

PAM Knockout Lentivirus

| 产品编号 | 产品名称 | 包装 |
|--------|-------------------------|--------------------|
| L29451 | PAM Knockout Lentivirus | 10 ⁸ TU |

产品简介:

- PAM Knockout Lentivirus (PAM基因敲除慢病毒)是一种感染动物细胞后可以同时表达Cas9、目的基因sgRNA和puromycin抗性基因的慢病毒。本产品用于在动物细胞中基于CRISPR/Cas9技术敲除目的基因，并且本慢病毒中sgRNA的有效性已经通过T7EI法的验证。
- 本慢病毒基因序列的关键图谱信息请参考图1。本慢病毒可用于感染细胞或组织并进行目的基因的CRISPR/Cas9敲除。



图1. 可同时表达sgRNA、Cas9和puromycin抗性的本慢病毒其基因序列的关键图谱信息。

- 用于包装本慢病毒的质粒中的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。
- 本慢病毒用于实验时，建议同时选购无任何靶向的对照慢病毒Control Knockout Lentivirus (L00015)或靶向GFP的对照慢病毒GFP Knockout Lentivirus (L00017)。
- 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 |
|--------|-------------------------|--------------------|
| L29451 | PAM Knockout Lentivirus | 10 ⁸ TU |
| — | 说明书 | 1份 |

保存条件:

-80°C保存，至少一年有效。

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序列信息与本慢病毒, 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。
- 对于非目录产品的CRISPR基因敲除用的慢病毒的定制, 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. 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、5 μ g/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 $^{\circ}$ C培养过夜后, 培养液中加入5~10 μ g/ml的Polybrene (C0351/ST551)。病毒感染前, 从-80 $^{\circ}$ 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100 μ l/孔或10⁷ TU已经足够, 轻轻摇匀, 37 $^{\circ}$ 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200 μ l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>

2. 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。
- 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 |
|--------------|--|----------------------|
| L00015 | Control Knockout Lentivirus | 10 ⁸ TU |
| L00017 | GFP Knockout Lentivirus | 10 ⁸ TU |
| C0222 | 青霉素-链霉素溶液(100X) | 100ml |
| C0351-1ml | Polybrene (Hexadimethrine Bromide) | 1ml |
| C0351-50mg | Polybrene (Hexadimethrine Bromide) | 50mg |
| D0508S/M | 基因组编辑突变检测试剂盒 | 25/100次 |
| D7080S/M/L | T7 Endonuclease I (CRISPR等基因突变鉴定用) | 250/1250/5000U |
| ST551-10mg | Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素) | 10mg/ml \times 1ml |
| ST551-50mg | Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素) | 10mg/ml \times 5ml |
| ST551-250mg | Puromycin Dihydrochloride (嘌呤霉素) | 250mg |
| ST1380-500mg | Polybrene (\geq 94%, Reagent grade) | 500mg |
| ST1380-2g | Polybrene (\geq 94%, Reagent grade) | 2g |
| ST1380-10g | Polybrene (\geq 94%, Reagent grade) | 10g |

Version 2020.12.08