

# EdiArray™ CRISPR Negative Control Lentivirus, (Human) 产品说明书 ( Cat. NO. ARR60305 )

慢病毒 (Lentivirus) 载体是以 HIV-1 (人类免疫缺陷 1 型病毒) 为基础发展起来的基因治疗载体, 属于逆转录病毒科, 为 RNA 病毒, 该载体可以将外源基因有效地整合到宿主染色体上, 从而达到持久性表达。区别于一般的逆转录病毒载体, 它对分裂细胞和非分裂细胞均具有感染能力, 并且可有效地感染神经元细胞、肝细胞、心肌细胞、肿瘤细胞、内皮细胞、干细胞等多种类型细胞, 从而达到良好的基因治疗效果, 一些临床研究的结果显示其效果非常理想, 具有广阔的应用前景。

EdiArray™ Negative Control Lentivirus, (Human) 提供了一种高效的包装了非靶向的 sgRNA 质粒的慢病毒 (质粒的 backbone 和高通量遗传筛选使用的质粒一致)。非靶向的 sgRNA 在人源的基因组中没有对应的靶点, 所以不会产生切割, 利用非靶向的 sgRNA 质粒的慢病毒可以用于高通量遗传筛选和高通量的 Array 筛选的阴性对照。

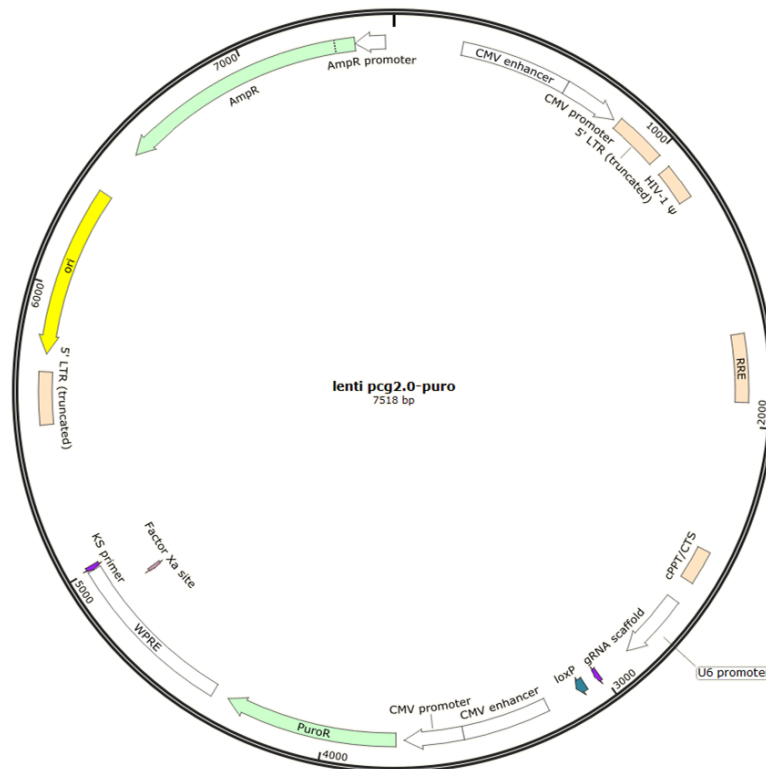
## 一、产品内容

**名称：** EdiArray™ CRISPR Negative Control Lentivirus, (Human)/ EdiArray™ 阴性对照慢病毒颗粒

**体积：** 1μL

**病毒滴度：**  $\geq 1 \times 10^7$  TU/mL

**慢病毒质粒图谱：**



**筛选方式：** puromycin

**存储方式：** - 80°C 存储, 避免反复冻融

## 二、实验前准备

使用 EdiArray™ 之前，需要确定目标细胞的生长速率，puromycin 的敏感性，Polybrene 的耐受性以及细胞的慢病毒转染效率。

### 1、使用方法

将 EdiArray™ 的慢病毒颗粒加入到 Cas9 稳定表达的细胞系中或者将 EdiArray™ 的慢病毒颗粒和包装有 Cas9 的慢病毒颗粒共同加入到靶细胞中去进行侵染。

### 2、筛选使用的 MOI

细胞的特性是影响慢病毒侵染效率的（例如分裂细胞和不分裂细胞侵染效率是不一样的），所以在筛选前首先要确定一下细胞所使用的 MOI，一般较高的 MOI 能确保较高的敲除效率。

我们建议使用 EdiGene 的 EdiArray™ CRISPR GFP 慢病毒颗粒来确定靶细胞侵染的 MOI。

### 3、侵染条件

对于每一株细胞需要先确定最适合的侵染条件，如果需要共侵染，我们建议是包装有 Cas9 的慢病毒的 MOI 应达到 5-10 左右以获得较好的敲除效果。

Polybrene 能够提升慢病毒的侵染效率 2-10 倍，所以在筛选前确定靶细胞所使用的 Polybrene 浓度。建议测试 Polybrene 的浓度区间为（2-8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）

使用 puromycin 进行抗生素筛选，首先要确定靶细胞所使用的最适浓度。一个典型的 puromycin 筛选测试需要 7-10 天左右。

## 三、实验方法

下面是使用 EdiArray™ 的 96 孔形式筛选的操作方法，将 EdiArray™ CRISPR Negative Control Lentivirus, (Human)同步加入到空中，作为整个筛选的阴性对照：

### 第 1 天

1. 在 96 孔板中加入 100 $\mu\text{L}/\text{well}$  的靶细胞，置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 24 h 后使得细胞密度达到 50%左右；

### 第 2 天

2. 从 - 80 $^{\circ}\text{C}$ 取出 EdiArray™ 的 CRISPR 文库板子，放置在 37 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中解冻，然后放置在冰上；
3. 在使用前对 EdiArray™ 的 CRISPR 文库板子离心，速度 $\leq 200\text{g} \times 2\text{min}$ ；
4. 加入合适的 MOI 的慢病毒到 96 孔的靶细胞上清中，轻轻晃动 96 孔板使得病毒均匀分散；
5. 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 48h；

### 第 5 天

6. 取出 96 孔细胞培养板，去除上清，加入含有合适浓度的 puromycin 的新鲜培养基，筛选侵染成功的靶细胞；
7. 每 2 天换一次含有合适浓度的 puromycin 的新鲜培养基；

### 第 9 天（或者更长）

8. 筛选侵染成功的细胞结束后，进行预先设计的实验方案（例如细胞存活实验、表面蛋白表达实验、高内涵筛选、报告实验等等）。

EdiGene Inc.

Web: edigene.com

E-mail: support@edigene.com

Tel: 010-8073 3899 ext.802

Address: Life Science Park, No.22 Kexueyuan Road, Changping District, Beijing, 102206, China