



艾迪基因  
EDITGENE

加速基因编辑进程,造福人类健康

www.edgene.cn



# 艾迪基因 Bingo™ CRISPR 点突变 细胞系构建试剂盒

EDITGENE Bingo™ CRISPR Point Mutation Cell Line Generation Kit

产品说明书



中国总部: 020-3223-8856

美国办事处: 833-2263234

总部地址: 广东省广州市黄埔区科学城掬泉路3号广州国际企业孵化器D栋5F





## 目录

▶ 产品信息	3
▶ 产品概述	3
▶ 产品组分	4
▶ 储存条件及有效期	5
▶ 所需其他材料	5
▶ 操作流程图	5
▶ 实验操作	6
● 细胞预实验	6
● 正式实验	7
▶ 常见的问题及其解决方案	9
▶ 应用案例	10
● 部分定点突变细胞 Pool 编辑效率	12
▶ 注意事项	12
▶ 附录	错误! 未定义书签。





## Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒

### ▶ 产品信息

货号	产品名称	组分
EDY003-Y01	Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒（基础版）	Bingo™点突变质粒
EDY003-Y02	Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒（升级版）	Bingo™点突变质粒
		Cell Lysis 相关试剂
		PCR Validation 相关试剂

### ▶ 产品概述

本试剂盒是 Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒，适用于制备精准、高效的基因定点突变（替换、插入、缺失）细胞株，可提供基因定点突变过程所需的细胞、质粒以及主要试剂，旨在为科研工作者提供高效便捷的基因定点突变工具，实现基因定点突变细胞的一站式构建。

Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒是基于目前最高效、最安全的先导编辑(Prime Editing, PE)技术开发，凝聚了艾迪基因十多年基因编辑经验，艾迪基因 PE 技术基因突变成功率远超传统基因定点突变系统。自开发 PE 技术以来，艾迪基因技术人员对 PE 进行了多轮优化，包括：1) 为提高 SpCas9 和 RT 酶编辑活性，将 PE 升级为 PEmax；2) 引入 nick sgRNA 提高编辑效率，将 PE2 升级至 PE3；3) 为抑制细胞错配修复机制（MMR）以及降低额外突变发生，在 PE3 系统基础上发展了 PE5；4) 进一步改造 PE5 编辑蛋白，影响 pegRNA 的稳定性，从而提高基因编辑效率，PE5 升级为精准、高效的 PE7 系统。

Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒搭配了最新 PE7 系统，相比于 PE5，PE7 编辑效率提高 4.7 倍，成功率提高了 20%，为 Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒高编辑活性和稳定性提供技术保障；提供的 3 组 Target Plasmids（Bingo™ pegRNA 和 Bingo™ gRNA）基于本公司独特 PE 设计逻辑，保障编辑效率和特异性等各参数达到综合最优。

为大大降低实验成本，本试剂盒可提供 Cell Lysis 和 PCR Validation 产品，基因组样品的制备只需 20 分钟，无需纯化即可进行下游 PCR 实验。PCR Validation 可以兼容粗提基因组样品中残余细胞裂解成分对 PCR 反应的影响，能快速准确地鉴定出定点突变的细胞基因型。





## ▶ 产品组分

### ● Bingo™点突变质粒

组分		规格	储存温度
Helper Plasmids (500 ng/μL)	Bingo™ PE	50 μg	-20 °C
Target Plasmids (200 ng/μL)	Bingo™ pegRNA1	Bingo™ gRNA1	4 μg/pegRNA 1.5 μg/gRNA -20 °C
	Bingo™ pegRNA2	Bingo™ gRNA2	
	Bingo™ pegRNA3	Bingo™ gRNA3	
Positive Control (200 ng/μL)	Bingo™ pegRNA Control	Bingo™ gRNA Control	4 μg/pegRNA 1.5 μg/gRNA -20 °C
Cell (可选)		1×10 <sup>6</sup> /管	液氮

### ● Cell Lysis 相关试剂

组分	规格	储存温度
Buffer A	10 mL	RT
Buffer B	200 μL	-20 °C

### ● PCR Validation 相关试剂

组分	规格	储存温度
2× High Fidelity Pfu Mix (+Dye)	1.25 mL	-20 °C
Genotyping Primer F	1 OD 干粉	-20 °C
Genotyping Primer R	1 OD 干粉	-20 °C

#### 注意:

- (1) 为便于转染后富集成功转染细胞, Bingo™ PE 具有 Blasticidin 抗性, Bingo™ pegRNA 具有 Puromycin 抗性。
- (2) Positive Control 为艾迪基因成功定点突变质粒, 相关信息见【附录】。





- (3) 本试剂盒可进行 10 次 24 孔板转染; Bingo™ PE: Bingo™ pegRNA: Bingo™ gRNA 转染质量比例**推荐使用 15 : 3.3 : 1.1**。
- (4) 2x High Fidelity Pfu Mix (+Dye)为高保真 Taq 酶, 2× Taq Plus Master Mix II (Dye Plus) (诺唯赞: P213-01) 也适用于本试剂盒。
- (5) 本试剂盒优先推荐与艾迪基因提供细胞搭配使用。

### ► 储存条件及有效期

保存条件: -20°C, 有效期 1 年。

### ► 所需其他材料

完成本实验可能需要本试剂盒未提供的其他材料:

试剂	细胞培养基、血清、PBS、胰酶、嘌呤霉素 (Puromycin)、杀稻瘟菌素 (Blasticidin)、Opti-MEM I、细胞冻存液、转染试剂等
耗材	24 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

### ► 操作流程图

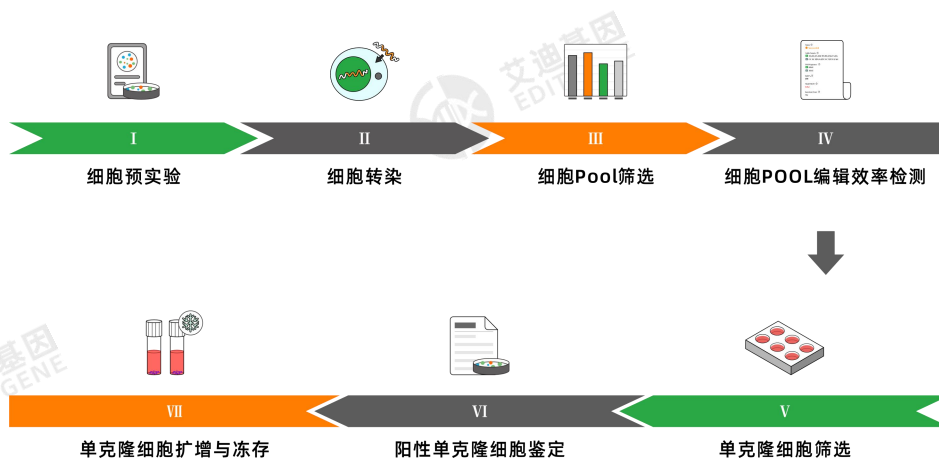


图 1 基因点突变操作流程图





## ▶ 实验操作

### ● 细胞预实验

#### 1. 靶位点鉴定

为确保 Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒的编辑效果,实验前建议先对定点突变位点进行 SNP 鉴定,并将鉴定结果提供给艾迪基因用于试剂盒 Target Plasmids 设计。艾迪基因可提供定点突变位点 SNP 鉴定有偿服务。

#### 2. 转染预实验

进行正式试验前,建议使用含 GFP 质粒对靶细胞进行预转染,获得最佳转染条件,便于正式实验的顺利开展。

**注意:** 高效的转染效率是成功编辑的前提。例如 293T、Hela、A549、N2A、CHO-K1 等常用细胞采用脂质体转染有效;对于一些治疗相关细胞转染比较困难,最佳转染方式差异大,建议优化转染方法后再进行实验。

#### 3. Puromycin 和 Blasticidin 药筛浓度摸索

- (1) 将对数生长期的细胞接种至 12 孔板中,培养基总体积为 1 mL/孔,置于培养箱中培养 24 小时。
- (2) 当汇合度达到 60%-70%时,将 12 孔板中的培养基换成含有不同浓度抗生素的药筛培养基,比如 Puromycin,浓度梯度为: 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- (3) 2-3 天后镜下观察细胞,选择 Puromycin 和 Blasticidin 完全杀死细胞的最低浓度作为后续实验的药物筛选浓度(最佳药筛浓度)。

#### 4. 单克隆形成验证

- (1) 将对数生长期的细胞消化计数,使用 Conditioned Medium 重悬细胞,按有限稀释法进行梯度稀释至 50-100 Cell/mL。
- (2) 取 1 mL 细胞悬液,加入 10 mL Conditioned Medium 稀释,100  $\mu\text{L}$ /孔接种至 96 孔板中,放入培养箱中静置培养。
- (3) 接种细胞贴壁后在 96 孔板中统计有单个细胞的细胞孔数(数值 1),放入培养箱中继续培养。
- (4) 7-10 天后镜下观察细胞是否有增殖趋势并且形成细胞簇,统计获得的单克隆数量(数值 2),





分析单克隆形成比例。

单克隆形成比例=数值 2/数值 1 \* 100%。

## ● 正式实验

### 1. 细胞转染

以 Lipofectamine 3000 转染为例,若使用电穿孔方法转染建议按电转仪实际推荐参数进行转染条件优化。

- (1) 将对数生长期的细胞消化计数。
- (2) 取适量细胞接种于 24 孔板中,放入培养箱中培养。

**注意: 不同细胞由于生长速率差异,建议控制细胞量培养 18-24 小时后融合率约为 80%。**

- (3) 培养 18-24 小时后进行转染,此时细胞的融合率应约为 80%。
- (4) 根据下表配制质粒混合液;

组分	24 孔板使用量
Bingo™ PE	1 µg
Bingo™ pegRNA	0.33 µg
Bingo™ gRNA	0.11 µg
Add opti-MEM I to	21 µL

- (5) 加 4 µL P3000 reagent, 轻轻吹打混匀;
- (6) 配制 Lipo 3000-opti-MEM I, 轻轻吹打混匀;

组分	24 孔板使用量
Lipo 3000	1.5 µL
opti-MEM I	23.5 µL
Add opti-MEM I to	25 µL

- (7) 加 25 µL 质粒混合液到 25 µL Lipo 3000-opti-MEM I, 轻轻吹打混匀, 室温静置孵育 15 min, 小心滴加在培养基中, 轻轻摇匀, 放入培养箱中培养。

- (8) 转染第二天上午将细胞传至 12 孔板, 放入培养箱中继续培养。

**注意: Lipofectamine 3000 转染具有细胞毒性, 建议转染后 4-24 h 换液。**





## 2. 细胞 Pool 筛选

转染 48 小时后, 更换成含 Puromycin 和 Blasticidin 的培养基进行筛选。抗生素浓度按照预实验摸索的最佳药筛浓度, 药筛时间为 2-3 天, 不同细胞有差异, 筛选至对照组细胞都被筛选即可停止加药, 换回完全培养基扩大培养, 即为基因定点突变细胞 Pool。

## 3. 细胞 Pool 编辑效率检测

- (1) 将细胞 Pool 胰酶消化, 离心收集细胞, 弃上清。
- (2) 取  $1 \times 10^5$  细胞加入 100  $\mu\text{L}$  DNA Lysis Buffer A 吹打混匀, 加入 2  $\mu\text{L}$  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 80  $\mu\text{L}$  上清转移至 1.5 mL EP 管, 上清液即可进行以下 PCR 反应。

### PCR 反应体系表:

试剂	体积 $\mu\text{L}$
2 × High Fidelity Pfu Mix (+Dye)	25
细胞裂解产物	2
Genotyping Primer F (10 $\mu\text{M}$ )	1
Genotyping Primer R (10 $\mu\text{M}$ )	1
Add ddH <sub>2</sub> O to	50

### PCR 反应程序表:

步骤	温度	时间	循环
预变形	95 °C	3 min	1 cycle
循环扩增	95 °C	15 s	35 cycles
	60 °C (根据引物 T <sub>m</sub> 值设置)	15 s	
	72 °C	1 min/kb	
再延伸	72 °C	5 min	1 cycle







(4) PCR 产物直接点样 3  $\mu$ 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。

(5) 然后用 SnapGene 对细胞 Pool 测序结果进行分析，判断定点突变位点编辑效率。

#### 4. 单克隆细胞筛选

(1) 将有成功编辑的细胞 Pool 消化成单细胞悬液，进行细胞计数。

(2) 将细胞按照预实验中接种梯度对细胞进行稀释后，接种于 96 孔板中，细胞放入 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中静置培养。

(3) 接种细胞贴壁后，标记有单克隆的细胞孔。

(4) 培养 7-10 天后当克隆团长至一定大小后（不同细胞有差异），可将克隆团在 96 孔板中消化，继续培养至长满 96 孔板，然后传代至 24 孔板中。

(5) 24 孔板长满后可取部分样品进行测序验证，剩余细胞继续培养。

#### 5. 阳性单克隆细胞鉴定

与细胞 Pool 编辑效率检测方法相同。

#### 6. 单克隆细胞扩增与冻存

将测序合格的单克隆细胞进行扩增和冻存，或者继续进行下游实验。

### ► 常见的问题及其解决方案

#### 1. Bingo™ 高效点突变试剂盒推荐脂质体转染还是电转染？

A：试剂盒中的 Bingo™ PE、pegRNA 和 gRNA 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，治疗相关细胞建议采用电转染。

#### 2. 目的细胞转染效率低怎么办？

A：建议正式试验前先进行转染预实验，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）和物理转染法（如电转）。





### 3. 如何判断 Bingo™ 高效点突变试剂盒有编辑活性?

A: 试剂盒提供的 Positive Control 在 HeLa 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编辑效率可能存在差异。

### 4. 使用 Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒构建的细胞能否稳定传代?

A: 能。Bingo™ CRISPR 点突变细胞系构建试剂盒靶向细胞基因组 DNA 进行基因突变, 获得目的细胞的基因型能够稳定遗传至子代细胞。

### 5. 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: 可能是基因突变影响了细胞活性。建议在进行基因点突变实验之前, 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, 定点突变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。

## ► 应用案例

### 1. 项目信息

细胞名称	Hela	
基因	HSPD1 (GeneBank ID: 3329)	
突变位点	c.A391G	

### 2. Bingo™ PE 系统质粒设计

Bingo™ pegRNA	Spacer	ggcttcgagaagattagcaa
	Extension	ttagcaccttCgctaattctctcga
Bingo™ gRNA	agcttcttcattgtgttat	





### 3. 编辑效率检测

Hela 细胞 HSPD1 基因 c.A391G 位点细胞 Pool 编辑效率为 71%，获得纯合突变单克隆细胞。



图2 Hela 细胞 HSPD1 基因 c.A391G 点突变细胞 Pool Sanger 测序结果

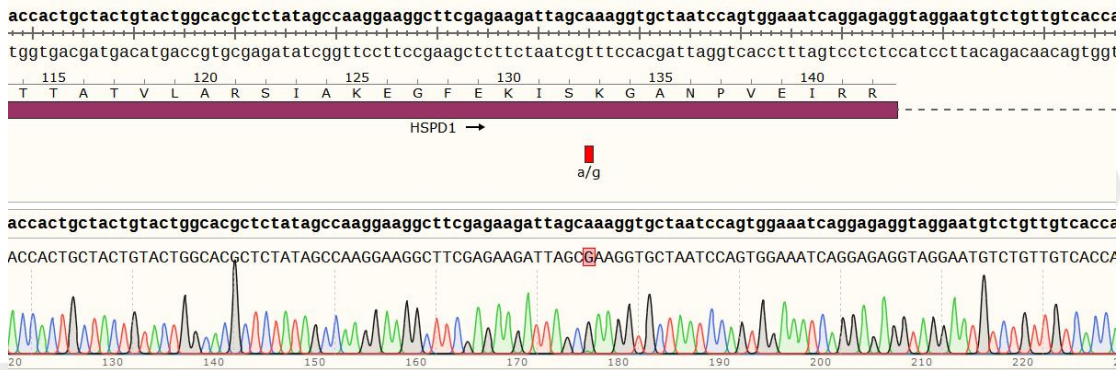


图3 Hela 细胞 HSPD1 基因 c.A391G 点突变单克隆细胞 Sanger 测序结果





● 部分定点突变细胞 Pool 编辑效率

细胞类型	细胞 Pool 编辑效率
293T	☆☆☆
Hela	☆☆☆
A549	☆☆☆☆
HepG2	☆☆☆☆
MDA-MB-231	☆☆☆☆
HCT116	☆☆☆
U2OS	☆☆☆
Ishikawa	☆☆☆
R28	☆☆☆
SN4741	☆☆☆

编辑效率 (%) :☆☆☆☆ >81%, ☆☆☆ 51~80%, ☆☆☆ 21~50%

▶ 注意事项

- (1) 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, 否则产生一切后果与本公司无关。
- (2) 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。

