

Edi-HTS™ Human Kinase & Phosphatase Lentiviral CRISPR Library

(Edi-HTS™ HKP)说明手册

(Cat. No.HTSLV60404)

第一部分 Edi-HTS™HKP 病毒文库说明书

一、产品组成

1. Edi-HTS™HKP 慢病毒颗粒
病毒滴度：2X10⁸ TU/mL；
规格：200μL/管；
数量：12 管。

二、注意事项

1. 收到产品后，请将 Edi-HTS™HKP 慢病毒颗粒置于-80℃保存。
2. Edi-HTS™HKP 慢病毒须避免反复冻融，以免病毒滴度降低。

三、产品说明

人类 Human Kinase&Phosphatase 病毒文库 Edi-HTS™ HKP 是 sgRNA 载体文库，总共 10556 条 sgRNA，其中每个编辑基因均有 6-10 个靶点 sgRNA，基因数达到了 1003 个基因。Edi-HTS™ HKP 文库可以在人类细胞内敲除所有的 Human Kinase & Phosphatase 相关编码基因，结合药物筛选及二代测序可以快速得到相关的耐药或者增敏基因。EdiGene 的 Edi-HTS™ HKP 病毒文库根据人类基因组 Hg38 版本作为基础，依据 EdiGene 自主开发的 DeepRank 算法进行设计，选择在人类基因组上没有脱靶位点的 sgRNA 作为目标基因的 sgRNA，运用该算法设计的 sgRNA 敲除效率已经过上千个基因敲除细胞系的验证。运用该病毒文库进行细胞文库构建，可在 Cas9 稳定且高效表达的细胞系中进行 Human Kinase & Phosphatase 相关基因的敲除，从而保证高效的细胞文库敲除效率。该文库已进行大量扩增和包装，且经过 NGS 多次验证其完整性。

四、技术支持

您可访问博雅辑因官方网站 <http://edigene.com/> 获取更多产品信息。

第二部分 Edi-HTS™HKP 文库质量检测

Edi-HTS™HKP 文库已进行大量扩增，并用高通量测序验证文库完整性，对文库 sgRNA 的覆盖度及分布进行生物信息学统计分析（表 1；图 1）。

表 1 Edi-HTS™HKP 文库质量评价

Parameters	sgRNA Library
Sequencing Depth	--
sgRNA Lost	--
Gene Lost	--
sgRNA distribution (90% : 10%)	--
Total sgRNA	--
Total Gene	--

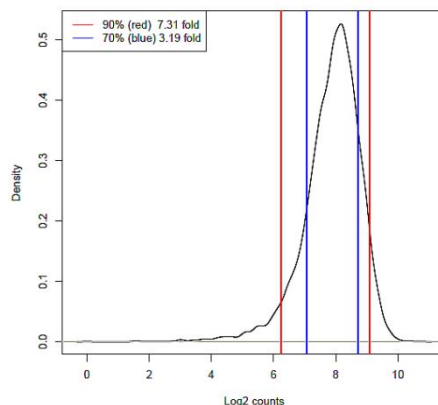


图 1 Edi-HTS™HKP 文库 sgRNA 的分布

第三部分 Edi-HTS™HKP 文库慢病毒包装与质量检测

一、实验流程

EdiGene 采用失活型慢病毒包装系统完成病毒文库包装过程。病毒包装共需要三个质粒，分别为携带 Edi-HTS™HKP 文库的质粒和两个病毒包装辅助质粒 pHelper 1 和 pHelper 2。

Edi-HTS™HKP 采用三质粒共转染 293T 细胞。在转染完成后 72h 收获病毒，并浓缩纯化得到高滴度的慢病毒保存液，测定病毒滴度（图 2）。



图 2 Edi-HTS™ HKP 文库 sgRNA 分布

二、实验材料

1. 细胞株

慢病毒包装细胞 293T 为贴壁依赖型上皮样细胞，细胞生长培养基为含 10% FBS 的 DMEM 细胞培养基。

2. 质粒载体

2.1 Edi-HTS™ HKP 文库质粒

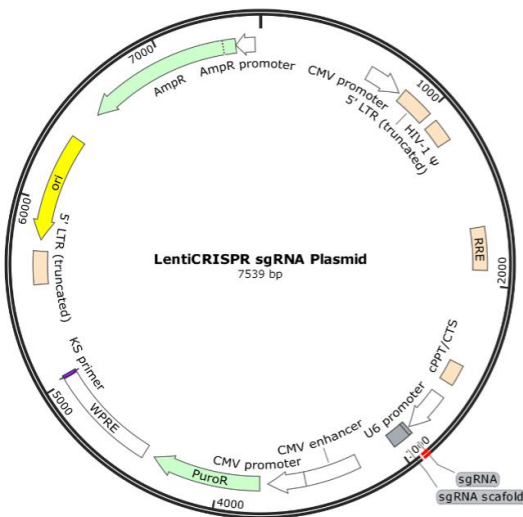


图 3 Edi-HTS™ HKP 文库质粒结构

2.2 Edi-HTS™ HKP 病毒包装质粒 pHelper 1 和 pHelper 2

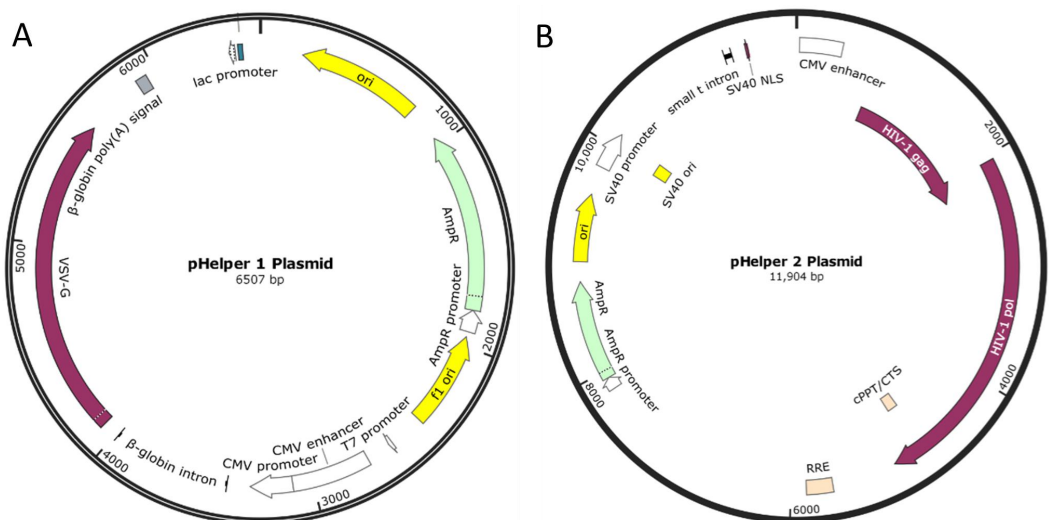


图 4 Edi-HTS™ HKP 病毒包装质粒 pHelper 1 和 pHelper 2

三、Edi-HTS™HKP 文库病毒包装

1. 接种 1×10^7 个细胞于细胞培养瓶中，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养 24h 后，细胞密度达 $\sim 80\%$ ，可用于转染；
2. 转染前 2h 更换为无血清培养基；
3. 向一无菌离心管中加入质粒转染混合试剂，其中包含 Edi-HTS™ HKP 文库质粒 20ug、pHelper 1 质粒 20ug 以及 pHelper 2 质粒 5ug，该混合试剂在室温下静置 15 min 后，加入细胞培养瓶中，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养；
4. 培养 6h 后，弃去含有转染混合物的细胞培养基，用 PBS 缓冲液清洗后，更换为新鲜配制的全培养基，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养 72h 后，收集细胞上清液，获得 Edi-HTS™ HKP 文库病毒；

四、Edi-HTS™HKP 文库病毒浓缩与纯化

1. 将细胞上清液于 1000rpm、 4°C 离心 10min，除去细胞碎片；
2. 用 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤上清液于浓缩超滤管中，于 4000g 、 4°C 离心 30min，进行病毒浓缩；
3. 将浓缩后的病毒按规格进行分装，并且检测病毒滴度；

五、慢病毒滴度检测

1. 接种 1×10^4 个细胞于 96 孔板中，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养；
2. 细胞接种 24h 后，按照梯度稀释的方法将病毒加入细胞孔中，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养；
3. 病毒侵染 24h 后，更换新鲜配制的完全培养基，置于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养；
4. 病毒侵染 72h 后，加入 $1\mu\text{g}/\text{mL}$ Puromycin 进行抗性筛选；
5. 抗性筛选 48h 后，未经病毒侵染的细胞 (Negative Control) 全部死亡，检测细胞活率。
6. 采用细胞侵染效率为 $10\% \sim 20\%$ 的病毒加入量计算病毒滴度。

六、慢病毒滴度检测结果

经检测，Edi-HTS™HKP 病毒滴度检测结果为 $2 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$ 。

第四部分 Edi-HTS™HKP 文库使用手册

一、实验流程

高通量遗传筛选流程包括以下步骤：病毒文库侵染靶向细胞；细胞文库抗性筛选；细胞文库药物筛选；筛选后富集细胞基因组 DNA 提取；富集 sgRNA 二代测序；测序结果分析 (图 5)。

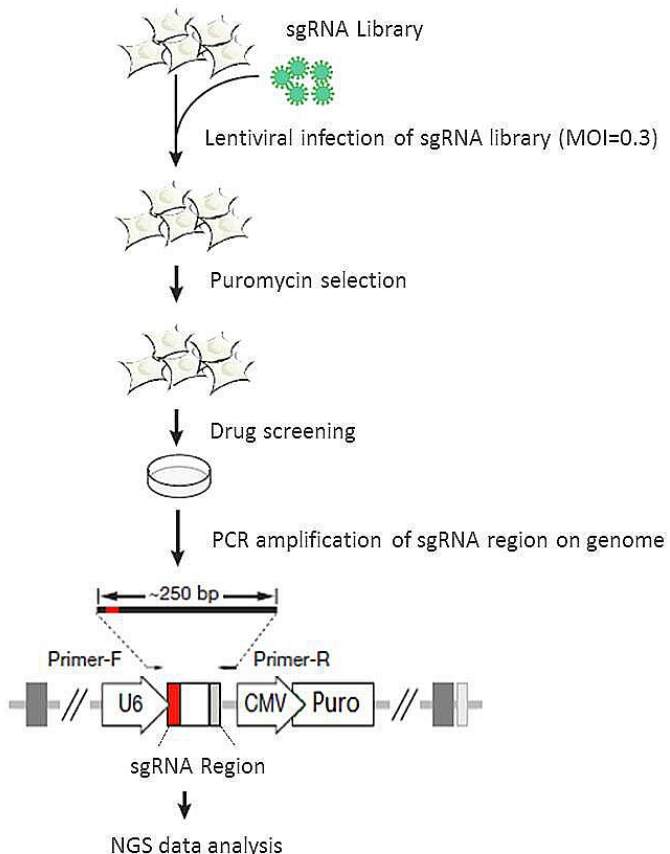


图 5 高通量遗传筛选实验流程

二、实验步骤

1. Puromycin 细胞毒性测定

- 1.1 接种适量细胞于 96 孔板中，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养；
- 1.2 细胞接种 24h 后，按照梯度稀释的方法将 Puromycin 加入细胞孔中，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养；
- 1.3 加入 Puromycin 处理 48h 后，检测细胞活率，选用可杀死目的细胞的最低浓度作为细胞文库抗性筛选所使用的 Puromycin 浓度。

2. 文库病毒对目的细胞滴度检测

- 2.1 接种适量目的细胞于 96 孔板中，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养；
- 2.2 目的细胞接种 24h 后，按照梯度稀释的方法将病毒加入细胞孔中，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养；
- 2.3 病毒侵染 24h 后，更换新鲜配制的完全培养基，置于 37°C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养；
- 2.4 病毒侵染 72h 后，加入预先摸索的 Puromycin 浓度进行抗性筛选；
- 2.5 抗性筛选 48h 后，未经病毒侵染的细胞 (Negative Control) 全部死亡，检测细胞活率。
- 2.6 采用细胞侵染效率为 10%-20% 的病毒加入量计算病毒滴度。

3. 细胞文库构建

- 3.1 在细胞培养皿中铺适量 Cas9 稳定表达的目的细胞，细胞数根据文库大小、覆盖倍数、MOI 以及生物学重复的个数决定，另设空白对照组。

$$\text{In Total Cell Number for Transduction} = \frac{\text{Number of sgRNA} \times 1000}{30\%} \times N \text{ Replicates}$$

- 3.2 弃去细胞液，更换成含有相应体积的病毒进行侵染。另设空白对照组，不加病毒。

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

- 3.3 病毒侵染 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。
- 3.4 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。将该细胞文库稳定传代 1-2 周之后，将其分为 3 份：一份用于冻存，一份用于 Control，一份用于药物筛选。

4. 药物筛选

- 4.1 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 Control 组和实验组，每组设置 N 个 Replicates。
- 4.2 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；
- 4.3 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。

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