

Protocol

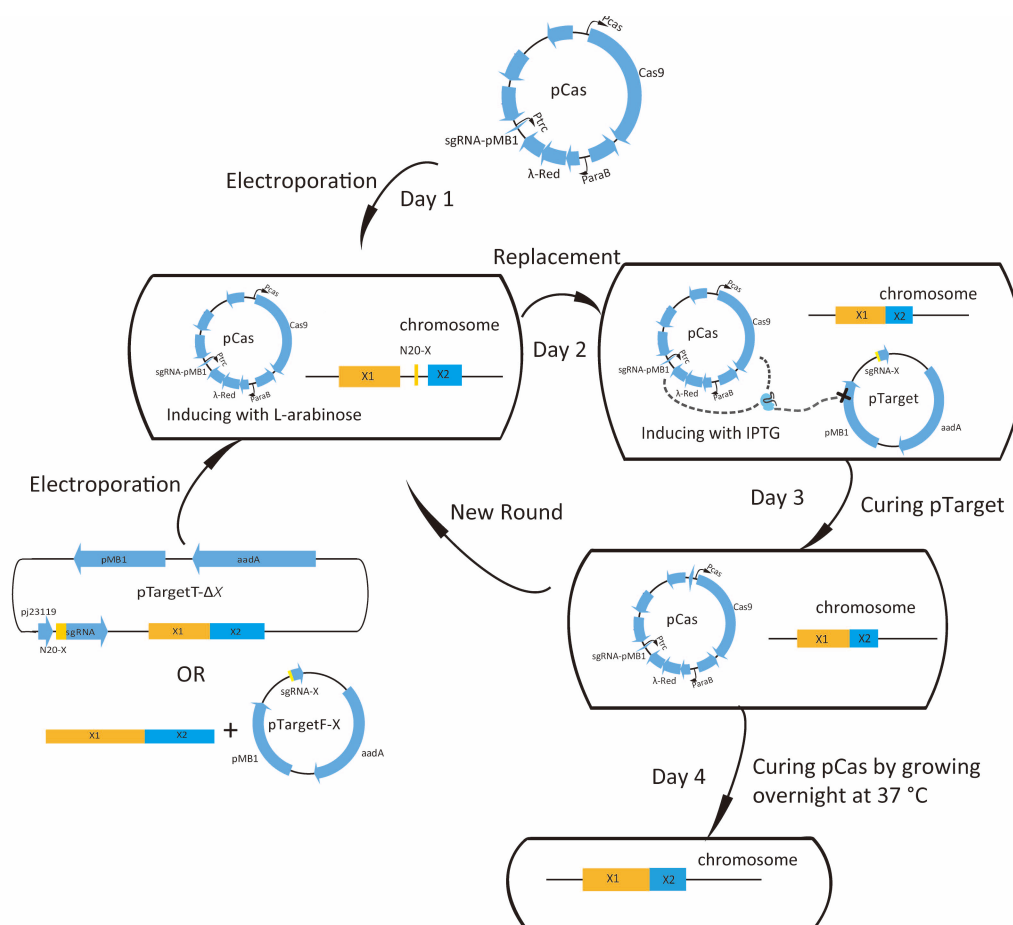


图 1 操作流程图

1. 实验操作流程

- 转化质粒 A (pCas)至宿主菌，以 kan 板，30 度进行筛选。
- 挑取阳性克隆子，制备电转感受态细胞，在离心收集前 1 小时加入 10mM 的阿拉伯糖诱导 RED 的表达。
- 电转转入含同源片段的质粒 pTargetT，或不含同源片段的质粒 pTargetF 扩增的同源片段，30 度复苏 1 小时后，以 kan+spc 板进行筛选。
- 过夜培养后对克隆子进行验证。
- 阳性克隆子接 LB 液体 (kan 抗性)，加入 0.5mM 的 IPTG 培养 8-20 小时，划线分单菌，并验证质粒 B (pTargetT 或 pTargetF) 的消除。
- 质粒 B 消除的阳性菌重新进行下轮的基因替换操作。
- 37 度液体培养，消除质粒 A (pCas)。

2. 靶基因修饰质粒 pTargetT 的衍生质粒 (带同源片段) 构建

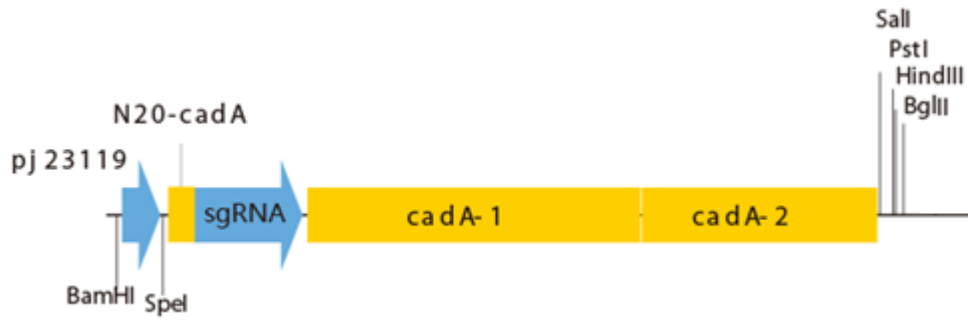


图 2 cadA 基因敲除模块

图中黄色部分为每敲除一个基因需要变化的部分，其它部分为不需要改变的部分。

2.1 设计引物对含靶基因 sgRNA 序列的 N20-sgRNA 片段进行扩增

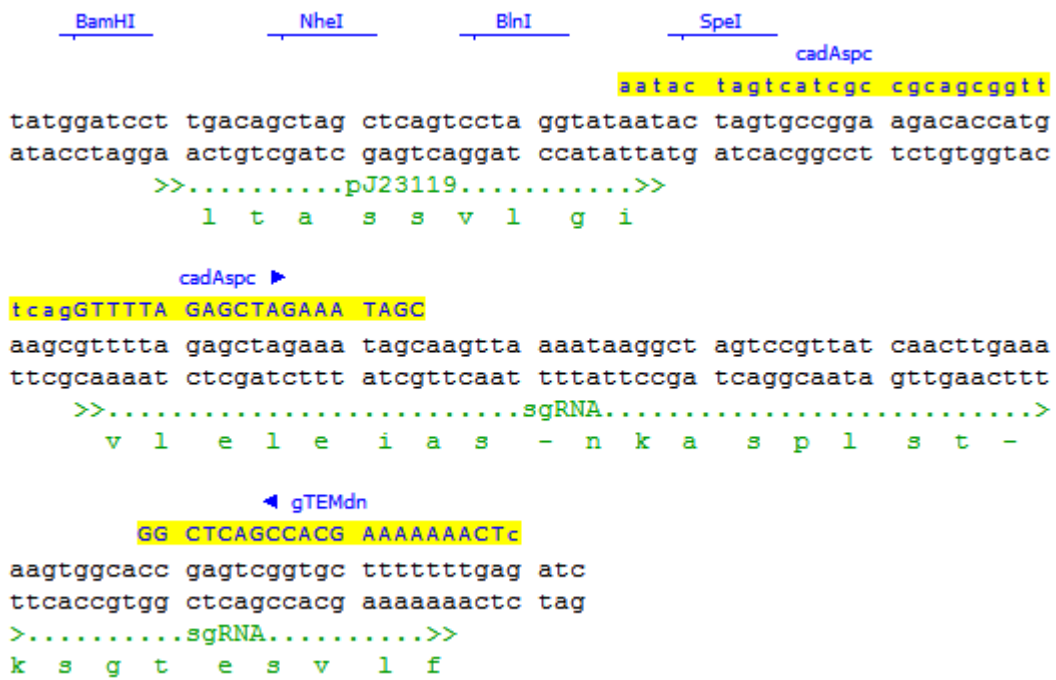


图 3 cadA 基因敲除模块的 N20-sgRNA 序列

如图所示设计引物（以 cadA 敲除为例）：

- SpeI
- cadAspc: AATACTAGTCATCGCCGAGCGGTTTCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
- gTEMdn: CTCAAAAAAGCACCGACTCGG

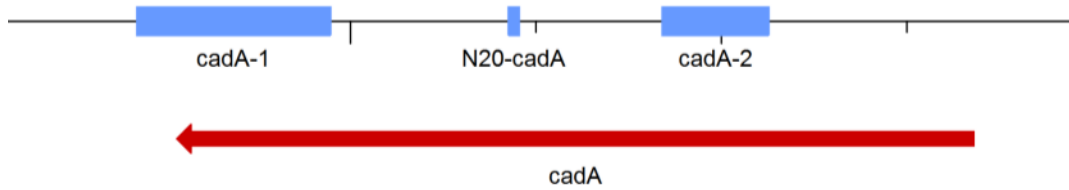


图 4 cadA 基因敲除模块序列在 MG1655 基因组上的图示

```

ttacctgcat tgcctttcat catcgccgca gcggtttcag tggacgccac gataccgtag
aatggacgta acggaaagta gtagcggcgt cgccaaagtc acctgcggtg ctatggcatc
>>....N20-cadA.....>>
  
```

图 5 N20-cadA 序列在 MG1655 基因组上的图示

其中 cadAspc 引物中含 N20（红色）序列为需敲除基因内部的 20bp 片段，要求基因组上其序列后面 3 个碱基为 NGG，即为 N20+NGG 的序列格式，并且基因组上没有重复的序列。

两个引物扩增出 N20+sgRNA 的片段，与 cadA 的同源片段（300+300bp）进行 overlap 扩增，以 SpeI/SalI 进行酶切，插入到质粒 pTargetF 的相同酶切位点中。

2.2 引物设计要点：

- cadAspc 引物中可引物与 SpeI 同尾的 XbaI, NdeI 酶切位点。
- 在同源片段上的右端引物中可引入 SalI, PstI, HindIII, BglII 等位点，方便进行插入连接。
- 也可以设计 N20+sgRNA 与同源片段不进行 overlap 连接，而直接引物酶切位点与载体相连。
- 可以加长设计引物，引入与载体 20bp 左右的片段，方便进行 GIBSON 连接。

3. 靶基因修饰质粒 pTargetF 的衍生质粒（不带同源片段）构建

以引物：TCCTAGGTATAACTAGT+N20+GTTTTAGAGCTAGAAATAGC

ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCAAG

对质粒 pTargetF（不含同源片段）进行扩增一圈，以 DpnI 消除模版质粒，转入 DH5α 中，测序验证。

4. 多基因的同时替换：通过构建含多个基因模块的 pTargetT 进行多基因的替换。

Tips:

1. cadAspc 引物中的 N20 序列需要确保基因组上没有重复序列，用什么工具进行检测？

如果敲除基因内部有多段符合要求的 N20+NGG 序列，如何选择？是随机的吗？

[BiaoChen] 可在 [网址](#) 的大肠基因组图形界面的搜索框中直接搜索 N20NGG 查看是否有重复的序列。

根据文献 <http://www.nature.com/nbt/journal/v31/n3/full/nbt.2508.html>

优化 N20 的选择：

1. 最优的保证 N20 的后面 11 个碱基在基因组中没有 11NRG 的重复（NRG 表示 NGG 或 NAG）

2. 次优的保证 N20 的后面 11 个碱基在基因组中没有 11NGG 的重复
满足上面的条件的话可以随机选择符合的 N20。

2. 扩增出 N20+sgRNA 片段与 cadA 同源片段 (300bp+300bp) 进行 overlap 扩增……

我不太理解这里的 cadA 同源片段具体是指哪段序列，可以详细说明一下吗？

[Biaochen] 同源片段是要敲除基因序列两侧的序列。这里的整合过程和 PKD46 的重组是一样的，CRISPR 主要起到一个代替抗性基因进行筛选的作用。所以同源片段和 pcr-targeting 一样也可直接在引物上引入 40bp 左右用 PCR 片段进行电转（用于敲除效率很高，>2kb 插入的效率偏低在几次都在 1/10---1/16），加长同源片段或者把同源片段放在质粒上都能很多的提高基因替换的效率。

3. pCas 的作用：

看操作流程似乎作用雷同 pKD46 诱导 RED 同源重组，那么用于表达 Cas9 的是哪个质粒？

[Biaochen] cas9 在质粒 pCas 上是组成型表达。是和 pKD46 一样的，也是温敏型的复制子，cas9 配合质粒 pTargetF 或 pTargetT 上的 sgRNA 起到筛选阳性克隆子的作用。

4. 步骤中如果电转不含同源片段的质粒 pTargetF+扩增的同源片段，这里扩增的同源片段分别指 cadA1 和 cadA2 吗 [Biaochen] 是的，是他们两个 overlap 扩增出来的片段？电转时质粒和片段的加量是多少 [Biaochen] 可参考 pcr-targeting 的文献。我一般是质粒加 3-6ul，片段为 PCR 产物浓缩（过柱纯化）4 倍后加 4-7ul。

这两种方式有何区别？常用哪种？

[Biaochen] 同源片段在质粒上，不管是敲除还是插入效率都很高，近 100%。同源片段以 PCR 产物电转敲除的效率很高，插入 >2kb 的片段效率就差很多在 10% 左右。但因为 PCR 扩增比较方便，我一般用电转质粒 pTargetF+扩增的同源片段的方式。用作敲除的同源片段可以采用通过两条引物（3 端有 20bp 左右的 overlap）对扩出的 80bp 左右的片段，也可以用单链 DNA 进行重组。

5. 消除质粒 pTargetF 或 pTargetT 的原理是什么？

[Biaochen] pCas 上有一个 IPTG 诱导转录的 sgRNA，导向于质粒 pTargetF 的复制子 pMB1，所以在诱导情况下 cas9+sgRNA 会切割 pMB1 使质粒断裂而消除。