDMO的知名企业行列。

锐博生物积极推动国内外核酸科学与技术的交流与合作，连续多年承办代表行业风向标的中国核酸国际论坛（CNAF）和非编码RNA与表观遗传学研究经验交流会，获批建立国家级博士后科研工作站，承担多项国家及省市重点科研项目。锐博生物致力于提供国际一流的核酸产品与服务，构建国际一流的合作平台与伙伴关系。

公司秉承“以创新求发展，以品质铸未来，以诚信待客户”的发展理念，追求“创新永不停”！

# 目 录

<b>01</b>	<b>关于 riboEDIT™ CRISPR-Cas9</b> .....	01
<b>02</b>	<b>riboEDIT™ CRISPR-Cas9: RNP 体系 &amp; 全 RNA 体系</b> .....	02
<b>03</b>	<b>CRISPR-Cas9 套装产品</b> .....	04
<b>04</b>	<b>riboEDIT™ CRISPR-Cas9 相关产品</b>	
	• 设计合成 crRNA: 靶向目的 DNA 序列 .....	05
	• CRISPR crRNA Library 文库 .....	05
	• crRNA 阳性对照套装: 检测编辑体系正确性 .....	06
	• 通用型 tracrRNA: 与 crRNA 形成 gRNA.....	06
	• Cas9 mRNA: 瞬时表达 Cas9 蛋白 .....	06
	• mRNA 转染试剂 .....	06
	• EGFP mRNA: 用于转染对照, 检测转染效率 .....	07
	• Cas9 蛋白 .....	07
	• T7E1 Enzyme 酶: 检测编辑效率 .....	07
<b>05</b>	<b>CRISPR 操作流程</b>	
	• CRISPR-Cas9 全 RNA 体系操作流程图 .....	09
	• CRISPR-Cas9 RNP 体系操作流程图 .....	10

## 关于 riboEDIT™ CRISPR-Cas9

锐博生物自主开发的 riboEDIT™ CRISPR-Cas9 是采用天然复合物系统的即用型 (Ready-to-Use) 基因编辑体系。gRNA 采用 crRNA 和 tracrRNA, 其中 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, 充分借助化学合成技术优势和质谱检测以确保质量稳定, 简单通过化学转染、显微注射或电穿孔 / 电转即可进行基因编辑实验。相比其他方法, riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系拥有更多优势:

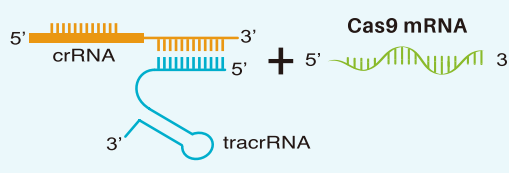
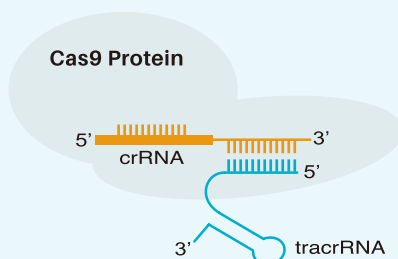


## riboEDIT™ CRISPR-Cas9 应用领域

riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系可用于哺乳动物细胞的基因编辑, 如肿瘤细胞、干细胞 (动物胚胎干细胞、多功能干细胞、造血干细胞等)、原代细胞、祖细胞、细胞治疗 (CAR-T)、动物模型 (受精卵) 等, 适合进行单 / 多基因敲除、细胞改造、构建稳转株、动物受精卵或干细胞, 或从受精卵或配套注射进行模式动物构建。

# riboEDIT™ CRISPR-Cas9: RNP 体系 & 全 RNA 体系

锐博生物可提供基于 mRNA 的全 RNA 体系 (crRNA+tracrRNA+Cas9 mRNA) 和 RNP 体系 (crRNA+tracrRNA+Cas9 Protein) 基因编辑工具。

	全 RNA 体系 (基于 Cas9 mRNA 的体系)	RNP 体系 (核糖核蛋白复合物)
描述与用途	Cas9 mRNA 在细胞内瞬时表达 Cas9 蛋白, 与 crRNA 和 tracrRNA 形成编辑复合物, 一般可用于多数哺乳动物细胞和肿瘤细胞等	体外生成的 Cas9 蛋白、crRNA 和 tracrRNA 形成编辑复合物, 一般用于难转染或电转细胞, 如干细胞、免疫细胞、原代细胞等
图示形式		
gRNA (guide RNA)	crRNA: tracrRNA, 经特殊纯化	crRNA: tracrRNA, 经特殊纯化
Cas9	Cas9 mRNA 人源密码子优化, 含核定位信号 NLS、C 端 1XFLAG 标签、5' UTR 和 3' UTR	Cas9 蛋白 野生型, 人源密码子优化
转染或递送方式	mRNA 转染试剂、显微注射、电转 (电穿孔)、阳离子脂质体等	电转 (电穿孔)、蛋白转染试剂、显微注射、阳离子脂质体等
编辑效率保证	提供效率保证套装 (每个基因设计 5 条 crRNA)	不提供效率保证套装, 需自行优化
编辑效率或脱靶	编辑效率高, 脱靶比质粒或病毒载体形式更低 (一般小于 5%), 毒性更小, 免疫反应更小	
操作时间	半小时配液, 一步转染, 5-6 个工作日完成编辑效率检测	
Cas9 PAM 序列	NGG (N=A, T, C, G)	
运输方式	低温运输	

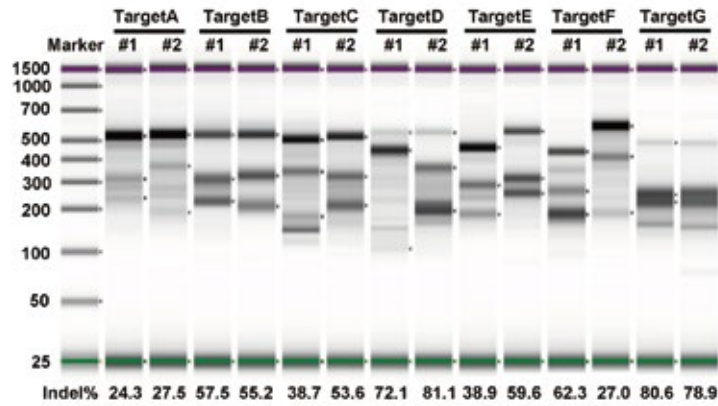


图 1. riboEDIT™ Cas9 Expression mRNA 具有高效的基因组剪切效率。

MHCC97H 细胞共转染 10pmol riboEDIT™ crRNA、10pmol riboEDIT™ tracrRNA 和 1ug riboEDIT™ Cas9 mRNA，48 小时后 riboEDIT™ T7EI Enzyme 酶切检测靶位点的剪切效率，候选 7 个靶基因的剪切条带及编辑效率。如图所示，#1#2 表示同一基因不同位点设计的 2 条 crRNA。

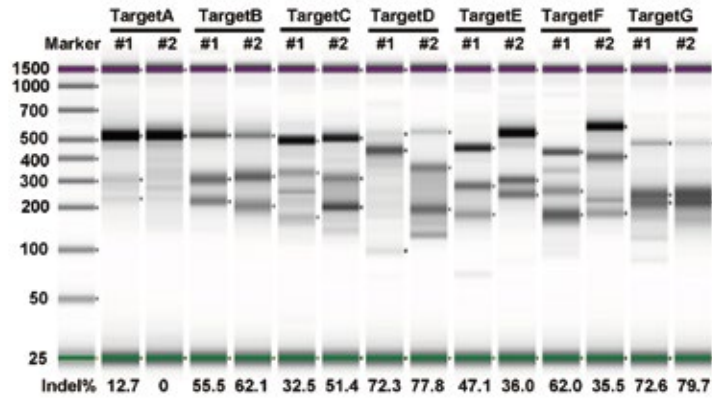


图 2. riboEDIT™ Cas9 RNP 具有高效的基因组剪切效率。

MHCC97H 细胞共转染 6pmol riboEDIT™ crRNA、6pmol riboEDIT™ tracrRNA 和 6pmol riboEDIT™ Cas9 Protein，48 小时后 riboEDIT™ T7EI Enzyme 酶切检测靶位点的剪切效率，候选 7 个靶基因的剪切条带及编辑效率。如图所示，#1#2 表示同一基因不同位点设计的 2 条 crRNA。

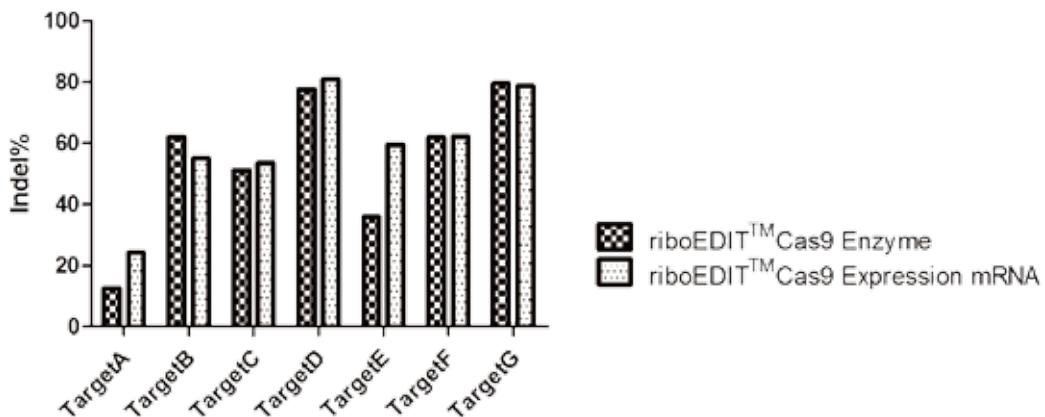


图 3. riboEDIT™ CRISPR-Cas9 mRNA 基因编辑体系与 riboEDIT™ Cas9 RNP 复合物具有等同的靶位点剪切活性。

# CRISPR-Cas9 套装产品

针对全 RNA 体系，锐博生物还提供方便高效的基因编辑套装产品：效率保证套装和标准套装。

效率保证套装针对人源基因，利用设计软件挑选评分高的 5 条 crRNA 进行合成，基于 Cas9 mRNA 的体系而配置必备试剂，包括 tracrRNA、Cas9 mRNA、mRNA 转染试剂、阳性对照 crRNA 套装、T7E1 酶及配套缓冲液等，提供即用型的基因编辑套餐。其中效率保证套装可以实现 MHCC97H 细胞的 T7E1 酶切效率至少 1 条达到 30% 以上并提供相应的售后服务。

标准套装不提供任何编辑效率的保证。

## riboEDIT™ CRISPR-Cas9 套装产品

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

\* 效率保证套装：按说明书操作条件下，对 MHCC97H 细胞的 T7E1 酶切效率可实现至少 1 条达到 30% 以上，若 5 条均低于 30%，客户须提供 MHCC97H 转染效率与检测方法步骤，经技术分析确认，可免费重新优化设计，挑选合成 5 条 crRNA 并提供实验技术指导。标准套装不提供编辑效率有效性保证和免费重合服务

套装名称	套装产品内容
riboEDIT CRISPR-Cas9 mRNA Set (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)
	riboEDIT™ tracrRNA, 5nmol
	riboEDIT™ Positive Control crRNA Validation Set for Human *, 3*5nmol
	riboEDIT™ mRNA Transfection Reagent, 75ul
	riboEDIT™ Cas9 mRNA (0.5ug/ul), 20ug
	riboEDIT™ T7E1 Enzyme (10U/ul), 100U

\* Positive Control crRNA Validation Set for Human 包括针对人源的阳性对照 crRNA 5nmol、正向引物 5nmol 和反向引物 5nmol

# riboEDIT™ CRISPR-Cas9 相关产品

## 设计合成 crRNA：靶向目的 DNA 序列

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，crRNA 包含 20 个与目标 DNA 序列互补配对的核苷酸（原间隔序列）以及与 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，经过严格的 PAGE 纯化，其他物种 crRNA 设计需另行评估。

## CRISPR crRNA Library 文库

锐博生物提供适用于大规模筛选的化学 CRISPR crRNA 文库，文库采用优化的设计算法提高特异性，相比单条 crRNA 更具经济性和通量性，以冻存管形式提供，可进行单孔细胞表型分析与高内涵高通量筛选分析，提供基因家族、特殊基因文库，crRNA 定制文库为 20 个基因起订。若定制 100 个基因以上的，可按要求提供 96 孔 PCR 板封装形式。

### CRISPR crRNA 文库优势：

- 锐博优化算法设计 crRNA，特异高效
- 每个靶点设计 4 条独特的 crRNA
- 灵活经济定制，20 个基因起订
- 单孔或阵列细胞表型结果
- 每批经过 PAGE 纯化和质谱检测
- 提供冻存管或 96 孔板封装
- 提供单条分装或多条预混 PreMix 形式
- 无需使用者具备 crRNA/sgRNA 设计经验
- 配套提供 tracrRNA

riboEDIT™ CRISPR crRNA 文库一览表

	riboEDIT crRNA 定制文库（特殊基因）	riboEDIT crRNA 定制文库（Premix 型）	riboEDIT crRNA 定制文库（Separate 型）
物种类型	人	人、小鼠	人、小鼠
提供形式 (4 个 crRNA/ 基因)	4 条预混， 合计 0.5nmol	4 条预混， 合计 0.5nmol	0.25nmol*4 管 0.5nmol*4 管 1nmol*4 管
筛选次数 (96 孔板， 工作浓度 20-100nM)	250-50 次	250-50 次	0.25nmol, 125-25 次 0.5nmol, 250-50 次 1nmol, 500-100 次
基因数量	根据基因家族而定	20 个基因以上	20 个基因以上
配套 tracrRNA	据定制文库 crRNA 总摩尔量，可提供相等摩尔量 tracrRNA 按照 5nmol/ 管分装，客户在下单时需备注说明 (tracrRNA 量 = 基因数 * 4 * 0.25nmol，需根据基因数另行报价！)		
封装形式 *	默认以冻存管形式提供，96 孔封装按客户特殊备注		

## crRNA 阳性对照套装：检测编辑体系正确性

*riboEDIT*<sup>TM</sup> crRNA 阳性对照套装用于检测基因编辑体系的正确性，该套装包括阳性对照 crRNA、正向引物和反向引物，各 5nmol。

## 通用型 tracrRNA：与 crRNA 形成 gRNA

*riboEDIT*<sup>TM</sup> tracrRNA 采用化学合成通用型 tracrRNA，经 PAGE 纯化，能够抗核酸酶，能与锐博生物的 crRNA 结合形成 crRNA/tracrRNA 复合物，共同指导 Cas9 蛋白切割双链 DNA。需要注意的是，*riboEDIT*<sup>TM</sup> tracrRNA 与 *riboEDIT*<sup>TM</sup> crRNA 是专利配套体系，两者必须配套使用（不兼容其他体系的 crRNA）。

## Cas9 mRNA：瞬时表达 Cas9 蛋白

*riboEDIT*<sup>TM</sup> Cas9 mRNA 为体外转录生成，是属于 spCas9 mRNA，具有帽子和 polyA 尾巴结构，编码序列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，Cas9 mRNA 可在细胞内瞬时表达 Cas9 蛋白（即 spCas9 蛋白），在 crRNA 和 tracrRNA 复合物指导下对目的 DNA 序列进行剪切，相比质粒或病毒体系，有效地降低 CRISPR 基因编辑的脱靶效应，适用于哺乳动物细胞基因编辑。

## mRNA 转染试剂

*riboEDIT*<sup>TM</sup> mRNA Transfection Reagent 是一种专门用于长链 RNA 分子的转染试剂，极具生物相容性，转染效率高，细胞毒性小，适合各种长链 RNA 分子（如 mRNA，lncRNA 等）的转染实验，可转染的长链 RNA 长度达 4kb，已经成功实现了几十种细胞类型的高效转染，包括原代细胞、干细胞等难以转染的细胞类型。该转染试剂的最大特点是低毒、高效，转染时无需进行培养基更换操作，方便，快速。产品为常温运输。收到产品后，请于 2-8°C 保存，可以稳定保存一年，使用前请瞬时离心。

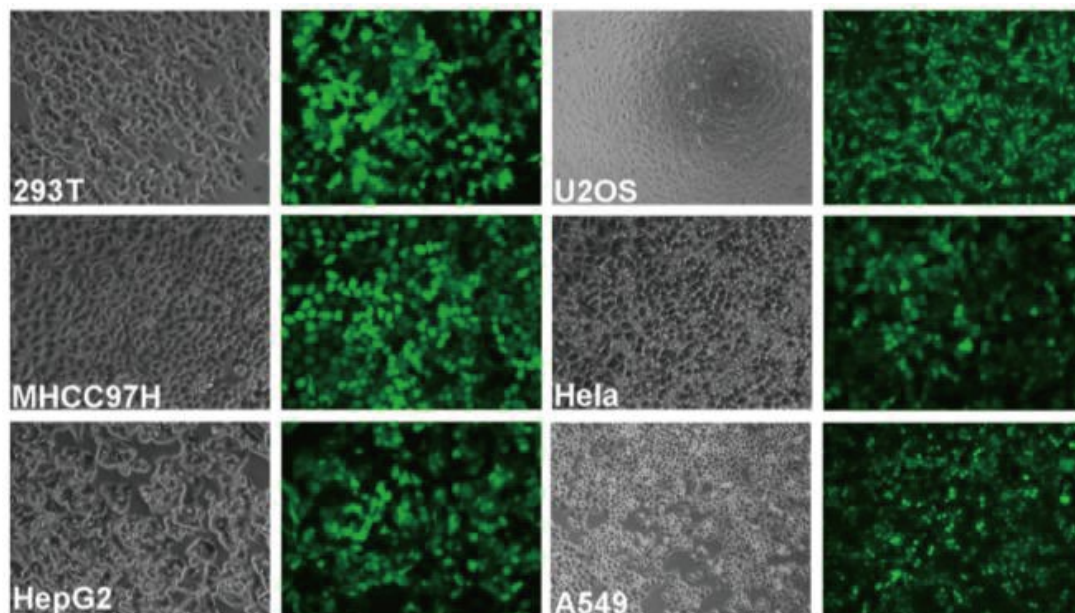


图4. *riboFECT*<sup>TM</sup> mRNA Transfection Reagent 具有高效的转染效率。

293T, MHCC97H, HepG2, U2OS, HeLa, A549细胞用*riboFECT*<sup>TM</sup> mRNA Transfection Reagent转染 500ng EGFP mRNA, 24h后荧光显微镜观察EGFP蛋白表达。

## EGFP mRNA:用于转染对照,检测转染效率

riboEDIT EGFP mRNA在转染试剂作用下进入目的细胞之后会表达绿色荧光EGFP蛋白,常作为检测CRISPR-Cas9体系转染效率的工具,提供的EGFP mRNA浓度为500ng/ $\mu$ L。

## Cas9蛋白

riboEDIT Cas9 Protein是riboEDIT CRISPR-Cas9的RNP体系的重要组成部分,RNP体系包括了crRNA和tracrRNA和Cas9蛋白,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,Cas9蛋白为热稳定*S.pyogenes*来源的核酸酶(又称为spCas9)。此RNP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,大大简化前期实验步骤。该即用型的RNP体系适合化学转染(借助蛋白转染试剂)、显微注射或电转(电穿孔)进行基因编辑。500pmol的Cas9蛋白相当于83ug,一般情况下每孔转染1-2ug的Cas9蛋白,可转染超过40次以上。

## T7E1 Enzyme酶:检测编辑效率

riboEDIT T7E1 Enzymes是经*E.coli*重组表达的结构特异性酶,可识别并切割非完全配对的双链DNA、十字形结构DNA、Holliday交叉DNA、异源双链DNA,或缓慢地切割带有切刻的双链DNA;可有效识别大于1个碱基的基因错配,广泛应用于由CRISPR-Cas9、锌指核酸酶(ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs)等工程核酸酶所介导的基因突变检测。试剂盒提供了T7E1 Enzyme、缓冲液和无酶水等组分。产品为低温运输,收到产品后,请于-20 $^{\circ}$ C保存,可以稳定保存1年,使用前请瞬时离心。

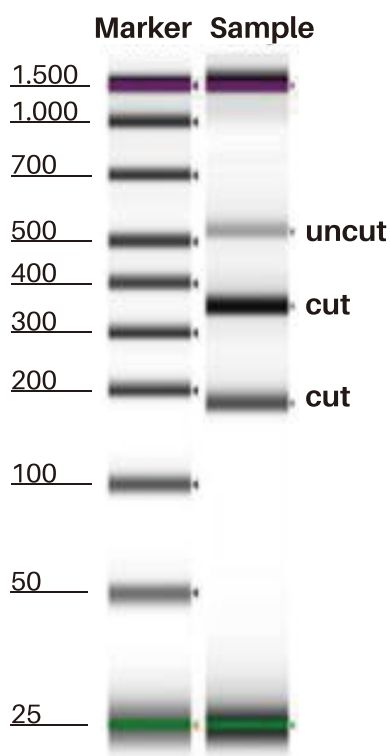


图5. Agilent 2200 Tape Station检测T7E1酶切后的DNA片段。

## 订购信息

### CRISPR-Cas9 套装产品

产品编号	产品名称	规格
crG00001	riboEDIT CRISPR-Cas9 mRNA Guarantee Set, (基因编辑效率保证套装)	20T
crS00001	riboEDIT CRISPR-Cas9 mRNA Standard Set, (基因编辑标准套装)	20T

### CRISPR guide RNA

产品编号	产品名称	规格
CR-NRA-1	riboEDIT Designed crRNA (设计合成 crRNA)	5nmol 起订
crT00001-5	riboEDIT tracrRNA	5nmol
crT00001-20	riboEDIT tracrRNA	20nmol

\* 以上产品其他规格亦可定制!

### Cas9 产品

产品编号	产品名称	规格
C11057-1	riboEDIT Cas9 mRNA (0.5ug/ul)	20ug
C11057-2	riboEDIT Cas9 mRNA (0.5ug/ul)	40ug
C11057-3	riboEDIT Cas9 mRNA (0.5ug/ul)	100ug
C11053-1	riboEDIT Cas9 Protein, S.pyogenes(20uM)	500pmol

### 其他产品

产品编号	产品名称	规格
crRP0001VS	riboEDIT Positive Control crRNA Validation Set for Human (验证用阳性对照 crRNA 及正反引物)	各 5nmol
C11055-1	riboEDIT mRNA Transfection Reagent	75ul
C11062-1	riboEDIT EGFP mRNA for Transfection Control,500ng/ $\mu$ L	10ug
C11054-1	riboEDIT T7EI Enzyme (10U/ul)	100U

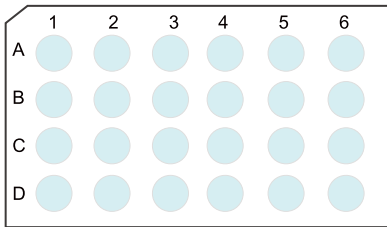
# CRISPR 操作流程：Ready-To-Use，更简单，步骤更少

## CRISPR-Cas9全RNA体系操作流程图

### ■ 以24孔板为例

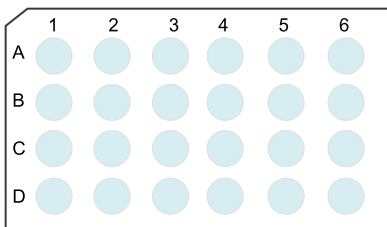
#### 第一步：接种细胞

转染前18-24h，取对数生长期细胞接种，细胞密度达到50-70%为宜。



#### 第二步：转染细胞、培养和检测

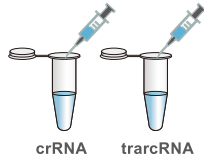
将右侧制备好的转染复合物约50μL加入到24孔细胞培养基中，继续培养48~72h。提取基因组，用T7E1酶切检测编辑效率。



### CRISPR-Cas9 全RNA体系溶液配制

#### 实验溶液稀释准备

(1) tracrRNA (5nmol) 和 crRNA (5nmol) 分别加入250μL RNase-free H<sub>2</sub>O, 各自稀释至20μM, 作为储存溶液。转染前, 用RNase-free H<sub>2</sub>O进一步稀释至10μM, 置于冰上备用。注: tracrRNA和crRNA可自行根据实验稀释至合适浓度  
(2) Cas9 mRNA (500ng/μL), 置于冰上备用。



#### Cas9 mRNA准备

取1.5mL EP管, 加入25μL Opti-MEM™减血清培养基, 加入2μL riboEDIT™ Cas9 mRNA (500ng/μL)。



#### mRNA转染试剂准备

取1.5mL EP管加入25μL Opti-MEM™减血清培养基, 再加入2μL riboFECT™ mRNA转染试剂, 室温孵育10min。



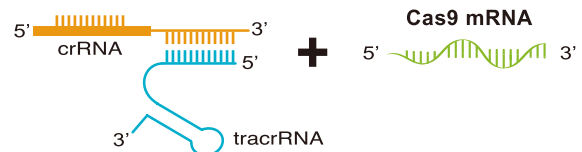
crRNA:tracrRNA + Cas9 mRNA  
(配制全RNA编辑体系)

在上述EP管中加入1μL tracrRNA (10μM) 和1μL crRNA (10μM), crRNA和tracrRNA按1:1加入。注: 加入浓度可自行优化, 需确保crRNA和tracrRNA按摩尔比1:1加入。



#### 形成转染复合物

将crRNA、tracrRNA、Cas9 mRNA混合物加入到上述稀释的mRNA转染试剂中, 混匀, 室温孵育5min。



#### 温馨提示:

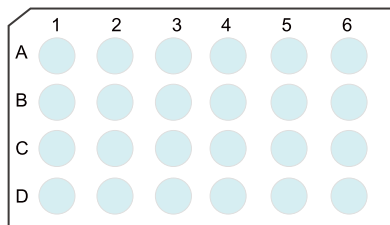
1. 请参照说明书中Cas9 mRNA转染体系设计不同孔板的转染量和试剂配比
2. 加入的体积V(μL)=转染摩尔数(pmol)/摩尔浓度(μM)
3. 其他类型孔板中加入的转染复合物体积需按比例换算

## CRISPR-Cas9 RNP体系操作流程

### ■ 以24孔板为例

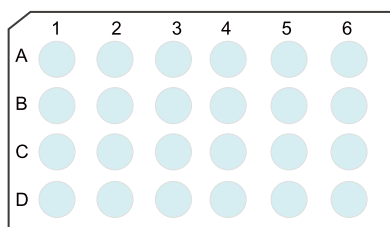
#### 第一步: 接种细胞

转染前18-24h, 取对数生长期细胞接种, 细胞密度达到50-70%为宜。



#### 第二步: 转染细胞、培养和检测

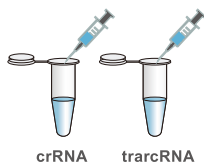
将右侧制备好的转染复合物约50μL加入到24孔细胞培养基中, 继续培养48~72h。提取基因组, 用T7E1酶切检测编辑效率。



### CRISPR-Cas9 RNP体系溶液配制

#### 实验溶液稀释准备

(1) tracrRNA (5nmol) 和 crRNA (5nmol) 分别加入250μL RNase-free H<sub>2</sub>O, 各自稀释至20μM, 作为储存溶液。转染前, 用RNase-free H<sub>2</sub>O进一步稀释至5μM, 置于冰上备用。注: tracrRNA和crRNA可自行根据实验稀释至合适浓度。  
(2) Cas9 Protein (20μM) 用Opti-MEM™减血清培养基或PBS稀释至6μM, 置于冰上备用。



#### Cas9 Protein准备

取1.5mL EP管, 加入25μL Opti-MEM™减血清培养基, 加入1μL Cas9 Protein (6μM)。



#### 蛋白转染试剂准备

用25μL Opti-MEM™减血清培养基稀释3μL Lipofectamine 3000转染试剂。



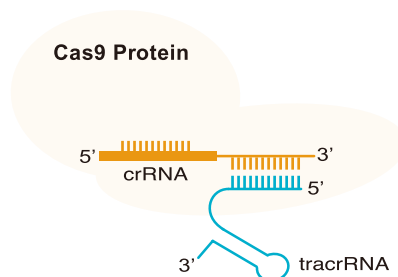
形成crRNA:tracrRNA + Cas9 Protein复合物  
(配制RNP编辑体系)

在上述EP管中再加入1.2μL tracrRNA (5μM) 和1.2μL crRNA (5μM), crRNA和tracrRNA按1:1加入, 室温孵育5-10min, 形成Cas9 RNP复合物。

注: 推荐crRNA:tracrRNA:Cas9 Protein按摩尔比1:1:1~5:5:1

#### 形成转染复合物

将Cas9 RNP复合物加入到上述稀释的蛋白转染试剂中, 室温孵育15min。



#### 温馨提示:

1. 请参照说明书中Cas9 Protein转染体系设计不同孔板的转染量和试剂配比
2. 加入的体积V(μL)=转染摩尔数(pmol)/摩尔浓度(μM)
3. 其他类型孔板中加入的转染复合物体积需按比例换算

RIBOBIO 锐博

创新永不停...

广州市锐博生物科技有限公司  
GUANGZHOU RIBOBIO CO., LTD.

地址:广州高新技术产业开发区科学城科学大道182号创新大厦C3栋1301  
Innovation Building C3-1301, 182 Kexue Avenue, Science Park, Guangzhou 510663.  
免费热线: 400 686 0075 电话: (020)3229 0075 投诉: (020)3221 0536  
企业QQ: 400 686 0075 网站: www.ribobio.com 邮箱: marketing@ribobio.com



锐博生物电子商务平台



锐博生物订阅号