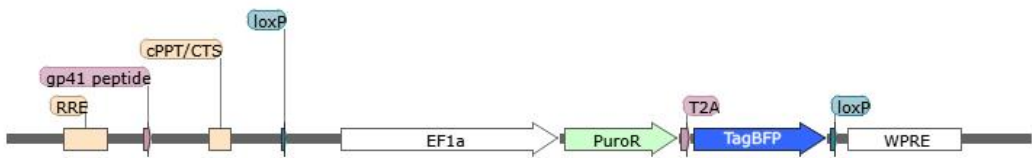


## 小鼠膜蛋白抑制文库说明书

### 产品简介

本抑制文库适用于小鼠膜蛋白基因的抑制和筛选，靶向 2,110 个小鼠膜蛋白基因，共包含 11,010 个抑制载体，针对每个基因有 5 个 gRNA 抑制载体，另有 250 个对照载体。文库采用 pCRISPRia-v2 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 (dCas9-KRAB)，需配套使用。

### 具体信息

产品名称	小鼠膜蛋白抑制文库
产品货号	YKO-Libr-M006
产品详情	<p>11,010 个 gRNA 抑制载体（详细序列见附件）；</p> <p>双质粒系统，病毒产毒量比单质粒系统高；</p> <p>载体上有 Puro 基因，感染细胞后可用嘌呤霉素进行筛选；</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 2,110 个基因，每个基因设计 5 个 gRNA；</p> <p>250 个非靶标对照 sgRNA。</p>
质粒骨架	 <p>pCRISPRia-v2</p>



鉴定引物	pCRISPRia-v2-F: GCGCCAATTCTGCAGACAAA pCRISPRia-v2-R: CCTTCTCTAGGCACCGGTTC
产品标准	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。

## ■ 产品使用说明

### 一、质粒扩增

#### 1. 电转文库质粒

将 50 ng 文库质粒加到 50  $\mu$ L 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 950  $\mu$ L 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 1 次，共制得 2 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) 从电转产物中取 10  $\mu$ L 用 990  $\mu$ L 复苏培养基稀释。取 20  $\mu$ L 稀释液涂布 10 cm 细菌培养皿，32°C 培养 14 h。对皿中的菌落进行计数，若菌落数量乘以 20,000 大于  $3 \times 10^6$  则可继续下一步操作，若小于  $3 \times 10^6$  则需重做。

\* 注：建议菌落数量乘以 20,000 大于  $5 \times 10^6$ ，以保证文库 gRNA 的均一性。

2) 剩余电转产物加入 500ml 含有氨苄抗性的 LB 培养基中，37°C 震荡过夜培养。

#### 3. 转化产物收集

将 LB 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）。

## 二、病毒包装

### 1. 病毒包装

小鼠膜蛋白抑制文库质粒和 dCas9-KRAB 质粒分别与第三代病毒包装质粒混合，然后转染进 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。

### 2. 病毒感染

先用病毒感染目的细胞，构建成稳定表达 dCas9 和抑制相关基因的细胞株，再进行文库的感染实验。

## 三、文库筛选

### 1. infect MOI 摸索

将文库病毒稀释成不同的梯度，如 MOI=0.3, 0.5, 1, 5, 10, 30, 100 感染目的细胞（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。选择药筛后存活比例为 30% 的 infect MOI 作为文库筛选实验的病毒感染条件（文献中的 MOI=0.3 实际上是指 30% 细胞被病毒感染所对应的病毒量）。

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

$$\text{细胞量} = \frac{\text{gRNA 数量} \times \text{gRNA 覆盖度}}{30\%} \quad * \text{gRNA 覆盖度} > 500$$

$$\text{病毒量} = \text{细胞量} \times \text{infect MOI}$$

### 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 Puro 药筛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  $5 \times 10^6$  细胞，实验组不少于  $1 \times 10^6$  细胞），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！

