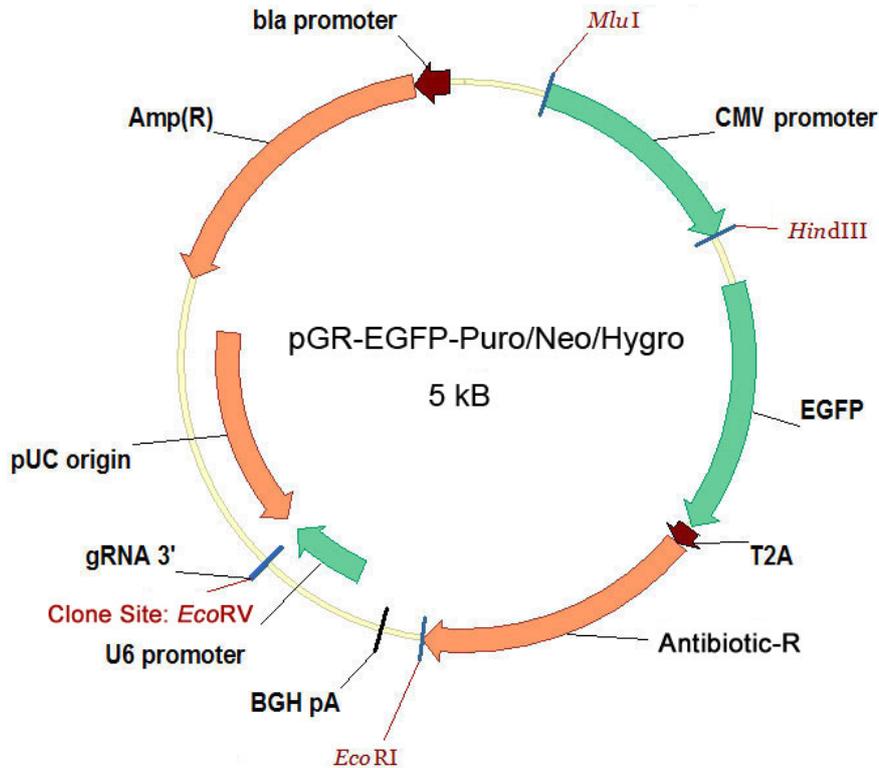


pGR-EGFP-Puro/Neo/Hygro

gRNA 表达载体



pGR-EGFP 载体包括 pGR-EGFP-Puro, pGR-EGFP-Neo 以及 pGR-EGFP-Hygro 三个载体。pGR-EGFP 载体表达 CRISPR/Cas9 基因敲除系统中的 gRNA, 用于表达根据基因敲除靶点设计的 gRNA。gRNA 与 Cas9 蛋白结合后, 可以实现 Cas9 蛋白对指定靶点的基因组 DNA 进行切割, 通过邻端接合效应 (NHEJ, nonhomologous end-joining) 实现基因敲除。也可在基因重组同源序列存在的情况下, 通过同源重组实现基因的定点突变或者敲入。载体表达的抗性基因可辅助进行阳性细胞筛选。载体同时表达 EGFP 荧光标签, 可以通过流式细胞技术进行阳性细胞分选。

| 货号 | 品名 |
|--------|----------------|
| CR2014 | pGR-EGFP-Puro |
| CR2015 | pGR-EGFP-Neo |
| CR2016 | pGR-EGFP-Hygro |

载体主要原件说明:

CMV promoter: 常用的动物基因启动子, 在 pGR-EGFP 载体中启动抗性基因表达。

EGFP: 绿色荧光蛋白标签。表达产生绿色荧光, 可以观察转染效率及用流式细胞仪筛选阳性细胞。

T2A: 蛋白剪切信号。

Antibiotic(R): 抗药基因。现有的 3 个 pGR 载体有不同的抗药基因, 分别是 puromycin R, neomycin R,

hygromycin R。可以采用对应的抗生素进行转染阳性细胞筛选。

U6 promoter: III 类 RNA 启动子, 启动小分子 RNA 转录。在 pGR 载体中, U6 启动子启动 gRNA 转录。

gRNA 3': 含有 gRNA 载体构建克隆位点 EcoRV 和 gRNA3' 端序列。在插入靶点序列后形成完整的 gRNA。

Amp (R): Ampicillin 原核抗性。

用法简介

pGR-EGFP 载体仅表达 gRNA (guide RNA), 需要与 Cas9 蛋白表达载体或者 Cas9 蛋白表达细胞系配合才能发挥作用。我公司现有慢病毒 Cas9 表达载体以及 Cas9 蛋白表达 293V 细胞系。配套的载体和细胞见附表。

pGR 系列载体中含有 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, 形成完整 gRNA 载体序列后发挥功能。连接后的完整序列见下:

U6 promoter
 tcttgtggaaggac **GAT**ACACCG **NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN**GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG
 CTAGTCCGTT**ATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTCTTTTTT**
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: gRNA3' 端序列
TTTTT: PolyT 终止信号

测序引物:

gRNA-F GACTATCATATGCTTACCGTAACT
 gRNA-R CAAGTTGATAACGGACTAGCCTTA

附表: 配套产品

| 货号 | 品名 | 说明 |
|--------|----------------------------|---|
| CR3001 | pLV-Cas9-Puro | 慢病毒载体, 表达 Cas9 和 Puromycin 抗性基因 |
| CR3002 | pLV-Cas9-Neo | 慢病毒载体, 表达 Cas9 和 Neomycin 抗性基因 |
| CR3003 | pLV-Cas9-Hygro | 慢病毒载体, 表达 Cas9 和 Hygromycin 抗性基因 |
| CR3004 | pLV-Cas9Nick-Puro | 慢病毒载体, 表达 Cas9Nickase 和 Puromycin 抗性基因 |
| CR3005 | pLV-Cas9Nick-Neo | 慢病毒载体, 表达 Cas9Nickase 和 Neomycin 抗性基因 |
| CR3006 | pLV-Cas9Nick-Hygro | 慢病毒载体, 表达 Cas9Nickase 和 Hygromycin 抗性基因 |
| CC1001 | HEK293T-Cas9 | 293T 细胞系, 表达 Cas9 蛋白 |
| CC1002 | HEK293T-Cas9Nickase | 293T 细胞系, 表达 Cas9Nickase 蛋白 |