

## 文库细胞(Cell Pool)说明书

### mGeCKO Library AB#1 in 4T1

#### 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	mGeCKO Library AB#1 in 4T1		
产品货号	LIBR-M002AB-C300D46		
文库名称	EZ-editor™ 小鼠全基因组敲除文库(单质粒系统 A+B)		
细胞形态	上皮样, 贴壁细胞	传代比例	1:3~1:4
药筛浓度		覆盖度	300X
培养基	88%RPMI-1640+10% FBS+1%Glutamax+1%Sodium Pyruvate 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	90%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°C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°C 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°C 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°C 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°C 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<sup>2</sup> 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°C、5% CO<sub>2</sub> 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<sup>2</sup> 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  $\mu$ L 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°C 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°C 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！

