



Quick-KO[®]基因敲除试剂盒

操作说明书

(仅限用于科学研究)

Ver. 1.2

2022年6月

上海派致生物科技有限公司

目 录

1. 背景介绍	2
2. 产品简介	2
3. 使用前警告	3
4. 注意事项	3
5. 保存与有效期	4
6. 试剂盒组成	4
7. 实验材料	4
8. 快速操作流程	5
9. 预实验	5
10. 正式实验	8
10.1. 细胞转染	8
10.2. 混合克隆筛选	9
10.3. 混合克隆鉴定	9
10.4. 单克隆挑选与鉴定	10
11. FAQ	12
12. 联系方式	14

1. 背景介绍

CRISPR/Cas 是一套最早在细菌中发现的由 RNA 引导的 DNA 内切酶系统¹。2013 年，CRISPR/Cas 系统被证实能够在哺乳动物细胞中进行高效基因编辑^{2,3}。之后，对经典 CRISPR/Cas 系统的改造，以及不断发现的新的 Cas 蛋白，使 CRISPR 技术的应用得到了极大的扩展⁴。

目前，来自化脓性链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的 CRISPR/Cas9 系统应用最为广泛。CRISPR/Cas9 系统主要由 gRNA (guide RNA) 和 Cas9 蛋白两部分组成。特异性的 gRNA 与 Cas9 蛋白在细胞体内形成核糖核蛋白复合物 (Ribonucleoprotein, RNP)，通过特异性的 gRNA 与基因组特定位点 DNA 的互补序列结合，引导 Cas9 蛋白切割 DNA 双链，造成 DNA 双链的断裂 (double-strand break, DSB)。细胞利用体内自身的 DNA 修复途径进行 DSB 的修复。DNA 修复途径主要有非同源末端连接 (non-homologous end joining, NHEJ) 和同源定向修复 (homology-directed repair, HDR) 两种途径。在真核细胞中，DSB 主要是通过 NHEJ 途径进行修复，这是一种非精确修复的方式，通常会导致在断裂位点插入或删除核苷酸 (insertions or deletions, Indels)。当基因编码区产生的 Indels 为非三整数倍时，就会导致基因开放阅读框 (open reading frames, ORFs) 移码突变 (frameshifts)，从而破坏或改变基因功能⁵。

利用 CRISPR/Cas9 进行基因敲除已成为基因功能研究的重要手段，此外，在新药研发、细胞治疗和生物生产等领域也在发挥越来越重要的作用。

参考文献

1. Jinek, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337, 816–821 (2012).
2. Cong, L. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339, 819–823 (2013).
3. Mali, P. et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339, 823–826 (2013).
4. Rongming, L. et al. Directed Evolution of CRISPR/Cas Systems for Precise Gene Editing. *Trends Biotechnol*, 39, 262-273 (2021).
5. Sander, J.D. et al. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol*, 32(4): 347-55 (2014).

2. 产品简介

Quick-KO[®]是一款基于 CRISPR/Cas9 基因编辑技术优化开发的即用型基因敲除试剂盒，针对人、小鼠等的编码基因，采用预设计方案，提供基因敲除实验过程中所需的关键试剂，帮助研究者轻松高效地完成

成细胞基因敲除实验。

Quick-KO[®]基因敲除试剂盒采用优化的 Multi-gRNA 策略,同时对每一个基因的敲除效率进行了验证,即用型的质粒避免了用户在 gRNA 设计、合成/载体构建、效率验证等方面耗费的大量时间和成本,同时试剂盒配套提供的样本处理和敲除验证试剂,进一步简化了研究者的工作,极大地保证了基因敲除实验的成功率。经大量项目验证,采用 Quick-KO[®]基因敲除试剂盒获得等位基因敲除单克隆细胞的成功率高于传统的基因敲除方案。

本说明书旨在提供一种可使用的参考,指导用户获得实验相关的参数以及完成实验的关键操作步骤,用户也可根据实际情况和需要进行相应调整。

3. 使用前警告

- 本产品仅供实验室作为科研目的使用,请严格遵守相关法律法规和伦理要求,严禁使用本产品进行临床诊断或治疗,否则产生一切后果与本公司无关。
- 请在符合相应生物安全等级的实验室中开展实验,并确保实验人员具备相应的知识和能力,否则产生一切后果与本公司无关。
- 未经合法授权,严禁将产品的任何组分进行复制(克隆)、分装、转售及修改,任何非授权的商业行为将受到司法追究。
- 请按要求运输、存储及使用试剂,非必要请勿反复冻融,因未按要求保存、操作造成的实验失败,本公司概不负责。

4. 注意事项

- 每一个试剂盒均为针对特定物种和基因序列设计(参考 NCBI 数据库),不存在跨物种和/或基因的通用性,请确保试剂盒标注的种属(如人或小鼠)与实验所用细胞的种属一致,试剂盒标注的基因 ID 与目标实验的基因 ID 一致。
- 本产品的基因敲除效果经特定细胞(如人 293T 细胞、小鼠 N2a 细胞)验证有效。然而,细胞具有高度的异质性,且受实验条件(如培养条件、转染或感染效率)的影响,可能导致基因切割效率和最终敲除效率的差异,建议客户在正式实验前进行预实验并根据预实验结果调整相应实验参数。
- 本产品不包含任何细胞材料。良好的细胞是实验成功的关键,请确保使用来源可靠、身份正确、无污染且活性良好的细胞进行相关实验。

- 病原体污染（细菌、真菌、支原体等）在全世界范围内普遍发生，为确保实验效果和结果，请严格按照无菌操作规范开展细胞实验。建议定期进行污染检测，一旦发现污染，及时进行处理。

5. 保存与有效期

- 请将本产品存储于-20 °C条件下，未开封有效期 1 年。
- 本产品在冷链或干冰冷藏下运输，收到产品后请及时储存于建议温度下。如在收货时发现试剂异常，请及时与客户经理联系。
- 试剂开封后请尽快使用，避免反复冻融。

6. 试剂盒组成

	组分	规格	数量
Quick-KO® Plasmid	Quick KO® gRNA (mCherry + Puro)	20 µL (1 µg/µL)	1
	Optimized SpCas9 (BSD)	80 µL (1 µg/µL)	1
	NC gRNA (mCherry + Puro)	20 µL (1 µg/µL)	1
Cell Lysis Buffer	Buffer A	1 mL	1
	Buffer B	50 µL	1
KO Validation	PCR Master Mix (2×)	1 mL	2
	Control Template	50 µL	1
	Genotyping Primer F1	1 OD	1
	Genotyping Primer R1	1 OD	1
	Genotyping Primer F2	1 OD	1
	Genotyping Primer R2	1 OD	1
	ddH ₂ O	1.8 mL	3

注：1、NC 为 Negative Control 缩写，NC gRNA 为不识别人源或鼠源已知基因的 gRNA 序列，可根据需要选择性使用构建相应细胞系。

2、Control Template 为 293T 细胞（人源）或 N2a 细胞（鼠源）野生型的基因组模板。

3、引物（Genotyping Primer）为干粉，使用前 12000 rpm 离心 2 min，加入 ddH₂O 至终浓度 10 µM，待用。

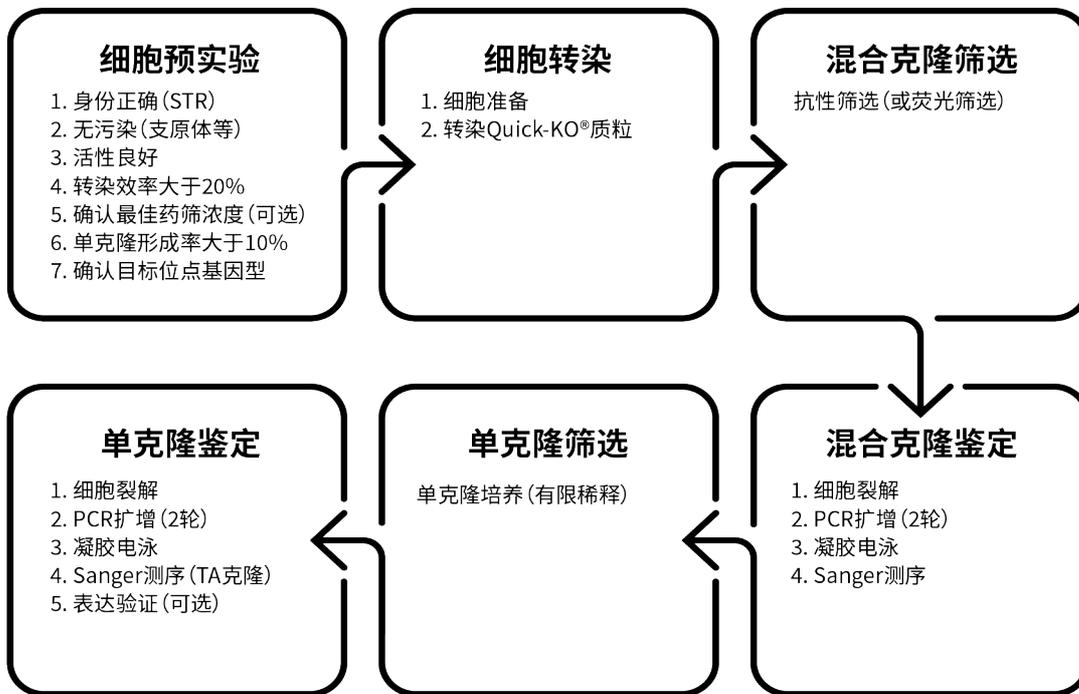
7. 实验材料

- 本产品仅提供基因敲除所需的关键试剂，说明书示例中使用其他试剂和材料需客户另外准备。

- 完成本实验可能需要的其他材料：

试剂	细胞培养基、血清、PBS、胰酶、嘌呤霉素 (Puromycin, Puro)、细胞冻存液、转染试剂等
耗材	培养皿、6孔板、96孔板、各种规格 tips、离心管等 (均要求无菌)
设备	生物安全柜/无菌操作台、细胞培养箱、荧光显微镜、离心机、PCR 仪、琼脂糖凝胶电泳仪、凝胶成像仪、移液枪等
其他	生物分析软件

8. 快速操作流程



9. 预实验

在进行正式实验前，请确保目的细胞满足以下条件和参数：

- (1) **身份正确。** 建议采用短串联重复序列 (STR) 分析法进行确认。
- (2) **无污染。** 包括无病原体 (细菌、真菌、支原体、病毒等) 和异种细胞污染。
- (3) **活性良好。** 常用的检测方法有台盼蓝染色、MTT 法等。

- (4) **转染效率大于 20%**。可采用化学法（如脂质体）或者物理法（如电转），常规转染效率无法满足时，推荐尝试慢病毒方案。
- (5) **确认最佳药筛浓度**。本试剂盒中 Quick KO[®] gRNA 和 NC gRNA 带有 Puro 抗性筛选标记和 mCherry 荧光筛选标记，如采用抗性筛选富集阳性细胞，请根据相应抗生素产品摸索最佳药筛浓度（最低致死药物浓度）。Optimized SpCas9 带有 BSD 抗性筛选标记，可选择性地将 BSD 与 Puro 同时使用。
- (6) **单克隆形成率大于 10%**。简单有效的操作方法是目的细胞进行有限稀释后，按 1 个/孔接种于 96 孔板中，培养 2-3 周后，统计能够形成单克隆细胞群落的孔数占总接种孔数的比例。
- (7) **确认目标位点基因型**。采用试剂盒内组分按如下操作进行基因型检测。
- 取 100 μL 细胞悬液（约 10^4 个/mL）至 PCR 管中，掌上离心机离心 5 min，弃上清。
 - 加入 20 μL 新鲜配制的 1 \times Cell Lysis Buffer（Buffer A : Buffer B=50:1），充分混匀，于 55 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min，之后 95 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。
 - 裂解产物 12,000 rpm 离心 5 min，将上清转移至新的 PCR 管备用。
 - 将 PCR Master Mix (2 \times) 置于冰上完全解冻，充分混匀，于冰上配制如下反应体系：

组分	体积
PCR Master Mix (2 \times)	25 μL
Genotyping Primer F1	2 μL
Genotyping Primer R1	2 μL
细胞裂解产物*	1-3 μL
ddH ₂ O	to 50 μL

* DNA 模板不超过 PCR 反应体系总体积的 1/10。使用 Control Template 作为阳性对照，ddH₂O（即不加任何模板）作为阴性对照。

- 设置 PCR 扩增程序：

步骤	温度	时间	循环数*
1	98 $^{\circ}\text{C}$	3 min	1
2	98 $^{\circ}\text{C}$	10 s	20
3	65 $^{\circ}\text{C}$ (0.5 $^{\circ}\text{C}$ touch down)	20 s	

4	72 °C	2 min	
5	72 °C	3 min	1
6	98 °C	10 s	10
7	55 °C	20 s	
8	72 °C	2 min	
9	72 °C	5 min	1
10	12 °C	∞	—

*建议总循环数不超过 35。

f. 取第一轮 PCR 产物作为模板，于冰上配制第二轮 PCR 反应体系：

组分	体积
PCR Master Mix (2×)	25 μL
Genotyping Primer F2	2 μL
Genotyping Primer R2	2 μL
第一轮 PCR 产物*	1-3 μL
ddH ₂ O	to 50 μL

* DNA 模板不超过 PCR 反应体系总体积的 1/10。使用 Control Template 作为阳性对照，ddH₂O（即不加任何模板）作为阴性对照。

g. 设置第二轮 PCR 扩增程序：

步骤	温度	时间	循环数
1	98 °C	3 min	1
2	98 °C	10 s	30-35
3	55 °C	20 s	
4	72 °C	2 min	
5	72 °C	5 min	1
6	12 °C	∞	—

- h. 取 2-5 μL 第二轮 PCR 扩增产物进行电泳检测 (1.5% [w/v] 琼脂糖凝胶, 恒压 160 V 电泳 20-30 min), 根据电泳结果, 将剩余 PCR 产物进行 Sanger 测序 (图 2)。

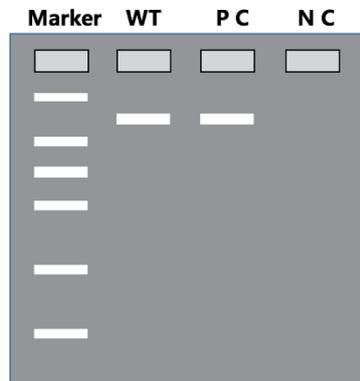


图 2. 目标位点基因型检测电泳结果示例。电泳条带长度应与 COA 文件中标示的引物扩增序列长度一致。WT : 野生型 ; PC : 阳性对照 ; NC : 阴性对照。

- i. 将测序结果与数据库 (NCBI) 中的基因组序列进行比对分析。确保 gRNA 靶向的序列与数据库基因组序列一致 (图 3)。

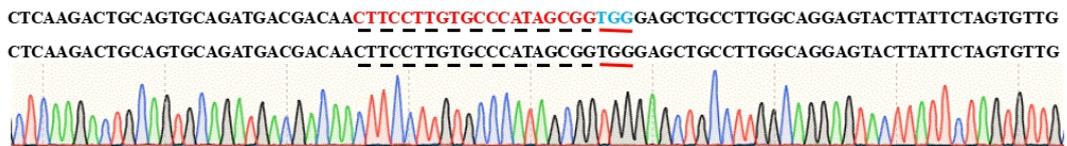


图 3. 目标位点基因型 Sanger 测序结果比对示例。第一行为基因组序列, 第二行为 Sanger 测序序列, 第三行为 Sanger 测序峰图, 黑色虚线标注为 gRNA 序列, 红线标注为 PAM 序列。

10. 正式实验

10.1. 细胞转染

提前准备合适数量的细胞。当转染效率大于 20% 时, 通常 6 孔板 1 个孔的细胞量 (约 5×10^5 个) 足够用于后续筛选获得阳性敲除单克隆细胞。

将 Quick KO[®] gRNA 和 Optimized SpCas9 按 1:2 比例混合 (6 孔板脂质体转染通常为 2.5 μg /孔), 根据转染效率预实验, 选择合适的参数转染细胞。留取等量未经转染的细胞作为抗性筛选或流式分选空白对照。

根据研究需要, 使用 NC gRNA + Optimized SpCas9 转染细胞, 构建基因敲除阴性对照细胞。

10.2. 混合克隆筛选

Quick KO[®] gRNA/NC gRNA 带有 Puro 抗性筛选标记和 mCherry 荧光筛选标记，可根据需要选择抗性筛选法或流式分选富集转染阳性的细胞。筛选前可通过荧光显微镜确认转染效率（图 4）。

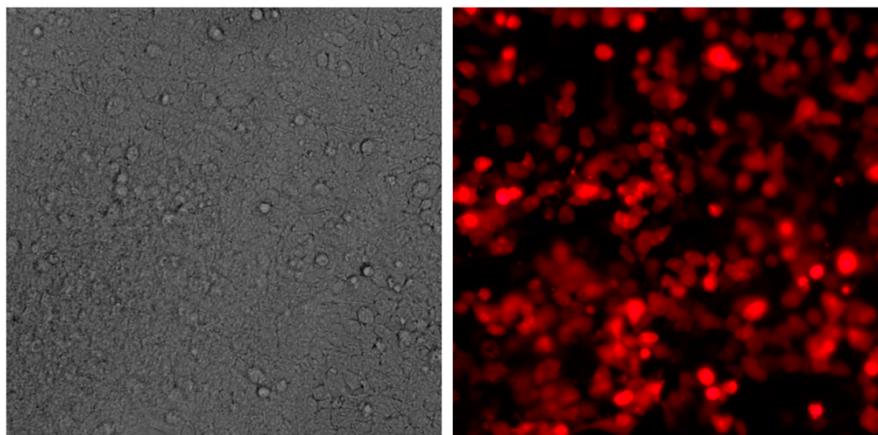


图 4. Quick-KO[®] gRNA 转染 293T 细胞荧光图示例。

(1) 抗性筛选

- a. 根据预实验确认的最低致死药物浓度，用完全培养基配置含对应药物浓度（如 Puro 药物）的筛选培养基。
- b. 细胞转染 48 h 后，换入上述筛选培养基，空白对照组同时换入相同筛选培养基。
- c. 每两天用筛选培养基进行一次换液，直至空白对照组细胞全部被杀死，将实验组细胞换回不含药物的完全培养基。
- d. 继续培养 2-3 天，得到混合克隆细胞（Pool）。

(2) 流式分选（荧光筛选）

- a. 将转染 72h 后的细胞制成单细胞悬液。
- b. 用空白对照组细胞进行设门，分选红色荧光阳性的细胞。
- c. 将得到的阳性细胞继续培养 2-3 天，得到混合克隆细胞（Pool）。

10.3. 混合克隆鉴定

- (1) 取适量混合克隆细胞（约 10^4 个），按预实验 7 中的步骤进行样本处理和 PCR 扩增（注意：设置阳性对照和阴性对照）。
- (2) 取 2-5 μ L PCR 产物进行电泳检测，观察结果（图 5），将剩余 PCR 产物进行 Sanger 测序。

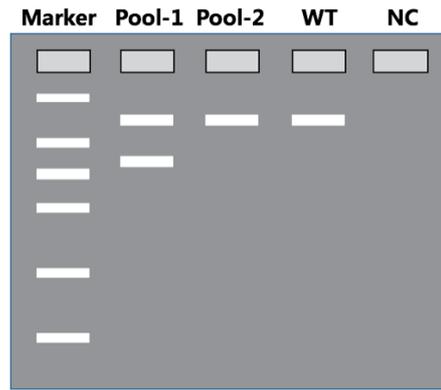


图 5. 混合克隆 PCR 检测电泳结果示例。实验组条带应不大于阳性对照组，若存在多条条带，可将不同大小的条带分别回收纯化，进行 Sanger 测序；阴性对照组应无扩增条带。Pool：实验组；WT：野生型；NC：阴性对照。

- (3) 将测序结果与数据库（NCBI）中的基因组序列进行比对分析。在设计的敲除位点（区域）出现主峰与杂峰并存的套峰或碱基缺失现象，则认为 Quick-KO[®] gRNA 发生作用，可进行后续单克隆挑选与鉴定（图 6）。

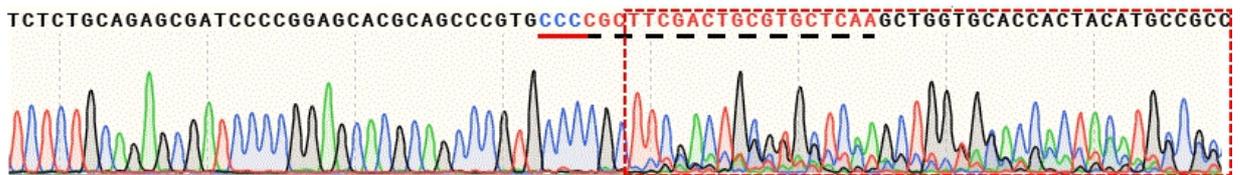


图 6. 293T 细胞混合克隆 Sanger 测序结果比对示例。

10.4. 单克隆挑选与鉴定

- (1) 用完全培养基将 10.2 得到的混合克隆细胞稀释至 0.5 ~ 1 个/100 μ L，按照 100 μ L/孔将单细胞悬液接种至 96 孔板中。
- (2) 培养 2-3 周，期间定期于显微镜下观察，对有单克隆细胞群落生长的孔进行标记，并适当更换或补充培养基（图 7）。

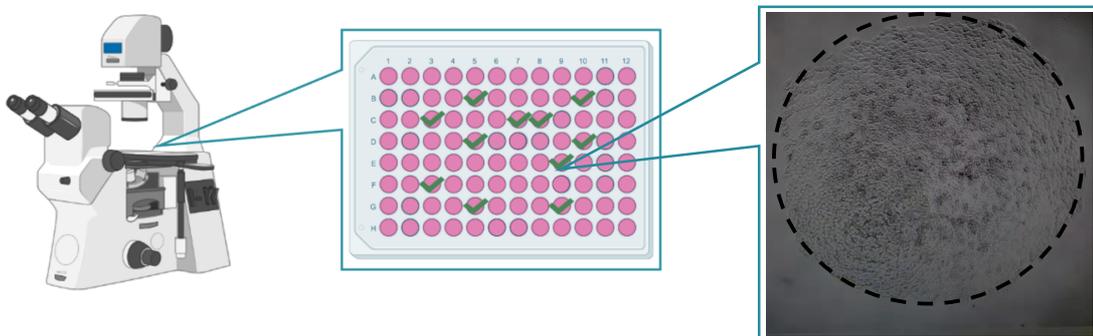


图 7. 单克隆细胞挑选示例

- (3) 将长有单克隆细胞群落的孔分别进行消化，处理成单细胞悬液，取 1/3 数量细胞，按预实验 7

中的步骤进行样本处理和 PCR 扩增（注意：设置阳性对照和阴性对照），剩余细胞转入 48 或 24 孔板进行扩大培养。

- (4) 优先将产生片段缺失（即电泳条带小于阳性对照组，图 8）的 PCR 产物进行 Sanger 测序，并将测序结果与数据库（NCBI）中的基因组序列进行比对分析。

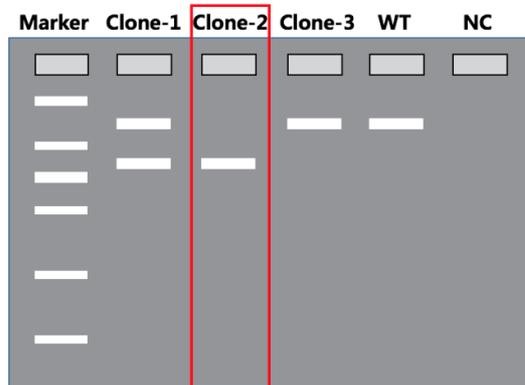


图 8. 基因敲除单克隆细胞 PCR 鉴定示例。Quick-KO® gRNA 采用 Multi-gRNA 策略，能够产生 Indels 和片段缺失两种类型的基因敲除，可优先挑选产生片段缺失的单克隆进行 Sanger 测序。

- (5) 基因敲除成功标准：（1）测序结果呈单一峰图（图 9A），且编码区缺失非 3 倍数的碱基；（2）测序结果呈现套峰（图 9B），需将 PCR 产物进行 TA 克隆鉴定，确保 TA 克隆测序结果对应的不同基因型编码区缺失均为非 3 倍数的碱基。

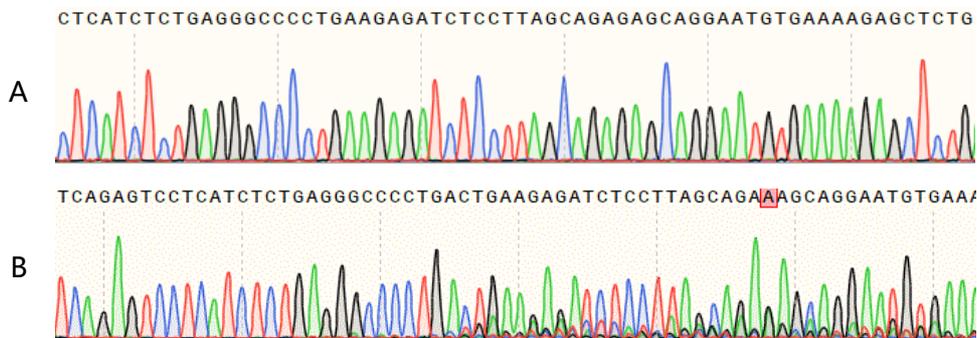


图 9. 单克隆 PCR 产物 Sanger 测序结果示例

- (6) 将上述成功基因敲除的单克隆细胞进行扩增和质检，冻存或进行后续实验。必要时进行 mRNA 水平（cDNA）鉴定。

11. FAQ

- (1) Quick-KO[®]基因敲除试剂盒推荐脂质体转染还是电转染？

A：试剂盒中的 gRNA 和 SpCas9 均为质粒形式，可同时适用于脂质体转染和电转染。可以根据不同的细胞类型选择合适的转染方法和参数，一般贴壁细胞同时适用于两种转染方式，悬浮细胞建议采用电转染。

- (2) 如何判断 Quick-KO[®]基因敲除试剂盒有敲除活性？

A：试剂盒提供的 Quick-KO[®] gRNA 在 293T 细胞（人基因）或 N2a 细胞（小鼠基因）中验证有效。由于细胞具有高度的异质性，同一试剂盒在不同细胞中的转染效率和敲除效率可能存在差异，如发现目的细胞敲除效率不佳，可尝试转染 293T 或 N2a 细胞，对照预实验的标准确保符合相应项目要求。

- (3) 使用 Quick-KO[®]基因敲除试剂盒构建的细胞能否稳定传代？

A：能。Quick-KO[®]基因敲除试剂盒靶向细胞基因组 DNA 进行基因敲除，获得目的细胞的基因型能够稳定遗传至子代细胞。

- (4) 使用 Quick-KO[®]基因敲除试剂盒为什么细胞在基因组 DNA 水平上可以检测到敲除，而蛋白水平（Western blot）变化不明显？

A：基因发生移码突变时，突变位点后的氨基酸会大范围改变，导致蛋白正常结构和功能的丧失，或提前终止表达，可以多筛选几个不同敲除基因型的克隆进行 WB 检测。此外，不同克隆号的抗体识别抗原的表位可能不同，WB 检测前应仔细阅读抗体说明书，查明其识别抗原表位，避免假阳性或假阴性结果出现，也可结合后期蛋白功能实验验证敲除效果。

- (5) 使用 Quick-KO[®]基因敲除试剂盒获得的基因敲除单克隆细胞为什么会存在多个基因型？

A：CRISPR/Cas9 实现基因敲除主要是通过 gRNA 引导 Cas9 对特定基因位点进行切割，产生 DNA 双链断裂，利用细胞内的非精确修复途径，在目的位点引入碱基的随机插入或缺失（insertions or deletions, Indels），当敲除细胞是二倍体或多倍体时，等位基因引入的“Indels”可能不同，因此会出现多个基因型。Quick-KO[®]基因敲除试剂盒是采用多 gRNA 策略，除了能使细胞基因组 DNA 产生“Indels”，还有一定概率能引起片段缺失，大大提高了基因敲除的效率和成功率。

- (6) 如何选择合适的细胞系进行基因敲除？

A：细胞在进行基因敲除实验过程中，需要经过多次传代，尤其是从单个细胞获得足够数量的细胞用于后续实验，因此，除了满足预实验的要求外，还要确保细胞有足够的增殖能力（至少能传

代 15 代以上)。此外,有些肿瘤细胞系存在多倍体的现象,即目的基因在基因组中存在两个以上的拷贝,此时会增加获得基因敲除细胞的难度,建议在实验前对细胞的核型进行分析。

(7) 在做基因型鉴定时,PCR 扩增不出目的条带怎么办?

A:在做基因编辑前,建议先对目的细胞株进行 STR 鉴定,确定需编辑的细胞株不存在细胞污染,为目的细胞株。在排除了细胞污染问题后,可以通过重新制备 DNA 模板、调整 DNA 模板量、加入 DMSO 等方法来优化 PCR 条件。

(8) 目的细胞转染效率低怎么办?

A:可尝试不同的转染方法,摸索最佳转染条件,如常用的化学转染方法(如脂质体、磷酸钙法等)和物理转染法(如电转)效率均无法满足时,可尝试使用病毒载体。

(9) 预实验时细胞单克隆形成率良好,为什么进行单克隆筛选时铺到 96 孔板里的细胞,会出现生长缓慢或者死亡现象?

A:可能是基因敲除影响了细胞活性。建议在进行基因敲除实验之前,查阅相关文献,了解目的基因功能,如果目的基因对细胞的增殖、存活有重要作用,敲除后可能因为影响细胞增殖、存活而无法获得需要的阳性细胞。此外,不同基因在不同细胞中的功能也可能不一样,可以选择合理的对照对结果进行分析,如已有文献报道在相同细胞中敲除其他基因,可选择同样基因进行敲除以排除细胞本身或实验操作的问题。

(10) 获取细胞单克隆的方法有哪些?

A:目前实验室常用的单克隆获取方法主要有流式细胞荧光分选技术(fluorescent activated cell sorting, FACS)和有限稀释法(limiting dilution cloning, LDC)两种。FACS 法的原理是根据细胞大小、递送载体所带荧光标签及细胞表面 marker 等条件挑选出所需的单细胞。LDC 法的原理是对计数好的细胞悬液通过一定的稀释,使每个细胞培养孔平均只含 0~1 个细胞,经单个细胞扩增培养后成为单克隆细胞系,该方法操作简单,对仪器设备的需求比较低,因此,是目前应用比较多的单克隆挑选方法。

(11) 基因敲除单克隆细胞基因型鉴定时 PCR 产物测序结果呈现套峰时,该怎么办?

A:当敲除细胞是二倍体或多倍体时,等位基因引入的“Indels”可能不同,会出现多个基因型。因此单克隆细胞基因型鉴定时 PCR 产物会因产物不单一导致 Sanger 测序出现套峰。遇到这种情况,建议将 PCR 产物进行 TA 克隆,然后再将克隆至 T 载体上的 PCR 产物进行 Sanger 测序,测序结果与数据库(NCBI)中的基因组序列进行比对。TA 克隆测序结果对应的不同基因型编码区“Indels”均为非 3 倍数的碱基,则认为基因敲除单克隆细胞符合敲除标准。

12. 联系方式

上海派致生物科技有限公司

地址：上海市嘉定区兴贤路 1180 号 5 幢 2 层

信息咨询：info@pregen.cn

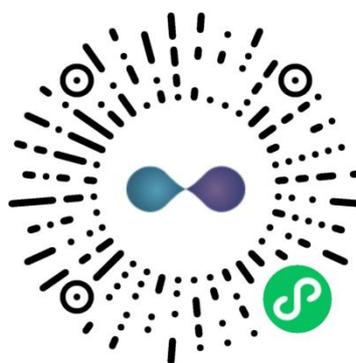
技术支持：project@pregen.cn

电话：400-661-1162/021-59541298

网站：www.pregen.cn



——关注公众号，联系专属技术支持



——更多产品，请检索小程序