

EZ-editor™ 猪 sgRNA 敲除质粒混合文库说明书

产品简介

本敲除文库适用于猪全基因组的敲除和筛选，靶向猪全基因组的 22661 个基因，共包含 123951 个敲除载体，针对每个基因有 5 个 gRNA 敲除载体，另有 2,000 个对照载体(包含 2000 个靶向非基因序列)。文库采用 YCS-LV005 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™ 猪 sgRNA 敲除质粒混合文库
产品货号	LIBR-PG005-P
产品详情	<p>123951 个敲除载体（详细序列参附件）；</p> <p>双质粒系统；</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 22661 个基因，每个基因设计 5 个 gRNA；</p> <p>2000 个对照 sgRNA（2000 个靶向非基因序列）。</p>



<p>骨架图谱</p>	
<p>鉴定引物</p>	<p>YCS-LV005-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>YCS-LV005-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<15。</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。重复上述操作七次, 共制得 8 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 8 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 3.72×10^7 则可继续下一步操作，若小于 3.72×10^7 则需重做。

* 注：建议菌落数量乘以 40,000 大于 6.20×10^7 ，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 40 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 6.20×10^7 细胞；实验组收取全部剩余细胞，且冻存前细胞数量大于 5×10^6 ），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！

