

## pLenti-ATP5MD-sgRNA

产品编号	产品名称	包装
L12485	pLenti-ATP5MD-sgRNA	5μg

### 产品简介:

- pLenti-ATP5MD-sgRNA (ATP5MD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ATP5MD基因敲除的质粒(L12485 pLenti-ATP5MD-sgRNA)、慢病毒(L12486 ATP5MD Knockout Lentivirus)、HEK293T细胞(L12487 ATP5MD Knockout HEK293T Cells)、HEK293T敲除细胞的RIPA裂解液(L12488 ATP5MD Knockout HEK293T RIPA Lysate)、HEK293T敲除细胞的Trizol裂解液(L12489 ATP5MD 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点击相应产品。
- ATP5MD基因的基本信息如下:

Species	Gene Symbol	Gene ID	GenBank Accession	Transcript
Human	ATP5MD	84833	BC007087	NM_032747

About the gene	
Official Symbol	ATP5MD
Previous Symbol	USMG5
Official Full Name	ATP synthase membrane subunit DAPIT
Synonyms	MGC14697; bA792D24.4; DAPIT
Location	10q24.33
Gene Type	protein-coding gene
Uniprot ID	Q96IX5
Pathway/Library	Lung Cancer Growth Related Genes Library
Gene Summary	Mitochondrial membrane ATP synthase (F(1)F(0) ATP synthase or Complex V) produces ATP from ADP in the presence of a proton gradient across the membrane which is generated by electron transport complexes of the respiratory chain. F-type ATPases consist of two structural domains, F(1) - containing the extramembraneous catalytic core and F(0) - containing the membrane proton channel, linked together by a central stalk and a peripheral stalk. During catalysis, ATP synthesis in the catalytic domain of F(1) is coupled via a rotary mechanism of the central stalk subunits to proton translocation (PubMed:29917077). ATP5MD is a minor subunit of the mitochondrial membrane ATP synthase required for dimerization of the ATP synthase complex and as such regulates ATP synthesis in the mitochondria (PubMed:21345788, PubMed:29917077). ATPMD_HUMAN,Q96IX5

### 包装清单:

产品编号	产品名称	包装
L12485	pLenti-ATP5MD-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。
- 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'ATGGACTATCATATGCTTACCGTA3'。比 对 序 列 为 :  
ATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCCTTTTTG。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% 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。
- 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<sup>®</sup> 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<sup>™</sup>转染试剂(C0521)、Lipo6000<sup>™</sup>转染试剂(C0526)、Lipo8000<sup>™</sup>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<sup>®</sup> 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

- a. 选择合适的拟敲除目的基因的细胞, 使用Lipo8000<sup>™</sup>转染试剂(C0533)、Lipo6000<sup>™</sup>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200 $\mu$ 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。

## 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。
- 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
L00002-5 $\mu$ g	CRISPR/Cas9 Packaging Vectors Set A	5 $\mu$ g/each
L00002-100 $\mu$ g	CRISPR/Cas9 Packaging Vectors Set A	100 $\mu$ g/each
L00011-5 $\mu$ g	pLenti-Control-sgRNA	5 $\mu$ g
L00011-100 $\mu$ g	pLenti-Control-sgRNA	100 $\mu$ g
L00013-5 $\mu$ g	pLenti-GFP-sgRNA	5 $\mu$ g
L00013-100 $\mu$ g	pLenti-GFP-sgRNA	100 $\mu$ g
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 <sup>TM</sup> 转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0526	Lipo6000 <sup>TM</sup> 转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
C0533	Lipo8000 <sup>TM</sup> 转染试剂	0.5/1.5/7.5ml
D0378	Stbl3甘油菌	200 $\mu$ l
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
FF345-10pcs	针头滤器(0.45 $\mu$ m/28mm, PES, Sterile, Sartorius分装)	10个/袋
FF345T-10pcs	针头滤器(0.45 $\mu$ m/28mm, PES, Sterile, 进口分装)	10个/袋
FF345-50pcs	针头滤器(0.45 $\mu$ m/28mm, PES, Sterile, Sartorius原装)	50个/盒
FF365-10pcs	BeyoGold <sup>TM</sup> 针头滤器(0.45 $\mu$ m/33mm, PES, Sterile)	10个/袋
FF365-100pcs	BeyoGold <sup>TM</sup> 针头滤器(0.45 $\mu$ m/33mm, PES, Sterile)	100个/盒
FF375-10pcs	BeyoGold <sup>TM</sup> 针头滤器(0.45 $\mu$ m/13mm, PES, Sterile)	10个/袋
FF375-100pcs	BeyoGold <sup>TM</sup> 针头滤器(0.45 $\mu$ m/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