

CRISPR 文库质粒使用说明

v20240513

一、产品概述

CRISPR 文库是一种用于高通量功能筛选的强大工具，最常见的是以 CRISPR/Cas9 系统为基础的 CRISPR 敲除、激活和抑制筛选。Scishare 是以“**科学的方式分享科学**”为使命的公益平台，以**学术性定价**（约为同类平台 Addgene 的 40%-50%）向科学工作者提供 CRISPR 文库。本平台所提供的所有文库均为**自主知识产权**，并进行了严格质控，同时满足覆盖度大于 99%、SK 值小于 10 和 AUC 小于 0.7 三个条件。

二、产品组成

CRISPR 文库质粒提供 1 μ g 和 50 μ g 两种包装，1 μ g 包装客户收到后需要进行电转扩增，50 μ g 包装客户收到后可直接用于慢病毒或者逆转录病毒包装。

三、使用方法

1. 电转文库质粒（规格为 1 μ g 的文库质粒：需进行文库扩增用于后续实验）

1) 取 100 ng 文库质粒加到 25 μ L 转化效率 $\geq 10^9$ cfu/ μ g 的电转感受态中，按照电转仪建议参数进行电转。

2) 电转结束后加入 975 μ L 复苏培养基（无抗生素），混匀并转移到摇菌管中；置于摇床，220 rpm、37 $^{\circ}$ C 条件下培养 1 h。

2. 扩增文库培养和转化效率计算

1) 准备用于计算转化效率的稀释液。从 1 ml 复苏菌液中取出 10 μ l 加入 990 μ l LB 培养基中，稀释 100 倍，混合均匀；然后将 100 倍稀释液 100 μ l 加入 900 μ l LB 培养基中，稀释 1000 倍，混合均匀；将 100 μ l 的 1000 倍稀释液涂在预热的标准 LB 琼脂板上（10cm 平板，加相应抗生素），37 $^{\circ}$ C 培养 14 小时。

2) 将剩余的 990 μ l 复苏菌液稀释至 7.5 ml，每个 15 cm 预热的标准 LB 固体平板上加入 500 μ l 复苏菌液（大约需 15 个 150 cm LB 固体平板，含抗生素），37 $^{\circ}$ C 培养 14 小时。

3) 计数 10000 倍稀释板上的菌落数，将菌落数乘以 10000 然后除以该文库的 sgRNA 数量，得到该文库的覆盖乘数，当文库菌落总数大于等于 sgRNA 数量的 500 \times 时才可进行下一步的菌体收集和质粒提取。

3. 菌体收集

- 1) 每皿加入 500 μ 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 TIANGEN 的无内毒素质粒提取试剂盒（**TIANGEN, EndoFree Maxi Plasmid kit, Cat. No. DP117**）。

5. 文库质控

将所提取的文库质粒进行 NGS 质检分析以确保文库的均一性以及覆盖度合格，推荐使用研美生物的 Magic™ 一步法 CRISPR 测序文库构建试剂盒（**YOMEBIO, One-step CRISPR NGS Library Construction Kit, Cat. No. PK201**）。

6. 病毒包装（规格为 50 μ g 的文库质粒：可直接用于病毒的包装用于后续的实验）

- 1) 15 cm dish 培养待包装的 293T 细胞至 80%左右。
- 2) 准备三种转染质粒的混合物，20 μ g of total DNA，pMD2.G：psPAX2：待转染文库质粒=1：2：4。
- 3) 加入 μ g DNA： μ l PEI=1：3 的 PEI（DNA 总量一般 20 μ g），再加入 DMEM 至 1 mL，轻轻地混匀（PEI 因为有毒，一般最后滴加混合）。室温孵育 15-20 min。
- 4) 小心地将转染混合物转移到 15 cm dish 中。滴加转染混合物，小心不要移动细胞。
- 5) 孵育 12-18 小时，然后更换新鲜培养基，继续孵育细胞。
- 6) 病毒可以在转染后（更换新鲜培养基为 0 时刻）48 和 72 小时以单独收获或合并收获的方式收获，其中所有单独收获都汇集在一起。如果汇集收获，将收获的病毒液转移到 EP 管中，并在收获之间储存在 4 $^{\circ}$ C。
- 7) 将病毒上清液以~500 g 离心 5 分钟，以沉淀收获期间收集的任何包装细胞。通过 0.45 μ m PES 过滤器过滤上清液。病毒上清液可在 4 $^{\circ}$ C 下保存数小时，但应分装并速冻于液氮中，并尽快在 -80 $^{\circ}$ C 下保存，以免滴度损失。

四、注意事项

在使用 CRISPR 文库质粒前，请务必阅读使用手册，并遵循实验室的生物安全规定。操作过程中需保持无菌环境，避免污染和交叉污染。质粒转化和细胞培养过程中，注意控制温度、湿度和 pH 值等条件，确保细胞的正常生长和编辑效果。

五、存储条件

CRISPR 文库质粒应存放在-20°C或更低温度的冰箱中，避免反复冻融。

六、售后服务

如您在使用过程中遇到任何问题或需要进一步的技术支持，请通过邮件（scishare@qq.com）或者微信（18140520208）联系我们的客服团队。我们将竭诚为您解答问题并提供帮助。

请注意，本使用说明仅为一般性指导，具体实验条件和操作细节可能因实验需求和细胞类型而有所不同。请根据您的实际情况和实验目的进行适当调整和优化。

七、参考文献

Joung J, Konermann S, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, Platt RJ, Brigham MD, Sanjana NE, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and transcriptional activation screening. Nat Protoc. 2017 Apr;12(4):828-863. doi: 10.1038/nprot.2017.016. Epub 2017 Mar 23.