

使用Cas9kit配套筛选载体对阳性细胞进行筛选

产品名称	使用Cas9kit配套筛选载体对阳性细胞进行筛选
公司名称	北京英茂盛业生物科技有限公司
价格	面议
规格参数	品牌:英茂盛业
公司地址	北京市昌平区沙河镇青年创业大厦B-916
联系电话	010-62495135 13681365274

产品详情

实验原理

pEGFP/puro为提高基因敲除
实
验中
阳性细胞
检出率设计的载体
, 表达EGFP荧光蛋白和puromycin抗
性基因。使用时pEGFP/puro与pCas9/gRNA1载体或者pCas9
/gRNA3载
体共转染, 用荧光标
签或者嘌呤霉素对转染后的细胞进行初步
筛选, 可以显著提高基因敲除
成功细胞的阳性率, 减少后续细胞克隆检测数量。这个步骤对于转染效率较低的细胞尤其有效。

简要步骤

设计靶点 构建pCas9/gRNA1载体 与pEGFP/puro共转染目的细胞 嘌呤霉素筛选2-3天 阳性细胞克隆
扩增 检测基因敲除效果

靶点设计和基因敲除载体构建

方法请参考pCas9/gRNA1载体说明书或者Cas9试剂盒说明书。

实验步骤

1) 转染前24小时将293T铺到6孔板中。 2) 按照下列体系制备质粒稀释液

pCas9/gRNA1 0.8ug
pEGFP/puro 0.08ug
DMEM培养基X ul
总体积50ul

3) 准备转染试剂稀释液： Polyfect-V转染试剂 1.6ul DMEM培养基 48.4ul 4) 将质粒稀释液和转染试剂稀释液分别混匀。取50ul转染试剂稀释液分别加入两组质粒稀释液中，充分混匀，室温孵育15min。 5) 将转染液加入293T细胞。 6) 24小时后加入puromycin至合适浓度。 7) 筛选3天后消化细胞，用有限稀释法将细胞接种到96孔板，标记单个细胞的孔，做单克隆细胞培养。培养时不加puromycin。 8) 约7-10天，细胞形成克隆。消化细胞，将部分细胞继续培养，部分细胞提取基因组DNA检测基因敲除结果。

用到的产品：

pTYNE载体 货号：CR1011

pCas9/gRNA1载体 货号：CR1001