Marchantia CRISPR/Cas9 克隆流程总览

适合已有分子生物学背景的使用者：从寡核苷酸退火、载体克隆到最终构建体验证与快速 gDNA 检测。

1. 寡核苷酸磷酸化与退火

双链化 gRNA 插入片段

37 °C → 95 °C → 缓慢降温

目的：得到可连接的双链寡核苷酸

2. BsaI 酶切 pMpGE_En03

载体线性化

37 °C 3 h，随后纯化

目的：开放载体接受 gRNA 片段

3. 连接反应

退火寡核苷酸 + 线性载体

T4 ligase，卡那霉素筛选

目的：构建 gRNA 入门载体

4. 第一轮菌落 PCR

oligo-F + M13-R

阳性约 250 bp

目的：确认 gRNA 已插入入门载体

5. LR 反应

pMpGE_En03_oligos → pMpGE010/011

LR clonase，壮观霉素筛选

目的：转入最终植物表达载体

6. 第二轮菌落 PCR

阳性约 500 bp

区分 250 / 250+500 / 500 bp

目的：筛出真正终构建体

7. 过夜培养与后续转化

保留阳性克隆

用于 Marchantia 后续实验

目的：得到可用 CRISPR 构建体

8. 快速 gDNA 提取 + PCR 检测

提取液 + 稀释液，90 °C 10 min

50 µL PCR 中用 4 µL 提取产物

目的：快速检测基因编辑结果

关键判断点

- 第一轮 PCR：约 250 bp
- 第二轮 PCR：约 500 bp
- 抗性筛选：Kan → Spec

理解要点

- 先把 gRNA 插入入门载体
- 再经 LR 重组进入最终表达载体
- 最终用快速 gDNA + PCR 检测编辑结果