

AAVS1easy 基因过表达试剂盒说明书

V2.1 版本，更新日期：2018 年 5 月 4 日

货号：CA8001002

规格：1 Kit

储存条件：-20℃。避免反复冻融。



产品简介：

扫描二维码，关注微信公众号即可查看[产品说明书](#)、[视频教程](#)、[产品相关论文下载](#)

(如果您有什么其他问题，可联系相关销售或拨打下方联系电话咨询)

联系电话：010—69737398

AAVS1easy 基因过表达试剂盒是由

赛贝公司开发的基于 CRISPR/Cas9 技术

在 AAVS1 位点进行定点外源或内源基因过表达的简单高效试剂盒。AAVS1 位点是位于人 19 号染色体上的一个开放位点，在该位点插入外源或内源基因基本不会对细胞的功能有影响，支持转基因片段在此位点长期稳定地表达，因此被广泛应用。

使用 AAVS1easy 基因过表达试剂盒可以方便高效地获得在 AAVS1 位点敲入目的片段的细胞株，产生的细胞株具有稳定表达目的基因、并且细胞内表达均一性好等特点，适用于多种类型的基因功能研究。

产品内容：

产品代码	名称	规格	数量
CA8001002-1	AAVS1-Cas9n	5 μ g	1 支
CA8001002-2	AAVS1-donor	10 μ g	1 支
CA8001002-3	AAVS1-GFP	5 μ g	1 支

自备试剂和仪器：

- Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (Invitrogen: Cat. no. 11668-027)
- 电转液试剂：TransEasy电转液 (CELLAPY: Ca3012040)
- 限制性内切酶 (NEB, 根据实际情况选择酶切位点)
- T4 DNA连接酶 (NEB: Cat. no. M0202S)
- 感受态：DH5 α 或 TOP10
- 电转仪：Lonza Nucleofector 或 Invitrogen Neon

AAVS1easy基因过表达试剂盒作用原理：

AAVS1easy 基因过表达试剂盒包含有 AAVS1-Cas9n 和 AAVS1-donor 质粒，其原理是利用 CRISPR/Cas9 系统的高效特异性切割功能，AAVS1-Cas9n 能对人的 AAVS1 位点进行高效切割，同时由于使用单切口的 Cas9n 酶（而不是野生型的 Cas9 酶），DNA 上的 Nick 缺口会很快被细胞修复，一般会造成基因突变。

AAVS1-donor 载体是 AAVS1 位点的同源载体，能有效地将目的片段整合在 AAVS1 位点。AAVS1easy 基因过表达试剂盒是利用 CRISPR/Cas9 系统的高效特异性切割和同源重组原理，在 AAVS1 位点插入目的基因片段，以实现目的基因的过表达。（图 1）

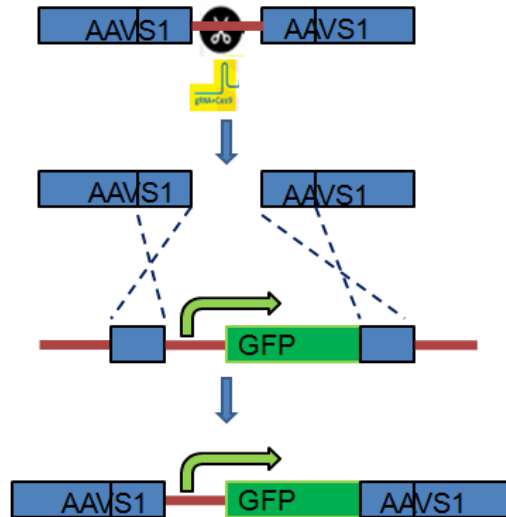


图 1：AAVS1easy 基因过表达试剂盒作用原理示意图（以 GFP 对照载体为例）

AAVS1easy 基因过表达试剂盒载体图谱：

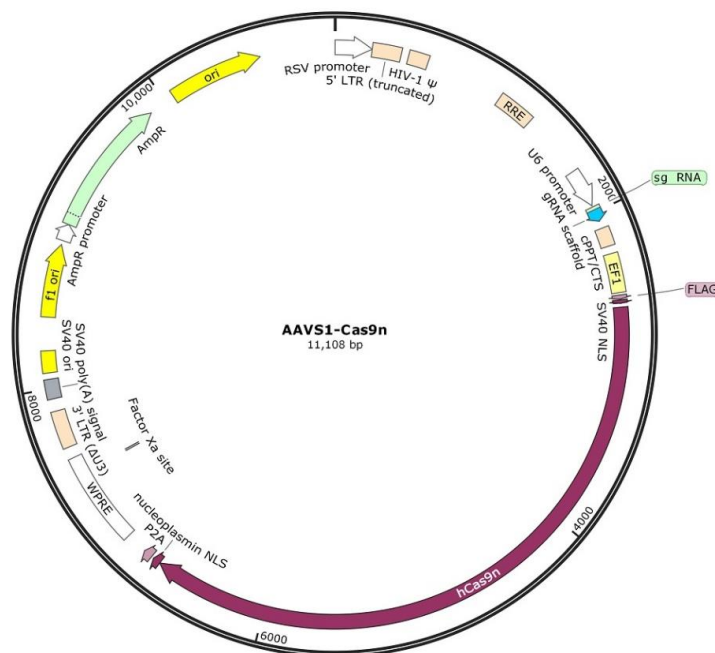


图 2：AAVS1- Cas9n 质粒图谱

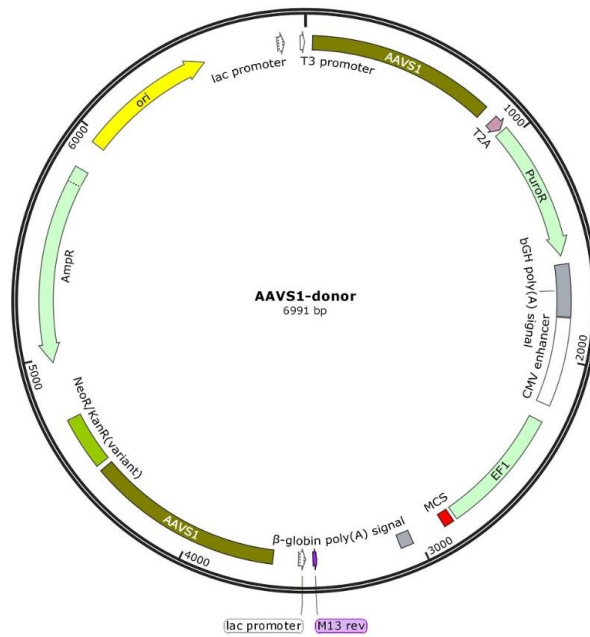


图 3: AAVS1- donor 质粒图谱

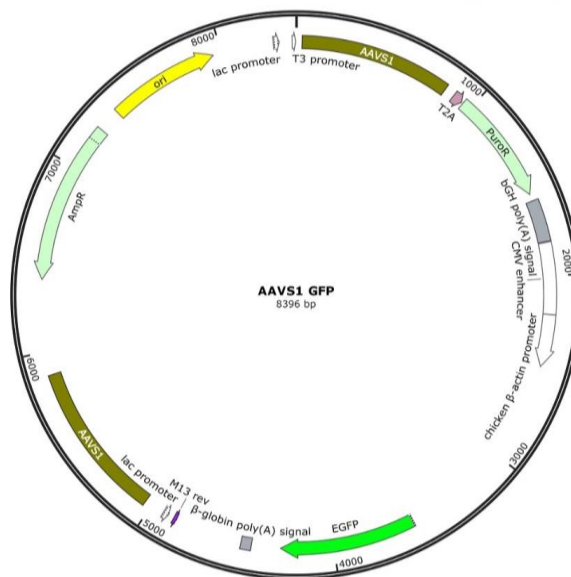


图 4: AAVS1-GFP 质粒图谱

实验案例: GFP 基因过表达

以在六孔板中培养的 HEK293 细胞 AAVS1 位点上定点插入 GFP 为例:

1. 在六孔板中进行细胞培养, 待细胞汇合度达到 30-40%时, 进行转染。
2. 将转染 $1 \mu\text{g}$ AAVS1-GFP 和 $0.5 \mu\text{g}$ AAVS1-Cas9n 的细胞作为实验组; 只转染 $1 \mu\text{g}$ AAVS1-Cas9n 的细胞作为对照组。按照 Lipofectamine2000 Transfection Reagent 的说明书操作, 将实验组和对照组的质粒转入细胞。

- 37℃, 5% CO₂培养箱孵育 24 小时后, 添加 2 μg/mL 的嘌呤霉素 (Puromycin) 进行筛选, 每天更换带有嘌呤霉素的新鲜培养基。
- 3-5 天后, 可以观察到: 未筛选前对照组的细胞没有 GFP 荧光, 实验组的细胞有 GFP 荧光; 筛选后对照组细胞全部死亡, 实验组有大量细胞存活; 荧光显微镜下观察细胞, 实验组的细胞多为 GFP 阳性, 定点整合的效率可达 90%以上。

注: 转染时, 使用的质粒量和筛选用嘌呤霉素的浓度可根据具体实验的细胞类型和实验需求进行相应调整。

结果鉴定:

抽取细胞基因组 DNA, 利用 PCR 扩增鉴定目的基因整合情况。

1. 引物序列:

AAVS1-F: accaacgccgacggtatcag

AAVS1-R: gtgggcttgtactcggtcatt

2. PCR 程序如下:

温度	时间	循环数
95° C	5 min	1 cycle
95° C	30 s	35 cycles
59° C	30 s	
72° C	1 min 30 s	
72° C	7 min	1 cycle
4° C	Forever	

3. 正确 PCR 产物大小: 1627bp:

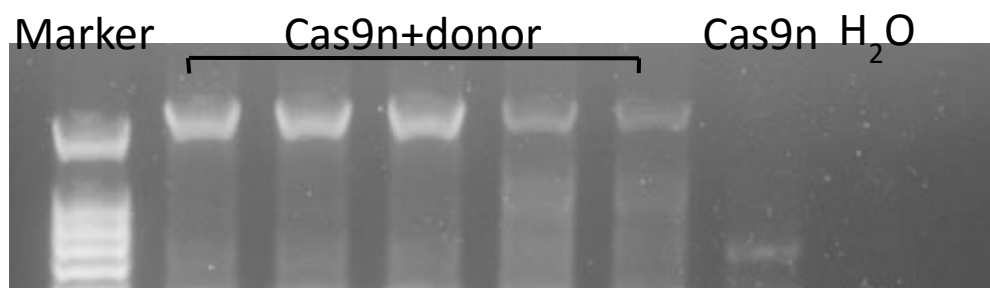


图 5: Genomic-PCR 检测基因整合