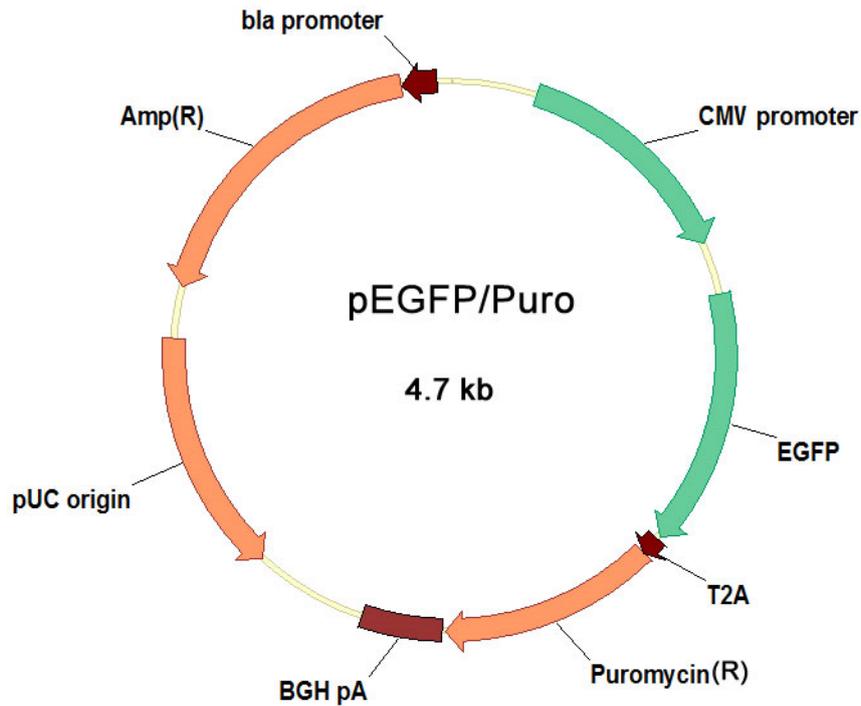


pEGFP/Puro

Cat. No.CR1020

EGFP Puromycin(R)表达载体



pEGFP/Puro 表达人源密码子优化的 EGFP 基因和 puromycin 抗性基因，可用于与 pCas9/gRNA 载体共转染细胞，用荧光标签或者抗生素筛选阳性细胞。可以配合 Cas9 表达载体或者 Cas9 过表达细胞系实现基因敲除。载体表达的 Puromycin 抗性基因可以提供抗生素筛选阳性细胞，EGFP 荧光标签可以用于流式细胞仪筛选阳性细胞。

载体特性：

类型：EGFP、puromycin (R) 双标载体

基因启动子：CMV promoter

真核抗性：Puromycin (R)

荧光标签：EGFP

原核抗性：Ampicillin

使用方法:

构建好的一个 pCas9/gRNA1 载体或者 1 对 pCas9/gRNA3 载体转染细胞对细胞基因组 DNA 定点切割, 发生基因突变或者敲除。为了减少后续对细胞株进行检测的工作量, 提高敲除成功细胞的比例, 我们推荐将 pCas9/gRNA 载体与筛选载体 pEGFP/puro 共转染细胞, 通过筛选载体上的抗性基因和荧光信号对转染阳性细胞进行初步筛选, 再从中筛选出基因敲除成功的细胞。

1 嘌呤霉素浓度测试

嘌呤霉素是一种快速高效的筛选抗生素。不同的细胞株对嘌呤霉素的耐受度不同, 不同批次和厂家的抗生素效力也有不同。为了得到理想的筛选效果, 需要在实验前对嘌呤霉素的筛选浓度进行测试。

通常嘌呤霉素的作用范围在 0.5ug/ml~10ug/ml。

测试方法:

- 1、在加入筛选药物前一天将细胞以 50%密度接种到 6 孔板。第二天在培养基中加入嘌呤霉素到终浓度分别为 0; 1; 2.5; 5; 7.5; 10 μ g/ml。
- 2、用嘌呤霉素处理 4-7 天。每 2 天更换新的有抗生素的培养基。选择 3-4 天细胞全部死亡的抗生素浓度为筛选浓度。

2 pCas9/gRNA1 与 pEGFP/puro 载体共转染目的细胞及筛选

- 1、转染前 24 小时将目的细胞铺到 6 孔板中。
- 2、按照下列体系制备质粒稀释液
pCas9/gRNA1-P531 0.8ug
pLV-EGFP (2A) puro 0.1ug
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质粒稀释液中, 充分混匀, 室温孵育 15min。
- 5、将转染液加入细胞培养基。
- 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。