



项目报告

协议号: KOAI220615LJ9

项目名称: 小鼠 Asb3 基因敲除模型



- 保密 -

目录

1. 产品信息	2
2. gRNA 靶序列	2
3. 交付鼠验证结果	3
3.1. 交付鼠信息	3
3.2. 交付鼠的同源臂 PCR 验证	4
3.2.1. 引物设计策略	4
3.2.2. PCR 实验条件	5
3.2.3. PCR 鉴定结果	6
3.2.4. 注意事项	6
3.3. 交付鼠的测序验证	7
3.3.1. 引物设计策略	7
3.3.2. 测序引物	7
3.3.3. 测序结果	7
4. 后续育种建议及基因分型策略	8
4.1. PCR 鉴定策略	8
4.2. 繁殖路线示例	8
5. 实验方法-DNA 提取	11
5.1. 试剂盒提取法	11
5.2. 粗提法	12
6. 相关试剂	14



1. 产品信息

品系名称	C57BL/6J-Asb3 ^{em1Cya}
品系编号	KOCMP-65257-Asb3-B6J-VA
基因名	Asb3
NCBI 号	65257
品系背景	C57BL/6J
修饰方式	conventional knockout

2. gRNA 靶序列

gRNA-A1 : TCTCTGATACGGGTTGACTAAGG

gRNA-A2 : GTGAGGTTGATAATGCCGGATTGG

gRNA-B1 : ACTAGATAAGTACAGGTCTAGGGG

gRNA-B2 : AGAAGTGAGGTTGATAATGCCCGG

3. 交付鼠验证结果

3.1. 交付鼠信息

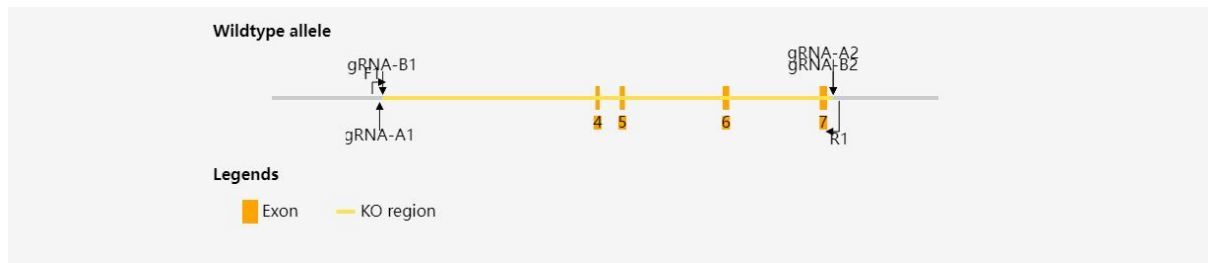
F1代小鼠	
2 Males ♂	2 Females ♀
出生日期: 09-20-2022	出生日期: 09-20-2022
小鼠 ID: 1, 2	小鼠 ID: 5, 6
品系: C57BL/6J	品系: C57BL/6J
基因型: (+/-)杂合	基因型: (+/-)杂合



3.2. 交付鼠的同源臂 PCR 验证

3.2.1. 引物设计策略

F1/R1 扩增目的基因删除后的阳性，获得 418 bp 片段则说明打靶成功。



3.2.2. PCR 实验条件

引物信息:

F1: 5'-TCTGACTCTTAGAATCTTCCCACCTCT-3'

R1: 5'-GAAGCAGTCAGCACCTTACTTGAT-3'

阳性条带: 418 bp 野生型条带: 12349 bp

PCR 反应体系: (推荐使用 Premix Taq Polymerase: Vazyme, P222)

Component	x1	
Mouse tail genomic DNA	1	μL
Forward primer (10 μM)	1	μL
Reverse primer (10 μM)	1	μL
Premix Taq Polymerase	12.5	μL
ddH ₂ O	9.5	μL
Total	25	μL

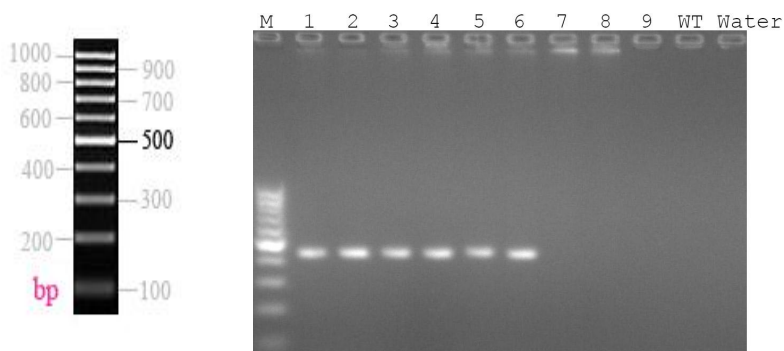
PCR 反应条件:

Step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	94 °C	3 min	
Denaturation	94 °C	30 s	35 x
Annealing	60 °C	35 s	
Extension	72 °C	35 s	
Additional extension	72 °C	5 min	

3.2.3. PCR 鉴定结果

1,2,5,6 号小鼠经鉴定目的基因删除后阳性。琼脂糖凝胶电泳结果如下：

Marker 目的基因删除引物 (MT: 418 bp; WT: 12349 bp)



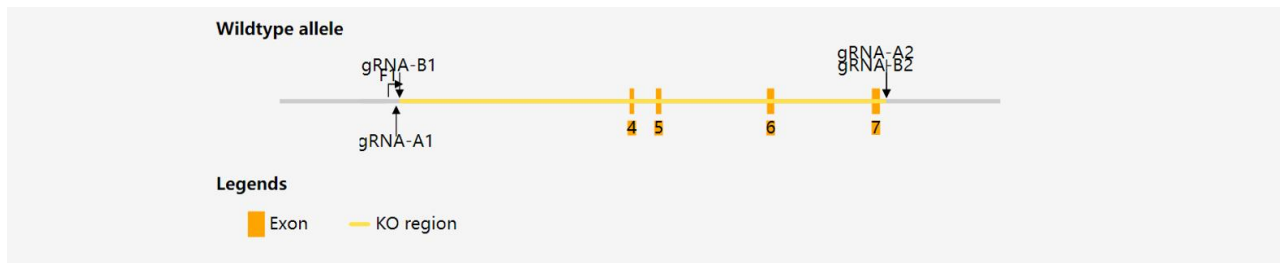
3.2.4. 注意事项

- 1) 按照 PCR 标准体系配制 25 μ LPCR 混合液，PCR 循环数推荐设置为 35；
- 2) 使用的 Premix Taq Polymerase: Vazyme, P222；
- 3) PCR 基因分型使用两组对照：
 - 阴性对照 (WT)：野生型小鼠 DNA；
 - 空白对照 (Water)：ddH₂O。

3.3. 交付鼠的测序验证

3.3.1. 引物设计策略

将 3.2.2 步骤中 PCR 扩增得到的 DNA 产物送一代测序，确认打靶情况。



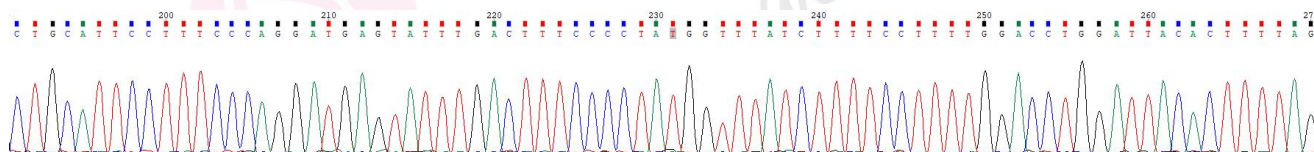
3.3.2. 测序引物

F1: 5'-TCTGACTCTTAGAATCTTCCCACCTCT-3'

3.3.3. 测序结果

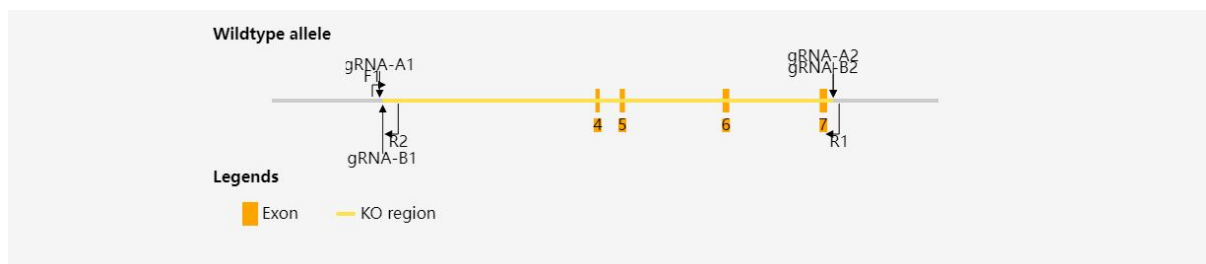
1,2,5,6 号小鼠测序结果为删除 11931 bp。

CTGCATTCTTTCCAGGATGAGTATTTGACTTTCCCCTA--del 11931 bp--TGGTTTATCTTTTCTTTTGGACCTGGATTACACTTTTAG



4. 后续育种建议及基因分型策略

4.1. PCR 鉴定策略

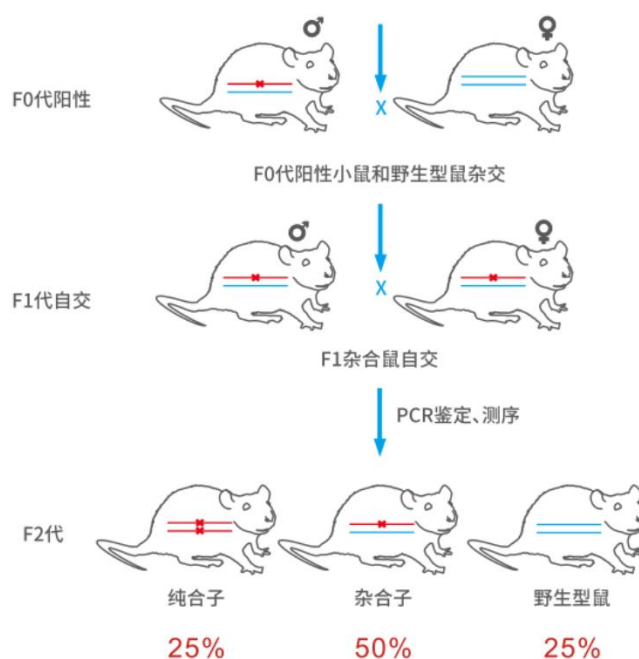


- F1/R1 引物：若扩增出目的条带，则判定目的基因成功删除。
- F1/R2 引物：若扩增出目的条带，则判定目的基因未成功删除。

综合 F1/R1 引物和 F1/R2 引物的扩增结果，判定出基因型包括(-/-)纯合子、(+/-)杂合子、(+/+)野生型。

4.2. 繁殖路线示例

注意下述繁育方案仅作参考，繁殖时需根据实际情况调整繁殖路线。



4.2.1. 步骤: 通过(+/-)杂合子小鼠自交可以产生(-/-)纯合子小鼠, 使用以下引物组判定基因型。

引物组 1:

F1: 5'-TCTGACTCTTAGAATCTTCCCACCTCT-3'

R1: 5'-GAAGCAGTCAGCACCTTACTTGAT-3'

目的基因敲除阳性: 418 bp

引物组 2:

F1: 5'-TCTGACTCTTAGAATCTTCCCACCTCT-3'

R2: 5'-GCAGCTGAGTGTGCAAGAAGGTATA-3'

目的基因未敲除阴性: 686 bp

(-/-)纯合子: 418 bp

(+/-)杂合子: 418 bp, 686 bp

(WT)野生型: 686 bp

注意点:

1. 如果 PCR 扩增出非目标条带, 请联系我们。

4.2.2. PCR 实验条件

PCR 反应体系：（推荐使用 Premix Taq Polymerase: Vazyme, P222）

Component	x1	
Mouse tail genomic DNA	1	μL
Forward primer (10 μM)	1	μL
Reverse primer (10 μM)	1	μL
Premix Taq Polymerase	12.5	μL
ddH ₂ O	9.5	μL
Total	25	μL

PCR 反应条件：

Step	Temp.	Time	Cycles
Initial denaturation	94 °C	3 min	
Denaturation	94 °C	30 s	35 x
Annealing	60 °C	35 s	
Extension	72 °C	35 s	
Additional extension	72 °C	5 min	

4.2.3. 注意事项

- 1) 使用的 Premix Taq Polymerase: Vazyme, P222;
- 2) PCR 基因分型使用两组对照:
 阴性对照 (WT) : 野生型小鼠 DNA;
 空白对照 (Water) : ddH₂O。

5. 实验方法-DNA 提取

5.1. 试剂盒提取法

使用 TaKaRa MiniBEST Universal Genomic DNA Extraction kit (Ver.5.0_Code No. 9765) 提取鼠尾 DNA。

5.1.1. 准备工作

- 1) 备好无水乙醇；
- 2) WB 使用前需要加入 65 mL 的无水乙醇；
注：试剂盒推荐 56 mL，但长期数据显示，加入 65 mL 提取的基因组纯度更高。
- 3) Buffer GL 若出现沉淀，请于 56 °C 加热溶解，待恢复至室温后使用；
- 4) 洗脱膜上的 DNA 时，用 0.25 x TE buffer 洗脱的 DNA 保存时间更持久；TE buffer 使用前放置 56 °C 预热，DNA 洗脱效率更高。

5.1.2. 实验流程

- 1) 每个装有样品（2-5mm 鼠尾）的 EP 管中加 180 μ L Buffer GL、20 μ L 蛋白酶 K（用试剂盒里的蛋白酶 K 加 20 μ L 即可，该浓度是 20 mg/mL）、10 μ L 的 RNA 酶；
注：鼠尾不能太长，一般 2~5 mm；如果鼠尾过粗，可以增大裂解体系至 300 μ L。
- 2) 放置 56 °C 烘箱过夜反应（一般 12~16 h）；
- 3) 第二天早上从烘箱取出样品放置离心机里，12000 rpm 离心 2 min，将毛发杂质离到管底；
- 4) 吸取上清至另一干净的 EP 管中（注：尽量不要吸到管底的毛发和杂质），再加入 200 μ L Buffer GB 和 200 μ L 的无水乙醇，盖好盖子后上下颠倒混匀；
- 5) 混匀后将液体转移至准备好的吸附柱中，12000 rpm 离心 2 min，弃滤液；
- 6) 向吸附柱中加入 500 μ L Buffer WA，12000 rpm 离心 1 min，弃滤液；
- 7) 吸附柱的管壁四周加入 700 μ L Buffer WB，静置 1 min，再 12000 rpm 离心 1 min；弃滤液；
注：一定要保证 WB 中已经加过了指定体积的无水乙醇；沿着吸附柱管壁四周加入 WB，有助于完全冲洗沾附管壁上的盐分。
- 8) 重复操作步骤 5.12.中 7），弃滤液；

- 9) 空甩：12000 rpm 离心 2 min；
- 10) 将吸附柱放置在一个新的 1.5 mL 的离心管上，盖子开着，室温放置 10 min，以去除残留的乙醇；
注：乙醇残留会抑制聚合酶扩增。
- 11) 向吸附柱膜的中央加入 50 μ L 预热过的 0.25 x TE buffer，盖好盖子后室温静置 10 min；（注：预热的灭菌水可以提高洗脱效率）
- 12) 12000 rpm 离心 2 min 洗脱 DNA；可以将离下的液体再次加入膜中央，再静置 5 min，再 12000 rpm 离心 2 min，获得浓度更高的 DNA；
- 13) 检测获得 DNA 的浓度，也可以通过电泳观察纯度。

5.2. 粗提法

使用粗裂的方法粗提鼠尾或鼠爪基因组 DNA，适用于扩增 <1 kb 的条带。

5.2.1. Triton 裂解液的配制（1 L 量）：

- 1) 分别用电子天平称取下列物品至烧杯：
KCl: 3.7 g ; Tris: 1.2 g;
- 2) 加入 300~400 mL 灭菌水溶解；
- 3) 加入 1 mL TritonX-100 充分溶解，若不能充分溶解可以放入 56 $^{\circ}$ C 烘箱中溶解；
注：TritonX-100 呈油状液体，吸取前先润洗移液器；排空 TritonX-100 后，才能把吸头伸到溶液中反复吹吸，避免 TritonX-100 大量残留在吸头内壁上。
- 4) 加入 80 μ L 浓盐酸调 pH 至 9.0；
- 5) 然后用灭菌水定容至 1 L 后，室温保存，待用。
注：请勿高压灭菌 TritonX-100，高压灭菌后 TritonX-100 会产生大量沉淀。

5.2.2. 样品的裂解

- 1) 取鼠尾或鼠爪（~2mm）至 EP 管，加入 98 μ L 裂解液、2 μ L 20 mg/mL 的蛋白酶 K；
注：
① 鼠尾不可超过 3mm，不然裂解不充分；

- ② 若鼠尾过粗，可以适量增加裂解液的量；
 - ③ 蛋白酶 K 需要注意不要反复冻融，不然会影响活性。
- 2) 加入裂解液和蛋白酶 K 后，将 EP 管放入 56℃ 恒温设备（烘箱或者水浴锅），过夜运行；
 - 3) 第二天从恒温设备中取出样品，放置金属浴或者 PCR 仪中，98℃ 反应 15 min，使蛋白酶 K 失活；
 - 4) 将样品离心 15 min，上清即可作为 PCR 模板。

注：一般 25 μ L 的 PCR 体系中，加入 1.5 μ L 的上清。



6. 相关试剂

Tris 盐酸盐溶液	Sigma, T2663
蛋白酶 K	SunShineBio, P0021
Triton X-100	Sigma, T8787-50 mL
Premix Taq Polymerase	诺唯赞, P222
	诺唯赞, P112-03
MgSO ₄ (25 mM)	TOYOBO CO, Code: KOD-401
10 X PCR Buffer for KOD-Plus-Neo	
KOD-Plus-Neo	
DMSO	Wak-chemie
琼脂糖	BIOWEST AGAROSE, REGULAR
DNA 分子量标准	Thermo Scientific GeneRuler 100 bp DNA 分子量标#SM0241
	Thermo Scientific GeneRuler 1 kb DNA 分子量标准#SM0311
	诺唯赞 DL2000 Plus DNA Marker #MD101-01
0.5×TBE	Tris Bio Basic Inc, TBO194-500g
	EDTA Shanghai Sangon, 0105-500g
	Boric Acid, Shanghai Sangon, 0588-500g
1×TAE	Tris Bio Basic Inc, TBO194-500g
	EDTA Shanghai Sangon, 0105-500g
	Acetic Acid, Dongdu CAS: 64-19-7-500 mL