華中農業大學 作物遗传改良全国重点实验室
National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University
农业农村部农业基因组学重点实验室（武汉）

基因编辑
操作手册

华中农业大学作物遗传改良全国重点实验室
湖北洪山实验室
棉花遗传改良团队

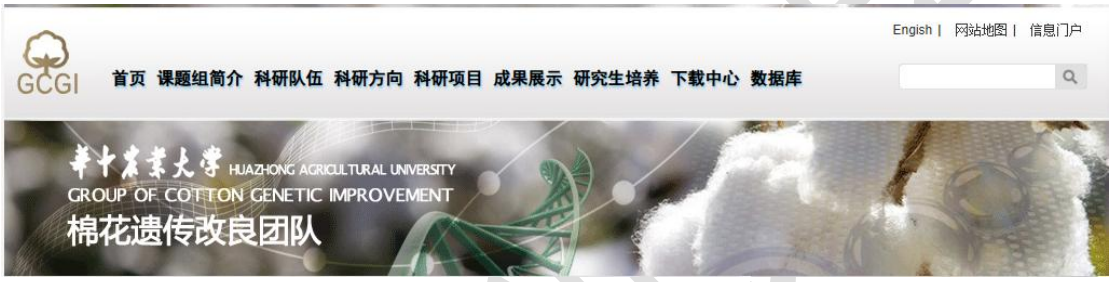
二〇二五年六月·武汉

基因编辑平台
GENOME EDITING PLATFORM

华中农业大学

目录

棉花遗传改良团队：https://cotton.hzau.edu.cn/



湖北洪山实验室：https://hbhs.hzau.edu.cn/

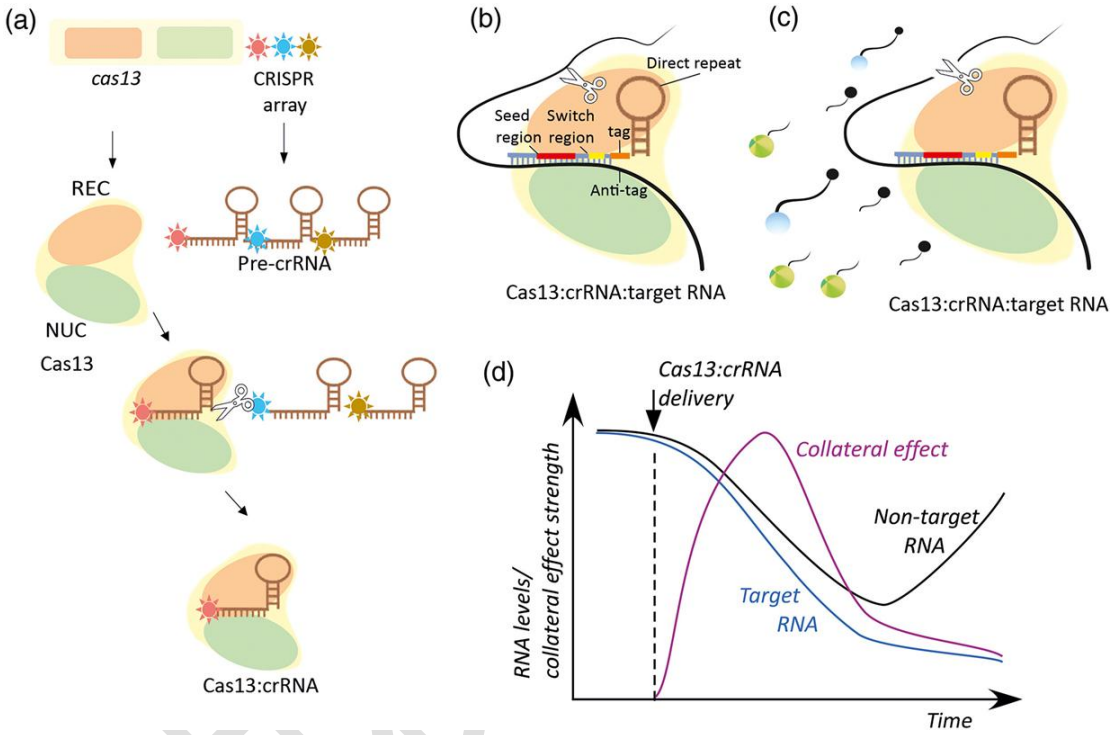
基因编辑平台：http://jinlab.hzau.edu.cn/GenomeEditingPlatform/

CRISPR/Cas13 protocol（中文版）

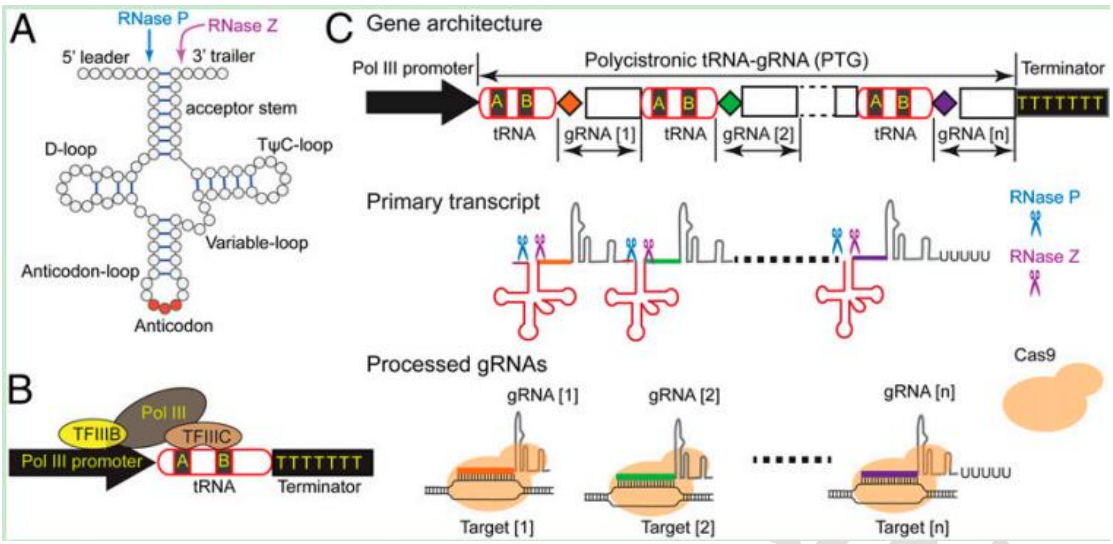
——以 CLA 为例

1.基本原理

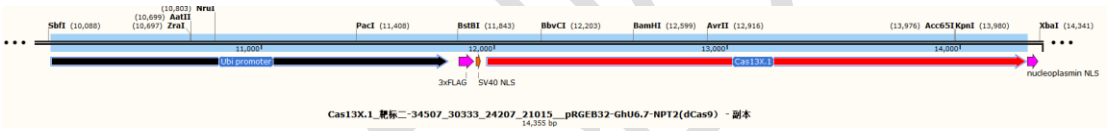
Cas13/crRNA 可以靶向任何转录本/RNA 进行降解。



我们采用的载体[1]可以串联多个 tRNA+靶标+实现多重敲低（下图 C），从而提高突变效率，植物体自身的 RNase P 和 RNase Z 分别切割 tRNA 的 5’端和 3’端（如下图 A），可以将多个靶标（引导序列）的 crRNA 释放，与目标序列互补后，Cas13/crRNA 切割靶 RNA 链。

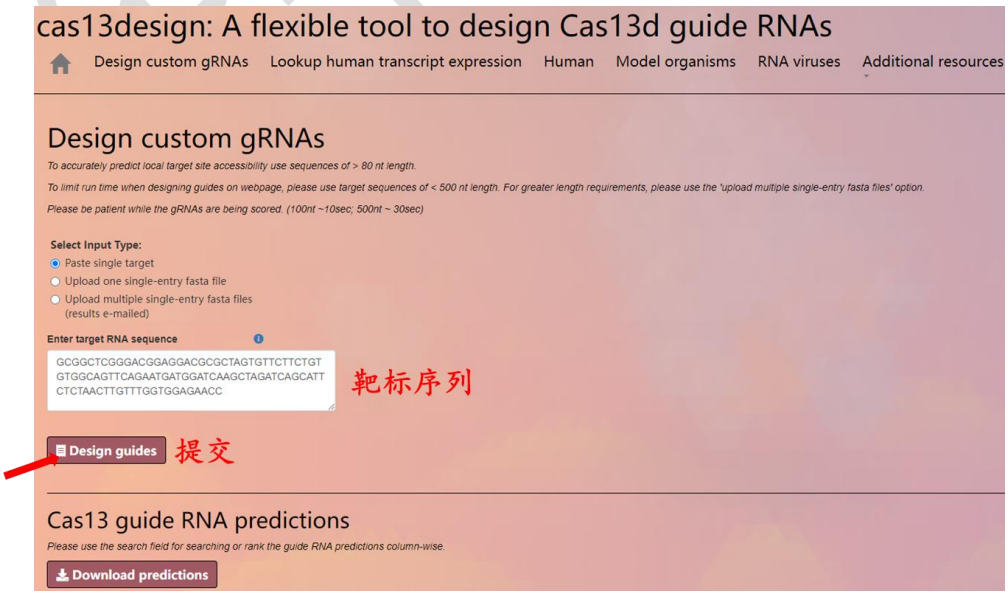


目前我们实验室在 PRGEB32 载体基础上，将真核中抗性标记潮霉素替换为卡纳抗性，以及引导 crRNA 转录的棉花内源 U6 启动子（编号为 U6-7），但驱动 Cas13 表达的依然是水稻 Ubiquitin2 启动子，原核中的抗性均为 kan。以下主要以 U6-7 启动子载体连接两个靶标位点，针对同一基因为例介绍载体构建过程。



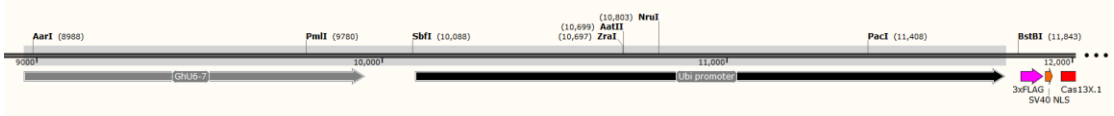
2.搜索靶标以及设计引物

利用 Cas13 design（https://cas13design.nygenome.org/）进行搜索靶标，选择分数最高序列即可，仅供参考。可以进行手动搜索， Blast 后，具有特异性的序列可以作为靶标



ATGGCCCTTTGTGCATCTTCATTTCCTGCCATTATCAACTGGGGTGCAGCTT
CAGATCCTCAAAAATCCACTCCTTTTGCTTCCCATTTTCTTGGTGGATCAGA
TCTGGTTTTGCAGCCATTGAAGAAGCTCAATCAGGTCAAGAAAAGGCCAG
GTGGGGTTTATGCATCACTATCAGAAGGAGCTGAATATCACTCCCAAAGAC
CAGCAACGCCTCTCTTGGACACTATAAACTATCCAATTCATATGAAAAATCT
CTCTGTCAAGGAACTGAAACAACTATCTGAAGAACTGCGGTCTGATGTGAT
TTTCAATGTTTCAAAAACTGGGGGTCACTTGGGTTCAAGCCTTGGTGTGGT
TGAACTCACTGTGGCTCTTCATTATGTCTTCAATGCCCCTAGAGACAAGATA
TTGTGGGATGTTGGTCATCAGTCTTACCCTCACAAAATCTTGACTGGGAGA
AGACATAAGATGCATACCATGAGGCAAACTAATGGATTGGCCGGATTCACG
AAACGGTCGGAGAGTGAATACGATTGCTTCGGGACTGGTCACAGTTCAAC
CACAATCTCTGCAGGCTTGGGGATGGCTGTGGGAAGGGATCTGAAAGGTG
AAAGGAATCATGTTGTTGCTGTCATAGGTGATGGTGCTATGACTGCAGGAC
AAGCTTACGAAGCAATGAACAATGCCGGATATCTTGATTCTGATATGATTGT
TATTCTTAATGACAATAAACAAGTTTCTCTGCCAACTGCCAATCTC

插入目标序列连接在载体图方框所示 Bsa I 酶切位点和 sbf1 酶切位点之间。



crRNA direct repeat/Cas13x.1

GCTGGAGCAGCCCCCGATTTGTGGGGTGATTACAGC

*aagcatcagatgggca*AACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGC
CACGGTACAGACCCGGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA*CATAGGCCCACCGA*
*TTTGCT*GCTGGAGCAGCCCCCGATTTGTGGGGTGATTACAGCAACAAAG
CACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGT
TCGATTCCCGGCTGGTGCA*GTGAAGTTCGATCCGGCAAC*GCTGGAGCAGCC
CCCGATTTGTGGGGTGATTACAGC*tgcaggtccacaaat……*

注：小写部分是载体序列；下划线部分是 tRNA;红色部分为 crRNA;蓝色部分是 DR 序列；斜体部分是靶标位置。

建议直接合成，单靶标参考序列如下

*aagcatcagatgggca*AACAAAGCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA*GTGAAGTTCGATCCGGCAAC*GCTGGAGCAGCCCCCGATTTGTGGGGTGATTACAGC*tgcaggtccacaaat……*

如需扩增，引物序列如下：

pRGEB32-7 s: 5’ *aagcatcagatgggca*AACAAAGCACCAGTGGTCTAG3’

Inf-cla as：5’ *atttgtggacctgca*CTGTAATCACCCCACAAATC 3'

3.载体 酶切：

	100μl 体系:
Cas13	10μg
10X cut smart Buffer	10μl
BSA1	2 μl
Sbf1	2 μl
ddH_2O	up to 100μl

37℃ 酶切 5.5h

电泳检测酶切效果、使用凝胶回收的试剂盒对酶切产物进行纯化、测浓度。

4. In-fusion 连接:

目的片段	100ng
线性化表达载体	100ng
Exnase	0.5μl
CE Buffer	1μl

37℃水浴 30min，冰上放置 5min，可-20℃保存备用

5.转化感受态

连接产物与感受态混合，冰上放置 30min，42℃热激 90S，冰上静置 5min。取 300μlSOC 加入新的 2ml 离心管，将热激产物加入 SOC 中，37℃震荡 45min，

涂于 KAN 皿，37℃培养过夜，挑单克隆于 500μl kan 抗性液体 LB,37℃震荡 3h,

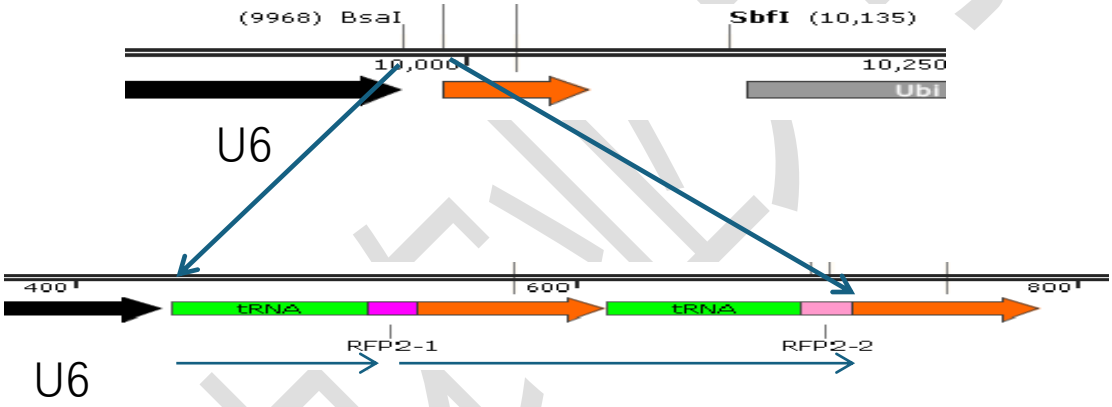
使用 U6--7 s 和 ubi-as 引物阳性检测，电泳跑胶，挑阳性送测序（**GC rich**）.
阳性检测引物/测序引物
u6-7 s: TGTGCCACTCCAAAGACATCAG

Ubi-as: TGTTGGTCGCCGTTAGGA

阳性检测电泳图：

5K 阴 阳

双靶标构建成功载体图：



6. 电转

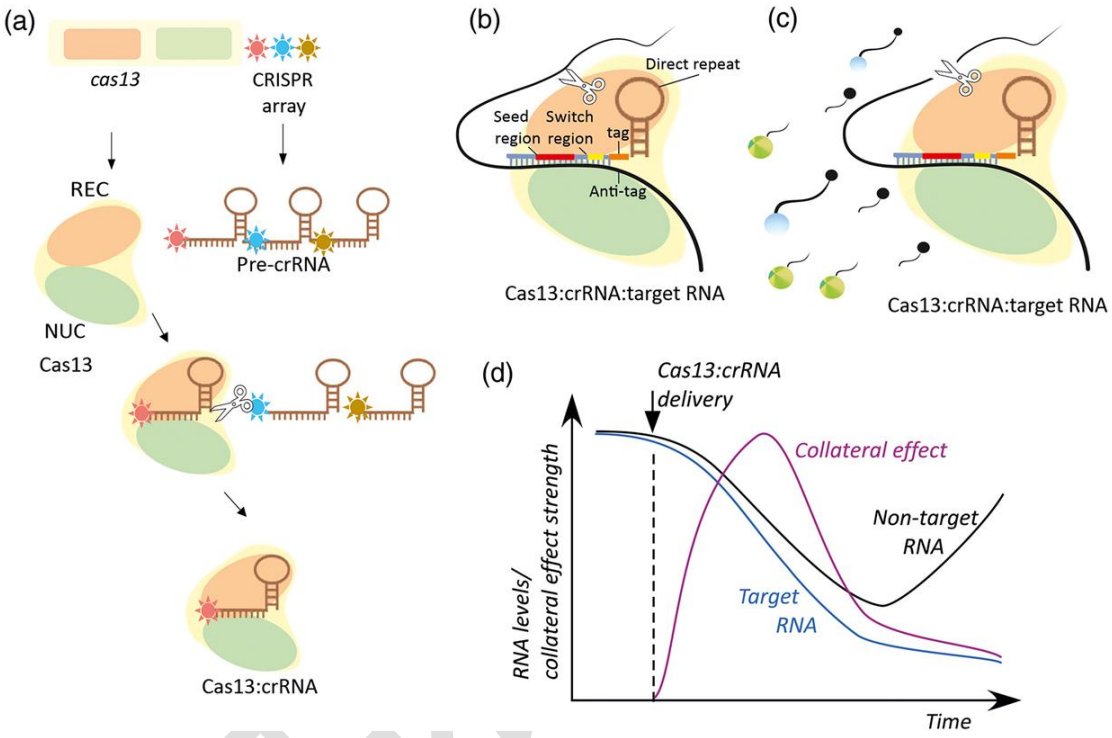
测序成功后，电转农杆菌
阳性检测引物
u6-7 s: TGTGCCACTCCAAAGACATCAG + Inf XX AS
u6-9 s: GTCAAAAACTATCCCACATTGCTAA + Inf XX AS

CRISPR/Cas13 protocol（英文版）

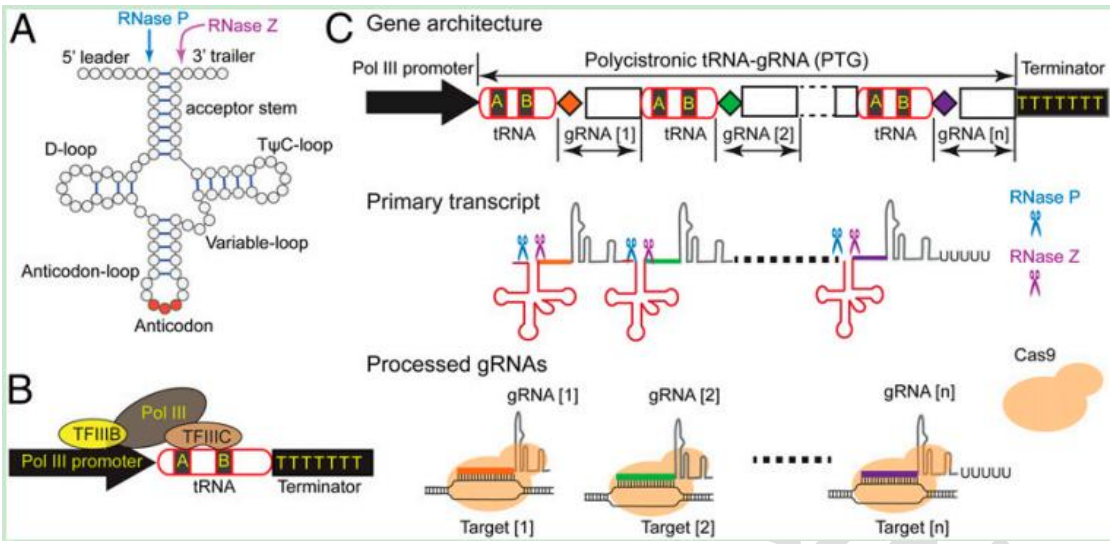
——Using CLA as an Example

1. Basic Principles

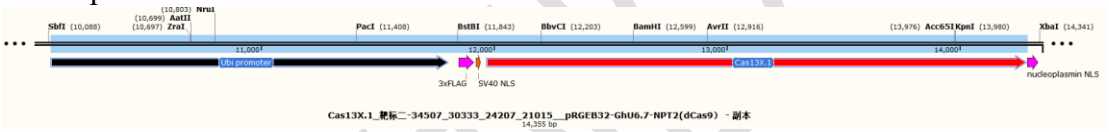
Cas13/crRNA can target any transcript/RNA for degradation.



Our vector system allows tandem integration of multiple **tRNA + target + crRNA** units (Fig. C), enhancing mutation efficiency. Plant endonucleases RNase P and RNase Z cleave the 5' and 3' ends of tRNA (Fig. A), releasing crRNAs that guide Cas13/crRNA to cleave the target RNA at the specified site.

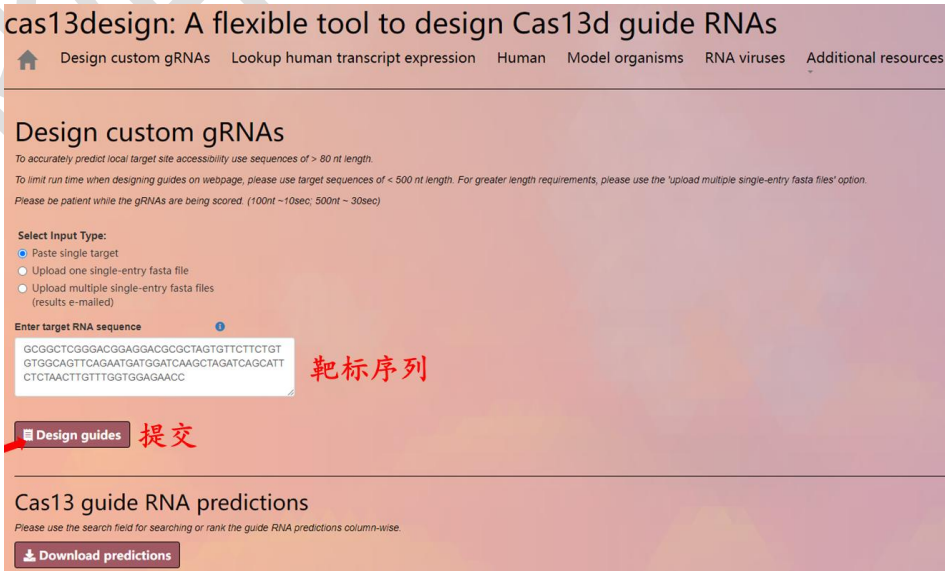


In our lab, we modified the pRGEB32 vector by replacing the kanamycin resistance marker with hygromycin and incorporating the cotton endogenous U6 promoters (U6-7) for crRNA transcription. The protocol below focuses on constructing a vector with two target sites under the U6-7 promoter using rice Ubiquitin2 as the Cas13 promtor.



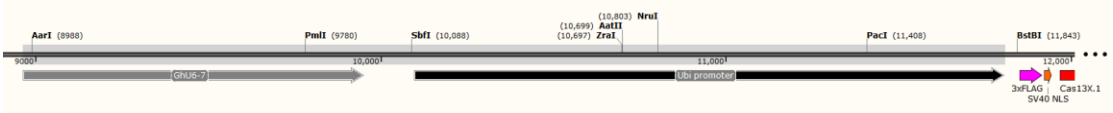
2. Target Search and Primer Design

CLA Sequence and Targets: Use the Cas13 design website (https://cas13design.nygenome.org/) to search for targets . Alternatively, manually BLAST sequences for specificity.



ATGGCCCTTTGTGCATCTTCATTTCCTGCCATTATCAACTGGGGTGCAGCTT
CAGATCCTCAAAAATCCACTCCTTTTGCTTCCCATTTTCTTGGTGGATCAGA
TCTGGTTTTGCAGCCATTGAAGAAGCTCAATCAGGTCAAGAAAAGGCCAG
GTGGGGTTTATGCATCACTATCAGAAGGAGCTGAATATCACTCCCAAAGAC
CAGCAACGCCTCTCTTGGACACTATAAACTATCCAATTCATATGAAAAATCT
CTCTGTCAAGGAACTGAAACAACTATCTGAAGAACTGCGGTCTGATGTGAT
TTTCAATGTTTCAAAAACTGGGGGTCACTTGGGTTCAAGCCTTGGTGTGGT
TGAACTCACTGTGGCTCTTCATTATGTCTTCAATGCCCCTAGAGACAAGATA
TTGTGGGATGTTGGTCATCAGTCTTACCCTCACAAAATCTTGACTGGGAGA
AGACATAAGATGCATACCATGAGGCAAACTAATGGATTGGCCGGATTCACG
AAACGGTCGGAGAGTGAATACGATTGCTTCGGGACTGGTCACAGTTCAAC
CACAATCTCTGCAGGCTTGGGGATGGCTGTGGGAAGGGATCTGAAAGGTG
AAAGGAATCATGTTGTTGCTGTCATAGGTGATGGTGCTATGACTGCAGGAC
AAGCTTACGAAGCAATGAACAATGCCGGATATCTTGATTCTGATATGATTGT
TATTCTTAATGACAATAAACAAGTTTCTCTGCCAACTGCCAATCTC

Insert the target sequence and ligate between the two Bsa I digestion sites and Sbf1 shown in the box of the vector diagram. The final ligation method is the one-step cloning method.



crRNA direct repeat/Cas13x.1
GCTGGAGCAGCCCCCGATTTGTGGGGTGATTACAGC

*aagcatcagatgggca**AACAAA*GCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGC
CACGGTACAGACCCGGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA*CATAGGCCCACCGA*
*TTTGCT*GCTGGAGCAGCCCCCGATTTGTGGGGTGATTACAGCAACAAAG
CACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGT
TCGATTCCCGGCTGGTGCA*GTGAAGTTCGATCCGGCAAC*GCTGGAGCAGCC
CCCGATTTGTGGGGTGATTACAGC*tgcaggtccacaaat……*

notes：Note: Lowercase = vector backbone; underscores = tRNA; bold = crRNA; italics = target site； crRNA in red.

Direct synthesis is recommended, single-target reference sequences are available upon request.

*aagcatcagatgggca**AACAAA*GCACCAGTGGTCTAGTGGTAGAATAGTACCCTGCCACGGTACAGACCCGGGTTCGATTCCCGGCTGGTGCA*CATAGGCCCACCGATTTGCT*GCTGGAGCAGCCCCCGATTTGTGGGGTGATTACAGC*tgcaggtccacaaat……*

pRGEB32-7 s: 5’ *aagcatcagatgggca*AACAAAGCACCAGTGGTCTAG3’

Inf-cla as： 5’ *atttgtggacctgca*CTGTAATCACCCCACAAATC 3'

3. Vector Digestion

Digest the vector with BsaI.

Reaction Mixture (100 µL):

	Volume (µL):
Cas13	10µg
10X cut smart Buffer	10µl
BSA1	2 µl
Sbf1	2 µl
ddH_2O	up to 100µl

Digestion: 37°C for 5.5 h.

4. In-Fusion Cloning

Assemble the digested vector and insert using In-Fusion technology.

Components:

- **Insert (100 ng)**
- **Linearized vector (100 ng)**
- **Exnase (0.5 µL)**
- **CE Buffer (1 µL)**

Incubation: 37°C for 30 min, then ice for 5 min. Store at -20°C.

5. Transformation

Transform competent cells with the ligation product.

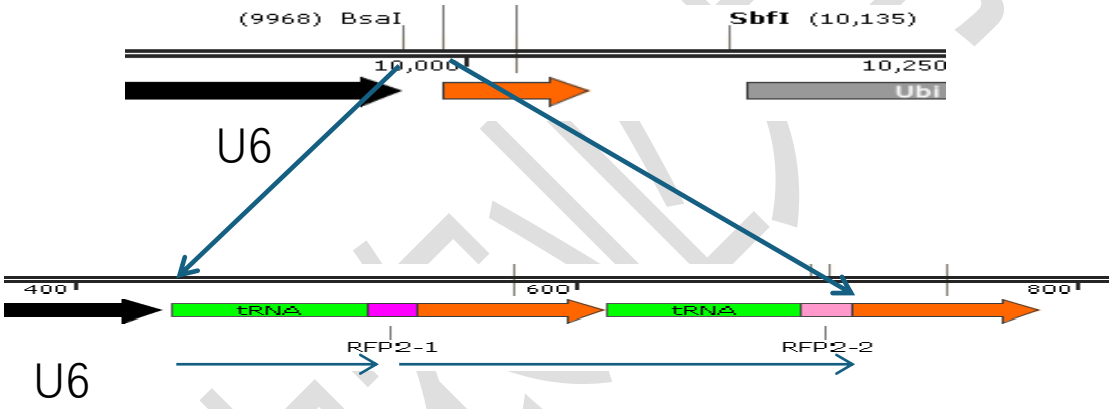
Mix with SOC medium and incubate at 37°C for 45 min.

Plate on kanamycin agar plates and incubate overnight.

Pick colonies for PCR validation using primers:

u6-7 s: 5’ TGTGCCACTCCAAAGACATCAG 3’

Ubi-as: 5’ TGTTGGTCGCCGTTAGGA 3’



Construct a successful carrier diagram：

6. Agrobacterium Electroporation

Electroporate the verified construct into *Agrobacterium*.