

人膜蛋白敲除文库说明书

产品简介

本敲除文库适用于人膜蛋白相关基因的研究。包含 12,334 个 gRNA，靶向 1,098 个基因。文库采用 pMCB320 骨架，是双质粒载体系统，仅表达 gRNA，而 Cas9 基因是在另一个载体上，需配套使用。

具体信息

| | |
|------|---|
| 产品名称 | 人膜蛋白敲除文库 |
| 产品货号 | YKO-Libr-H014 |
| 产品详情 | <p>12,334 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 1,098 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℃冰箱中。

二、质粒扩增

1. 电转文库质粒

取 25 ng 文库质粒加到 50 μL 转化效率 $\geq 10^9$ cfu/ μg 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 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。重复上述操作一次，共制得 2 管电转产物，置于摇床，250 rpm、37℃条件下培养 2 h。

2. 扩增文库培养和转化效率计算

1) 将 2 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 20,000 大于 3.7×10^5 则可继续下一步操作，若小于 3.7×10^5 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℃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 6.2×10^6 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！

