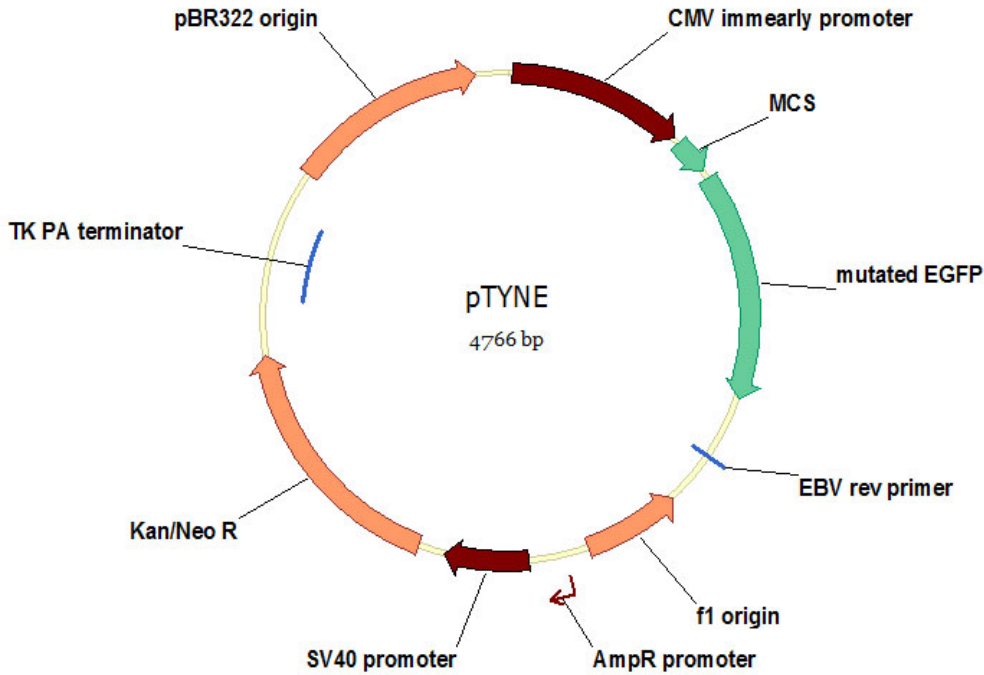


pTYNE

Cat. No.CR1011

基因敲除验证载体



pTYNE 载体中含有起始密码子移位突变，在未发生 DNA 剪切和突变时不能有效表达 EGFP 蛋白，仅有少量本底荧光表达。当 pCas9/gRNA1 载体表达出的 Cas9/gRNA 复合物实现对 pTYNE 质粒的切割后，DNA 断裂引发的 NHEJ 作用即可实现对 EGFP 蛋白的修复，从而产生荧光。通过荧光细胞数量多少，可以直观反映基因敲除效率的高低。pTYNE 载体也可以用于 TALEN 或 ZNF 基因敲除载体的验证。

载体特性:

类型: 哺乳动物细胞基因载体

基因启动子: CMV promoter

标签: 突变 EGFP

原核抗性: Kanamycin

pTYNE 载体多克隆位点序列:

... CMV promoter→

...GCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC

\xrightarrow{NheI} \xrightarrow{SacI} \xrightarrow{PstI} \xrightarrow{KpnI}
 Start codon \xrightarrow{XhoI} $\xrightarrow{HindIII}$ \xrightarrow{EcoRI} \xrightarrow{Sall}
 CGCTAGCCGAAGATGCCACCATGGGCCACCATGGCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCGCAGTCTCGACGGTACCG
 pCas9-P 靶点

\xrightarrow{ApaI} \xrightarrow{BamHI}
 \xrightarrow{SaclI} \xrightarrow{SmaI} \xrightarrow{NotI}
 CCGGCCCGGGATCCTAGGGATAACAGGGTAATAGAAGCGGTGGGTCTGGCGGCGGAGGATCTGCGGCCGCAT

EGFP coding sequence→

GTG AGC AAG GGC GAG GAG CTG TTC ACC GGG GTG GTG CCC ATC CTG GTC GAG CTG GAC
 GGC GAC GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC GTG TCC GGC GAG GGC GAG GGC GAT GCC ACC
 TAC GGC AAG CTG ACC CTG AAG TTC ATC TGC ACC ACC GGC AAG CTG CCC GTG CCC TGG
 CCC...

pTYNE 验证载体构建设计方法: 将含有基因敲除靶点的序列通过载体上的酶切位点插入到 pTYNE 载体中。

☆设计原则:

- 1、插入序列越短, 检测效果越好。插入序列长度不能超过 100bp。原则上每个 pTYNE 载体中仅插入 1 个靶点序列。
- 2、推荐将靶点序列插入到 XhoI、HindIII 酶切位点之间, 插入序列碱基数为 3 的倍数。
- 3、插入序列不能有启动子 ATG。尽量不要有终止子。如果设计困难, 可以有一个终止子。
- 4、靶序列的插入方向可以为正向或者反向。插入方向对检测结果没有影响。

设计举例:

靶点序列: CGTGTAGATAACTACGATACGG

该靶点序列中有 2 个终止密码子 CGTGTAGATAACTACGATACGG。我们采用其反向互补序列进行构建。序列为: CCGTATCGTAGTTATCTACACG

设计插入序列:

加入 2 个碱基补足 3 的倍数, 在两端加上酶切位点。

5' - TCGAGAACCGTATCGTAGTTATCTACACGA - 3'
 3' - CTTGGCATAGCATCAATAGATGTGCTTCGA - 5'

合成引物:

F: 5' - TCGAGAACCGTATCGTAGTTATCTACACGA - 3'

R: 5' - TCGAAGCACATCTATTGATGCTATGCCAAG - 3'

构建方法: 合成正反引物退火后连接到 XhoI、HindIII 酶切的 pTYNE 载体, 连接和退火方法可以参照 pCas9/gRNA 载体。