

EZ-editor™ 人可成药敲除文库说明书

产品简介

本敲除文库适用于人可成药基因的敲除和筛选，靶向人可成药的 1980 个基因，共包含 10000 个敲除载体，针对每个基因有 5 个 gRNA 敲除载体，另有 100 个对照载体(包含 100 个靶向非基因序列)。文库采用 YCS-LV003 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 | EZ-editor™ 人可成药敲除文库 |
| 产品货号 | LIBR-H090-P |
| 产品详情 | <p>10000 个敲除载体 (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 Bsd 基因，感染细胞后可用杀稻瘟菌素进行筛选;</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 1980 个基因，每个基因设计 5 个 gRNA;</p> <p>100 个对照 sgRNA (100 个靶向非基因序列) 。</p> |



| | |
|-------------|---|
| <p>骨架图谱</p> | |
| <p>鉴定引物</p> | <p>YCS-LV003-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>YCS-LV003-R: GACTCGGTGCCACTTTTTTCA</p> <p>PCR 片段: 213 bp</p> <p>上述引物可用于做文库 NGS 测序前的 PCR 片段扩增, 扩增后的片段纯化后即可送 NGS 测序。</p> |
| <p>产品标准</p> | <p>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。</p> |

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

将 50 ng 文库质粒加到 25 μL 转化效率 $\geq 10^9$ cfu/ug 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°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 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，37°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 3.00×10^6 则可继续下一步操作，若小于 3.00×10^6 则需重做。

*** 注：建议菌落数量乘以 40,000 大于 5.00×10^6 ，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，37°C 过夜培养。

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. 文库细胞感染 MOI 摸索

设置不同梯度的 MOI 感染文库细胞，如 MOI=0.3, 0.5, 1, 5, 10, 30, 100（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。选择药筛后感染效率为 30%（也即细胞存活比例为 30%）的 MOI 作为文库筛选实验的病毒感染条件。

| 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

细胞量 = gRNA 数量 × gRNA 覆盖度 / 30% * gRNA 覆盖度 > 500

病毒量 = 细胞量 × 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 Bsd 药筛后，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 5.00×10^6 细胞；实验组收取全部剩余细胞，且冻存前细胞数量大于 1×10^6 ），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 三大定制文库高通量 sgRNA 文



电话: 400-688-9033

网址: www.ubigene.com

地址: 广州市黄埔区瑞吉二街45号京广协同2号楼A栋12楼

美国办事处: 855 777 3210

欧洲办事处: 800 3272 9252

亚太联系方式: 001 800 3272 9252

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！



电话:400-688-9033

网址:www.ubigene.com

地址:广州市黄埔区瑞吉二街45号京广协同2号楼A栋12楼

美国办事处:855 777 3210

欧洲办事处:800 3272 9252

亚太联系方式:001 800 3272 9252