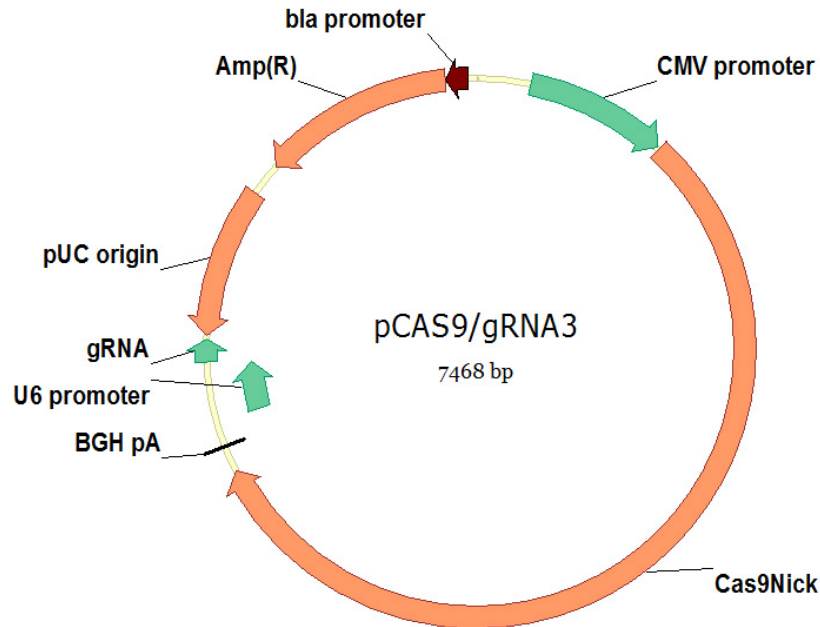


pCas9/gRNA3

Cat. No.CR1004

CRISPR-Cas 基因敲除质粒



pCas9/gRNA3 载体用于动物细胞基因敲除。该载体表达的 Cas9Nickase 蛋白是野生 Cas9 蛋白的 D10A 突变体。与野生型 Cas9 蛋白不同，Cas9Nickase 蛋白结合 gRNA 后对 DNA 进行单链切割，产生一个 DNA 缺口。单独 Cas9Nickase 产生的缺口产生的缺口一般会被修复，不会产生 DNA 突变。使用一对 gRNA 同时对 DNA 进行切割，可使 DNA 断裂，从而通过同源重组或者邻端接合产生实现基因敲除。

pCas9/gRNA3 载体中有 U6 启动子启动的 gRNA 表达框可以同时实现 gRNA 和 Cas9Nickase 蛋白同时表达。

载体特性:

类型: 哺乳动物细胞基因载体

基因启动子: U6 promoter

原核抗性: Ampicillin

用法简介

pCas9/gRNA3 载体中含有 gRNA 序列 3' 端 49bp 序列及 polyT 终止信号。gRNA 包括基因特异靶序列的 5' 端序列通过载体中 EcoRV 酶切位点连接到载体上。连接后的完整序列见下：

U6 promoter→

```
tcttggaaaggacGATACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG  
CTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTCTTTTTT
```

GATATC: EcoRV 克隆位点

AGCTA: 人工插入 gRNA 5' 端序列

NNNNN: 19nt 靶点识别序列

AACTT: gRNA 3' 端序列

TTTTT: PolyT 终止信号

测序引物：

gRNA-F	GACTATCATATGCTTACCGTAACT
gRNA-R	CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA

主要载体元件位置

- CMV promoter: 234–862
- Cas9Nickase CDS: 875–5038
- BGH polyA: 5045-5269
- U6 promoter: 5276-5533
- pUC origin: 5585-6258(complementary)
- Amp (R): 6403 – 7263 (complementary)

原核培养特性

pCas9/gRNA3 载体为高拷贝质粒，带有氨苄抗性基因，可以在含有 100 µg/ml 氨苄抗生素的 LB 培养基中增殖。宿主菌可以采用 DH5α, JM109, TOP10 等常见大肠杆菌菌种。