

# 人 CRISPR 敲除库-药物靶点、激酶、磷酸酶文库说明书

## ■ 产品简介

本敲除文库适用于对药物靶点，激酶，磷酸酶相关基因的研究。包含 24,569 个 gRNA，靶向 2,333 个基因。文库采用 pMCB320 骨架，是双质粒载体系统，仅表达 gRNA，需配套另一个表达 Cas9 基因的载体使用。

## ■ 具体信息

产品名称	人 CRISPR 敲除库-药物靶点、激酶、磷酸酶文库
产品货号	YKO-Libr-H010
产品详情	<p>24,569 个 gRNA 敲除载体（详细序列见附件）；</p> <p>双质粒系统；</p> <p>载体上有 mCherry 基因和 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 2,333 个基因，每个基因设计 10 个 gRNA；</p> <p>750 个非靶标对照 gRNA；</p> <p>750 个安全靶标 gRNA。</p>
骨架图谱	
鉴定引物	<p>pMCB320-F: CAGCACAAAAGGAAACTCACC</p> <p>pMCB320-R: GCCTAATGGATCCTAGTACTCGAG</p>
产品规格	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 $-80^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。

### 二、质粒扩增

#### 1. 电转文库质粒

取 25 ng 文库质粒加到 25  $\mu\text{L}$  转化效率 $\geq 10^9$  cfu/ $\mu\text{g}$  的电转感受态中，按照电转仪建议参数进行电转。电转结束后加入 975  $\mu\text{L}$  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。重复上述操作一次，共制得 2 管电转产物，置于摇床，250 rpm、 $37^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 2 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  $\mu\text{L}$  用 990  $\mu\text{L}$  复苏培养基稀释。取 20  $\mu\text{L}$  稀释液涂布 10 cm 细菌培养皿， $32^{\circ}\text{C}$ 培养 14 h。对皿中的菌落进行计数，若菌落数量乘以 20,000 大于  $7.5 \times 10^5$  则可继续下一步操作，若小于  $7.5 \times 10^5$  则需重做。

2) 剩余电转产物接种到 2 瓶 500 mL LB+Amp 液体培养基中，225rpm， $37^{\circ}\text{C}$ 培养 16 h。

#### 3. 转化产物收集

- 1) 将菌液收集到 50 mL 离心管中。
- 2) 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. 构建稳定表达 Cas9 的细胞系

使用双质粒敲除文库前需构建好 Cas9 稳转细胞系，源井可提供 Hygromycin 和 Blasticidin 两种抗性的 Cas9 病毒。

#### 2. 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	——	——



### 3. 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，筛选后取  $1.5 \times 10^7$  个细胞提取基因组进行二代测序，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！

