

CRISPR 文库慢病毒使用说明

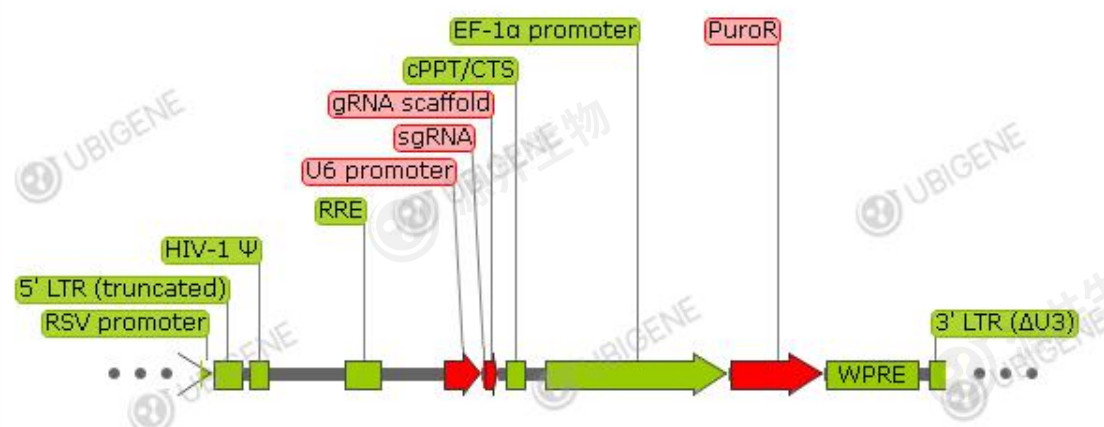
产品简介

Ubigene 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。Ubigene 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™ 小鼠全基因组敲除文库病毒(双质粒系统 A)
产品货号	LIBR-M007A-LV
产品详情	<p>67405 个敲除载体（详细序列见附件）；</p> <p>双质粒系统；</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 20611 个基因，每个基因设计 6 个 gRNA；</p> <p>1000 个对照 sgRNA（1000 个靶向非基因序列）</p>



<p>骨架图谱</p>	
<p>鉴定引物</p>	<p>LentiGuide-Puro-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT</p> <p>LentiGuide-Puro-R: GACTCGGTGCCACTTTTTCA</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>
<p>滴度</p>	<p>≥1.00E+08TU/ml</p>
<p>储存条件</p>	<p>-80℃</p>

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℃保存, 同时避免反复冻融。
- 2) 病毒可在-80℃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℃。

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, 其最佳 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。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 $\text{MOI}=10$, 细胞量=200000, 病毒滴度为 $3 \times 10^8 \text{ TU}/\text{mL}$, 则病毒体积为 6.7 μL 。

将文库病毒稀释成不同的梯度, 如 $\text{MOI}=0.3, 0.5, 1, 5, 10, 30, 100$ 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

$$\text{细胞量} = \text{gRNA 数量} \times \text{gRNA 覆盖度} / 30\%$$

* 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

$$\text{病毒量} = \text{细胞量} \times \text{infect MOI (预实验所得)}$$

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 $3.27E+07$ 。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 $3.27E+07/30%$ ，即 $1.09E+08$ 。

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 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，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！

