



Flash-Pro 极速敲除试剂盒说明书

(类器官/干细胞专用)

产品货号	产品名称	规格
EDKO-K05	Flash-Pro 极速敲除试剂盒	50μL
	(Flash-Pro CRISPR KO Kit)	100μL

【产品简介】

Flash-Pro 极速敲除试剂盒通过递送预组装的递送载体、Cas9 蛋白与 sgRNA 复合物 (RNP)，实现高效、精准的基因敲除，是一款专为科研用户定制研发的即用型基因敲除试剂盒。该产品包含艾迪基因创新研发的 **CRISPR RNP 递送载体** 以及经数千例实战验证过的 **Cas 酶**，经过特殊处理的递送载体-RNP 复合物能够在哺乳动物细胞中产生高效的基因组编辑。

【储存条件及有效期】

有效期 6 个月，储存条件-80 °C，干冰运输。

建议根据使用次数进行分装，避免反复冻融。

【产品优势】

- **高编辑效率**: 高效的递送载体和 RNP 直接递送方式，基因敲除效率高达 95%。
- **周期短**: 本产品提供一体化的载体-RNP 复合物，转染后 6 小时即可检测到 DNA 切割，48 小时内完成基因敲除。
- **普适性强**: 适用于多数哺乳动物细胞，对于难转染细胞、生长代数受限细胞同样具有优势。
- **操作要求低**: 无需复杂操作，无需电转仪，即加即用，实现高效编辑。无需筛选，瞬时作用机制，无需抗生素或荧光标记筛选，节省实验周期。
- **低风险**: 低脱靶效应，RNP 在细胞内的半衰期短（数小时），Cas 蛋白快速降解，显著减少非特异性切割。无外源 DNA 随机整合风险。
- **细胞毒性低**: 创新研发的生物分子递送载体，结合 RNP 的递送方式。



【产品组分】

产品编号	组分	规格	备注
EDKO-K05-50	递送载体-RNP 复合物	50 μ L (足够 3 个 24 孔)	24 孔板, 15uL/孔
EDKO-K05-100	递送载体-RNP 复合物	100 μ L (足够 3 个 12 孔)	12 孔板, 30uL/孔

注意: 本产品只提供一体化的递送载体-RNP 复合物, 客户只需要提供 sgRNA 序列。

【可选组分】

编号	可选项	备注
1	sgRNA 设计	艾迪基因提供 sgRNA 序列设计服务
2	阳性对照	人 B2M 基因 递送载体-RNP 复合物

【类器官实验步骤】

1. 类器官培养和铺板 (以 24 孔板为例)

类器官培养至生长旺盛状态, 消化计数, 接种 50 μ L 1.2×10^5 细胞至 24 孔板。

请使用生长状态较好的类器官, 并确保细胞无细菌、真菌或支原体污染。

消化类器官至 3-5 个细胞团即可。如果类器官是近期复苏的液氮冻存类器官, 请在转染前至少传代两次。

2. 类器官转染

- 1) 提前将载体-RNP 复合物从 -80°C 转移至 4°C 缓慢解冻, 每孔缓慢加入 15 μ L, 用完全培养基补足 100 μ L 体积, 轻轻晃动混匀, 将 24 孔板进行 32°C 500g 离心 90 min;
- 2) 收集类器官细胞, 离心分离细胞沉淀和上清液, 将细胞沉淀进行种胶, 上清液用于培养, 并补足完全培养基;
- 3) 转染 24h, 更换完全培养基, 继续培养。

转染时细胞量较少, 但转染步骤较多, 注意避免细胞在操作过程中丢失; 若无孔板离心机推荐使用 2mL EP 管替代, 不建议使用 1.5mL EP。

3. 分析转染细胞

转染 72h 后, 提取所转染细胞的基因组, 使用特异性引物扩增靶标区域(扩增子包含 sgRNA 靶向切割的位置);

使用 TIDE (分析网址: <https://tide.nki.nl/>)或者 ICE (分析网址:





<https://ice.synthego.com/#/>，使用说明：<https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/ice-analysis-guide>) 等工具进行基因编辑效率分析。

【细胞实验步骤】

1. 细胞培养和铺板（以 24 孔板为例）

细胞培养至生长旺盛状态，转染前 24 h，接种细胞至 24 孔板（对于贴壁细胞，使转染时细胞汇合度为 50%~60%；对于悬浮细胞，使转染时细胞数量为 $1.2 \times 10^5 \sim 1.6 \times 10^5$ ）。

请使用生长状态较好的细胞，并确保细胞无细菌、真菌或支原体污染。如果细胞是近期复苏的液氮冻存细胞，请在转染前至少传代两次。

2. 细胞转染

提前将载体-RNP 复合物从 -80°C 转移至 4°C 缓慢解冻，每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ 加入时分多次缓慢加入，加入后轻轻晃动混匀。

对于贴壁细胞的要求：细胞状态好，分布均匀，汇合度为 50%~60%，则可直接加入本产品；

对于悬浮细胞的要求：细胞状态好，加入载体-RNP 复合物前需将细胞团轻柔吹散，分散均匀后直接加入本产品。

3. 分析转染细胞

转染 48h 后，提取所转染细胞的基因组，使用特异性引物扩增靶标区域(扩增子包含 sgRNA 靶向切割的位置)；

使用 TIDE (分析网址：<https://tide.nki.nl/>)或者 ICE (分析网址：<https://ice.synthego.com/#/>，使用说明：<https://www.synthego.com/guide/how-to-use-crispr/ice-analysis-guide>) 等工具进行基因编辑效率分析。



【类器官结果展示】



图1 小鼠舌类器官 (某基因) Sanger 测序比对结果

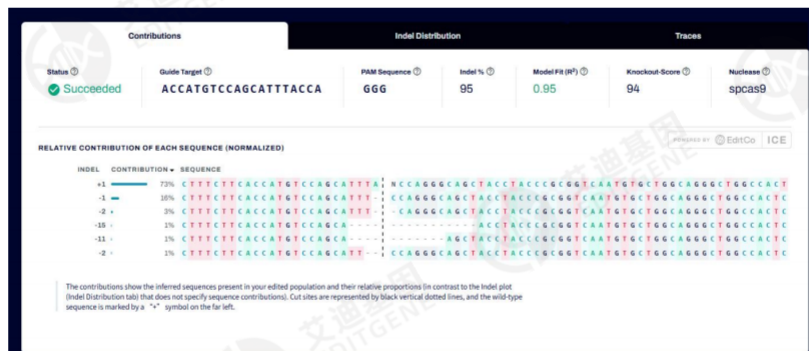


图2 小鼠舌类器官 (某基因) 多克隆 ICE 分析结果

【干细胞结果展示】



图3 hPSC-B4 (B2M) Sanger 测序比对结果

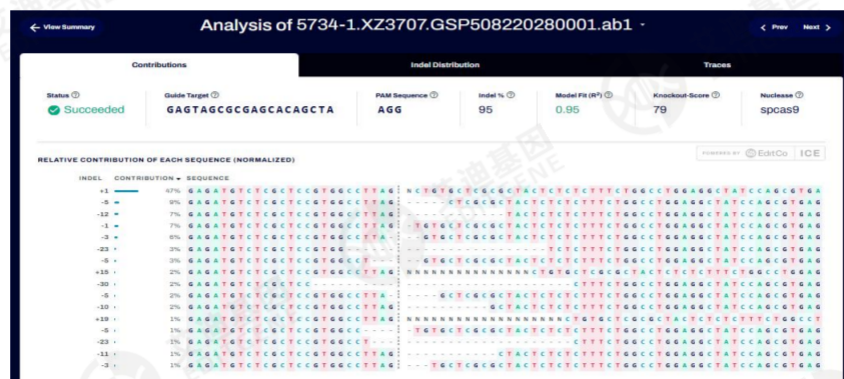


图4 hPSC-B4 (B2M) 多克隆 ICE 分析结果

【部分成功编辑清单】



细胞类型	编辑效率	细胞类型	编辑效率	细胞类型	编辑效率
Raw264.7	100%	SNU-1	90%	H9	75%
CHO-K1	100%	HEK293	90%	SK-N-AS	75%
A9	99%	PANC-1	90%	OCI-Aml3	74%
小鼠舌类器官	98%	SGC-7901	90%	VCaP	74%
JURKAT	97%	HMRSV5	90%	ARPE-19	74%
HK-2	97%	MDA-T32	90%	MM1S	73%
SN4741	97%	HGC-27	89%	K-562	73%
786-0	96%	U-87-MG	89%	A549	73%
U2OS	96%	Caki-1	89%	MKN45	71%
HUH-6	96%	LX-2	89%	HT-1080	71%
UM-UC-3	95%	3T3-L1	89%	SH-SY5Y	66%
U251	95%	KYSE-30	88%	MDA-MB-231	66%
hiPSC-B4	95%	AGS	88%	SNT-8	66%
IBMDM	94%	HLE-B3	88%	LO2	65%
HEC-1-B	94%	143B	87%	AsPC-1	64%
NCI-H1703	94%	MC38	87%	OCI-AML2	64%
SW13	94%	BV2	86%	NCI-H460	61%
NALM6 clone G5	94%	NCI-H716	86%	hepg2	61%
hela	93%	NCI-H1299	85%	HT-29	61%
Huh7	93%	SNU-449	84%	MB49	57%
DLD-1	92%	KMRC-1	84%	PC-3	52%
DMS-273	92%	SVG p12	84%	SW579	52%
HEK293T	92%	MOLM-13	84%	5637	52%
Hap1	92%	U-937	83%	THP-1	51%
A673	92%	KMS-12-PE	83%	HEL	50%
Ishikawa	92%	CACO-2	82%	CAL-33	48%
SNU-398	91%	CAL-27	82%	SK-N-SH	48%
RKO	91%	JAR	81%	Calu-3	47%
KYSE150	91%	NIH/3T3	81%	A375	46%
SK-BR-3	91%	MPC5	80%	FaDu	44%
2V6.11	91%	RD	79%	OE33	42%
MDA-T41	91%	NCTC929	79%	NCI-H3122	42%
ID8	91%	GBC-SD	78%	KLE	42%
HuCC1	90%	HCT-116	77%	C2C12	42%
SK-OV-3	90%	NCI-H520	75%	OVCAR-3	40%



【常见问题及解答】

1. 如何证明无需筛选仍能获得高编辑效率？

答：本产品已在多个细胞上验证，RNP 系统在转染后 4 小时内即进入细胞发挥作用，Cas9 蛋白在 24-48 小时降解，通过瞬时高效表达实现编辑，无需持续筛选。

2. 为何对细胞的损伤比较小？

答：本产品采用先进的生物分子转染技术，相比传统化学转染法的毒性及电转法的物理冲击，具有显著优势。

3. 能否在悬浮细胞中达到相同效率？

答：通常而言，悬浮细胞转染难度相对较大。然而，本产品凭借卓越性能，不仅适用于贴壁细胞，在悬浮细胞中同样表现出色。以 Jurkat 细胞为例，转染 48h 后即可实现高达 97% 的编辑效率，充分彰显了本产品对悬浮细胞转染方面的高效率优势，可充分满足您对悬浮细胞转染的高标准需求。

4. 若使用试剂盒敲除失败，该如何处理？

答：使用本试剂盒进行基因敲除时，若出现敲除失败的情况，艾迪基因将不收取试剂盒费用，同时，您所支付的试剂盒费用可直接转为艾迪基因提供的基因敲除服务费用，确保您在基因编辑实验中无后顾之忧。

注：使用该产品发表文章时，请标注我司名称 Guangzhou Editgene Co., Ltd, China, CRISPR RNP KO kit (CAS: EDKO-K05)

