

# Knock-out cell-line 제작 (CRISPR/Cas9)

20200211 HW Chung

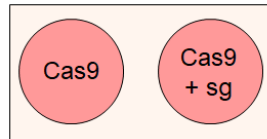
## ➤ Materials

- Opti-MEM
- lipofectamine 2000
- Cas9/ single guide(sg) DNA

## ➤ Process

### Step 1: Cell transfection

- 24-well plate 각각의 well에 실험하고자 하는 cell을 seeding ( $2.5 \sim 5 \times 10^4$  cells/well) ; 다음날 기준, cell confluency 50%가 적당함
- Opti-MEM 25 $\mu$ l에 lipofectamine 2000 2.5 $\mu$ l 넣어줌 (1)
- Opti-MEM 25 $\mu$ l에 Cas9 500ng (DNA)만 넣는 군(Cas9)과 Opti-MEM 25 $\mu$ l에 Cas9 500ng (DNA)과 sgDNA 500ng를 넣는 군(Cas9+sg), 이렇게 2개 군으로 각각 준비 (2)
- (1)과 (2)를 mix하여 (total 50 $\mu$ l) 5 min 상온
- Mix한 것을 24 well plate seeding한 세포에 방울 방울 dropping (군당 50 $\mu$ l)



### Step 2 : GFP confirmation

- 다음날, media change (세포에 따라 transfection에 의한 damage 관찰 가능)
- 3일동안 media change없이 culture후 형광현미경으로 형광확인 (Cas9에 GFP tagging됨)
- Well에 있는 cell를 떼서 96-well plate에 0.3 cells/100 $\mu$ l seeding (최대한 1 well에 1개의 세포가 들어갈 수 있도록!!)\_96-well plate 4 ~ 5개 seeding

### Step 3 : Positive cell selection

- 96-well plate에 seeding 된 well 중에 single cell이 들어간 well만 표시함 (시간이 많이 지나면 single cell이 들어간 well을 구별하기가 어려우므로 seeding 후 2~3일에 관찰하여 확인필요)
- 표시해둔 single cell이 들어간 well의 세포가 자라서 confluency가 70 ~ 80% 되었을 때, trypsin 60  $\mu$ l 넣고 세포가 다 떨어지면 140  $\mu$ l media를 넣어줌 (well 당 total 200  $\mu$ l)
- Total 200  $\mu$ l를 60  $\mu$ l (30%) 와 140  $\mu$ l (70%)로 둘로 나눠서 각각 다른 24-well plate로 옮김 (나머지는 media로 채워서 well당 500  $\mu$ l이 되도록 함)
- 이후 culture하여 70%의 cell을 seeding 한 well이 먼저 다 차면 genomic DNA 합성
- 추출한 Genomic DNA에 대한 deep sequencing을 통해 (김대식 박사님 의뢰) knock out

된 세포만 selection

- Sequencing 기간동안, 30% seeding 한 세포가 24 well에 가득 차면 각 well의 세포를 25T-Flask로 각각 옮겨서 유지 (sequencing이 보통 1주~2주 정도 소요되므로 이런 점을 고려하여 subculture 필요)
- Deep sequencing 결과 양성으로 나온 세포만 이후에 증식시켜서 저장!

Clone-25

GTGTT <b>GCCCCCTTCATCTTTGT-CATTGG</b> ACCTG	WT	
GTGTTGCCCCCTTCATCTTTGT-----gCCTG	7bp del/1bp ins	37%
GTGTTGCCCCCTTCATCTTTGTtCATTGGACCTG	1bp ins	33%
GTGTTGCCCCCTTCATCTTT-----TGGACCTG	5bp del	30%

### Sequencing 결과 예시