

## CRISPR 文库慢病毒使用说明

### 产品简介

Ubigen CRISPR 文库病毒应用了 CRISPR iScreen 技术，先获得覆盖度高和均一性好的文库质粒，再用慢病毒包装试剂盒 YK-LVP-20 进行病毒包装，收集病毒上清并进行浓缩，获得高滴度的文库病毒。Ubigen CRISPR 文库病毒可直接用于 CRISPR 文库稳转株(文库 cell pool)构建，直接省略繁琐复杂的文库质粒扩增过程，快一步获得 CRISPR 文库稳转株(文库 cell pool)。

### 产品信息

|      |                                                                                                                                                                                                                  |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 产品名称 | EZ-editor™ 人泛素化敲除文库病毒                                                                                                                                                                                            |
| 产品货号 | LIBR-H017-LV                                                                                                                                                                                                     |
| 产品详情 | <p>11108 个敲除载体（详细序列见附件）；</p> <p>单质粒系统，不需先构建 Cas9 稳转株即可直接做文库筛选；</p> <p>载体上有 Puro 基因，感染细胞后可用嘌呤霉素进行筛选；</p> <p>质粒可直接用于病毒包装，匹配第三代病毒包装系统。</p> <p>靶向 660 个基因，每个基因设计 15 个 gRNA；</p> <p>1000 个对照 sgRNA（1000 个靶向非基因序列）</p> |
| 骨架图谱 |                                                                                                                                                                                                                  |
| 鉴定引物 | LentiCRISPRv2-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT                                                                                                                                                                         |



|      |                                                                                                                             |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|      | <p>LentiCRISPRv2-R: GACTCGGTGCCACTTTTCA</p> <p>PCR 片段: 213 bp</p> <p>上述引物可用于做文库 NGS 测序前的 PCR 片段扩增, 扩增后的片段纯化后即可送 NGS 测序。</p> |
| 滴度   | $\geq 1.00E+08$ TU/ml                                                                                                       |
| 储存条件 | -80°C                                                                                                                       |

## 产品接收

- 1) Ubigene 的 CRISPR 敲除文库慢病毒产品使用干冰运输, 收到货物后请把病毒置于-80°C保存, 同时避免反复冻融。
- 2) 病毒可在-80°C稳定保存至少 6 个月, 若储存时间超过 6 个月, 建议在使用前重新测定病毒滴度。
- 3) 促感染试剂 Polybrene 随病毒发货, 保存在-20°C。

## CRISPR 敲除文库慢病毒使用的方法

### 1. 名词注释:

**MOI 值:** 复感染指数, 定义为感染时病毒和细胞数量的比值, 对于不同种类不同来源的细胞, 其最适 MOI 各有差别。一般选择能达到 80%感染效率, 并且细胞状态不受影响的 MOI 作为最佳 MOI。对于易感细胞, 其 MOI 在 1~10。对于较难感染的细胞, 可能需要 20 或更高的 MOI。

**infect MOI:** 感染 MOI, 定义为使 30%细胞感染病毒时的病毒和细胞数量的比值。此数值会受病毒批次的影响, 所以建议做文库病毒感染前, 先用该批次病毒做预实验, 再进行正式实验。若换了另外一批病毒批次, 则需重做一次预实验, 摸索 infect MOI。

**Polybrene:** 一种促感染试剂, 其常用浓度为 5~8  $\mu\text{g/mL}$ 。Polybrene 能通过中和电荷间的相互作用来增强病毒与细胞膜的结合, 从而提高病毒的转导效率。但 Polybrene 对于某些细胞有毒性,



不同细胞对 polybrene 的敏感度不同，必要的话可以设置几个工作浓度以测试 Polybrene 对靶细胞的毒性。Ubigen 提供的 Polybrene 的浓度为 0.5 mg/mL，如有需要，使用过程中可用 PBS 或培养液进行稀释。

## 2.infect MOI 摸索

提前一天将细胞接种至 12 孔板，使感染当天细胞汇合度为 30%~50%。

取 2 个孔，使用胰酶消化后进行细胞计数，计算平均每孔的细胞量 N。

根据病毒的滴度 T (TU/mL) 和细胞量 N 计算各 MOI 所需的病毒体积，计算公式为： $V (\mu\text{L}) = 1000 \times \text{MOI} \times N / T$ 。假设 MOI=10，细胞量=200000，病毒滴度为  $3 \times 10^8$  TU/mL，则病毒体积为 6.7  $\mu\text{L}$ 。

将文库病毒稀释成不同的梯度，如 MOI=0.3, 0.5, 1, 5, 10, 30, 100 感染目的细胞，每个梯度需设置 2 个孔，感染 48 小时后按下表的设置加入 Puro 进行筛选，待空白组细胞（未感染病毒的细胞）全部死亡停止药筛。选择药筛后存活比例为 30% 的 infect MOI 作为文库筛选实验的病毒感染条件。

| 组别      | MOI | 是否药筛 | 药筛后细胞量 | 药筛后存活比例 |
|---------|-----|------|--------|---------|
| 实验组 1   | 0.3 | 是    | N1     | N1/M1   |
| 实验组 2   | 0.5 | 是    | N2     | N2/M2   |
| 实验组 3   | 1   | 是    | N3     | N3/M3   |
| 实验组 4   | 5   | 是    | N4     | N4/M4   |
| 实验组 5   | 10  | 是    | N5     | N5/M5   |
| 实验组 6   | 30  | 是    | N6     | N6/M6   |
| 实验组 7   | 100 | 是    | N7     | N7/M7   |
| 药筛空白组 1 | 0.3 | 否    | M1     | ——      |
| 药筛空白组 2 | 0.5 | 否    | M2     | ——      |
| 药筛空白组 3 | 1   | 否    | M3     | ——      |
| 药筛空白组 4 | 5   | 否    | M4     | ——      |



|         |     |   |    |    |
|---------|-----|---|----|----|
| 药筛空白组 5 | 10  | 否 | M5 | —— |
| 药筛空白组 6 | 30  | 否 | M6 | —— |
| 药筛空白组 7 | 100 | 否 | M7 | —— |
| 空白组     | 0   | 是 | —— | —— |

### 3.文库病毒感染（即文库稳转株构建）

#### 细胞和病毒用量计算：

##### ①细胞用量计算

细胞量 = gRNA 数量 × gRNA 覆盖度 / 30%

\* gRNA 覆盖度 100~500 不等，全基因组建议按 500 的覆盖度做。

##### ②病毒用量计算

病毒量 = 细胞量 × infect MOI（预实验所得）

#### 感染药筛：

1) 病毒转导前一天，准备好足够量的细胞，汇合度为 30%~50%。

例：293T 感染人全基因组单质粒敲除文库 A，infect MOI=0.3，gRNA 覆盖度选择 500×，则需要细胞量为 $(65383 \times 500) / 30\% = 1.09E+08$ 。已知每瓶汇合度 30%的 T175 的 293T 细胞量为  $5.5E+6$ ，则感染所需细胞瓶数大约为 20 瓶。此外，还需另加 1 瓶细胞用来做药筛对照。

2) 转染当天，取 1 瓶细胞，将细胞消化成单细胞悬液，进行细胞计数。

3) 根据计数结果，计算感染需用的细胞量对应的细胞瓶数，在瓶子上做标记，逐瓶添加 Polybrene。

4) 将文库病毒从冰箱取出置于冰上融化，用移液器轻柔吹打混匀，根据每个培养瓶细胞量和 infect MOI 计算病毒用量，将文库病毒加到细胞培养液中混匀，放回培养箱中孵育，进行感染。

5) 感染 24 小时后，吸出含有病毒和 Polybrene 的培养液，更换新鲜的完全培养液。



6) 文库病毒感染 48 小时后，加文库病毒对应的抗生素进行筛选，直到野生型对照组细胞死完飘起。

注意：为了获得较好的药筛结果，建议进行药筛预实验，用不同浓度的抗生素来测试野生型细胞，制作致死曲线，选出一个可以完全杀死未有效转导的细胞，但又不会影响有效转导细胞的浓度。下表列出了 4 种常用抗生素的药筛浓度以及时间。

| 抗生素名称  | Puromycin  | Blasticidin | Hygromycin B  | G418           |
|--------|------------|-------------|---------------|----------------|
| 常用工作浓度 | 1~10 µg/mL | 5~30 µg/mL  | 100~500 µg/mL | 400~1000 µg/mL |
| 筛选时间   | 2~3 天      | 7~10 天      | 3~5 天         | 4~7 天          |

7) 药筛结束后可进行半药扩增，取一份细胞做 NGS 鉴定，检测 gRNA 覆盖度。（一份文库稳转株细胞的量=gRNA 数量×覆盖度）

8) 细胞扩增足够量之后，按照常规方法对文库稳转株细胞进行冻存。

## CRISPR 敲除文库慢病毒使用的安全须知

Ubigen 生产的慢病毒属于“第三代”慢病毒载体，其基因组的 3' LTR 经过突变形成了所谓的“自失活”（Self-inactivation, SIN），即该病毒基因组整合到细胞基因组后，不会产生新的子代病毒，因此具有较好的安全性。但该病毒仍具有感染人原代细胞的能力，有潜在的生物学危险。Ubigen 建议您操作病毒时按照 BSL-2 安全防护水平，穿戴实验服、口罩和手套等防护用具，使用生物安全柜进行实验。接触过病毒的枪头、离心管、培养板、废液等物品可用常规灭菌程序（121℃，20 分钟）进行病毒灭活。

## 常见问题

### 1. 什么是 gRNA 覆盖度？

在做稳转株构建时，gRNA 覆盖度是指文库病毒感染药筛后，细胞总量相对于 gRNA 数量的倍数关系。



例：相对于 gRNA 数量为 65383 的文库来说，要求 gRNA 覆盖度为 500×，则需要保证感染药筛后，细胞数量大于  $3.27\text{E}+07$ 。由于感染时选取的 infect MOI 是以药筛后细胞剩余 30%为标准的，因此，感染时的初始细胞数量应为  $3.27\text{E}+07/30\%$ ，即  $1.09\text{E}+08$ 。

## 2. NGS 测序样品怎么制备？

NGS 测序样品的类别可以是细胞团，基因组，PCR 产物或构建好的测序文库。

### 1) 细胞样品

把细胞用 PBS 重悬，离心后弃上清，获得细胞团，以干冰形式寄送，细胞量要求总量大于或等于 gRNA 数量×覆盖度。

### 2) 基因组

按照细胞样品的标准先准备好细胞团，再用试剂盒进行基因组提取，基因组的浓度和总量按照测序公司的要求提供。

### 3) PCR 产物

PCR 产物是提取完基因组后，用 gRNA 扩增引物将文库的 gRNA 扩增出来（不含测序接头和测序引物），需要进行纯化操作，然后按照测序公司的要求，提供对应浓度，总量的 PCR 纯化产物。

送给源井做二代测序的 PCR 产物要求：总量 > 1.5 μg，浓度 > 60 ng/μL，片段大小 250~280 之间。

### 4) 测序文库

不推荐此选项，自行构建的文库可能与测序平台的匹配度低。

## 3. gRNA 扩增引物序列

在源井购买的文库产品，会有对应的文库使用说明书，其中包含 gRNA 扩增引物序列。

## 相关产品及服务



源井生物 CRISPR 现货文库系列还有人全基因组单质粒敲除文库、小鼠全基因组单/双质粒敲除文库。除此之外，源井还提供 CRISPR-KO、CRISPRa、CRISPRi 三大定制文库从高通量 sgRNA 文库构建到病毒包装、细胞转染、药物筛选、高通量测序和数据分析等一站式服务，多种交付方式满足不同科研需求！

