**转染gRNA和供体以标记Grb2**

a. 在12孔板中培养HeLa细胞至含10% FBS的DMEM中90%汇合度。用100ng/mL诺考达唑处理细胞12小时。

b. 在转染当天，将PX459-Grb2-gRNA和Grb2-mNG供体DNA质粒稀释至无核酸酶水中的适当浓度。

c. 用1×DPBS洗去诺考达唑。加入1mL新鲜含FBS的DMEM。

d. 按以下顺序在1.5mL微量离心管中制备DNA-脂质混合物（表22）。

表22. 标记Grb2的转染混合物组分

**管1**

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| OptiMEM | 50 μL |
| PX459-Grb2-gRNA(250 ng) | 0.5 μL |
| Grb2-mNG供体(750 ng) | 1 μL |
| P3000试剂 | 2 μL |

**管2**

| **组分** | **用量** |
| --- | --- |
| OptiMEM | 50 μL |
| Lipofectamine 3000 试剂 | 1.5 μL |

e. 将管1的内容物加入管2。在室温下孵育混合物10分钟。

f. 将质粒-脂质混合物滴加至细胞上。

g. 转染后第二天，用2μg/mL嘌呤霉素处理转染的细胞48小时，通过杀死未转染的细胞来富集转染的细胞。

h. 去除含嘌呤霉素的DMEM，用DPBS洗涤细胞两次，并让细胞恢复。分散存活的细胞并扩增它们进行流式分选分析。