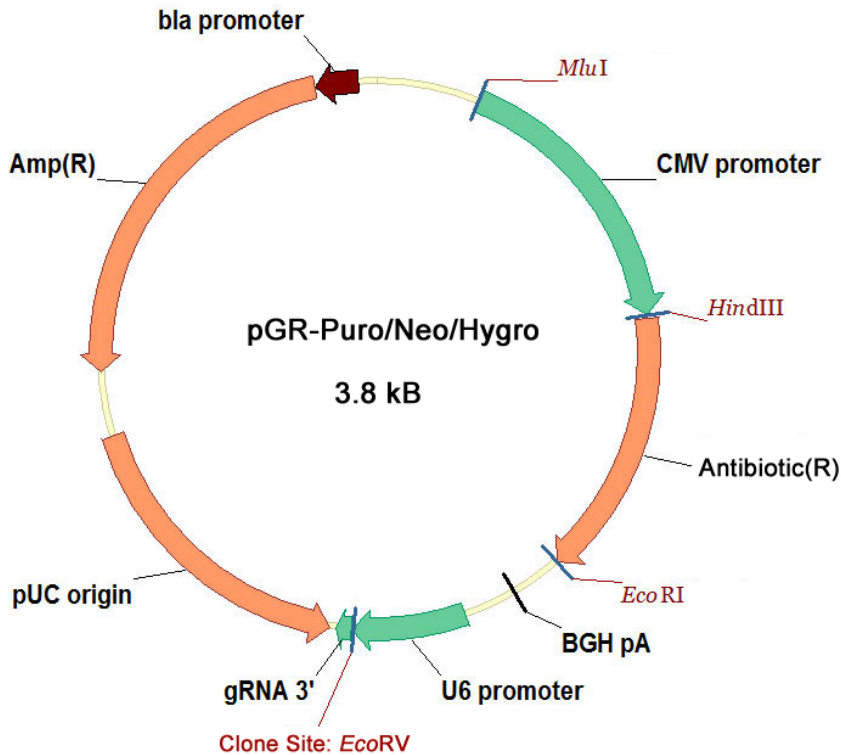


pGR-Puro/Neo/Hygro

gRNA 表达载体



pGR 载体包括 pGR-Puro, pGR-Neo 以及 pGR-Hygro 三个载体。pGR 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。

货号	品名
CR2011	pGR-Puro
CR2012	pGR-Neo
CR2013	pGR-Hygro

载体主要原件说明:

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

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 系列载体仅表达 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 293T 细胞系。配套的载体和细胞见附表。

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 载体序列后发挥作用。连接后的完整序列见下：

U6 promoter →
 tcttgtggaaggacGATACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTAATCAACTTGAAAAAGTGGCACCCAGTCTGGTCTTTTTT

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

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