

Marchantia CRISPR/Cas9 克隆流程 (中文翻译)

原始文档: Marchantia_CRISPR_CloningGuide.docx

说明: 以下为对原始流程的忠实中文整理。每一步后补充“本步目的”，便于理解实验设计。原文中未给出的条件不擅自补充。

一、gRNA 寡核苷酸示例

编号	名称	序列	用途
AK54	MpERF7_gRNA1_AK-F	CTCGTGGCCGCCATCTCGGGGGTG	通过 Gateway 系统进行 Marchantia CRISPR 克隆 (Sugano 2018)
AK55	MpERF7_gRNA1_AK-R	AAACCACCCCGAGATGGCGGCCA	

本步目的: 给出一对可用于 Marchantia CRISPR 克隆的寡核苷酸示例，说明后续流程所处理的是带有目标靶序列的引导序列寡核苷酸。

二、Marchantia 中 CRISPR/Cas9 系统克隆流程

原文说明: according to Sugano et al., 2018 [PLOS One]

1. 寡核苷酸的磷酸化与退火

- 1 μL oligo 1 (100 μM 储存液)
- 1 μL oligo 2 (100 μM 储存液)
- 1 μL 10 \times T4 ligation buffer (必须含 ATP, 例如 NEB)
- 6.5 μL dH₂O
- 0.5 μL T4 polynucleotide kinase

退火程序:

- 37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min
- 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min
- 以 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率降温至 25 $^{\circ}\text{C}$

本步目的: 给寡核苷酸 5' 端加磷酸，并使互补链退火形成可连接的双链 DNA 片段，为后续插入载体做准备。

2. 用 BsaI 酶切 pMpGE_En03

- 1 μg DNA
- 5 μL 10 \times CutSmart buffer
- 1 μL Bsal restriction enzyme (NEB)
- 以 dH_2O 补足至 50 μL

37 °C 孵育 3 h; 随后按照 PCR clean-up kit 说明纯化线性化载体, 但用 15–20 μL dH_2O 洗脱。

本步目的: 将 pMpGE_En03 定向切开并线性化, 得到可接受 gRNA 双链插入片段的载体骨架。

3. 线性化载体与退火寡核苷酸连接

- 1 μL 退火并磷酸化后的寡核苷酸双链 (1:200 稀释)
- 2 μL 10 \times ligation buffer (含 ATP)
- 50 ng 线性化且已纯化的载体
- 以 dH_2O 补足至 20 μL 小计体积
- 最后加入 1 μL T4 ligase

室温孵育 1–2 h, 随后冰箱过夜。之后转化至感受态细菌, 使用卡那霉素筛选。

本步目的: 将目标 gRNA 片段连接进入入门载体 pMpGE_En03, 构建后续 Gateway/LR 反应所需的中间载体。

4. 第一轮菌落 PCR 鉴定

- 使用 oligo-F primer 和 M13-R primer
- 阳性转化子应出现约 250 bp 条带
- 选阳性克隆做过夜培养

本步目的: 快速确认 gRNA 片段是否成功插入入门载体, 避免将阴性克隆带入下一步。

5. LR 反应 (采用厂家建议体积的一半)

- 75 ng pMpGE_En03_oligos
- 150 ng pMpGE010 或 pMpGE011 (若有问题可调比例)
- 至少 2 μL TE buffer pH 8.0 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM EDTA)
- 以 dH_2O 补足至 4 μL
- 加入 0.5 μL LR clonase

轻弹混匀两次, 短暂离心, 室温至少孵育 1 h (更推荐 2–4 h 或过夜), 然后转化入感受态细菌, 使用壮观霉素筛选。

本步目的: 通过 Gateway LR 重组, 将含 gRNA 的入门载体转移到最终植物表达载体 pMpGE010/011 中。

6. 第二轮菌落 PCR 鉴定

- 仍使用 oligo-F primer 和 M13-R primer
- 阳性转化子应出现约 500 bp 条带
- 若使用自制感受态，可能出现大小不一的菌落，优先挑选大菌落
- 可能出现 250 bp、250+500 bp 或仅 500 bp 条带；只保留目标正确者

本步目的：确认 LR 反应成功，获得真正可用于 Marchantia 转化的最终 CRISPR 构建体。

三、快速基因组 DNA 提取（原文附带）

- Extraction solution E7526-24 mL (Sigma-Aldrich)
 - Dilution solution D5688-12 mL (Sigma-Aldrich)
1. 向 PCR 管中加入 15–30 μL extraction buffer。
 2. 加入一小块植物组织；样品之间注意无菌操作，组织应完全浸没在液体中。
 3. 在 PCR 仪中 90 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。
 4. 加入等体积 dilution buffer（与 extraction buffer 体积比 1:1）。
 5. 吹打混匀，gDNA 即可使用；可冷藏或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。
 6. 若 PCR 反应总体积为 50 μL ，则取 4 μL 混合物使用。

本步目的：快速获得可直接用于 PCR 的植物基因组 DNA，用于后续 CRISPR 编辑结果的检测。

四、说明

注：原始 docx 后半部分已经混入一份中文解释稿。我在此以原文英文流程为主重新整理，数值、试剂、载体名称和筛选抗生素保持与原始记录一致。