



CRISPR EDITx™ KO 极速敲除试剂盒

【产品名称】

CRISPR EDITx™ KO 极速敲除试剂盒

【储存条件及有效期】

有效期 1 年，保存条件-20℃；如长期储存，建议置于-80℃。干冰运输建议根据使用次数进行分装，避免反复冻融。

【产品简介】

CRISPR EDITx™ KO 极速敲除试剂盒是一款专为科研用户定制研发的即用型 CRISPR 敲除试剂盒。该产品包含艾迪基因创新研发的 CRISPR EDITx™Tran 转染试剂以及经数千例实战验证过的 Cas 酶，为科研工作者提供一种快速高效的基因敲除工具。

CRISPR EDITx™Tran 转染试剂是一种基于生物分子辅助递送 Cas 蛋白和 crRNA 系统的转染试剂。该转染试剂无细胞毒性，只需与细胞孵育30 分钟，即可与Cas-crRNA 复合物成功转染至细胞，实现强大的基因编辑能力。

- 高效转染：采用创新研发的 CRISPR EDITx™Tran 转染试剂就，30min 转染，48h 检测编辑效率。
- 高效编辑：结合高效转染试剂、经市场验证的Cas 酶以及独特 crRNA 设计逻辑，敲除效率高达95%。
- 细胞毒性级低：生物分子辅助 Cas-crRNA 系统递送转染，进入细胞后迅速释放 DNA，并快速降解。
- 普适性强：适用于多数细胞，对于难转染细胞、生长代数受限细胞更有优势。
- 设备要求低：生物分子辅助递送，实现高效编辑，无需电转仪等仪器。

注：使用该产品发表文章时，请标注我司名称 **Guangzhou Edigene Co., Ltd, China**，**CRISPR EDITx™ KO kit**（CAS: EDKO-K01）



【包装规格】

货号	名称	规格
EDKO-K01	CRISPR EDITx™ KO 极速敲除试剂盒（基础版）	5 rxns/盒
		10 rxns/盒
		25 rxns/盒
EDKO-K02	CRISPR EDITx™ KO 极速敲除试剂盒（加强版）	5 rxns/盒
		10 rxns/盒
		25 rxns/盒
EDKO-K03	CRISPR EDITx™ KO 极速敲除试剂盒（完全版）	5 rxns/盒
		10 rxns/盒
		25 rxns/盒

【产品组分】

组分	基础版	加强版	完全版
CRISPR EDITx™ Tran	√	√	√
AsCas12a (50 μM)	√	√	√
crRNA(1.5nmol, 3 条)	/	√	√
DNA Lysis	Buffer A	/	√
	Buffer B	/	√
PCR Validation	2x High Fidelity Pfu Mix (+Dye)	/	√
	Genotyping Primer F	/	√
	Genotyping Primer R	/	√

【需准备其他实验材料】

1. crRNA（根据 Cas12a 设计骨架，可以使用脱盐级，建议使用修饰的 crRNA 或者 HPLC，使用HPLC 级别效果更佳，如果定制加强版/完全版则无需准备）

crRNA 设计：可在 Broad institute 设计网站进行设计，网站地址：

<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>；Mechanism 选择 CRISPRko，Enzyme 选择 AsCas12a (TTTV)；

crRNA 合成：化学合成的 crRNA 可以使用脱盐纯化，建议使用HPLC 纯化，效果更佳；

2. Opti-MEM I Reduced Serum Medium (Gibco 货号：31985062)；

3. RNase-free EP 管和枪头等。



【实验步骤】**1. 细胞培养和铺板（以 24 孔板为例）**

细胞培养至生长旺盛状态，转染前 24 h，接种细胞至 24 孔板，使转染时细胞融合度约为 60%。请使用生长状态较好的细胞，并确保细胞无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞，请在转染前至少传代两次。

注意：本方法不需要抗性筛选，因此无需添加抗生素。

2. 细胞转染**2.1 配置 RNP 混合物**

转染前 24h 确认每孔细胞融合度达 40%~60%，按表 1 建议，取 EP 管将 Cas12a 酶和 crRNA 混合到 Opti-MEM I Reduced Serum Medium 培养液中，用枪头混匀，避免产生气泡，称为管 1，室温孵育 20min。

组分	体积	终浓度
crRNA (100 μ M)	2.4 μ L	8 μ M
AsCas12a (50 μ M)	6 μ L	10 μ M
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Add to 30 μ L	

表 1

2.2 配置转染复合物

取 30 μ L CRISPR EDITx™ Tran 转染试剂至管 2，将管 1 复合物加入管 2 中，轻轻吹打混匀，室温孵育 5 min，形成转染复合物。

2.3 转染目的细胞

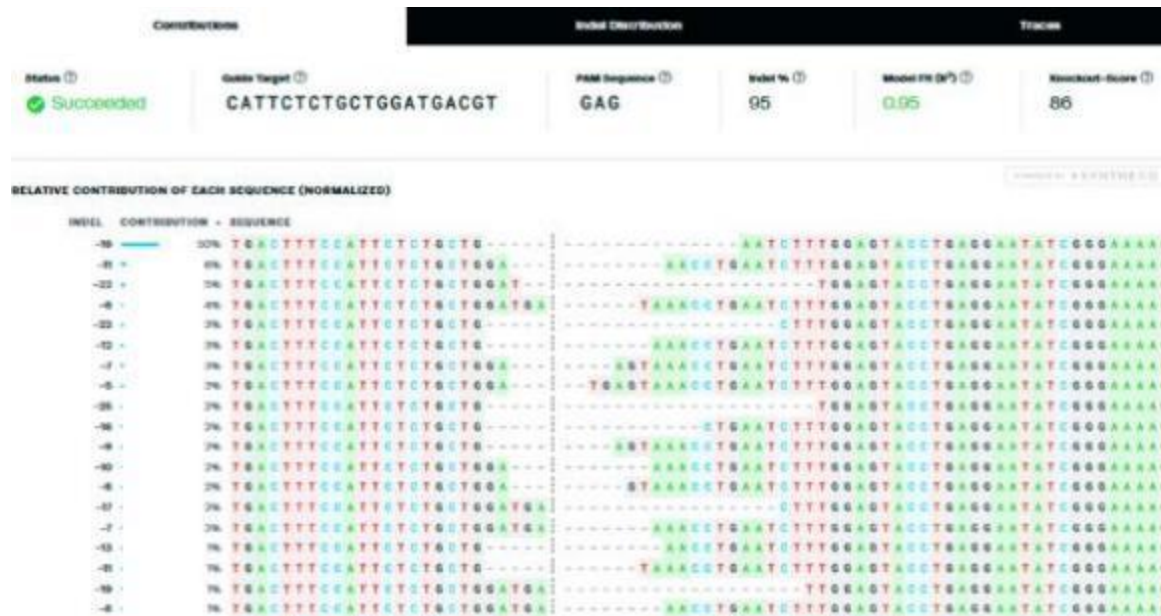
PBS 清洗细胞 2 次，吸干上清，加入转染复合物，37°C 孵育 30 min，更换完全培养基。

3. 分析转染细胞

转染 48h 后，提取所转染细胞的基因组，使用特异性引物扩增靶标区域(扩增子包含 crRNA 靶向切割的位置)；

使用 TIDE (分析网址：<https://tide.nki.nl/>)或者 ICE (分析网址：<https://ice.synthego.com/#/>)，使用说明：<https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/ice-analysis-guide>)等工具进行基因编辑效率分析。





ICE 工具分析示例

3.1 pool 切割效果检测

① 将 Pool 中 1 个复孔的细胞用 PBS 冲洗后，胰酶消化，离心收集细胞，弃上清。

② 按照 $1 \times 10^5 \sim 10^6$ Cell/mL DNA Lysis 的比例加 200 μ L DNA Lysis Buffer A 吹打混匀，加 4 μ L DNA Lysis Buffer B 涡旋振荡混匀后，55°C 水浴 10 min，95°C 水浴 5 min。

③ 12000 rpm 离心 5 min，取 150 μ L 上清即裂解液，待用于 PCR 反应。

④ 取 2 μ L 裂解液做模板，按表 2 和表 3 配制 PCR 体系。

组分（每反应计算）	体积
2x High Fidelity Pfu Mix (+Dye)	25 μ L
单克隆细胞裂解液	2 μ L
Genotyping Primer F	1 μ L
Genotyping Primer R	1 μ L
dd H2O	21 μ L
总体积	50 μ L

表 2.实验样品配制体系

⑤ PCR 上机反应，程序如下表：



步骤	温度	时间	循环
预变性	95 °C	3 min	1 cycle
循环扩增	95 °C	15 s	35 cycle
	60 °C (根引物 Tm 值设置)	15 s	
	72 °C	1 min/kb	
延伸	72 °C	5 min	1 cycle

表 3. PCR 鉴定程序

⑥ PCR 产物直接点样 3 μ L 跑琼脂糖凝胶电泳 (不需加 Loading Buffer), 若 Pool 裂解产物 PCR 条带为单一条带且与设计理论值条带大小相符, 则可直接送 PCR 产物进行 Sanger 测序。

常见问题

1. 如何确认该试剂盒的转染效果?

答: 该试剂盒中的 cas 酶带有 GFP 标签, 可以通过荧光显微镜观察是否转入细胞内。孵化 30 min 后即可观察到荧光, 如果时间超过 12 h, 可能就无法观察到荧光。

2. 是否可以试用其他公司的酶搭配试用?

答: 试剂盒中的 cas 酶是艾迪基因多年研发的成果, 是经过特殊改造的, 所以不能用其他的酶替代。

3. 如何设计 crRNA?

答: 该系统使用的是 cas12a, 设计 crRNA 请参考网址:

<https://portals.broadinstitute.org/gppx/cripick/public>

实例: crRNA: UAAUUUCUACUCUUGUAGAUCAUUCUCUGCUGGAUGACGU
(骨架 20 bp、全长 40 bp)

注: 下划线部分为 Cas12a 的 crRNA 骨架。

4. 为什么选择 cas12a, 而不是 cas9, Cas12a 的附属切割活性是否会影响其他基因?

答: 因为 cas12a 的 crRNA 只有 40 bp, 合成更容易, 而且成本低; 艾迪基因



前期测试了 cas12a; 后期也会测试 cas9。

Cas12a 的附属切割活性不会影响其他基因，因为对靶标基因切割以后，cas12a 一样从激活状态失去切割能力。

5. 该方法为何对细胞的损伤比较小？

答：该方法使用的是生物分子，不会像化学转染法有毒性，或者电转法对细胞产生伤害。

6. 如果敲除失败如何处理？

答：如果通过试剂盒敲除失败，艾迪基因不收费，所有试剂盒的费用可以转为艾迪基因做基因敲除的服务费用。

部分成功编辑细胞清单

细胞类型	细胞来源	敲除效率
THP-1	人单核细胞白血病系	★★★★★
Hela	人宫颈癌细胞系	★★★★★
A549	人非小细胞肺癌系	★★★★★
C2C12	小鼠成肌细胞系	★★★★★
MDA-MB-231	人乳腺癌细胞系	★★★★
SNU-449	人肝癌细胞系	★★★★
H1975	人肺腺癌细胞系	★★★★
LLC	小鼠 lewis 肺癌细胞系	★★★
Kupffer	小鼠肝固有巨噬细胞系	★★★
BV2	小鼠胶质细胞系	★★★
RAW264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞系	★★★
DC2.4	小鼠骨髓树突状细胞系	★★★

*敲除效率 (%) ; ★★★★★ >70% , ★★★★ >50% , ★★★ >30%

