

## 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™ 人代谢基因敲除文库病毒
产品货号	LIBR-H005-LV
产品详情	<p>30290 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 2981 个基因，每个基因设计 10 个 gRNA；</p> <p>500 个对照 sgRNA（500 个靶向非基因序列）</p>
骨架图谱	<p>The diagram illustrates the genetic backbone of the CRISPR library virus. Key components include the 5' LTR (truncated), RSV promoter, HIV-1 Ψ packaging signal, RRE (Rev Responsive Element), cPPT/CTS (central polyprotein target site), U6 promoter driving the gRNA array, scaffold, hPGK promoter driving the PuroR selection marker, WPRE (Woodchuck Posttranscriptional Regulatory Element), and the 3' LTR (ΔU3). The gRNA array is flanked by scaffold and U6 promoter elements.</p>



鉴定引物	YKO-LV004-F: ATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTT YKO-LV004-R: GACTCGGTGCCACTTTTTCA PCR 片段: 212 bp 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。
滴度	≥1.00E+08TU/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 μg/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 μL。

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

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

\* 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 $\times$ , 则需要细胞量为 $(65383 \times 500) / 30\% = 1.09\text{E}+08$ 。已知每瓶汇合度 30% 的 T175 的 293T 细胞量为  $5.5\text{E}+6$ , 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 $\times$ ，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 $\times$ 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  $\mu$ g，浓度 > 60 ng/ $\mu$ 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！

