

# 构建稳定Cas9过表达293T细胞系

产品名称	构建稳定Cas9过表达293T细胞系
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

### 一、试剂

1. 细胞培养基及其他细胞培养所需试剂。
2. 转染辅助试剂Polybrene（用水配制为6mg/ml，-20℃冻存）。
3. Cas9表达慢病毒（制备方法见Cas9慢病毒包装实验）。
4. 嘌呤霉素或者G418。

### 二、实验步骤

- 1、转染前24小时将293T以适当密度铺板到12孔板。感染病毒时细胞密度在80%左右。
- 2、取出制备好的Cas9表达慢病毒（pLV-Cas9-Puro包装得到，制备方法见Cas9慢病毒包装实验），室温融化。按照下面的方法准备慢病毒感染液：以感染1个12孔板细胞（细胞培养基体积1ml）为例，病毒液50ul，细胞完全培养基到950ul，加入Polybrene到终浓度为6ug/ml。
- 3、用病毒感染液替换原细胞培养基，继续培养24小时。用新鲜的培养基替换病毒感染液。
- 4、病毒感染48小时后，转入的基因开始表达。这时可以加入嘌呤霉素至终浓度为3ug/ml。
- 5、在筛选过程中为维持抗生素合适的浓度和细胞营养，每隔2-3天应该换液一次，去除死细胞，补加抗生素。
- 6、大约6-7天，细胞不再死亡。扩大培养筛选得到的细胞，进行检测。

### 三、PCR检测细胞基因组中的Cas9基因

用基因组PCR检测293T-Cas9细胞中的Cas9基因。

鉴定引物： Cas9-F： ACAGTCTTCACGAGCACATC Cas9-R： TCCTCTTCATCCTTTCCCTA  
产物大小198bp

步骤：

1、 分别提取293T-Cas9细胞和293T细胞的基因组DNA。 2、 PCR扩增 反应体系： 2 × Taq Mix 25ul  
Cas9-F ( 10uM ) 2ul Cas9-R ( 10uM ) 2ul 基因组模板 5ul 加水补足50ul

反应条件： 95 预变性5min； 95 30sec， 55 30sec， 72 30sec， 35个循环。 3、 电泳检测PCR产物

M： DL2000 DNA marker 1： 293T-Cas9扩增产物 2： 293T扩增产物

#### 四、 相关实验

Cas9表达慢病毒包装 用pTYNE载体验证Cas9过表达细胞系

#### 五、 相关产品

Cas9稳定表达细胞系