

## pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo

| 产品编号        | 产品名称                                | 包装    |
|-------------|-------------------------------------|-------|
| D8302-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo | 1μg   |
| D8302-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo | 100μg |

### 产品简介:

- pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo是碧云天自行研发的用于方便地插入靶向目的基因的sgRNA (Single guide RNA)并使用CRISPR/Cas9基因编辑(Gene editing)系统进行基因编辑的质粒。本质粒表达mCherry便于观察转染效率或感染效果,同时携带了Neo抗性(G418抗性),方便后续进行多克隆或单克隆稳定细胞株的筛选。本质粒在插入靶向目的基因的sgRNA后,可以直接转染细胞进行基因编辑,也可以用于包装慢病毒后感染细胞或组织进行基因编辑。
- 慢病毒(Lentivirus)是以HIV-1 (人类免疫缺陷1型病毒)为基础发展起来的病毒载体系统。它能高效地将目的基因(蛋白质编码序列或小RNA)导入动物或人的原代细胞或细胞系。慢病毒的宿主范围广,对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力,可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上,从而达到持久性表达,被广泛应用到各种细胞系的基因过表达、RNA干扰、microRNA研究以及活体动物实验中[1-3]。本慢病毒载体进行了多方面的改造,删除了慢病毒绝大部分的致病基因,并使包装后的病毒失去了自我复制能力,安全性大大提升,并能有效提高外源基因的表达效果。本质粒可以和pCMV-VSV-G (D8215)以及pCAG-dR8.9 (D8216)配合使用进行慢病毒的包装。
- 本质粒经过BsmBI (CGTCTC(1/5)<sup>^</sup>)限制性核酸内切酶消化后,切除图谱中标示的filler,把设计好的靶向特定基因的sgRNA序列经退火后形成的双链寡核苷酸片段连接到载体中,就能构建成相应的用于基因编辑的质粒了。
- 本质粒中使用了人源化脓性链球菌Cas9 (Humanized *S. pyogenes* Cas9, hSpCas9)。hSpCas9是一种能在sgRNA的引导下切割双链DNA的核酸内切酶。在sgRNA的引导下,Cas9剪切基因靶位点产生双链DNA断裂,随后在细胞DNA修复过程中会导致基因靶位点处的插入、删除或替换,从而可能产生移码突变,导致目的基因的缺失突变。当设计的sgRNA的基因靶位点相对比较靠近5'端的时候,就能导致通常所说的基因敲除。本质粒中在hSpCas9的C端添加了核定位信号(Nuclear localization signal, NLS),能够有效确保hSpCas9定位在细胞核,从而有效提高基因编辑效率。
- 本质粒表达的Cas9带有Flag标签,可通过Flag抗体(AF0036/AF5051/AF519)检测Cas9的表达。同时本质粒中Cas9-Flag和mCherry之间通过P2A连接。mCherry与Cas9-Flag同时翻译,可以呈现很强的红色荧光,可以在荧光显微镜下非常便捷地观察到本质粒的表达情况(图1),并且也方便使用流式细胞仪分选阳性细胞。P2A是一个可以被理解为含有19个氨基酸残基(ATNFSLLKQAGDVEENPGP)的“自剪切”小肽。但实际的过程并不是发生自剪切,而是使核糖体跳过P2A等2A元件C端的甘氨酸和脯氨酸肽键的合成而发挥作用,最终导致2A序列末端和下游产物分离。上游Cas-Flag的C端将会添加一些额外的P2A残基(GSGATNFSLLKQAGDVEENPG),而下游蛋白的N端将会有额外的脯氨酸。在P2A肽的N端加入GSG序列,可提高剪切效率。

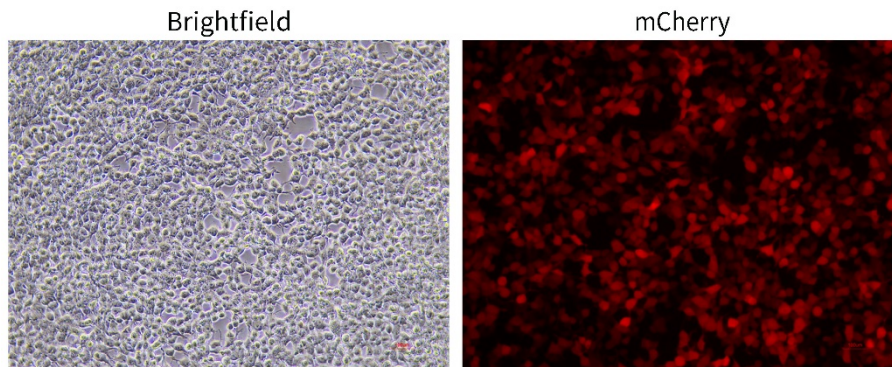


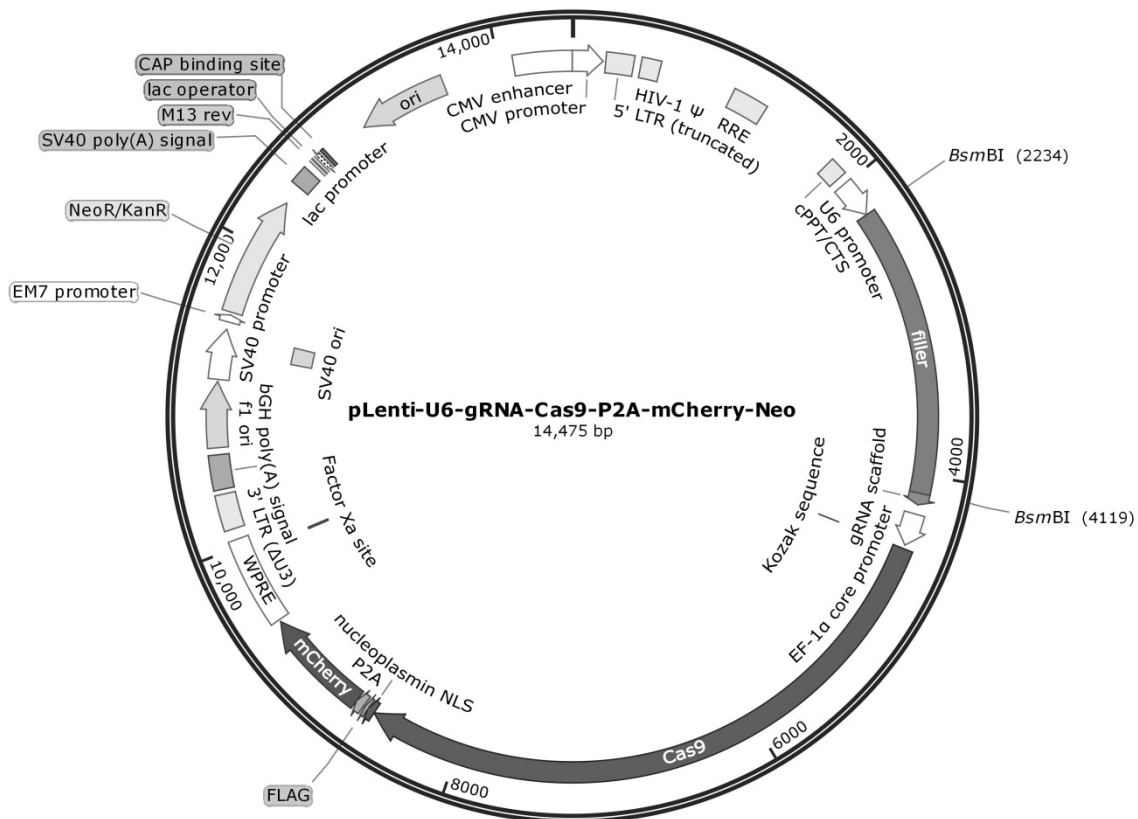
图1. 碧云天pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo质粒使用Lipo8000™转染试剂(C0533)转染293T细胞后的表达效果图。左侧为明场照片,右侧为荧光照片。

- 本质粒为卡那霉素(Kanamycin)和新霉素(Neomycin)抗性。在大肠杆菌中呈现卡那霉素抗性。本质粒转染哺乳动物细胞后,可使用G418 (ST081)筛选多克隆或单克隆细胞株。
- pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo质粒的主要信息如下:

| Feature Nucleotide | Position |
|--------------------|----------|
| CMV promoter       | 1-199    |

|                     |             |
|---------------------|-------------|
| 5' LTR (truncated)  | 217-397     |
| HIV-1 Ψ             | 444-569     |
| RRE                 | 1062-1295   |
| cPPT/CTS            | 1822-1939   |
| U6 promoter         | 1990-2230   |
| filler              | 2235-4119   |
| gRNA scaffold       | 4120-4195   |
| EF-1α core promoter | 4257-4468   |
| Kozak sequence      | 4487-4496   |
| Cas9                | 4493-8596   |
| nucleoplasmin NLS   | 8597-8644   |
| FLAG                | 8645-8668   |
| P2A                 | 8678-8734   |
| mCherry             | 8735-9445   |
| WPRE                | 9461-10049  |
| Factor Xa site      | 9932-9943   |
| 3' LTR (ΔU3)        | 10121-10354 |
| bGH poly(A) signal  | 10386-10610 |
| f1 ori              | 10656-11084 |
| SV40 promoter       | 11098-11427 |
| SV40 ori            | 11278-11413 |
| EM7 promoter        | 11475-11522 |
| NeoR/KanR           | 11541-12335 |
| SV40 poly(A) signal | 12465-12586 |
| M13 rev             | 12635-12651 |
| lac operator        | 12659-12675 |
| lac promoter        | 12683-12713 |
| CAP binding site    | 12728-12749 |
| ori                 | 13037-13625 |
| CMV enhancer        | 14095-14474 |

➤ pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo质粒(14475bp)的图谱如下:



► pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo的详细图谱如下:

|      |            | hU6-F primer         |            |              |             |
|------|------------|----------------------|------------|--------------|-------------|
|      |            | ┌──────────────────┐ |            |              |             |
|      |            | │ U6 promoter │      |            |              |             |
| 1981 | TAAGGTACCG | AGGGCCTATT           | TCCCATGATT | CCTTCATATT   | TGCATATACG  |
|      | ATTCCATGGC | TCCCGGATAA           | AGGGTACTAA | GGAAGTATAA   | ACGTATATGC  |
| 2031 | ATACAAGGCT | GTTAGAGAGA           | TAATTAGAAT | TAATTTGACT   | GTA AACACAA |
|      | TATGTTCCGA | CAATCTCTCT           | ATTAATCTTA | ATTAAACTGA   | CATTTGTGTT  |
| 2081 | AGATATTAGT | ACAAAATACG           | TGACGTAGAA | AGTAATAATT   | TCTTGGGTAG  |
|      | TCTATAATCA | TGTTTTATGC           | ACTGCATCTT | TCATTATTAA   | AGAACCCATC  |
| 2131 | TTTGCAGTTT | TAAAATTATG           | TTTTAAAATG | GACTATCATA   | TGCTTACCGT  |
|      | AAACGTCAAA | ATTTTAATAC           | AAAATTTTAC | CTGATAGTAT   | ACGAATGGCA  |
| 2181 | AACTTGAAAG | TATTTTCGATT          | TCTTGGCTTT | ATATATCTTG   | TGAAAGGAC   |
|      | TTGAACTTTC | ATAAAGCTAA           | AGAACCGAAA | TATATAGAAC   | ACCTTTCCTG  |
|      |            | BsmBI                |            |              |             |
| 2231 | GAAACACCGG | AGACGGTGTG           | AAATGAGCAC | ACAAAATACA   | CATGCTAAAA  |
|      | CTTTGTGGCC | TCTGCCAACA           | TTTACTCGTG | TGTTTTATGT   | GTACGATTTT  |
| 2281 | TATTATATTC | TATGACCTTT           | ATAAAATCAA | CCAAAATCTT   | CTTTTAATA   |
|      | ATAATATAAG | ATACTGGAAA           | TATTTTAGTT | GGTTTTAGAA   | GAAAAATTAT  |
| 2331 | ACTTTAGTAT | CAATAATTAG           | AATTTTTATG | TTCCTTTTGT   | CAA ACTTTTA |
|      | TGAAATCATA | GTTATTAATC           | TTAAAAATAC | AAGGAAAAAC   | GTTTGAAAAAT |
| 2381 | ATAAAAATGA | GCAAAAATAA           | AAAACGCTAG | TTTTAGTAAC   | TCGCGTTGTT  |
|      | TATTTTTACT | CGTTTTATTT           | TTTTGCGATC | AAAATCATTG   | AGCGCAACAA  |
| 2431 | TTCTTCACCT | TTAATAATAG           | CTACTCCACC | ACTTGTTCCT   | AAGCGGTCAG  |
|      | AAGAAGTGGG | AATTATTATC           | GATGAGGTGG | TGAACAAGGA   | TTCGCCAGTC  |
| 2481 | CTCCTGCTTC | AATCATTTTT           | TGAGCATCTT | CAAATGTTCT   | AACTCCACCA  |
|      | GAGGACGAAG | TTAGTAAAAA           | ACTCGTAGAA | GTTTACAAGA   | TTGAGGTGGT  |
| 2531 | GCTGCTTTAA | CTAAAGCATT           | GTCTTTAACA | ACTGACTTCA   | TTAGTTTAAC  |
|      | CGACGAAATT | GATTTCTGTA           | CAGAAATTGT | TGACTGAAGT   | AATCAAATTG  |
| 2581 | ATCTTCAAAT | GTTGCACCTG           | ATTTTGAAAA | TCCTGTTGAT   | GTTTTAACAA  |
|      | TAGAAGTTTA | CAACGTGGAC           | TAAAACTTTT | AGGACAAC TA  | CAAAATTGTT  |
| 2631 | ATTCTAATCC | AGCTTCAACA           | GCTATTTTAC | AAGCTTTCAT   | GATTTCTTCT  |
|      | TAAGATTAGG | TCGAAGTTGT           | CGATAAAGTG | TTCGAAAGTA   | CTAAAGAAGA  |
| 2681 | TTTGTTAATA | AACAATTTTC           | CATAATACAT | TTAACAACAT   | GTGATCCAGC  |
|      | AAACAATTAT | TTGTTAAAAG           | GTATTATGTA | AATTGTTGTA   | CACTAGGTCG  |
| 2731 | TGCTTTTTTT | ACAGCTTTC A          | TGTCTTCTAA | AACTAATTCA   | TAATTTTTGT  |
|      | ACGAAAAAAA | TGTCGAAAAGT          | ACAGAAGATT | TTGATTAAGT   | ATTAAAAACA  |
| 2781 | CTTTTAATGC | ACCAATATTT           | AATACCATAT | CAATTTCTGT   | TGCACCATCT  |
|      | GAAAATTACG | TGTTTATAAA           | TTATGGTATA | GTTAAAGACA   | ACGTGGTAGA  |
| 2831 | TTAATTGCTT | CAGAACTTTC           | GAATGCTTTT | GTAGCTGTTG   | TGCATGCACC  |
|      | AATTAACGAA | GTCTTTGAAG           | CTTACGAAAA | CATCGACAAC   | ACGTACGTGG  |
| 2881 | TAGAGGAAAA | CCTACAACAT           | TTGTTATTCC | TACATTTGTG   | CCTTTTAATA  |
|      | ATCTCCTTTT | GGATGTTGTA           | AACAATAAGG | ATGTAAACAC   | GGAAAATTAT  |
| 2931 | ATTCTTTACA | ATAGCTTGTT           | CAATATGAAT | TAACACAAAC   | TGTTGCAAAA  |
|      | TAAGAAATGT | TATCGAACAA           | GTTATACTTA | ATTGTGTTTG   | ACAACGTTTT  |
| 2981 | TCAAATTCAA | TTGCTTCATC           | ACATAATTGT | TTAATTTT CAG | CTTTCGTAGC  |
|      | AGTTTAAGTT | AACGAAGTAG           | TGTATTAACA | AATTAAAGTC   | GAAAGCATCG  |
| 3031 | ATCTTGTTTT | AATAATGTGT           | GATCTATATA | TTTGTTTAGT   | TTCATTTTTT  |
|      | TAGAACAAA  | TTATTACACA           | CTAGATATAT | AAACAAATCA   | AAGTAAAAAA  |

3081 CTCCTATATA TTCATTTTTA ATTTTAATTC TTTAATAAAT TCGTCTACTT  
GAGGATATAT AAGTAAAAAT TAAAATTAAG AAATTATTAA AGCAGATGAA

3131 TAACTTTAGC GTTTTGAACA GATTACACCA CACCTATAAA ATAAATTTTT  
ATTGAAATCG CAAAACCTGT CTAAGTGGTT GTGGATATTT TATTTAAAAA

3181 AGTTTAGGTT CAGTTCCTACT TGGGCGAACA GCAAATCATG ACTTATCTTC  
TCAAATCCAA GTCAAGGTGA ACCCGCTTGT CGTTTAGTAC TGAATAGAAG

3231 TAAATAAAAT TTTAGTAAGT CTTGTCCTGG CATATTATAC ATTCCATCGA  
ATTTATTTTA AAATCATTCA GAACAGGACC GTATAATATG TAAGGTAGCT

3281 TGTAGTCTTC AACATTAACA ACTTTAAGTC CAGCAATTTG AGTTAAGGGT  
ACATCAGAAG TTGTAATTGT TGAAATTCAG GTCGTTAAAC TCAATTCCCA

3331 GTTGCTCTCA ATGATTTTCA TAATGGTTCA ATTTTAAAT TCTTTTCTTC  
CAACGAGAGT TACTAAAGTA ATTACCAAGT TAAAAATTAA AGAAAAGAAG

3381 TGGTTTAAAA TTCAAGTTTA AAGTGAAAGT GTAATATGCA CCCATTTCTT  
ACCAAATTTT AAGTTCAAAT TTCACTTTCA CATTATACGT GGGTAAAGAA

3431 TAAATAAATC TTCTAAATAG TCTACTAATG TTTTATTTTG TTTTTTATAA  
ATTTATTTAG AAGATTTATC AGATGATTAC AAAATAAAAC AAAAAATATT

3481 AATCAAGCAG CCTCTGCTAT TAATATAGAA GCTTGTATTC CATCTTTATC  
TTAGTTCGTC GGAGACGATA ATTATATCTT CGAACATAAG GTAGAAATAG

3531 TCTAGCTGAG TCATCAATTA CATATCCATA ACTTTCTTCA TAAGCAAAAA  
AGATCGACTC AGTAGTTAAT GTATAGGTAT TGAAAGAAGT ATTCGTTTTT

3581 CAAAATTTAA TCCGTTATCT TCTTCTTTAG CAATTTCTCT ACCCATTCAT  
GTTTTAAATT AGGCAATAGA AGAAGAAATC GTTAAAGAGA TGGGTAAGTA

3631 TTAAATCCAG TTAAAGTTTT TACAATATTA ACTCCATATT TTTCATGAGC  
AATTTAGGTC AATTTCAAAA ATGTTATAAT TGAGGTATAA AAAGTACTCG

3681 GATTCTATCA CCCAAATCAC TTGTTACAAA ACTTGAATAT AGAGCCGGAT  
CTAAGATAGT GGGTTTAGTG AACAATGTTT TGAACCTATA TCTCGGCCTA

3731 TTTTTGGAAT GCTATTTAAG CGTTTTAGAT TTGATAATTT TCAATCAATT  
AAAAACCTTA CGATAAATTC GCAAAATCTA AACTATTAAA AGTTAGTTAA

3781 AAAATTGGTC CTGTTTGATT TCCATCTAAT CTTACAAAAT GACCATCATG  
TTTTAACCG GACAAACTAA AGGTAGATTA GAATGTTTTA CTGGTAGTAC

3831 TTTTATTGCC ATTCCAATC TGTCAGCATC TGGGTCATTC ATAATAATAA  
AAAATAACGG TAAGGTTTAG ACAGTCGTAG ACCCAGTAAG TATTATTATT

3881 TATCTGCATC ATGTTTAATA CCATATTCAA GCGGTATTTT TCATGCAGGA  
ATAGACGTAG TACAAATTAT GGTATAAGTT CGCCATAAAA AGTACGTCCT

3931 TCAAATCTCG GATTTGGATT TACAACATTT TTAAATGTTT CATCTTCAAA  
AGTTTAAGAC CTAAACCTAA ATGTTGTAAA AATTTACAAA GTAGAAGTTT

3981 TGCATGCTCT TCAACCTCAA TAACGTTATA TCCTGATTCA CGTAATATTT  
ACGTACGAGA AGTTGGAGTT ATTGCAATAT AGGACTAAGT GCATTATAAA

4031 TTGGGGTAAA TTTAGTTCCT GTTCCATTAA CTGCGCTAAA AATAATTTTT  
AACCCCATTT AAATCAAGGA CAAGGTAATT GACGCGATTT TTATTAAAAA

4081 AAATCTTTTT TAGCTTCTTG CTCTTTTTTG TACGTCTCTG TTTTAGAGCT  
TTTAGAAAAA ATCGAAGAAC GAGAAAAAAC ATGCAGAGAC AAAATCTCGA

4131 AGAAATAGCA AGTTAAAATA AGGCTAGTCC GTTATCAACT TGAAAAAGTG  
TCTTTATCGT TCAATTTTAT TCCGATCAGG CAATAGTTGA ACTTTTTTAC

4181 GCACCGAGTC GGTGCTTTTT TGAATTCGCT AGCTAGGTCT TGAAAGGAGT  
CGTGGCTCAG CCACGAAAAA ACTTAAGCGA TCGATCCAGA ACTTTCCTCA

BsmBI gRNA scaffold

➤ pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo中没有的酶切位点包括:

|        |         |        |         |         |         |        |
|--------|---------|--------|---------|---------|---------|--------|
| AarI   | AbsI    | AscI   | AsiSI   | AxyI    | BoxI    | BpvUI  |
| Bse21I | BsiWI   | BstHPI | BstPAI  | Bsu36I  | Eco81I  | FseI   |
| FspAI  | HpaI    | I-CeuI | I-PpoI  | I-SceI  | KspAI   | MauBI  |
| MreI   | Paer7I  | PalAI  | Pfl23II | PI-PspI | PI-SceI | Ple19I |
| PshAI  | PspLI   | PspXI  | PvuI    | RgaI    | RigI    | SfaAI  |
| SfiI   | Sfr274I | SgfI   | SgrDI   | SgsI    | SlaI    | SrfI   |
| XhoI   |         |        |         |         |         |        |

➤ pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo中的单酶切位点包括:

|         |            |       |         |             |       |
|---------|------------|-------|---------|-------------|-------|
| Acc65I  | G`GTAC,C   | 1984  | NruI    | TCG CGA     | 596   |
| AfeI    | AGC GCT    | 4483  | PacI    | TTA,AT`TAA  | 1980  |
| AgeI    | A`CCGG,T   | 4470  | PasI    | CC`CWG,GG   | 6262  |
| AvrII   | C`CTAG,G   | 11421 | PflFI   | GACN`N,NGTC | 11796 |
| BamHI   | G`GATC,C   | 8669  | PmeI    | GTTT AAAC   | 10373 |
| BmtI    | G,CTAG`C   | 4212  | RsrII   | CG`GWC,CG   | 12194 |
| BspDI   | AT`CG,AT   | 3277  | SacII   | CC,GC`GG    | 9973  |
| BsrGI   | T`GTAC,A   | 9444  | SbfI    | CC,TGCA`GG  | 9090  |
| BssHII  | G`CGCG,C   | 474   | SexAI   | A`CCWGG,T   | 11188 |
| BstBI   | TT`CG,AA   | 2849  | SgrAI   | CR`CCGG,YG  | 9416  |
| BstZ17I | GTA TAC    | 12606 | SmaI    | CCC GGG     | 11444 |
| ClaI    | AT`CG,AT   | 3277  | SnaBI   | TAC GTA     | 14459 |
| EcoRI   | G`AATT,C   | 4202  | SpeI    | A`CTAG,T    | 14118 |
| EcoRV   | GAT ATC    | 6346  | SwaI    | ATTT AAAT   | 3632  |
| KpnI    | G,GTAC`C   | 1988  | TspMI   | C`CCGG,G    | 11442 |
| MluI    | A`CGCG,T   | 9455  | Tth111I | GACN`N,NGTC | 11796 |
| NheI    | G`CTAG,C   | 4208  | XbaI    | T`CTAG,A    | 4476  |
| NotI    | GC`GGCC,GC | 907   | XmaI    | C`CCGG,G    | 11442 |

➤ pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo质粒可使用的测序引物序列如下:

sgRNA的测序引物hU6-F primer: 5'-GAGGGCCTATTTCCCATGATT-3'

➤ pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo的全序列信息请参考碧云天的网站上该质粒的信息。

**包装清单:**

| 产品编号        | 产品名称                                | 包装    |
|-------------|-------------------------------------|-------|
| D8302-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo | 1μg   |
| D8302-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo | 100μg |
| —           | 说明书                                 | 1份    |

**保存条件:**

-20°C保存。

**注意事项:**

- 本质粒未经碧云天书面许可不得用于任何商业用途，也不得移交给订货人所在实验室外的任何个人或单位。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

**使用说明:**

1. 首次使用1μg包装的本产品时，请先取少量本质粒转化大肠杆菌，进行质粒小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。抽提获得的质粒可以通过酶切电泳进行鉴定，或通过测序进行鉴定。
2. 100μg包装的本产品质粒浓度为0.1μg/μl，共1ml。可以直接用于酶切或者转染细胞。
3. 本质粒构建方案如下，仅供参考。

a. 质粒酶切和去磷酸化。

| Reagent                             | Volume      |
|-------------------------------------|-------------|
| pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Neo | xμl (1-2μg) |
| FastDigest BsmBI                    | 1μl         |
| BeyoAP Alkaline Phosphatase (D7027) | 1μl         |
| 10X FastDigest Buffer               | 2μl         |
| 100mM DTT                           | 0.2μl       |
| ddH <sub>2</sub> O                  | (15.8-x)μl  |
| Total volume                        | 20μl        |
| Incubate at 37°C for 30min          |             |

**b. 使用DNA凝胶回收试剂盒纯化酶切后的质粒。**

如果质粒成功被BsmBI酶切，则会产生两个片段，一个大的为目的片段，小片段为filler。酶切电泳鉴定后，切胶回收12kb的目的条带，弃去约2kb的filler条带。

**c. 磷酸化和退火Oligos。**

| Reagent                          | Volume |
|----------------------------------|--------|
| sgRNA oligo 1 (100μM)            | 1μl    |
| sgRNA oligo 2 (100μM)            | 1μl    |
| 10X T4 Ligation Buffer           | 1μl    |
| ddH <sub>2</sub> O               | 6.5μl  |
| T4 Polynucleotide Kinase (D7096) | 0.5μl  |
| Total volume                     | 10μl   |

设计Oligo的原则如下：

Forward: 5'-CACCG-20bp-3'

Reverse: 5'-AAAC-20bp (Copy bottom strand 5'->3')-C-3'

**注1：**反应中请使用 T4 Ligation Buffer，因为随T4 Polynucleotide Kinase (D7096)提供的缓冲液不包含ATP。如果使用随T4 Polynucleotide Kinase (D7096)提供的缓冲液，请补充1mM ATP。

**注2：**使用以下参数将磷酸化/退火反应放入热循环仪中：37°C 30min，95°C 5min，然后以 5°C/min的速度下降到 25°C。

**d. 将步骤3c中退火的双链寡核苷酸以1:200的比例稀释到超纯水中。**

**e. 按照常规连接方式进行连接反应。**

取50ng步骤3b中经BsmBI酶切且纯化后的质粒，与1μl步骤3d中稀释后的双链寡核苷酸进行连接，具体连接用量与步骤参照所使用的连接试剂盒说明书进行。推荐使用碧云天生产的快速DNA连接试剂盒(D7002/D7003)进行连接反应。建议同时设置阴性对照(仅含有载体，用水代替退火的双链寡核苷酸)。

**f. 转化至StbI3菌。**

本质粒包含长末端重复序列(LTR)，适合转化至重组缺陷菌，使用StbI3甘油菌(D0378)能够获得良好的质粒产量。尽管其它RecA菌株可能有效，但我们测试发现使用StbI3的转化效率和质粒产量都总体更加理想。

**g. 直接转染细胞或进行慢病毒的包装。**

推荐使用碧云天生产的Lipo8000™转染试剂(C0533)转染细胞。构建好的质粒后续也可以和pCMV-VSV-G (D8215)以及pCAG-dR8.9 (D8216)配合使用进行慢病毒的包装。

**参考文献：**

1. Mautino MR. Curr Gene Ther. 2002. 2(1):23-43.
2. Sumimoto H, Kawakami Y. Future Oncol. 2007. 3(6):655-664.
3. Stripecke R, Koya RC, Ta HQ, Kasahara N, Levine AM. Blood Cells Mol Dis. 2003. 31(1):28-37.

**相关产品：**

| 产品编号        | 产品名称  | 包装    |
|-------------|---|-------|
| D8301-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Neo            | 1μg   |
| D8301-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Neo            | 100μg |
| D8303-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Puro&Zeocin    | 1μg   |
| D8303-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Puro&Zeocin    | 100μg |
| D8304-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Puro&Zeocin | 1μg   |
| D8304-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Puro&Zeocin | 100μg |
| D8305-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Zeocin         | 1μg   |
| D8305-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Zeocin         | 100μg |
| D8306-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Zeocin      | 1μg   |
| D8306-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Zeocin      | 100μg |
| D8307-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Bla            | 1μg   |
| D8307-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Bla            | 100μg |
| D8308-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Bla         | 1μg   |
| D8308-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Bla         | 100μg |
| D8309-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Hygro          | 1μg   |
| D8309-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-EGFP-Hygro          | 100μg |
| D8310-1μg   | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Hygro       | 1μg   |
| D8310-100μg | pLenti-U6-gRNA-Cas9-P2A-mCherry-Hygro       | 100μg |
| ST081-1ml   | G418 (遗传霉素)                                 | 1ml   |

|             |                                       |          |
|-------------|---------------------------------------|----------|
| ST081-5ml   | G418 (遗传霉素)                           | 5ml      |
| ST081-1g    | G418 (遗传霉素)                           | 1g       |
| ST081-5g    | G418 (遗传霉素)                           | 5g       |
| ST101       | Kanamycin                             | 1g       |
| ST102       | Kanamycin (10mg/ml,1000X)             | 5ml      |
| D8215-1μg   | pCMV-VSV-G (慢病毒包装用质粒)                 | 1μg      |
| D8215-100μg | pCMV-VSV-G (慢病毒包装用质粒)                 | 100μg    |
| D8216-1μg   | pCAG-dR8.9 (慢病毒包装用质粒)                 | 1μg      |
| D8216-100μg | pCAG-dR8.9 (慢病毒包装用质粒)                 | 100μg    |
| D8202-1μg   | pLenti-H1 (慢病毒小RNA表达载体, 绿色荧光)         | 1μg      |
| D8202-100μg | pLenti-H1 (慢病毒小RNA表达载体, 绿色荧光)         | 100μg    |
| AF5051      | Flag Tag Mouse Monoclonal Antibody    | 50μl     |
| AF0036      | FLAG Tag Rabbit Polyclonal Antibody   | 100μl    |
| AF519       | Flag抗体(小鼠单抗)                          | >40次     |
| AF0123      | CRISPR-Cas9 Mouse Monoclonal Antibody | 50μl     |
| D7096       | T4 Polynucleotide Kinase              | 100U     |
| D7097       | T4 Polynucleotide Kinase              | 500U     |
| D7002       | 快速DNA连接试剂盒                            | 100次     |
| D7003       | 快速DNA连接试剂盒                            | 500次     |
| D7006       | T4 DNA Ligase                         | 40,000U  |
| D7008       | T4 DNA Ligase                         | 200,000U |
| D7027       | BeyoAP Alkaline Phosphatase           | 200U     |
| D0378       | Stb13甘油菌                              | 200μl    |
| C0533-0.5ml | Lipo8000™转染试剂                         | 0.5ml    |
| C0533-1.5ml | Lipo8000™转染试剂                         | 1.5ml    |
| C0533-7.5ml | Lipo8000™转染试剂                         | 5×1.5ml  |

Version 2021.12.27