文库细胞(Cell Pool)说明书
hGeCKO Library A#2 in HEK293

产品简介

Ubigene CRISPR 文库细胞（Cell Pool，下同）应用了 CRISPR iScreen 技术，用自主研发的感受态制备覆盖度高和均一性好的文库质粒，再用慢病毒包装试剂盒 YK-LVP-20 进行病毒包装，获得高滴度的 CRISPR 文库病毒，最后经过源井独家 Cell pool 工艺，用低病毒 MOI 感染目的细胞系，控制每个细胞只进一个病毒，批量构建标准化的 CRISPR 文库细胞。Ubigene CRISPR 文库细胞批间差异小、重复性好，对其进行不同的压力条件筛选，可筛选到适用于不同领域研究的靶基因。

细胞信息			
产品名称	hGeCKO Library A#2 in HEK293		
产品货号	LIBR-H002A-C300D5		
文库名称	EZ-editor™ 人全基因组敲除文库(双质粒系统 A)		
细胞形态	上皮样, 贴壁细胞	传代比例	1:3~1:6
药筛浓度	Puromycin 1.5μg/mL Hygromycin B Gold 300μg/mL	覆盖度	300X
培养基	90%DMEM+10% FBS 本司培养时不加双抗，但细胞生长状态良好。客户可自行决定是否添加双抗。		
冻存液	50%DMEM+40% FBS+10%DMSO		

备注	

细胞接收

EZ-editor™ CRISPR 文库细胞均以冻存细胞的形式进行运输，收到后请立即转入液氮储存或短暂（24h）放至-80℃冰箱保存，或直接进行细胞复苏。

注意：冻存细胞若发现干冰已挥发完、冻存管瓶盖脱落、破损等异常情况，请务必**拍照保留**，并于收货 24h 内与我们联系（电话：400-688-9033；https://www.ubigene.com）。

细胞复苏

1）准备工作：将完全培养液置 37℃水浴锅预热 30 分钟，随后将冻存的细胞从液氮中取出，转移到-80℃冰箱，放置数分钟让残余液氮挥发，复苏细胞量参照表 1；

表 1 文库复苏细胞量

gRNA 文库大小	复苏细胞量
≤10,000	3.00E+06~5.00E+06
≤20,000	6.00E+06~1.00E+07
≤30,000	9.00E+06~1.50E+07
≤60,000	1.80E+07~3.00E+07
≤130,000	3.90E+07~6.50E+07

2）在超净台内用吸管吸取 6-7 mL 完全培养液至 15 mL 离心管中，每 2 管冻存细胞对应 1 个 15 mL 离心管；

3）将细胞从-80℃冰箱取出暂时放置于干冰里，复苏时稍稍甩动，去除残留的干冰和液氮，再迅速用镊子夹住盖子放入 37℃水浴中快速晃动（注意：水不能没过盖子），使其在 1 分钟左右完全融化；

4）在超净台内，用酒精棉球擦拭冻存管外壁消毒，稍稍晾干。用单道移液器将所有融化的细胞悬液转至提前准备好的完全培养液中，盖上盖子，1100 rpm 室温离心 4 分钟收集细胞；超净台内小心吸弃上清，用移液器吸取适量（3-5 mL）新鲜完全培养液重悬细胞至单细胞悬液；

5）将 15 mL 离心管中的细胞混合在一起，再接种至 T75 cm^2 培养瓶中(一般贴壁细胞 2 管冻存细胞，复苏到一个 T75 瓶），写上细胞名称、复苏日期、代次，放置 37℃、5% CO2 饱和湿度培养箱内培养

细胞传代

1）通常细胞长至 80%-90%汇合度即可传代。在超净台内把培养瓶里的培养液倒至废液缸，用 1×PBS（T75 cm^2 培养瓶约 8~10 mL）洗涤细胞 1~2 次，以去除残余的培养液和血清（血清含有胰酶的抑制因子）；

2）加入相应体积的胰酶溶液，具体参考附表 2，轻轻晃动瓶子并使胰酶完全浸过细胞，将培养瓶放入培养箱孵育 1~2 分钟（若细胞难以消化，可适当延长孵育时间），待在显微镜下观察到大部分细胞变圆不贴壁，轻轻晃动和敲击培养瓶两侧有大量细胞脱离，时立即终止消化；

3）加入 2 倍胰酶体积的完全培养液终止消化，并轻吹打细胞数次，使所有细胞彻底脱壁；（注意：吹散细胞时注意要轻柔，尽量不产生气泡或尽可能产生少量气泡。）

4）用 25 mL 移液管转移细胞悬液到一支 50 mL 离心管中，同一批次的细胞可以合并收集在一起，视情况用适量 PBS 将培养瓶里的残余细胞洗下来，一起加到 50ml 离心管中。盖上盖子，做好标记；

5）1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子弃上清，加适量的完全培养基重悬细胞；

6）细胞按照一定的接种比例传代，首次按照 1：3 进行传代，若细胞在两天内长满可增加传代比例，若细胞生长三四天还未长满，可适当缩小传代比例。

表 2　不同规格培养物加入胰酶体积列表

培养物规格	胰酶体积
6 孔板	0.2ml
T25	0.3ml-0.5ml
T75	1ml-1.5ml
T175	2ml-2.5ml

注意：传代时建议半药培养。

细胞冻存

1）按细胞传代的方法，在超净台内把培养瓶里的细胞进行消化至单细胞悬液，加入培养基终止反应。所有液体转移到一支 50 mL 离心管中。

2）用移液管吹打混合均匀，取 20 μL 进行细胞计数；

3）1100 rpm 室温离心 4 分钟，离心后，打开盖子倒去上清，用 4℃预冷的冻存液重悬细胞，随后加入冻存液调整至密度约为 5E+6 个细胞/ml。

4）将细胞悬液按 1 mL/管平均分装至冻存管中，旋紧盖子，冻存管应提前贴好细胞名称、细胞代次、数量、冻存日期；

5）将冻存管放置于 4℃预冷的程序降温盒中，并在冻存结束的 15 分钟之内将程序降温盒放置超低温冰箱内；

6）过夜后，将冻存细胞转移至液氮罐内保存。

注意：文库稳转株冻存细胞量参考表 1 中文库对应细胞量。

文库细胞药物筛选

1）确定药物筛选的浓度和筛选时长。筛选浓度可根据文献常用浓度进行选择，或根据药物作用于细胞的 IC50、IC80 等数值确定；筛选时长建议 2-4 周。

2）根据实验设置的实验组和对照组组数（记为 N）计算所需细胞量(细胞量=gRNA 条数*500*N)。

注意：500 代表文库细胞覆盖度为 500x，建议药物筛选时各组细胞均不低于 500x 覆盖度。

3）扩增文库细胞至所需细胞量，根据所设置的实验组数将细胞等分为若干份。

注意：为保证药物筛选期文库细胞中 gRNA 覆盖度和均一性，扩增代次不宜太高，建议控制在 5 代以内。

4）参照已确定的药物筛选浓度和筛选时长对实验组文库细胞进行筛选，并同步培养对照组细胞。

5）药物筛选结束后，收取全部实验组细胞以及不低于 500x 覆盖度的对照组细胞。

6）分别提取上述细胞基因组，用于下游 NGS 建库以及测序。

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！