

## pLenti-PAM-sgRNA

产品编号	产品名称	包装
L29450	pLenti-PAM-sgRNA	5μg

### 产品简介:

- pLenti-PAM-sgRNA (PAM基因敲除质粒)是一种在动物细胞中可以同时表达Cas9、目的基因的sgRNA和puromycin抗性基因的质粒。用于在动物细胞中直接基于CRISPR/Cas9技术敲除目的基因，或者通过包装慢病毒后基于CRISPR/Cas9技术敲除目的基因。本质粒中sgRNA的有效性已经通过T7EI法的验证。
- 本质粒在细菌中为Amp抗性，全长约13,000bp。本质粒的关键图谱信息请参考图1。本质粒可直接转染细胞用于目的基因的CRISPR/Cas9敲除，以及通过puromycin筛选稳定细胞株；也可以与pMDLg、Rev及VSV-g共转HEK293T细胞进行重组慢病毒(lentivirus)的包装，然后再用于感染细胞或组织并进行目的基因的CRISPR/Cas9敲除。



图1. 表达sgRNA、Cas9和puromycin抗性的pLenti-sgRNA质粒关键图谱信息。

- 本质粒中的sgRNA基于碧云天研发的CRISPR/Cas9 sgRNA快速筛选和验证体系获得，sgRNA的有效性已经通过T7EI法验证。
- 本质粒用于实验时，建议同时选购无任何靶向的对照质粒pLenti-Control-sgRNA (L00011)或靶向GFP的对照质粒pLenti-GFP-sgRNA (L00013)。
- 碧云天同时提供基于CRISPR/Cas9技术的PAM基因敲除的质粒(L29450 pLenti-PAM-sgRNA)、慢病毒(L29451 PAM Knockout Lentivirus)、HEK293T细胞(L29452 PAM Knockout HEK293T Cells)、HEK293T敲除细胞的RIPA裂解液(L29453 PAM Knockout HEK293T RIPA Lysate)、HEK293T敲除细胞的Trizol裂解液(L29454 PAM Knockout HEK293T Trizol Lysate)等产品，具体请在碧云天网站查询或在本产品网页面点击相应产品。
- PAM基因的基本信息如下：

Species	Gene Symbol	Gene ID	GenBank Accession	Transcript
Human	PAM	5066	BC018127	NM_000919

About the gene	
Official Symbol	PAM
Previous Symbol	-
Official Full Name	peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase
Synonyms	PAL; PHM
Location	5q21.1
Gene Type	protein-coding gene
Uniprot ID	P19021
Pathway/Library	others
Gene Summary	This gene encodes a multifunctional protein. It has two enzymatically active domains with catalytic activities - peptidylglycine alpha-hydroxylating monooxygenase (PHM) and peptidyl-alpha-hydroxyglycine alpha-amidating lyase (PAL). These catalytic domains work sequentially to catalyze neuroendocrine peptides to active alpha-amidated products. Multiple alternatively spliced transcript variants encoding different isoforms have been described for this gene but some of their full length sequences are not yet known.

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
L29450	pLenti-PAM-sgRNA	5μg
—	说明书	1份

### 保存条件:

-20°C保存，至少两年有效。

## 注意事项：

- 碧云天拥有sgRNA序列的知识产权，如果需要sgRNA序列，请在订购后发送邮件向info@beyotime.com索取。sgRNA与质粒及其序列信息，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。使用者在发表研究论文或结果时，应注明来源。
- 慢病毒包装使用的包装质粒，可以订购碧云天的Lentivirus Packaging Vectors Set A (L00002)，包括pMDLg、Rev和VSV-g。
- 对于非目录产品的CRISPR基因敲除用的sgRNA表达质粒的定制，可联系碧云天技术服务service@beyotime.com。
- 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. 质粒的扩增和鉴定：

- 扩增：**请先取少量本质粒转化Stb13感受态细胞或其它适当的感受态细胞，Amp抗性，进行质粒的小量、中量或大量抽提后再用于后续用途。
- 鉴定：**抽提获得的质粒可使用菌落PCR的方法进行鉴定，Forward primer为5'TATACGATACAAGGCTGTTAGAGAG3'，Reverse primer为5'ACTGTGGGCGATGTGCGCTCTG3'，PCR产物约为700bp。也可进一步测序鉴定，测序引物为hU6，Forward primer为5'ATGGACTATCATATGCTTACCGTA3'。比对序列为：  
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAAAGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTTGAAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACCTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTTG。其中N为sgRNA序列。

### 2. 慢病毒包装与浓缩：

- 细胞的准备：**复苏用于慢病毒包装的HEK293T细胞，24小时后1:3传至10cm培养皿，37°C、5% CO<sub>2</sub>培养箱24小时。复苏后的细胞尽量能培养一周以上后再进行慢病毒的包装，效果更好。
- 慢病毒的包装：**对于10cm培养皿，在500μl不含抗生素和血清的DMEM培养液(高糖DMEM或低糖DMEM均可)或Opti-MEM® Medium中加入本sgRNA质粒、pMDLg、Rev、VSV-g分别为10μg、6.5μg、2.5μg、3.5μg，混匀后加入一定量转染试剂和培养液混合液，转染试剂推荐使用Lipo293™转染试剂(C0521)、Lipo6000™转染试剂(C0526)、Lipo8000™转染试剂(C0533)或其它合适的转染试剂，具体转染步骤参考特定转染试剂的产品说明书。转染后24小时和48小时可两次收集培养液上清，上清用0.45μm的针头滤器进行过滤，该上清含慢病毒，可直接使用。上清可分装后-80°C冻存。
- 慢病毒的浓缩：**如果需要滴度更高的慢病毒，可以使用100kDa的超滤管进行超滤浓缩，如碧云天的超滤管(15ml, 100kDa MWCO, PES, Sartorius分装) (FUF158)或Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit (UFC9100)，4°C、按照推荐的最高转速离心30分钟左右，最终剩下约400μl的病毒浓缩液。病毒浓缩液可以分装后-80°C冻存。

### 3. 慢病毒的感染：

- 确定puromycin的筛选浓度：**待感染的细胞按一定密度铺在12孔或24孔中，按照0、0.2、0.5、1、1.5、2、3、4、5μg/ml这样的浓度测试细胞对puromycin的敏感性，推荐使用碧云天的Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素) (ST551)。两天后细胞全部死亡的最低浓度即为该细胞的puromycin筛选浓度，具体步骤参考碧云天该产品的使用说明：<https://www.beyotime.com/product/ST551-10mg.htm>。
- 慢病毒感染细胞：**按实验需要将细胞铺板(如12孔板)，细胞数以第2天密度约50%为宜。设置非感染细胞组、对照组和基因敲除组。37°C培养过夜后，培养液中加入5~10μg/ml的Polybrene(C0351/ST551)。病毒感染前，从-80°C冰箱取出病毒后冰浴融化，参考相关文献或者根据预实验得到的MOI值加入适量病毒，对于未浓缩的病毒，可以直接按0.5ml/孔加入细胞，对于浓缩或测定滴度的病毒，一般100μl/孔或10<sup>7</sup> TU已经足够，轻轻摇匀，37°C继续培养。两天后，吸除含病毒的培养液，换为新鲜的含一定浓度的puromycin的培养液进行筛选，一般筛选2天后，非感染细胞组细胞逐渐死去，加入病毒组存活率比较高，就可以收集部分细胞检测目的蛋白的表达或进行其它实验。培养过程中，可以将细胞转至6孔板或10cm培养皿进行扩大培养。一周之后，puromycin浓度可减半。如果有必要后续可以通过将细胞稀释至2.5个/ml，然后按照每孔200μl接种到96孔板中(每孔平均0.5个细胞)，筛选单克隆细胞株。病毒感染的方法可参考Polybrene (C0351)的使用说明：<https://www.beyotime.com/product/C0351-1ml.htm>。

### 4. 直接转染细胞与稳定株的筛选

- 选择合适的拟敲除基因的细胞，**使用Lipo8000™转染试剂(C0533)、Lipo6000™转染试剂(C0526)或其它合适的转染试剂，具体转染细胞的步骤参考特定转染试剂的产品说明。
- 确定puromycin的筛选浓度：**细胞按一定密度铺在12孔或24孔中，按照0、0.2、0.5、1、1.5、2、3、4、5μg/ml这样的浓度测试细胞对puromycin的敏感性，推荐使用碧云天的Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素) (ST551)。两天后细胞全部死亡的最低浓度即为该细胞的puromycin筛选浓度，具体步骤参考碧云天该产品的使用说明：<https://www.beyotime.com/product/ST551-10mg.htm>。
- 转染后约48小时，**按照上述检测获得的puromycin筛选浓度加入puromycin，筛选阳性细胞。一般筛选2天后，阴性细胞逐渐死去。培养过程中，可以将细胞转至6孔板或10cm培养皿进行扩大培养。一周之后，puromycin浓度可减半。如果有必要后续可以通过将细胞稀释至2.5个/ml，然后按照每孔200μl接种到96孔板中(每孔平均0.5个细胞)，筛选单克隆细胞株。

### 5. 基因编辑的鉴定：

- 对于多克隆细胞，**可以通过T7 Endonuclease I (T7EI)进行鉴定，即提取细胞的基因组DNA，在sgRNA序列两边设计引物

进行PCR扩增，然后进行T7EI酶切，具体请参考碧云天的T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用) (D7080)或基因组编辑突变检测试剂盒(D0508)；也可以通过相应的抗体进行检测。

- b. 对于单克隆细胞，可通过PCR扩增出sgRNA靶向的基因片段后进行常规测序的方式进行验证，同时也可以使用相应的抗体进行检测。

#### 相关产品：

产品编号	产品名称	包装
L00002-5μg	CRISPR/Cas9 Packaging Vectors Set A	5μg/each
L00002-100μg	CRISPR/Cas9 Packaging Vectors Set A	100μg/each
L00011-5μg	pLenti-Control-sgRNA	5μg
L00011-100μg	pLenti-Control-sgRNA	100μg
L00013-5μg	pLenti-GFP-sgRNA	5μg
L00013-100μg	pLenti-GFP-sgRNA	100μg
C0222	青霉素-链霉素溶液(100X)	100ml
C0351-1ml	Polybrene (Hexadimethrine Bromide)	1ml
C0351-50mg	Polybrene (Hexadimethrine Bromide)	50mg
C0521	Lipo293™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0526	Lipo6000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0533	Lipo8000™转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
D0378	Stbl3甘油菌	200μl
ST551-10mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×1ml
ST551-50mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	10mg/ml×5ml
ST551-250mg	Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素)	250mg
ST1380-500mg	Polybrene (≥94%, Reagent grade)	500mg
ST1380-2g	Polybrene (≥94%, Reagent grade)	2g
ST1380-10g	Polybrene (≥94%, Reagent grade)	10g
FF345-10pcs	针头滤器(0.45μm/28mm, PES, Sterile, Sartorius分装)	10个/袋
FF345T-10pcs	针头滤器(0.45μm/28mm, PES, Sterile, 进口分装)	10个/袋
FF345-50pcs	针头滤器(0.45μm/28mm, PES, Sterile, Sartorius原装)	50个/盒
FF365-10pcs	BeyoGold™针头滤器(0.45μm/33mm, PES, Sterile)	10个/袋
FF365-100pcs	BeyoGold™针头滤器(0.45μm/33mm, PES, Sterile)	100个/盒
FF375-10pcs	BeyoGold™针头滤器(0.45μm/13mm, PES, Sterile)	10个/袋
FF375-100pcs	BeyoGold™针头滤器(0.45μm/13mm, PES, Sterile)	100个/盒
FUF158-2pcs	超滤管(15ml, 100kDa MWCO, PES, Sartorius分装)	2个/袋
FUF158-12pcs	超滤管(15ml, 100kDa MWCO, PES, Sartorius分装)	12个/袋

Version 2020.12.09