

人全基因组单质粒敲除文库说明书

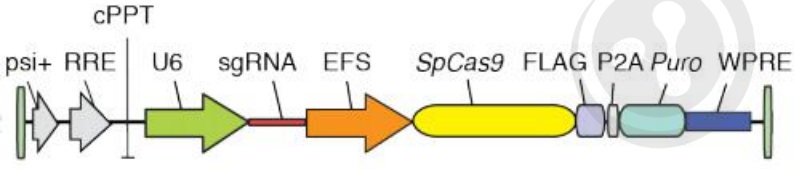
■ 产品简介

本全基因组单质粒敲除文库适用于人基因组的敲除和基因筛选，包含 100,000 多个靶向整个基因组所有外显子的敲除载体，分为 A、B 两个子文库，子文库针对每个基因有 3 个 gRNA 敲除载体，A 文库和 B 文库合起来针对每个基因就有 6 个 gRNA 敲除载体，A、B 文库可根据需要联合使用或单独使用。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 | 人全基因组单质粒敲除文库 | |
| 产品货号 | YKO-Libr-H001A, YKO-Libr-H001B | |
| 产品详情 | 123,411 个 gRNA 敲除载体（详细序列见附件）； 单质粒系统，不需先构建 Cas9 稳转株即可直接做文库筛选； 载体上有 Puro 基因，感染细胞后可用嘌呤霉素进行筛选； 质粒可直接用于病毒包装，匹配第三代病毒包装系统。 * 推荐使用源井生物慢病毒包装试剂盒，货号：YK-LVP-05 | |
| | A 库 | 65,383 个 gRNA 敲除载体； 靶向 19,050 个基因，每个基因设计 3 个 gRNA； 靶向 1,864 个 miRNA，每个 miRNA 设计 4 个 gRNA； 1,000 个非靶标对照 sgRNA。 |
| | B 库 | 58,028 个 gRNA 敲除载体； 靶向 19,050 个基因，每个基因设计 3 个 gRNA； |



| | |
|------|---|
| | 1,000 个非靶标对照 sgRNA。 |
| 骨架图谱 |  |
| 鉴定引物 | <p>LentiCRISPRv2-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>LentiCRISPRv2-R: GACTCGGTGCCACTTTTTTCA</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°C 冰箱中。

二、质粒扩增

1. 电转文库质粒

取 100 ng 文库质粒加到 25 μ L 转化效率 $\geq 10^9$ cfu/ug 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 μ 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。重复上述操作三次，共制得 4 管电转产物，置于摇床，250 rpm、37°C 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 μ L 用 990 μ L 复苏培养基稀释。取 20 μ L 稀释液涂布 10 cm 细菌培养皿，32°C 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 6×10^6 则可继续下一步操作, 若小于 6×10^6 则需重做。

* 注: 建议菌落数量乘以 40,000 大于 2×10^7 , 以保证文库 gRNA 的均一性。

2) 剩余电转产物按 400 μ L 每细菌培养皿涂布, 总共可涂约 20 个皿, 32°C 培养 14 h。

3. 转化产物收集

1) 每皿加入 500 μ L 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，筛选后取 5×10^7 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。

