

pLenti-RC3H2-sgRNA

产品编号	产品名称	包装
L10115	pLenti-RC3H2-sgRNA	5μg

产品简介:

- pLenti-RC3H2-sgRNA (RC3H2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T7E1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T7E1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RC3H2基因敲除的质粒(L10115 pLenti-RC3H2-sgRNA)、慢病毒(L10116 RC3H2 Knockout Lentivirus)、HEK293T细胞(L10117 RC3H2 Knockout HEK293T Cells)、HEK293T敲除细胞的RIPA裂解液(L10118 RC3H2 Knockout HEK293T RIPA Lysate)、HEK293T敲除细胞的Trizol裂解液(L10119 RC3H2 Knockout HEK293T Trizol Lysate)等产品，具体请在碧云天网站查询或在本产品网点击相应产品。
- RC3H2基因的基本信息如下:

Species	Gene Symbol	Gene ID	GenBank Accession	Transcript
Human	RC3H2	54542	BC044642	NM_018835

About the gene	
Official Symbol	RC3H2
Previous Symbol	MNAB
Official Full Name	ring finger and CCCH-type domains 2
Synonyms	FLJ20301; FLJ20713; RNF164
Location	9q33.2
Gene Type	protein-coding gene
Uniprot ID	Q9HBD1
Pathway/Library	Ubiquitin Ligases Genes Library
Gene Summary	<p>Post-transcriptional repressor of mRNAs containing a conserved stem loop motif, called constitutive decay element (CDE), which is often located in the 3'-UTR, as in HMGXB3, ICOS, IER3, NFKBID, NFKBIZ, PPP1R10, TNF and in many more mRNAs. Binds to CDE and promotes mRNA deadenylation and degradation. This process does not involve miRNAs. In follicular helper T (Tfh) cells, represses of ICOS and TNFRSF4 expression, thus preventing spontaneous Tfh cell differentiation, germinal center B-cell differentiation in the absence of immunization and autoimmunity. In resting or LPS-stimulated macrophages, controls inflammation by suppressing TNF expression. Also recognizes CDE in its own mRNA and in that of paralogous RC3H1, possibly leading to feedback loop regulation (By similarity). miRNA-binding protein that regulates microRNA homeostasis. Enhances DICER-mediated processing of pre-MIR146a but reduces mature MIR146a levels through an increase of 3' end uridylation. Both inhibits ICOS mRNA expression and they may act together to exert the suppression (PubMed:25697406). Acts as a ubiquitin E3 ligase. Pairs with E2 enzymes UBE2B, UBE2D2, UBE2E2, UBE2E3, UBE2G2, UBE2K and UBE2Q2 and produces polyubiquitin chains (PubMed:26489670). Shows the strongest activity when</p>

	paired with UBE2N:UBE2V1 or UBE2N:UBE2V2 E2 complexes and generate both short and long polyubiquitin chains (PubMed:26489670). Involved in the ubiquitination of MAP3K5 (PubMed:24448648, PubMed:26489670) (By similarity). Able to interact with double-stranded RNA (dsRNA) (PubMed:26489670). RC3H2_HUMAN,Q9HBD1
--	---

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
L10115	pLenti-RC3H2-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:

- a. 扩增: 请先取少量本质粒转化Stbl3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。
- b. 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'ATGGA CTATCATATGCTTACCGTA3'。 比 对 序 列 为 :
ATGGA CTATCATATGCTTACCGTA ACTTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAA
CACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA
CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTG。其中N为sgRNA序列。

2. 慢病毒包装与浓缩:

- a. 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% CO₂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。
- b. 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。
- c. 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:

- a. 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>。
- b. 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10⁷ 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

- a. 选择合适的拟敲除目的基因的细胞, 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。
 - b. 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>。
 - c. 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:**
- a. 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	Stb13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