

pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)

产品编号	产品名称	包装
D8414-1μg	pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)	1μg
D8414-100μg	pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)	100μg

产品简介:

- pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)是碧云天自行研发的用于构建能有效示踪或富集发生有效基因编辑的GFP替身报告基因质粒。该质粒表达红色荧光蛋白RFP (Red fluorescent protein), 便于观察转染效率或作为流式细胞实验的检测内参, 同时包含仅在发生基因编辑并且导致移码时才可表达的GFP报告基因, 在插入sgRNA靶向的目的基因序列后, 即可构建成用于基因编辑细胞示踪或富集的GFP替身报告质粒。
- 通常对细胞进行基因编辑的时候效率不会太高, 仅部分细胞发生基因编辑, 但哪些细胞发生基因编辑缺乏有效的活细胞示踪方法。本质粒通过替身报告基因(Surrogate Reporter)技术, 用户仅需按照使用说明设计并合成gRNA靶向的基因组DNA序列(合成单链DNA后退火而成), 连接至线性化的本质粒中, 就可构建成可用于基因编辑细胞示踪或富集的替身报告质粒。替身报告基因质粒与表达Cas9及sgRNA的质粒共转染哺乳动物细胞后, 可以直接通过检测细胞中的GFP荧光信号来确定该细胞中是否发生了有效的基因编辑。后续也可以通过流式细胞仪分选出GFP阳性细胞, 从而获得高比例的基因编辑细胞, 并用于下一步实验。由于替身报告基因质粒上含有和靶基因组相同的DNA序列, 因此当替身报告基因发生基因的移码突变从而到GFP表达时, 通常该细胞中也会发生基因组DNA的基因编辑, 这样就可以根据GFP荧光信号有无来判定该细胞是否发生了基因编辑, 同时也能初步判定该细胞的基因组DNA是否存在较高概率发生基因编辑。
- 本质粒基于替身报告基因(Surrogate Reporter)技术, 将与靶基因序列一致的外源片段定向非终止性插入至本质粒中的RFP及GFP之间, 并且确保仅在发生基因编辑并且导致移码时才能使GFP报告基因表达, 由此构建的替身报告质粒与能表达Cas9和sgRNA的质粒共转染时, 可通过绿色荧光直观显示发生基因编辑的细胞, 因此把这类报告基因命名为替身报告基因(Surrogate Reporter)。有研究表明, 当细胞中某一染色体上的目标序列被CRISPR/Cas9、TALEN或ZFN等核酸酶突变时, 同一细胞中另一条同源染色体上的相同目标序列发生突变的频率更高[1,2]。基于这一原理, 可进一步通过流式细胞技术富集GFP阳性细胞, 从而大幅提升获得基因编辑细胞的概率。
- pCMV-RFP-STOP-GFP质粒(5958bp), 也称BeyoCRISPR™ Surrogate Reporter Vector (GFP)质粒的图谱如下:

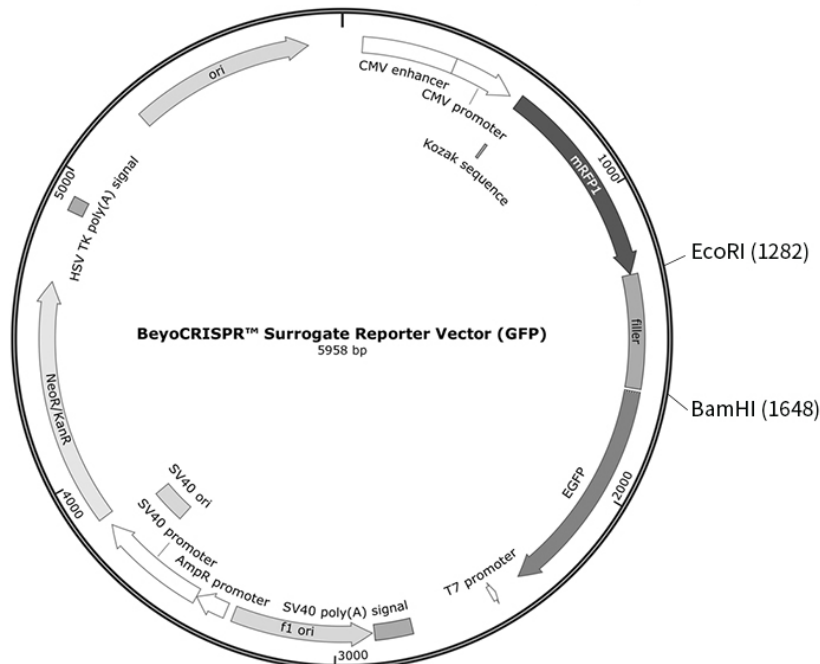


图1. 碧云天pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter) (D8414)质粒图谱。

- 本质粒经过EcoRI (GAATTC (1/5)^)和BamHI (GGATCC (1/5)^)限制性核酸内切酶消化后, 切除图谱中标示的 ‘ ‘filler’ ’, 把设计好的sgRNA对应的靶向基因组DNA序列经退火后形成的双链寡核苷酸片段连接到载体中, 就能构建成相应的用于基因编辑的替身报告基因质粒了。

- 在发生基因编辑的情况下，GFP基因序列处于表达框内，细胞仅表达处于表达框内的红色荧光蛋白。当Cas9及相应sgRNA一起表达，并且发生基因编辑时，Cas9通过sgRNA靶向识别两个荧光蛋白之间插入的特异性替身序列，诱导靶位点双链断裂，并在修复后发生移码突变，使终止密码子因为移码而失效，导致原本处于表达框外的GFP移码至与RFP同一表达框内，从而导致细胞中红色荧光蛋白和绿色荧光蛋白的双重表达，实现基因编辑的示踪检测(图2)。后续可以通过流式细胞仪进一步富集RFP/GFP双阳性细胞，从而大幅提升基因敲除细胞的获得效率，实现相应的基因编辑细胞的快速富集。

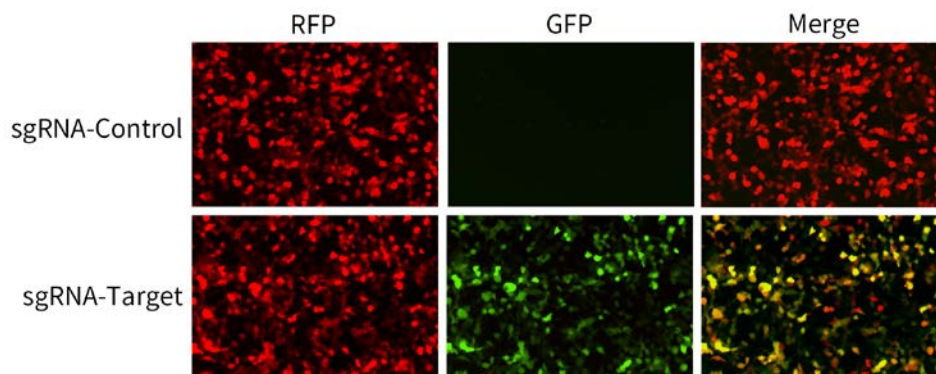


图2. 使用碧云天pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter) (D8414)构建的替身报告质粒的基因编辑示踪效果图。转染前一天，将稳定过表达Cas9的HEK293T细胞接种至24孔板中。细胞密度70%左右时，使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)将150ng带有特异性靶向序列的替身报告基因质粒分别与300ng非靶向的对照sgRNA (sgRNA-Control)或编码靶向sgRNA (sgRNA-Target)的质粒进行共转染。转染约48小时后，仅在转染靶向sgRNA质粒的细胞中同时观察到RFP及GFP荧光信号，GFP荧光信号的产生源自发生基因编辑的细胞。本效果图参考BeyoCRISPR™基因编辑Surrogate GFP Reporter构建试剂盒(D8403)。实际检测效果会因实验条件的不同而存在差异，图中效果仅供参考。

- BeyoCRISPR™ Surrogate Reporter Vector (GFP)质粒的主要信息如下：

Feature Nucleotide	Position
CMV enhancer	67-370
CMV promoter	371-574
Kozak sequence	601-610
mRFP1	607-1281
filler	1293-1648
EGFP	1658-2374
T7 promoter	2462-2480
SV40 poly(A) signal	2754-2875
f1 ori	2882-3335
AmpR promoter	3362-3466
SV40 promoter	3468-3825
SV40 ori	3676-3811
NeoR/KanR	3860-4654
HSV TK poly(A) signal	4886-4933
ori	5262-5850

- 碧云天同时提供基于替身报告基因技术的快速质粒构建试剂盒BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒 (D8403)及可用于sgRNA效率快速筛选的试剂盒BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法) (D8407)。
- pCMV-RFP-STOP-GFP质粒可使用的测序引物序列如下：
Primer F: 5'-AGATCAAGATGAGGCTGAAG-3'
- pCMV-RFP-STOP-GFP质粒的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

包装清单：

产品编号	产品名称	包装
D8414-1μg	pCMV-RFP-STOP-GFP	1μg
D8414-100μg	pCMV-RFP-STOP-GFP	100μg
—	说明书	1份

保存条件：

-20°C保存。

注意事项：

- 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

- 首次使用1μg包装的本产品时，请先取少量本质粒转化大肠杆菌，进行质粒小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。抽提获得的质粒可以通过酶切电泳进行鉴定，或通过测序进行鉴定。
- 100μg包装的本产品质粒浓度见标签。可以直接用于酶切或者转染细胞。
- 本质粒构建方案如下，仅供参考。

a. 质粒酶切。

Reagent	Volume
pCMV-RFP-STOP-GFP	xμl (~1μg)
10X CutEZ™ Buffer or 10X Quick Ligation Buffer	2μl
BeyoFast™ EcoRI (D5705)	1μl
BeyoFast™ BamHI (D5625)	1μl
Ultrapure Water	(16-x)μl
Total Volume	20μl
Incubate at 37°C for 15-30min	

b. 使用DNA凝胶回收试剂盒纯化酶切后的质粒。

如果质粒成功被EcoRI和BamHI酶切，则会产生两个片段，一个大的为目的片段，小片段为filler。酶切电泳鉴定后，切胶并胶回收5592bp的目的条带，弃去约366bp的filler条带。推荐使用碧云天BeyoMag™磁珠法DNA凝胶回收试剂盒(D0043)进行DNA凝胶回收实验。

c. 退火Oligos (从本步骤起，也可参考BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒(D8403)的相关使用说明)。

推荐使用Annealing Buffer for DNA Oligos (5X) (D0251)进行退火或自行按照常规方法进行退火。退火结束后可以稀释后直接用于连接反应，也可以在-20°C冻存备用。

注1：设计Target oligos的原则如下，具体也可参考碧云天BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒(D8403)的说明书进行oligo的设计：

Forward: 5'-AATT-23bp (Target sequence with PAM)-A-3'

Reverse: 5'-GATCT-23bp (Copy bottom strand 5'→3')-3'

注2：也可直接使用10X T4 Ligation Buffer作为退火的缓冲液，退火后的双链oligo浓度为100μM。

d. 将步骤3c中退火的双链寡核苷酸以1:200的比例稀释到超纯水中。

e. 按照常规连接方式进行连接反应。

取60ng步骤3b中经双酶切且纯化后的线性化质粒，与1μl步骤3d中稀释后的双链寡核苷酸进行连接，具体连接用量与步骤参照所使用的连接试剂盒说明书进行。推荐使用碧云天生产的快速DNA连接试剂盒(D7002/D7003)进行连接反应。建议同时设置阴性对照(仅含有载体，用水代替退火的双链寡核苷酸)。

f. 转化至DH5α超级感受态细胞(D1031)。

请参考DH5α超级感受态细胞(D1031)产品说明书进行操作，或自行参考常规的感受态转化步骤进行操作。

4. 哺乳动物细胞的转染和基因编辑效率的示踪。

a. 哺乳动物细胞的转染。上述构建的替身报告质粒须与编码Cas9及sgRNA的质粒共转染，推荐转染质粒质量比例为Cas9:sgRNA:Reporter=2:2:1。推荐使用碧云天Lipo8000™转染试剂(C0533)或Lipo6000™转染试剂(C0526)进行细胞转染。也可将本报告质粒与编码sgRNA的质粒按照1:2的质量比共转染过表达Cas9的稳转细胞株中。首次实验建议同时设置阳性对照与阴性对照。碧云天同时提供包含阴性及阳性对照相关质粒的可用于sgRNA效率快速筛选的完整质粒试剂盒(BeyoCRISPR™ sgRNA筛选试剂盒(替身报告基因法)(D8407))。

注1：共转染的Cas9及sgRNA的编码质粒不能表达GFP，或其它与GFP有相近激发/发射光谱的荧光蛋白。

注2：推荐使用碧云天BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro) (D7087)进行Cas9/sgRNA编码质粒的快速构建。此外，碧云天还提供可用于sgRNA质粒快速构建的试剂盒及多种常见细胞的Cas9稳转细胞株，具体可在碧云天网站查询或参考相关产品。

b. 基因编辑的示踪。转染后约48-60小时，即可通过荧光显微镜或流式细胞仪对细胞样品的基因编辑情况进行快速检测。通常情况下，未发生基因编辑的细胞只能观察到RFP的红色荧光，而发生基因编辑的细胞会出现RFP和GFP的红色和绿色荧光，其中GFP阳性的细胞是发生了基因编辑的细胞，这部分细胞的基因组发生有效编辑的可能性会高很多。此时可以富集GFP阳性细胞直接进行下一步实验，也可根据基因编辑效率选择最优的sgRNA序列后进一步包装成病毒，然后用于后续实验。

参考文献：

- Kim HJ, Lee HJ, Kim H, Cho SW, Kim JS. Genome Res. 2009. 19(7):1279-1288.
- Perez EE, Wang J, Miller JC, Jouvenot Y, Kim KA, et al. Nat Biotechnol. 2008. 26(7):808-816.

相关产品：

产品编号	产品名称	包装
C0526	Lipo6000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0533	Lipo8000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
D0508	基因组编辑突变检测试剂盒	25/100次
D0510	FnCas12a (Cpf1)	100-2000pmol
D0511	Cas9 Nuclease (SpCas9)	50/250/1000pmol
D1031	DH5α超级感受态细胞	20/100×100μl
D5625	BeyoFast™ BamHI	500μl
D5705	BeyoFast™ EcoRI	600μl
D7002	快速DNA连接试剂盒	100次
D7003	快速DNA连接试剂盒	500次
D7080	T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用)	250/1250/5000U
D7085	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (mOrange2 Reporter)	10次
D7086	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (CD4 Enrichment)	10次
D7087	BeyoCRISPR™ Quick Construction Kit (Puro)	10次
D7280	菌落直接PCR试剂盒	100/400/1000次
D8403S	BeyoCRISPR™ Surrogate GFP Reporter构建试剂盒	10次
D8414	pCMV-RFP-STOP-GFP (Surrogate Reporter)	1μg/100μg

Version 2024.11.04