

## EZ-editor™ Lin 人类 miRNA-CRISPR 敲除文库说明书

### 产品简介

本敲除文库适用于人 miRNA 的敲除和筛选，靶向人 1594 个 miRNA，共包含 8382 个敲除载体，针对每个基因有 5 个 gRNA 敲除载体，另有 1,000 个对照载体(包含 1000 个靶向非基因序列)。文库采用 YCS-LV002 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™ Lin 人类 miRNA-CRISPR 敲除文库   |
| 产品货号 | LIBR-H056-P   |
| 产品详情 | <p>8382 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 Hygro 基因，感染细胞后可用潮霉素进行筛选；</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 1594 个基因，每个基因设计 5 个 gRNA；</p> <p>1000 个对照 sgRNA（1000 个靶向非基因序列）。</p> |



|             |  |
|-------------|--|
| <p>骨架图谱</p> |  |
| <p>鉴定引物</p> | <p>YCS-LV002-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>YCS-LV002-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&gt;99%，均一性&lt;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℃ 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  $\mu\text{L}$  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，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  $2.51 \times 10^6$  则可继续下一步操作，若小于  $2.51 \times 10^6$  则需重做。

**\* 注：建议菌落数量乘以 40,000 大于  $4.19 \times 10^6$ ，以保证文库 gRNA 的均一性。**

2) 剩余电转产物按 400  $\mu\text{L}$  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 Hygro 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  $4.19 \times 10^6$  细胞；实验组收取全部剩余细胞，且冻存前细胞数量大于  $1 \times 10^6$ ），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



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！

