



**sbs** 赛百盛  
SBS Genetech Co., Ltd.

---

电话: 010-62969345, 62969346

地址: 北京海淀区上地信息路2号  
2号楼11E 100085

网址: [www.sbsbio.com](http://www.sbsbio.com)

邮箱: [order@sbsbio.com](mailto:order@sbsbio.com)

● CRISPR 基因敲除

北京赛百盛基因技术有限公司

# 目录

## CONTENTS

在阅读本指南之前，我们强烈建议您先阅读《CRISPR 入门指南》以了解 CRISPR 的基础知识。

在本指南中我们将重点介绍 Synthego 的 CRISPR Revolution Gene Knockout Kit v2，这个工具包主要用于敲除人类细胞中编码单个蛋白质的基因。

利用生物信息学，我们可以设计多个 sgRNAs 来诱导靶基因中 21+bp 片段的缺失，这种高度破坏性的编辑将导致蛋白的完全敲除。Gene Knockout Kit v2 将让你的敲除实验一次便能获得成功，从而再也不需要设计不同的 sgRNAs 进行大量试错。

快在这里了解和学习到一切与 CRISPR 敲除相关的基础知识，然后开始你的第一次 CRISPR 敲除吧！

01	CRISPR 系统与 Gene Knockout Kit v2 简介
02	实验材料
03	转染 Protocols
04	核转染 Protocol
06	脂质转染 Protocol
08	故障排除

色彩鲜 自然界各种景物的色彩极为丰富，当这些景物被记录在彩色感光片上时，

就使得风景照片的色彩格外丰富、鲜艳。

## CRISPR 系统简介

CRISPR 系统包含两个成分：可以识别特定 DNA 序列的 gRNA 和负责切割 DNA 序列的 CRISPR 相关核酸内切酶（Cas 蛋白）。在 CRISPR 实验中，gRNA 和 Cas 蛋白会形成核糖核蛋白（RNP）复合物。

Cas 蛋白可以被理解为一把分子剪刀，而 gRNA 则是用于定位的 GPS 系统。在原核细胞中，gRNA 将内切酶引导至病毒 DNA。而在实验中，通过设计 gRNA 我们几乎可以定位任何有机体基因组上的任何位置。

在许多基因组工程运用中，我们使用的是源于 *Streptococcus pyogenes* 的 Cas9 蛋白。gRNA 与基因组目标位点的结合还同时取决于位于目标位点下游的一段前间隔序列邻近基序（PAM）的存在。其中，PAM 序列所在的 DNA 单链与 gRNA 所结合的 DNA 单链是两条不同的链。源于不同原核生物的 Cas 蛋白识别不同的 PAM 序列。我们最常用的 Cas9 蛋白识别的 PAM 序列是 5'-NGG-3'，其中 N 代表任意核苷酸。

如果 PAM 序列匹配正确，并且 gRNA 成功地与目标位点结合，那么 Cas9 会在 PAM 序列上游约 3-4 个核苷酸进行 DNA 双链的切割。



### Synthego 的多导向设计

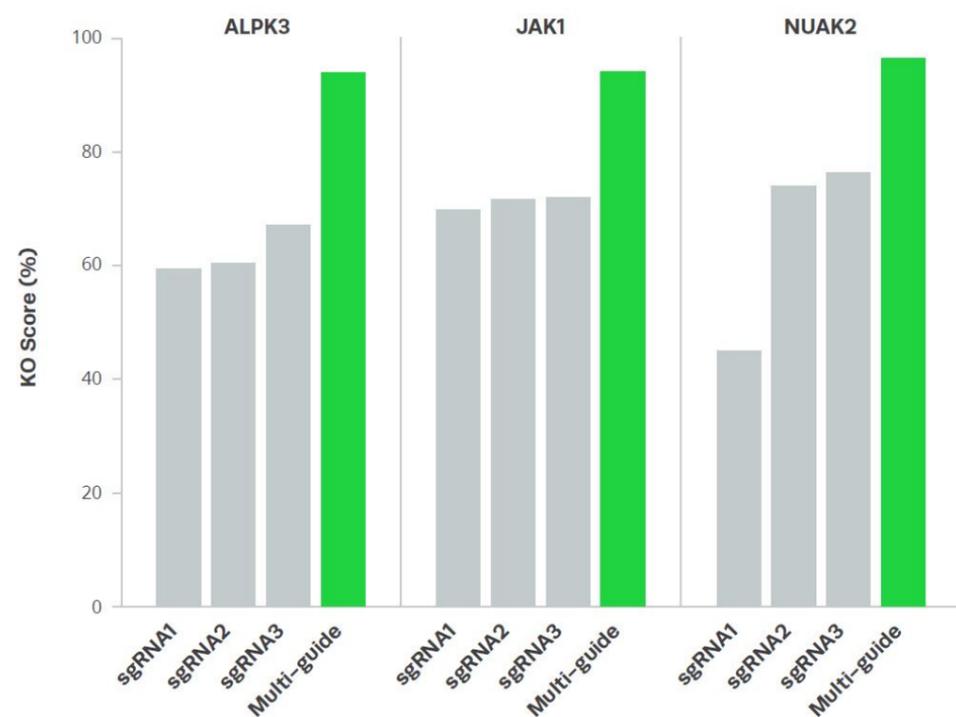
Synthego 的多导 gRNAs 设计包括多达 3 个针对感兴趣的单个基因的经修饰的 gRNAs（浅灰色）。每个 gRNAs 与 SpCas9 的 PAM 序列（5'-NGG-3' 或 5'-NGA-3'；深灰色）上游的互补序列结合。当共转染时，gRNAs 在靶基因位点同时产生双链断裂（垂直虚线），从而诱导一个或多个 21+bp 片段缺失。这些大的缺失（~7 个氨基酸）将有效地使蛋白失去原有功能。

## Gene Knockout Kit v2 简介

常见的 CRISPR 基因敲除实验是通过单个 gRNA 来产生随机的 indel。然而由于这种编辑方式是多样的且不可预测的，并且很大概率不会产生影响功能的敲除，所以这种策略是低效的。

Synthego 的 Gene Knockout Kit v2 是专门设计来敲除编码人类蛋白质编码基因的。我们采用多导向策略，其中高达三个 gRNA 被策略性地设计为靶向你感兴趣的基因。多个 gRNAs 在靶序列中诱导多个并发的双链断裂，从而导致一个或多个 21+bp 缺失。这些具有高度破坏性的“片段缺失”可靠地敲除了目标基因。

Gene Knockout Kit v2 对多种细胞类型有效，包括原代细胞和干细胞。所有的 gRNAs 都被设计为与 SpCas9 核酸酶共同使用，并且包含化学修饰以抵抗细胞内降解和防止细胞内免疫反应的激活。本手册包含两种以核糖核蛋白（RNP）复合物的形式转染多导 gRNAs 的方法：核转染和脂质转染。



### 多导sgRNA具有很高的敲除效率

实验中我们分别为三个基因（ALPK3、JAK1、NUAK2）设计了三个 gRNA，实验条件为分别导入（sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3）和一起导入（多导）。平均而言，多导 sgRNA 对ALPK3、JAK1 和 NUAK 2的效果分别比单独导入好 50.8%、32.1% 和 48.2%。HEK293 细胞（用于ALPK3）和 MCF7 细胞（用于JAK1 和 NUAK2）是通过核转染将核糖核蛋白（RNPS）导入的。上述数据是通过对每个靶点周围区域进行 PCR 扩增、Sanger 测序，并采用 CRISPR Edits (ICE) 推断分析得到的。其中，敲除得分（KO Score）是指推测的被敲除的序列所占的百分比（移码诱导的 indels 和21+bp片段缺失）。

## 提供的材料

数量	名称	描述	存储
1.5 nmol	靶向性多导 gRNA	1-3 个经化学修饰的 gRNA (1管)	-20°C 3个月 (无反复冻融 6个月)
1.5 ml	无核酸酶TRIS-EDTA缓冲液 (1X TE缓冲液)	10 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8.0)	室温
1.5 ml	无核酸酶水		室温

## 所需附加材料

名称	描述	订购信息
Cas9 2NLS 核酸酶	野生型 Cas9 源自 <i>S. pyogenes</i> (20 μM, 162 kDA)	赛百盛代理 Synthego
Transfection Optimization Kit (推荐)	包含：阳性对照多导 gRNA (人源 TRAC) 阳性对照 PCR 和测序引物 (人源 TRAC) 无核酸酶 Tris-EDTA 缓冲液 无核酸酶水 Cas9 NLS 核酸酶 源自 <i>S. pyogenes</i> (300 pmol, 20 μM, 162 kDA)	赛百盛代理 Synthego

## 转染 Protocols

本手册中的 Protocols 所提到的试剂材料都已经进行了实验优化验证，如果用户使用了其他非本手册里提到的试剂材料的话还需自行额外进行实验优化验证。

### 一般准则

- 实验时请戴手套，并使用无核酸酶管和试剂，以避免 RNase 污染。
- 始终保持无菌状态，并使用带滤芯无菌枪头。
- 应在转染后 48-72小时 使用荧光显微镜检测 GFP 转染效率（下表中的转染控制）。确定GFP 阳性细胞的百分比后可以以后不再进行检测，但对于不同细胞类型都应进行优化。
- 建议在进行基因敲除实验之前先使用TRAC 多导 sgRNA 优化转染条件。

### 建议的对照组

对照	描述	用途
空白	没有 Cas9 或 sgRNA	与实验和其他阴性对照相比较的野生型序列。用于观察 RNP 毒性、转染所致细胞死亡或其他影响生存率的对照。
阴性对照	Cas9 与 非靶向目标序列的 sgRNA 复合或无 sgRNA	确保没有由于污染而导致的假阳性。
阳性对照	已经验证了的具有高编辑效率的 sgRNA 推荐： 人源 TRAC 多导 sgrna sgRNA 1: 5'-CUCUCAGCUGGUACACGGCA-3' sgRNA 2: 5'-GAGAAUCAAAAUCGGUGAAU-3' sgRNA 3: 5'-ACAAAACUGUGCUAGACAUG-3'	确保所有试剂、protocols、和设备都正确。 用于优化特定细胞类型的转染条件。
转染	pMAXGFP 质粒	用于检测转染效率。

## 核转染 Protocol

该 Protocol 旨在为您的 CRISPR 编辑实验提供一个好的起点，并已优化到可以直接为 150000 个 HEK293 细胞进行核转染，默认使用的是 9:1 的 sgRNA 与 Cas9 的比率。如果需要为其他的细胞类型重新设置核转染的参数，我们建议查阅 Lonza Nucleofector™ 细胞和转染数据库，可在线访问：[knowledge.lonza.com](http://knowledge.lonza.com)

所有 Synthego 和 NucleFector™ 试剂应按照制造商的建议进行储存。我们强烈建议在进行基因敲除实验之前，使用阳性对照多导 sgRNA（例如，转染优化试剂盒）优化细胞类型的转染条件。

优化特定细胞类型的编辑效率需要更改以下参数：

- 每个反应的细胞数
- Cas9 的量
- sgRNA:Cas9 的比率
- 核转染程序
- 核转染溶液类型

## 所需附加试剂材料

试剂材料	购买
阳性对照多导 sgRNA (可选)	Synthego, Transfection Optimization Kit
转染对照 (可选)	Lonza, pMAXGFP 质粒
正常生长培养基	依赖于细胞类型
24 孔细胞培养板	多个供应商
细胞分离试剂 (如胰蛋白酶)	多个供应商
1X PBS, 细胞培养级	多个供应商
细胞计数器	多个供应商
离心管	赛百盛
4D-Nucleofector™ System (4D-Nucleofector™ Core Unit and 4D-Nucleofector™ X Unit)	Lonza
Cell specific Lonza 4D-Nucleofector™ X Kit with 16-well Nucleocuvette™ Strips	Lonza

## 核转染前

### 种子细胞

核转染前2-3天传代培养细胞，并在适当大小的容器中接种，使其在转染当天70-80%汇合。每个核转染反应需要150,000个细胞。

注：一般情况下，建议使用尽可能少的传代数的细胞。

## 核转染

### 准备培养板

在两个 24 孔细胞培养板的每个孔中预热 1 毫升正常生长培养基。核转染后细胞将被均分到两个板的孔中。第一个板上的细胞将被裂解和处理，以分析编辑效率。第二个培养板上的细胞将被培养用于分析、储存和/或单细胞克隆。

### 溶解并稀释 RNA

短暂离心含有 1.5 nmol 多导 sgRNA 的试管，以确保 RNA 都位于底部。将 sgRNA 加入 15μl 无核酸酶缓冲液（1x TE 缓冲液）中，并振荡 30 秒，以确保完全混合。这将形成 100μm（100 pmol/μl）多导 sgRNA 的存储溶液。在 14μl 无核酸酶水中加入 6μl 100μm 多导 sgRNA，使总体积为 20μl 30μm 的多导 sgrna 溶液（30 pmol/μl）。振荡 30 秒，在室温下孵育 5 分钟以完全溶解 sgRNA。

### 组装核糖核蛋白复合物

Cas9 2NLS 的浓度为 20μm（20 pmol/μl；3.22 mg/ml）。确保将补充剂加入 Nucleofector™ 溶液中。Nucleofector™ 溶液与补充剂的比例为 4.5:1。按下表所示，在 0.2 毫升 PCR 管中加入试剂。sgRNA:Cas9 比率为 9:1，但您可能需要通过实验确定适合您的细胞类型或实验的最佳 sgRNA:Cas9 比率，建议在 3:1 到 9:1 之间。室温孵育 RNPs 10 分钟。室温保存 1 小时，4°C 保存一周，或 -20°C 保存一个月。如果立即转染细胞，则将 5μl 细胞悬液添加到 25 μl 预复合 RNPs 中，每次反应的总转染体积为 30μl

### 准备细胞悬液

吸取细胞培养基，用适当体积的 1X PB S 洗涤细胞 1-2 次。加入适量的胰蛋白酶表达物或其他解离试剂，在 37°C/5% CO2 条件下培养细胞 5 分钟，或直到细胞完全脱离培养板。不要摇晃或撞击容器以取出细胞，因为这可能会导致细胞聚集、细胞计数不准确以及转染效率低下。用至少 2 倍体积的培养基中和溶解反应。计算细胞数以确定细胞密度。在 NucleFector™ 溶液中制备细胞悬浮液，浓度为每微升 30,000 个细胞。每个反应需要 150,000 个细胞。

### 准备细胞/RNP 溶液

对于每个反应，将 5μl 细胞悬液添加到 25μl 预复合 RNP 中，总转染体积为 30μl。将所有 30μl 细胞 RNP 溶液转移到 Nucleocuvette™ 条带上，并将盖子按入位。轻敲架上的 Nucleocuvette™ Vessel，确保样品覆盖反应杯底部，且反应杯中无气泡。注意：在移液时，细胞悬液需要频繁且温和的搅拌以防止细胞沉降。动作要快，但要小心，

### 转染细胞

在 Nucleofector 上选择模式（HEK293 为 CM-130）。将盖好的 Nucleocuvette™ Vessel 放入 4D-X Core 中。检查 Nucleocuvette™ Vessel 的方向是否正确。较大的切口位于顶部（A1和A2），较小的切口位于底部（H1和H2）。按核心单元显示屏上的“开始”。运行完成后，屏幕应在成功转染的孔上显示绿色“+”。从 4D-X Core 上取下反应条带。注：某些细胞类型需要在核转染后在室温下培养 10 分钟。请看优化后的 Lonza protocol 以了解您的细胞系是否需要这一步。

### 加入复苏培养基

用 70μl 预热的生长培养基小心地将细胞重新培养在 Nucleocuvette™ 的孔中复苏，并通过移液管上下轻轻混合细胞悬液（~3次），以确保细胞均匀分布。

### 细胞存储

现在要用到第一步中制备的两个 24 孔细胞培养板。在每次反应的 100μl 细胞悬液中，将 50μl 转移到第一个预热的 24 孔板上进行基因组分析。将另外 50μl 转移到第二个预热板上进行分析/克隆扩增。将细胞培养在 37°C/5%CO2 加湿培养箱中，24 小时后更换介质。注意：通过更换培养基和分裂来维持第二个培养板中的细胞状态，直到完成克隆扩增、分析或储存。

试剂材料	控制组				实验组 靶向多导 sgRNA
	转染 GFP	空白对照	阴性对照 仅 Cas9	阳性对照 TRAC sgRNA	
Nucleofector™ 溶液 + 补充剂	24.6μl	25μl	24μl	18μl	18μl
pmaxGFP 质粒 (1 μg/μl)	0.4μl	-	-	-	-
多导 sgRNA (30 pmol/μl)	-	-	-	6μl	6μl
Cas9 2NLS 核酸酶 (20 pmol/μl)	-	-	1μl	1μl	1μl
总体积	25μl	25μl	25μl	25μl	25μl

## 核转染后

转染 48 小时后，从第一个平板上提取基因组 DNA 进行基因组分析。从实验细胞和对照细胞中扩增靶点周围的 DNA 区域，并合成相应引物以进行 Sanger 测序。

在测序之后，我们建议使用 Synthego 的 CRISPR Edits (ICE) 在线工具来分析扩增产物。有关如何提取 DNA、执行 PCR 和准备 Sanger 测序用扩增子的说明，请参见 Synthego's Knockout Analysis protocol。该 protocol 还包含如何使用 ICE 工具分析编辑效率以及如何解释 ICE 结果的说明。

通过更换培养基和分裂来维持第二个培养板，直到克隆扩增、分析或储存。有关如何克隆敲除细胞的说明，请参阅 Synthego's Limiting Dilution and Clonal Expansion protocol。对于 Western Blot 分析，我们建议在至少 7 天的时间内测量蛋白质数量，并使用阴性对照验证。

## 脂质转染 Protocol

该 protocol 旨在为永生细胞脂质转染提供一个大致思路，用户有必要通过实验根据每种细胞类型和培养板形式来对体积和比率进行优化以得到 RNP。按下面推荐的顺序添加试剂是非常重要的。在添加稀释的 Lipofectamine™CrisprMax™ 试剂（2号管）之前，将 RNP 复合物与 Lipofectamine™Cas9 Plus™ 试剂和 Opti Mem™ I 还原血清培养基分别置于单独的试管（1号管）中制备。以下体积是针对每个反应所说的，应按所需反应的数量成比例放大。

重要注意事项：

- 所有 Synthego 和 CRISPRMAX™ 试剂应按照制造商的建议进行储存。
- 该 protocol 已经在 HEK293 细胞中进行了优化，可用于其他常见细胞系，如 A549、U2OS、HELA、CHO和MCF-7。
- 转染是否成功取决于细胞密度。可能有必要优化细胞接种密度，以确定最适合的转染汇合水平。
- 细胞接种是基于细胞生长速度。快速生长的细胞的接种量应该少一些。下一页的 protocol 中列出了建议的起始细胞数量。
- 为了最大限度地对粘附细胞进行 CRISPR 编辑，确保在脂质转染前对细胞进行胰蛋白酶化。
- 使用尽可能少的传代细胞。
- 可在Opti-MEM™ I 还原血清培养基中稀释 Cas9 核酸酶，以根据培养板体积达到适合的工作浓度。
- Synthego 建议 RNP 形成的 sgRNA:Cas9 比率为1.3:1，用户可能需要针对不同的细胞系/条件优化比率。
- RNP复合物在opti mem™i还原血清培养基中形成，可直接添加到培养基中的细胞中，与抗生素无关。转染后，无需去除RNP复合物或添加/改变培养基。

## 所需附加试剂材料

试剂材料	购买
阳性对照多导 sgRNA（可选）	Synthego, Transfection Optimization Kit
转染对照（可选）	Lonza, pMAXGFP 质粒
Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas9 转染试剂（含 Cas9 Plus Reagent 和 CRISPRMAX™ 转染试剂）	Thermo Fisher Scientific, 目录 #CMAX00001
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	Thermo Fisher Scientific, 目录 #31985062
正常生长培养基	依赖于细胞类型
24 孔细胞培养板	多个供应商
细胞分离试剂（如胰蛋白酶）	多个供应商
1X PBS, 细胞培养级	多个供应商
细胞计数器	多个供应商
离心管	赛百盛

## 脂质转染前

### 种子细胞

将细胞接种在 37°C/5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养过夜，使其在转染当天 30-70% 汇合（可能需要1-2天）。

## 脂质转染后

转染 48 小时后，从第一个平板上提取基因组 DNA 进行基因组分析。从实验细胞和对照细胞中扩增靶点周围的 DNA 区域，并合成相应引物以进行 Sanger 测序。

在测序之后，我们建议使用 Synthego 的 CRISPR Edits (ICE) 在线工具来分析扩增产物。有关如何提取 DNA、执行 PCR 和准备 Sanger 测序用扩增子的说明，请参见 Synthego's Knockout Analysis protocol。该 protocol 还包含如何使用 ICE 工具分析编辑效率以及如何解释 ICE 结果的说明。

通过更换培养基和分裂来维持第二个培养板，直到克隆扩增、分析或储存。有关如何克隆敲除细胞的说明，请参阅 Synthego's Limiting Dilution and Clonal Expansion protocol。对于 Western Blot 分析，我们建议在至少7天的时间内测量蛋白质数量，并使用阴性对照验证。

## 脂质转染

### 准备培养板

在两个 24 孔细胞培养板的每个孔中预热 1 毫升正常生长培养基。核转染后细胞将被均分到两个板的孔中。第一个板上的细胞将被裂解和处理，以分析编辑效率。第二个培养板上的细胞将被培养用于分析、储存和/或单细胞克隆。

### 组装 RNP 复合物

稀释多导 sgRNA 和 Cas9 至 3µm 工作储备浓度 (3 pmol/µl)。在离心管 (1号管) 中制备 RNP，对于每个反应使用下表中的量。在室温下孵育 RNPs 5-10 分钟。  
注：您可能需要实验确定最佳比率的 sgRNA 和 Cas9 核酸酶，我们建议的 sgRNA/Cas9 比率为 1.3:1。

### 准备转染溶液

在另一个离心管中 (2号管) 中用 Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium 稀释 Lipofectamine™ CRISPRMAX™ 试剂，对于每个反应使用下表中的量。  
将转染液在室温下孵育 5 分钟。

### 准备 RNP 转染溶液

将转染液 (2号管) 直接加入 RNPs (1号管) 中，通过移液枪吹吸以充分混合。  
室温下孵育 5-10 分钟。不要超过 30 分钟。  
注：我们建议先将 RNP 加入孔中，再加入细胞，这样可以提高编辑效率。

### 准备细胞

用 1x PBS 洗细胞，然后吸去 PBS。加入胰蛋白酶或其他细胞分离试剂，在加湿的 37°C/5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5 分钟。之后在等量的生长培养基中重新培养细胞以停止胰蛋白酶反应。计数细胞以确定密度，再将 42,000 - 120,000 细胞转移到离心管中。以 200 x g 离心细胞 5 分钟，再在 500µl 的生长培养基中重新培养细胞。

### 转染细胞

如下表所示，将 RNP 转染溶液添加到第一步中制备的 24 孔细胞培养板中的一个。再将生长培养基中的细胞悬浮液添加到孔中，充分混合。在 550µl 细胞悬浮液中，分别将 225µl 转移到两个预热的 24 孔板上。两个平板一个用于基因组分析，另一个用于分析/克隆扩增。将细胞培养在 37°C/5% CO<sub>2</sub> 加湿培养箱中 2-3 天，24 小时后更换介质

### 准备 RNP (1号管)

组分	摩尔浓度	体积/反应
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	-	25 µl
多导 gRNA	3 µM (pmol/µl)	1.3 µl (3.9 pmol)
Cas 9	3 µM (pmol/µl)	1 µl (3 pmol)
Lipofectamine™ Cas9 Plus 试剂	-	1 µl
总体积	-	28.3 µl

### 转染溶液 (2号管)

组分	体积/反应
Opti-MEM™ I Reduced Serum Medium	25 µl
Lipofectamine™ CRISPRMAX™ 转染试剂	1.5 µl
总体积	26.5 µl

### RNP 转染溶液 & 细胞悬液

组分	体积/反应
RNP 转染溶液	50 µl
生长培养基中的悬浮细胞	500 µl
总体积	550 µl

## 核转染故障排除

问题	可能原因	解决方案
板子上没有细胞	核转染前丢失细胞	吸取上清液时要小心
	细胞留在核转染反应杯中	吹吸以确保细胞不留在反应杯底部
不同反应中细胞分布不均	细胞悬液不均匀	确保加入 RNP 前细胞混合均匀
	细胞留在核转染反应杯中	吹吸以确保细胞不留在反应杯底部
	核转染后细胞未充分混合	
细胞生存率低	细胞培养条件欠佳	避免过高的细胞密度或细胞汇合度
	细胞在过程中受损	避免高速离心或过度接触胰蛋白酶
	细胞在 Nucleofector 中过久	避免细胞在 Nucleofector 中超 15 分钟
低转化效率	细胞数量不合适	用 GFP 质粒优化细胞数量
	错误的 Nucleofector 或程序	用推荐的 Nucleofector 和程序
低编辑效率	正向转染	我们推荐反向转染（先加 RNP）
	sgRNA:Cas9 比率	用阳性对照多导 sgRNA 优化

## 脂质转染故障排除

问题	可能原因	解决方案
板子上没有细胞	核转染前丢失细胞	吸取上清液时要小心
细胞生存率低	细胞培养条件欠佳	避免过高的细胞密度或细胞汇合度
	过多 Lipofectamine™	增加 Lipofectamine™ 会降低生存率
低转化效率	细胞数量不合适	用 GFP 质粒优化细胞数量
低编辑效率	多导 sgRNA 浓度不合适	用阳性对照多导 sgRNA 优化
	Lipofectamine™ 体积不合适	用阳性对照多导 sgRNA 优化
	正向转染	我们推荐反向转染（先加 RNP）
	sgRNA:Cas9 比率	用阳性对照多导 sgRNA 优化

“

# 开始第一次 CRISPR 敲除吧!

---

现在你已经得到了所有你需要的关于 CRISPR 基因敲除的基础知识了，可以开始着手设计你自己的 CRISPR 敲除实验了!

我们提供各类用于 CRISPR 实验的细胞系和工具包，让你的 CRISPR/Cas 弹无虚发!

北京赛百盛基因技术有限公司

