

# Edi-CELL™ HT-29 Whole Genome CRISPR Knock-out Cell Library

## 说明手册

( Cat : HTSCL2202201 )

### 第一部分 Edi-CELL™ HT-29 全基因组 CRISPR 敲除细胞文库

#### 一、产品组成

细胞名称：HT-29 人结肠癌细胞  
细胞来源：人源  
靶基因数目：人类全基因组 18823 个基因  
sgRNA 数目：229484 条 sgRNA  
规格：2X10<sup>7</sup> cells/tube  
形态特征：上皮细胞样  
生长特性：贴壁  
培养基：DMEM+10% FBS  
培养条件：37°C，5% CO<sub>2</sub>，PH 值 7.2~7.4，无菌恒温培养

#### 二、注意事项

1. 收到产品后，请将 Edi-CELL™ HT-29 全基因组 CRISPR 敲除细胞文库放置在液氮中冻存。
2. Edi-CELL™ HT-29 全基因组 CRISPR 敲除细胞文库避免传代次数过多。

#### 三、产品说明

HT-29 细胞是 1964 年由 Fogh J 用移植培养方法和含 15%FBS 的 F12 培养液从原发性肿瘤分离的。近来，已建株的培养细胞用含血清的 McCoy 's 5a 培养基培养。该细胞系在裸鼠中成瘤，也能在类固醇处理的地鼠中成瘤。Edi-CELL™ HT-29 细胞从 ATCC 购买获得。使用双质粒系统首先构建 HT-29 的 Cas9 稳定表达细胞系，然后再使用人类全基因组文库进行慢病毒侵染，通过抗性筛选获得单个细胞单个基因敲除的全基因组敲除细胞文库。细胞文库通过 NGS 检测，确保细胞文库的完整度，细胞文库覆盖度不低于 500 倍。

#### 四、细胞文库制备

##### 1. Cas9 稳定转染细胞系的质粒

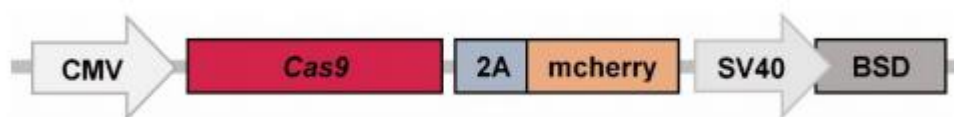


图 1 HT-29-Cas9 稳定表达细胞系使用的质粒

## 2. Edi-CELL™ HT-29 细胞文库构建质粒

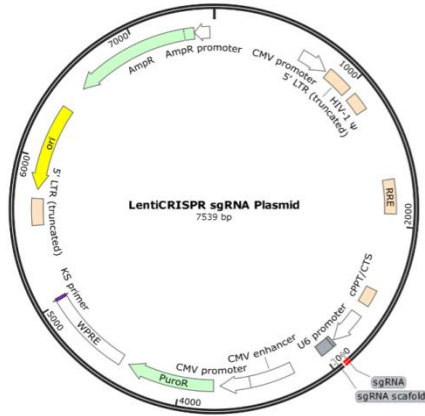


图 2 Edi-CELL™ HT-29 细胞文库 sgRNA 质粒结构

## 3. Edi-CELL™ HT-29 细胞文库构建使用的病毒包装质粒 pHelper 1 和 pHelper 2

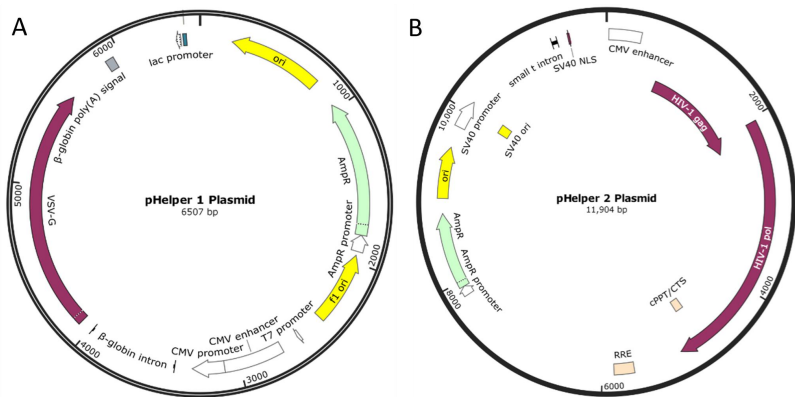


图 3 病毒包装质粒 pHelper 1 和 pHelper 2

## 4. 细胞文库构建和筛选方法

4.1 在细胞培养皿中接种适量 Cas9 稳定表达的目的细胞，细胞数目由文库大小、覆盖倍数、细胞感染效率等因素决定，另设空白对照组。

4.2 弃去细胞液，更换成含有相应体积的病毒进行感染。另设空白对照组，不加病毒。

$$\text{Cell Number of transduction in each dish} \times \text{MOI}$$

$$\text{Volume of Virus for Each Dish} = \frac{\text{Cell Number of transduction in each dish} \times \text{MOI}}{\text{Titer of Virus}} \quad (\text{MOI}=0.3)$$

4.3 病毒感染 24h 之后，弃去原细胞培养基，更换成新鲜的细胞培养基。空白对照组进行同样的操作。

4.4 上述细胞换液培养 72h 后，更换成含有预先摸索好的 Puromycin 浓度的细胞培养基进行筛选。待空白对照组的细胞全部死亡之后（约 48h），收集所有细胞，即为细胞文库。

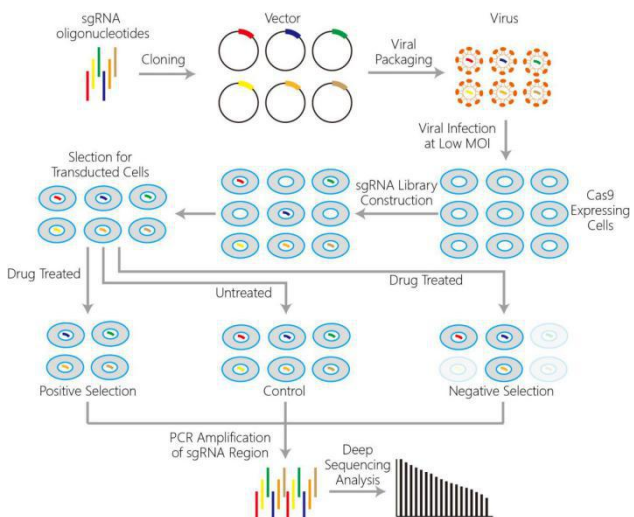


图 4 细胞文库构建方法和筛选流程图

## 五、文库质控

1. 本细胞经过了检测，不含有细菌、真菌、支原体。
2. 文库经过 NGS 测序检测，数据如下：

表 1 Edi-CELL™ HT-29 细胞文库质量评价

Parameters	sgRNA Library
Sequencing Depth	100×
sgRNA Lost	0.03%
Gene Lost	0%
Total sgRNA	225484
Total Gene	18823

## 六、细胞文库使用方法

### 细胞复苏

1. 37°C 水浴预热培养基 ( DMEM+10% FBS );
2. 从液氮中取出细胞迅速放入 37°C 水浴快速解冻 ( 解冻后不要继续暖细胞 );
3. 在超净台中加入 5ml 培养基重悬细胞，1000rpm 离心 5min ；
4. 弃上清，加入 5ml 培养基重悬细胞后转入培养皿，轻轻晃匀；
5. 置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养(培养瓶盖没有透气孔的话，瓶盖不要拧太紧)；
6. 第二天，用新鲜的培养基给细胞换液后继续培养。

### 细胞传代

1. 当细胞融合度达到 90%以上时，给细胞传代；
2. 37°C 水浴预热培养基 ( DMEM+10% FBS );
3. 在超净台中，弃培养基，加入 2-5ml PBS 清洗细胞后，再加入 1ml 胰酶消化细胞；
4. 显微镜下观察到细胞变圆，有细胞开始脱离瓶壁时，加入 5ml 培养基 ( DMEM+10% FBS ) 终止消化；
5. 用移液器轻轻吹下瓶壁上剩余的细胞，并轻轻吹打将细胞吹散；
6. 将细胞移入离心管中，1000rpm 离心 5min ；
7. 弃上清，加入 15-20mL 的培养基 ( 含血清 ) 重悬细胞后转入培养皿中或按适当比例传到培养皿 ( 确保细胞贴壁后融合度在 25-50%之间 )，混匀细胞悬液，确保细胞均匀分布；
8. 将培养瓶置于 37°C，5% CO<sub>2</sub> 的无菌培养箱中培养。

### 药物筛选

1. 将上述筛选得到的细胞文库按照一定的细胞浓度接种于细胞培养皿中，分别分为对照组和实验组，每组设置 2-3 个重复。
2. 细胞接种 24h 后，在实验组中加入预先摸索好的筛选用药物浓度；
3. 药物筛选 72h 后，分别收集各组细胞，提取基因组，进行 PCR 后，将 PCR 产物用于测序。

## 七、相关产品

Name	Product Number	Gene
Edi-HTS™ Whole Human Genome Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ WHG)	HTSLV60401	19277
Edi-HTS™ Human Kinase Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HK)	HTSLV60402	738
Edi-HTS™ Human Phosphatase Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HP)	HTSLV60403	265
Edi-HTS™ Human Kinase&Phosphatase Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HKP)	HTSLV60404	1003

Edi-HTS™ Human Cytokine Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HC)	HTSLV60405	175
Edi-HTS™ Human Kinase & Phosphatase & Plasma Membrane Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HKPP)	HTSLV60406	4255
Edi-HTS™ Human Enzyme Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HE)	HTSLV60407	2948
Edi-HTS™ Human GPCR Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HGPCR)	HTSLV60408	692
Edi-HTS™ Human Growth Factor Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HGF)	HTSLV60409	131
Edi-HTS™ Human Ion Channel Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HIC)	HTSLV60410	337
Edi-HTS™ Human Ligand-dependent Nuclear Receptor Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HLNR)	HTSLV60411	46
Edi-HTS™ Human Peptidase Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HPD)	HTSLV60412	530
Edi-HTS™ Human Transcription Regulator Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HPCR)	HTSLV60413	1515
Edi-HTS™ Human Translation Regulator Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HTLR)	HTSLV60414	103
Edi-HTS™ Human Transmembrane Receptor Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HTMR)	HTSLV60415	354
Edi-HTS™ Human Transporter Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HT)	HTSLV60416	1033
Edi-HTS™ Human Deubiquitin Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HD)	HTSLV60417	87
Edi-HTS™ Human Ubiquitin Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HU)	HTSLV60418	438
Edi-HTS™ Human Epigenetics Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HEG)	HTSLV60419	438
Edi-HTS™ Human druggable target Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ HDT)	HTSLV60420	2897
Edi-HTS™ Whole Mouse Genome Lentiviral CRISPR Library (Edi-HTS™ WMG)	HTSLV60301	

**EdiGene Inc.**

Web: [edigene.com](http://edigene.com)

E-mail: [support@edigene.com](mailto:support@edigene.com)

Tel: 010-8073 3899 ext.802

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