

## CRISPR/Cas9基因敲除试剂盒(Cat. GMCA-001)

### 产品组分

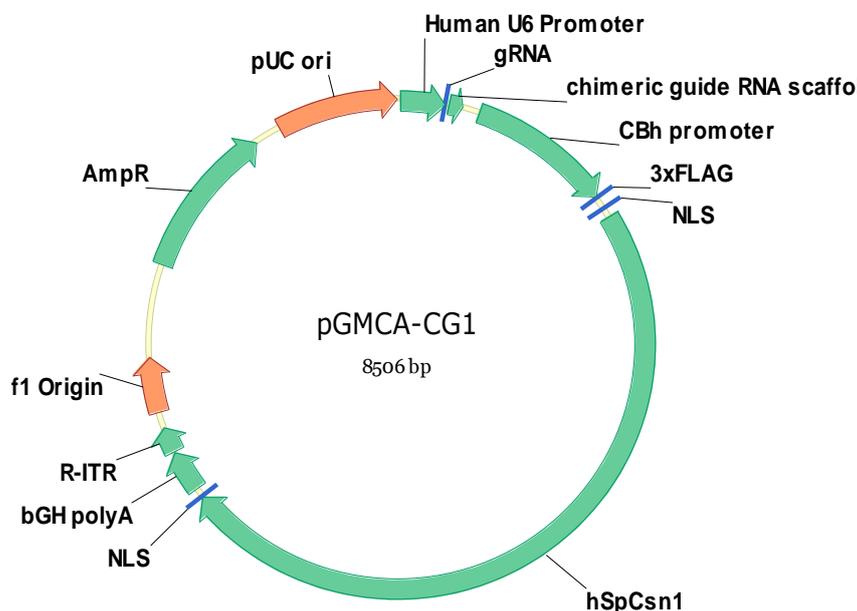
组分	含量
Cas9/gRNA linearized Vector	11 $\mu$ l
Annealing Buffer(20x)	100 $\mu$ l
T4 DNA Ligase	11 $\mu$ l
10xT4 DNA Ligase Buffer	25 $\mu$ l

### 贮存条件

收到货后, 将组分瞬时离心后置于-20℃保存, 避免反复冻融。

### 产品说明

此试剂盒能快速方便地将 gRNA 靶点序列插入到 Cas9/gRNA 质粒中。构建好的 Cas9/gRNA 质粒能够同时表达人密码子优化的 Cas9 蛋白及 gRNA, 应用 CRISPR 技术进行目标基因的敲除和编辑。GMCA-001 Cas9/gRNA 质粒构建试剂盒使用 pGMCA-CG1 载体, 其图谱如下:



### 操作步骤

#### 1. 预实验

A. 单细胞生长情况, 确保单个细胞可以正常生长形成单克隆。



混匀离心后，按照如下程序处理：

---

95℃3min
95℃到 25℃缓慢冷却，例如 -1℃/20S 或将样品管放在 95℃水中，自然冷却至室温
16℃5min

---

退火结束后，将退火产物用 H<sub>2</sub>O 稀释 25 倍备用（可吸取 1 μl 加到 24 μl H<sub>2</sub>O 中）。取 1.5ul 进入连接反应。体系如下：

---

Cas9/gRNA linearized Vector	1 μl
退火稀释产物	1.5 μl
T4 DNA Ligase	1 μl
10xT4 DNA Ligase Buffer	1 μl
ddH <sub>2</sub> O	5.5 μl

---

连接产物可以直接转化大肠杆菌感受态细胞，转化和筛选阳性克隆的实验步骤请参考《分子克隆实验指南》。Cas9/gRNA 载体都为 Amp 抗性。测序引物为 Hu6-F。