

EZ-editor™ 人类转录因子 DNA 结合域 CRISPR 敲除文库说明书

产品简介

本敲除文库适用于人转录因子 DNA 结合域相关基因的敲除和筛选，靶向人转录因子 DNA 结合域相关的 1427 个基因，共包含 8658 个敲除载体，针对每个基因有 6 个 gRNA 敲除载体，另有 86 个对照载体(包含 50 个靶向非基因序列以及 36 个靶向必须基因的阳性对照载体)。文库采用 LRG2.1 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	EZ-editor™ 人类转录因子 DNA 结合域 CRISPR 敲除文库
产品货号	LIBR-H021-P
产品详情	<p>8658 个敲除载体（详细序列见附件）；</p> <p>双质粒系统；</p> <p>载体上有 EGFP 基因，可以用流式细胞术分选文库细胞。</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 1427 个基因，每个基因设计 6 个 gRNA；</p> <p>86 个对照 sgRNA（50 个靶向非基因序列）。</p>



<p>骨架图谱</p>	
<p>鉴定引物</p>	<p>LRG2.1-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>LRG2.1-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 2.60×10^6 则可继续下一步操作，若小于 2.60×10^6 则需重做。

* 注：建议菌落数量乘以 40,000 大于 4.33×10^6 ，以保证文库 gRNA 的均一性。

2) 剩余电转产物接种到 4 瓶 500mL LB+Amp 液体培养基中，225rpm，37°C培养 16h。

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%），感染 48 小时后，通过流式细胞术分析各个 MOI 梯度中细胞带 EGFP 荧光的比例。选择 EGFP 荧光占比为 30%（也感染效率为 30%）的 MOI 作为文库筛选实验的病毒感染条件。

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，并经流式细胞术分选出带 EGFP 荧光细胞。

④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 4.33×10^6 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！

