

## 人代谢基因敲除文库说明书

### 产品简介

本敲除文库适用于人代谢基因的敲除和筛选，靶向 2,981 个人代谢功能相关基因，包含 29,790 个靶向代谢基因的敲除载体，针对每个基因有 10 个 gRNA 敲除载体，另有 500 个对照载体。文库采用 LentiCRISPRv1 骨架，是 all in one 载体系统，即 gRNA 和 Cas9 基因是在同一个载体上的，可单独使用。

### 具体信息

产品名称	人代谢基因敲除文库
产品货号	YKO-Libr-H005
产品详情	<p>30,290 个 gRNA 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 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 2,981 个基因，每个基因设计 10 个 gRNA;</p> <p>500 个非靶标对照 sgRNA。</p>
骨架图谱	
鉴定引物	LentiCRISPRv1-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAAGTTT



	LentiCRISPRv1-R: GACTCGGTGCCACTTTTTTCA
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、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

取 50 ng 文库质粒加到 25  $\mu$ L 转化效率 $\geq 10^9$  cfu/ug 的电转感受态中, 按照电转仪建议参数进行电转。电转结束后加入 975  $\mu$ 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。重复上述操作一次, 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) 将 2 管电转产物混合在一起, 从中取 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  $9 \times 10^6$ , 以保证文库 gRNA 的均一性。

2) 剩余电转产物按 400  $\mu$ L 每细菌培养皿涂布, 总共可涂约 10 个皿, 30°C过夜培养。

#### 3. 转化产物收集

1) 每皿加入 500  $\mu$ L LB 培养基, 使用刮刀刮下菌落, 将菌液收集到 50 mL 离心管中。



- 2) 重复上述步骤。
- 3) 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. 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，筛选后取  $1.5 \times 10^7$  个细胞提取基因组进行二代测序，对实验组和对照组 gRNA 进行对比分析。

