

人全基因组敲除文库 (Brunello) 说明书

产品简介

本敲除文库适用于人全基因组的敲除和筛选，靶向人全基因组的 19,114 个基因，共包含 76,441 个敲除载体，针对每个基因有 4 个 gRNA 敲除载体，另有 1000 个对照载体。文库采用 LentiCRISPRv2 骨架，是 all in one 载体系统，即 gRNA 和 Cas9 基因是在同个载体上的，可单独使用。

具体信息

产品名称	人全基因组敲除文库 (Brunello)
产品货号	YKO-Libr-H015
产品详情	<p>76,441 个 gRNA 敲除载体 (详细序列见附件);</p> <p>单质粒系统，不需先构建 Cas9 稳转株即可直接做文库筛选;</p> <p>载体上有 Puro 基因，感染细胞后可用嘌呤霉素进行筛选;</p> <p>质粒可直接用于病毒包装，匹配第三代病毒包装系统。</p> <p>* 推荐使用源井生物慢病毒包装试剂盒，货号：YK-LVP-05</p>
	<p>靶向 19,114 个基因，每个基因设计 4 个 gRNA;</p> <p>1000 个非靶标对照 sgRNA。</p>
骨架图谱	
鉴定引物	<p>LentiCRISPRv2-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>LentiCRISPRv2-R: GACTCGGTGCCACTTTTTTCA</p>



产品标准	即用型无内毒素大提质粒，经二代测序验证，覆盖度>99%，均一性<10。
------	-------------------------------------

■ 产品使用说明

一、病毒包装

混合文库质粒与第三代病毒包装质粒，共转染进 293T 细胞（源井生物慢病毒包装 293T，货号：YC-A006），48 小时或 72 小时后收毒，浓缩后即可使用，储存需放置在-80℃冰箱中。

二、质粒扩增

1. 电转文库质粒

将 100 ng 文库质粒加到 25 μL 转化效率 $\geq 10^9$ cfu/ μg 的电转感受态中，细胞按照电转仪建议参数进行电转，电转结束后加入 975 μL 复苏培养基，混匀并转移到摇菌管中，向摇菌管中加入 1 mL 复苏培养基再次混匀，制得 1 管电转产物。重复上述操作三次，共制得 4 管电转产物，置于摇床，250 rpm、37℃条件下培养 1 h。

2. 扩增文库培养和转化效率计算

1) 将 4 管电转产物混合在一起，从中取 10 μL 用 990 μL 复苏培养基稀释。取 20 μL 稀释液涂布 10 cm 细菌培养皿，32℃培养 14 h。对皿中的菌落进行计数，若菌落数量乘以 40,000 大于 2×10^7 则可继续下一步操作，若小于 2×10^7 则需重做。

* 注：建议菌落数量乘以 40,000 大于 4×10^7 ，以保证文库 gRNA 的均一性。

2) 剩余电转产物按 400 μL 每细菌培养皿涂布，总共可涂约 20 个皿，30℃过夜培养。

3. 转化产物收集

1) 每皿加入 500 μL LB 培养基，使用刮刀刮下菌落，将菌液收集到 50 mL 离心管中。

2) 重复上述步骤。



3) 离心后弃去上清, 对沉积物 (菌) 进行称重。

4. 质粒提取

根据大提试剂盒的说明书提取质粒, 推荐 QIAGEN, MACHEREY-NAGEL 等公司的无内毒素质粒提取试剂盒 (如: QIAGEN 的 EndoFree Plasmid Mega Kit)。

三、文库筛选

1. infect MOI 摸索

将文库病毒稀释成不同的梯度, 如 MOI=0.3, 0.5, 1, 5, 10, 30, 100 感染目的细胞 (细胞汇合度为 30-50%), 每个梯度需设置 2 个孔, 感染 48 小时后按下表的设置加入 Puro 进行筛选, 待空白组细胞 (未感染病毒的细胞) 全部死亡停止药筛。选择药筛后存活比例为 30% 的 infect MOI 作为文库筛选实验的病毒感染条件 (文献中的 MOI=0.3 实际上是指 30% 细胞被病毒感染所对应的病毒量)。

组别	MOI	是否药筛	药筛后细胞量	药筛后存活比例
实验组 1	0.3	是	N1	N1/M1
实验组 2	0.5	是	N2	N2/M2
实验组 3	1	是	N3	N3/M3
实验组 4	5	是	N4	N4/M4
实验组 5	10	是	N5	N5/M5
实验组 6	30	是	N6	N6/M6
实验组 7	100	是	N7	N7/M7
药筛空白组 1	0.3	否	M1	—
药筛空白组 2	0.5	否	M2	—
药筛空白组 3	1	否	M3	—
药筛空白组 4	5	否	M4	—
药筛空白组 5	10	否	M5	—
药筛空白组 6	30	否	M6	—
药筛空白组 7	100	否	M7	—
空白组	0	是	—	—



2. 文库病毒感染药筛

① 确认细胞和病毒的用量

$$\text{细胞量} = \frac{\text{gRNA 数量} \times \text{gRNA 覆盖度}}{30\%} \quad * \text{gRNA 覆盖度} > 500$$

$$\text{病毒量} = \text{细胞量} \times \text{infect MOI}$$

② 按照上一步计算出来的细胞量扩增细胞，并准备足量病毒。

③ 使用文库病毒感染目的细胞，经 Puro 药筛将细胞分成为实验组和对照组。实验组加入目的药物进行压力筛选，筛选后分别提取实验组和对照组细胞基因组（建议对照组不少于 3.5×10^7 细胞，实验组不少于 1×10^6 细胞），进行二代测序后，对实验组和对照组 gRNA 进行对比分析。

■ 相关产品及服务

源井生物 CRISPR 现货文库系列还有人全基因组单质粒敲除文库、小鼠全基因组单/双质粒敲除文库。除此之外，源井还提供 CRISPR-KO、CRISPRa、CRISPRi 三大定制文库从高通量 sgRNA 文库构建到病毒包装、细胞转染、药物筛选、高通量测序和数据分析等一站式服务，多种交付方式满足不同科研需求！

