

pCas9 gRNA3基因敲除载体对照实验

产品名称	pCas9 gRNA3基因敲除载体对照实验
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

pTYNE载体

在EGFP编码框上游有

2个错码的ATG起始密码子，由于不能有效地启动EGFP表达，pTYNE转染细胞仅能发出很微弱的荧光。

pCas9/gRNA3载体需要成对发挥作用。我们根据pTYNE载体设计构建了pCas9/gRNA3

阳性对照载体pCAS9-Pf、pCas9-Pr

。由于Cas9NICKnase对一个靶点切割后形成的DNA单链断裂会被修复，几乎不会引起DNA序列改变。我们用pCAS9-Pf与pTYNE共转染作为阴性对照组，pCAS9-Pf、pCas9-Pr

与pTYNE三个质粒共转染作为阳性对照组。pCAS9-Pf、pCas9-Pr共同切割pTYNE载体，使pTYNE载体DNA双链断裂，经细胞修复后，突变的pTYNE

将表达出读码框正确的EGFP蛋白，发出明亮的绿色荧光。

pCas9/gRNA3阳性对照载体（pCas9-Pf）靶序列：CGAAGCTTGAGCTCGAGCCA。

pCas9/gRNA3阳性对照载体（pCas9-Pr）靶序列：TACCGCGGGCCCGGGATCCT。

Pf、Pr靶点在pTYNE载体上的位置:

Cas9Nicknase切割原理:

实验内容

1、实验材料

pTYNE质粒（验证载体，无内毒素试剂盒制备；货号：CR1011）
pCas9-Pf质粒（pCas9/gRNA3阳性对照，货号：CR1012，无内毒素试剂盒制备）
pCas9-Pr质粒（pCas9/gRNA3阳性对照，货号：CR1012，无内毒素试剂盒制备） Polyfect-V转染试剂（货号：P2010-1） 293T细胞系

2、实验步骤

1) 转染前24小时将293T铺到24孔板中。同时准备2个孔。

2) 按照下列体系制备2个质粒稀释液

组A	组B
pTYNE 0.4ug	pTYNE 0.4ug
pCas9-Pf 0.4ug	pCas9-Pf 0.2ug
-	pCas9-Pr 0.2ug
DMEM培养基X ul	DMEM培养基 X ul
总体积50ul	总体积50ul

3) 准备转染试剂稀释液：

Polyfect-V转染试剂 3.2ul

DMEM培养基 96.8ul

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) 48小时后检测EGFP荧光表达。

实验结果