

CRISPR

文库筛选

入门指南



前言

关于文库筛选

CRISPR 文库筛选技术是一项基于 CRISPR/Cas9 系统的生物学工具，用于高通量的基因功能研究。其背景可追溯至 CRISPR/Cas9 技术的诞生，这一革命性的基因编辑工具最初只是用于单个基因的编辑。然而，科学家们很快意识到，通过整合适当的 sgRNA 序列，可以同时干预或编辑多个基因，这一观念催生了 CRISPR 文库筛选技术。

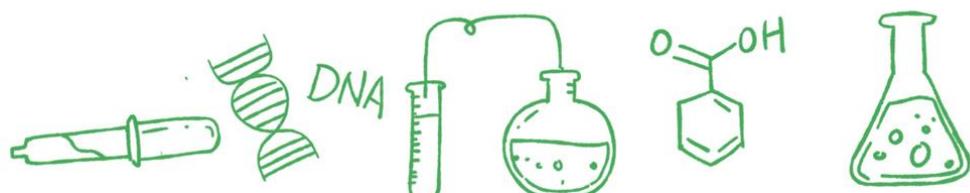
CRISPR/Cas9 文库筛选技术可实现全基因组范围的高通量筛选，其针对每个基因设计 3-10 条 sgRNA，利用芯片一次性合成数万条覆盖整个基因组的 sgRNA 探针，通过克隆构建载体库，经慢病毒包装后以低感染复数感染宿主细胞，使得理论上每个细胞整合一条 sgRNA，构建获得覆盖全基因组的基因敲除细胞池；经过筛选后，提取基因组并针对整合的 sgRNA 序列进行高通量测序，分析筛选前后 sgRNA 的丰度变化，进而找出其对应候选基因。目前，人源和鼠源全基因组文库以及针对多种特异生物学通路的亚库已经日渐完善。

CRISPR 文库筛选技术的出现，使得科学家可以在基因组级别进行精确的功能研究。通过构建 CRISPR 文库，可以对大量基因进行系统的筛选和功能研究。在疾病治疗、农业改良和生物工程等领域具有广泛应用前景。通过筛选和鉴定特定的基因和途径，科学家可以更好地理解生物体的运作机制，揭示潜在的治疗靶点和优化生物工程过程。鉴于 CRISPR/Cas9 高通量文库筛选技术的强大功能，可以预见未来其将得到前所未有的发展和应用。

本册将详细介绍 CRISPR 文库筛选技术流程，一册搞定 CRISPR 文库筛选实验。

目录

前言	2
CRISPR 文库筛选操作步骤	5
一、整体步骤:	5
二、具体实验操作步骤:	5
1. Cas9 病毒包装	5
2. 药筛浓度确定	6
2.1. 抗性滴定细胞:	6
2.2. sgRNA 病毒转染抗性曲线	6
2.3. 确定最佳铺板密度	7
3. sgRNA 文库扩增及提取	7
4. Cas9 稳转株构建	8
5. sgRNA 文库病毒包装	9
6. sgRNA 文库病毒转染 Cas9+稳转株	10
6.1. 在目的细胞上滴定病毒使用量	10
6.2. 确定目的细胞数量	11
6.3. sgRNA 文库病毒转染目的细胞	11
7. 筛选	12
7.1. 正向筛选	12
7.2. 负向筛选	13
8. gDNA 提取	13
9. PCR 扩增	13
10. gDNA PCR	13
11. PCR 产物提取及定量	14
11.1. DNA 纯化和定量	15
12. 二代测序文库制备	15
13. 分析	15
三、CRISPR 文库筛选常见问题及解决方法	15
四、Q&A	16





CRISPR 文库筛选操作步骤

一、整体步骤：

- Cas9 慢病毒包装
- 药筛浓度确定
- Cas9 慢病毒转染
- sgRNA 文库扩增及质控
- sgRNA 慢病毒包装
- 确定 sgRNA 慢病毒转染 Cas9+稳转株的 MOI
- sgRNA 慢病毒文库转染 Cas9+稳转株
- 根据实验目的进行文库细胞扩培及铺板
- 筛选后提取 gDNA
- 测序文库构建
- NGS 测序及分析

二、具体实验操作步骤：

1. Cas9 病毒包装

1) 转染前约 24 小时，将 $4 - 5 \times 10^6$ Lenti-X 293T 细胞/10 cm 平板接种在 8 ml 完全培养基中。在 37°C、5%二氧化碳条件下培养过夜。转染时，细胞应达到 80-90%的汇合度。

2) 将转染混合物在室温下混合并孵育培养 10 分钟，以形成复合物。孵育 10 分钟后，离心 2 秒，使液体到达管底部。

3) 将转染复合物溶液滴加到步骤 1 中制备的 8ml 细胞培养物中。轻轻地来回摇动盘子使其混合。

***注：添加转染复合物溶液后，介质的颜色略有变化是正常的。**

4) 在 37°C、5%CO₂ 的培养箱中培养细胞。

***注：转染 4 小时后可进行换液。也可直接培养过夜，但通常不会提高转染效率或滴度。**

5) 过夜后，再加入 6 毫升新鲜的完全培养基，在 37°C、5%CO₂ 下再孵育 24-48 小时。病毒滴度通常在转染开始后 48 小时最高；然而，可以在 48 小时和 72 小时多次收集合并。

6) 如果需要，可以把多个培养瓶的慢病毒上清液合并起来（48 小时的样品可在 4°C 下储存，直到收获 72 小时的样品）。

7) 短暂离心（500g，10 分钟）后通过 0.2μm 滤膜过滤以去除细胞碎片，然后等量分装并储存在 -80°C 冰箱。

注：使用的过滤器应由醋酸纤维素或聚砜（低蛋白结合）制成，而不是硝化纤维素。因为硝化纤维素会结合慢病毒膜中的蛋白质并破坏病毒。



8) 测病毒原液滴度，然后使用病毒转染靶细胞。

注：在每次冻融中，滴度可能下降 2-4 倍

2. 药筛浓度确定

在使用 G418、潮霉素或嘌呤霉素建立稳定和双稳定的细胞系之前，需要先确定改批次的抗性试剂对宿主细胞系的最佳选择浓度。这一点很重要，因为不同批次药物的效力存在较大差异。因此，每一批新的抗生素试剂都需要经过滴定实验，以确定最佳浓度。我们建议您对每种药物进行两个实验：

- 绘制细胞杀伤曲线确定最佳药物浓度
- 通过预实验以确定最佳铺板密度。即使您使用的是预制的 Cas9 细胞系，也建议您执行此步骤。

对于双质粒系统的 CRISPR sgRNA 文库（例如 pLCKO2::mTKO），需要先构建稳定表达 Cas9 的细胞系。在开始筛选之前，确保细胞系不含支原体。在您选择的容器中确定最佳的细胞接种密度，使细胞在培养 3-4 天后汇合度达到 80%。记录细胞的大概倍增时间。

2.1. 抗性滴定细胞

1) 铺板 2×10^5 个细胞，每种细胞接种在 6 个 10 厘米皿中，培养皿含有 10 毫升合适的完全培养基和不同浓度（0、50、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）的潮霉素或 G418。对于嘌呤霉素，添加 0、1、2.5、5、7.5 和 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗生素。

- 2) 将细胞培养 10-14 天，每 2 天更换一次选择性培养基（必要时更频繁）。
- 3) 每两天检查一次培养皿中的活细胞。

为了筛选稳转株，使用在约 5 天内开始导致大量细胞死亡并在 7-10 天内杀死所有细胞的最低浓度。

2.2. sgRNA 病毒转染抗性曲线

- 1) 测定细胞系对嘌呤霉素的敏感性。
- 2) 可以在 12 孔板中进行，并且可以通过细胞计数或台盼蓝染色进行定量。
- 3) 嘌呤霉素梯度稀释范围可以为 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，增量为 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。
- 4) 确定在 48 小时内杀死 100% 未感染细胞的最低浓度。
- 5) 使用上述获得抗性浓度筛选感染后的细胞

6) 对嘌呤霉素的敏感性和反应时间可能因细胞系而异，重要的是在开始表型筛选前使用 48-72 小时内可筛选完细胞的最佳抗性浓度，以最大限度地减少必需基因的丢失。

7) 对于倍增时间较长的细胞系，使用嘌呤霉素筛选的时间可以适当延长。在这些情况下，杀伤曲线应基于 <3 代增殖所需的时间。

2.3. 确定最佳铺板密度

确定了最佳药筛浓度后，使用不同细胞密度铺板来确定最佳铺板密度。如果细胞以过高的密度铺板，它们将



在抗性筛选生效之前达到融合度约 80%。最佳铺板密度取决于细胞倍增时间和细胞大小。

- 1) 在含有 10ml 选择性培养基的六个 10cm 培养皿中以几种不同密度铺板细胞。建议密度（细胞/10cm 培养皿）： 5×10^6 、 1×10^6 、 5×10^5 、 2×10^5 、 1×10^5 和 5×10^4 。
- 2) 培养细胞 5-14 天，每四天更换一次选择性培养基。
- 3) 每两天检查一次培养皿中的活细胞。
- 4) 为了筛选稳转株，在细胞大量死亡开始之前（大约第 5 天），使用使细胞达到~80%融合度的培养密度。

在 cas9 稳转株转染 sgRNA 病毒文库时需要重复此步骤。

3. sgRNA 文库扩增及提取

材料：

- 50 μ L 感受态细胞 (Lucigen, Endura™ Competent Cells 60240-1)
- 50 ng/ μ L 文库质粒 DNA
- 2 个电击杯 (0.1 cm gap, Bio-Rad, 165-2089)
- 10 mL SOC (1X SOC, New England BioLabs, B9020S)
- 15-cm² 平板 (low salt LB agar + carbenicillin antibiotic)
- 2 个大提试剂盒 (Qiagen Plasmid Maxi Kit 12163)
- 玻璃珠
- 电转仪 (Bio-Rad Genepulser II)

具体步骤：

- 1) 用 TE 稀释文库质粒至 50 ng/ μ L
- 2) 使用 Endura 电转感受态细胞 (Lucigen, 60242) 转染质粒文库。设置共 4 组转染：
 - a. 将感受态在冰盒上融化后加入 2 μ L 的 50 ng/ μ L 文库质粒并轻柔混合。
 - b. 将以上混合物加入预冷的电击杯 (1.0 mm)，根据电转仪厂家建议的条件及操作进行电转；
 - c. 电转后 10 秒内向电极杯加入 975 μ L SOC 复壮培养基
 - d. 将大肠杆菌转移至培养管中并额外加入 1ml 复壮培养基；
 - e. 将培养管放置在摇床中，以 250 rpm 速度 37°C 培养 1 小时；
- 3) 设置稀释平板用于滴定文库以及预估转化效率：
 - a. 将 4 组共 8ml 恢复后的菌液混匀；
 - b. 将 10 μ L 菌液加入到 990 μ L 的恢复培养基稀释 800 倍。在预热的 10-cm LB + carbenicillin (100 mg/mL) 平板上加入 20 μ L 菌液涂板。相当于 40,000 倍稀释，可以用于计算转化效率。
- 4) 剩下的菌液平均涂在 20 个预热的 15-cm LB+ carbenicillin (100 mg/mL) 平板上，即一个平板 400 μ L 菌液
- 5) 30°C 培养 14-16 小时，在较低温度下培养可以减少在体重重复序列的重组。



6) 计算转化效率:

- a. 计算 40,000 倍稀释的平板上的克隆数;
- b. 从 a 获得的克隆数乘以 40,000 可以得知总克隆数;
- c. 如果总克隆数至少大于等于 200x 的 sgRNA 数量即可进行下一步, 最好是达到 500-1000x。足够的克隆数可以确保文库的覆盖度。
- d. 如果克隆数不足, 根据目前的克隆数相应增加电转数量已达到合适的覆盖度。

7) 收集菌落:

- a. 在一个 15cm 培养皿上加入 7ml LB + carbenicillin 液体培养基;
- b. 用细胞刮将菌落刮下来;
- c. 将刮下的菌转移到 1L 的三角瓶中;
- d. 用 5 mL of LB + carbenicillin 培养基润洗刮过的平板, 并把培养基转移到瓶中;
- e. 在所有的平板上重复 a-d 步骤, 将所有刮下来的菌落合并到一个瓶中;
- f. 在室温下搅拌 1 小时使菌块分散;
- g. 将菌转移到预先称重的离心管中;
- h. 用 7000x 的速度离心, 收集菌体, 弃上清;
- i. 称重并确定菌的重量。

8) 纯化质粒文库:

- a. 使用质粒 DNA maxi 或 mega 提取试剂盒;
- b. 根据纯化柱的容量进行质粒提取, 一般一个大提纯化柱可以提取 1g 湿重的菌, mega 纯化柱可以提取 2.5g 湿重的菌。

4. Cas9 稳转株构建

- 1) 转染前 12-18 小时在 6 孔板中铺上细胞, 细胞应在转染前达到 50-60%的汇合度。
- 2) 融化一管 Cas9 慢病毒。
- 3) 向细胞中加入 polybrene 以达到最佳浓度。
- 4) 用不同的病毒量/MOI 转染转染目标细胞, 例如起始的 MOI 可以是 50-60, 然后梯度稀释, 如果可以的话可以通过离心提高转染转染效率。

***注意: 离心可以提高感染效率。在 32°C 1,200g 下离心 60-90 分钟。**

- 5) 转染细胞 8-24 小时后移除含有病毒的培养基, 并加入新鲜的完全培养基。
- 6) 继续培养细胞 24 小时, 使细胞状态恢复并且表达 Cas9 蛋白。
- 7) 将所有 MOI 的细胞传代并且使用 puromycin 筛选直到未转染的细胞死亡。
- 8) 当细胞富集到可以计数时, 在 40-50%汇合度的时候计算所有细胞的数量。并且继续培养、传代、计数, 以获得生长曲线。
- 9) 当曲线制定好后, 选择转染病毒数量最多且不影响细胞生长和活性的 MOI。不同的细胞最佳 MOI 不一样,





而且也取决于细胞对 Cas9 蛋白的耐受。

- 10) 选择最合适的 Cas9 稳转株后，扩培并冻存细胞供后续使用。
- 11) 接下来就可以根据文库的大小，扩培需要的 Cas9 细胞量

***注意：Cas9 稳转株构建好后，建议使用之前验证过的 sgRNA 进行编辑效率测试，编辑效率直接决定后续筛选的效果。**

5. sgRNA 文库病毒包装

所需材料：

- 293T 包装细胞（建议代次 < 15 代）
- 转染质粒：CRISPR library 质粒，psPAX（包装质粒 Addgene plasmid #12260），pMD2.G（包装质粒，Addgene plasmid #12259）
- X-tremeGene 9（Roche, 06 365 787 001）
- OPTI-MEM serum-free media（Invitrogen, #31985-070）
- 细胞铺板培养基 - 低抗生素生长培养基 (DMEM + 10% FBS + optional: 0.1x Pen/Strep)
- 收毒培养基- 无血清，High-BSA 293T growth media (DMEM + 1.1 g/100 mL BSA + 1x Pen/Strep)

具体步骤：

- 1) 将 293T 细胞铺板，使用不含双抗的完全培养基，15cm 培养皿铺 8E6 个细胞，20ml 培养基。制备 500ml 病毒需要准备~30 个板。
- 2) 细胞培养 24 小时 (37 °C, 5% CO₂)，细胞的汇合度达到 70-80% 时进行转染。
- 3) 转染 293T 细胞：
 - a. 将 3 种质粒按 1:1:1 的 molar ratio，用 Opti- MEM 混合均匀，根据需要转染的培养皿的数量+1 来准备质粒，具体用量如下：

试剂	用量/15-cm 培养皿	
	单质粒系统	双质粒系统
Opti-MEM	100 μL	100 μL
psPAX2	4.8 μg	7.0 μg
pMD2.G	3.8 μg	4.0 μg
文库质粒	8.0 μg	5.0 μg

- b. 另外准备 X-tremeGENE 9（用量如下）。根据需要转染的培养皿的数量分装 Opti- MEM 到 1.5-mL 离心管。将 X-tremeGENE 9 加入到分装的 Opti-MEM 中，轻轻混匀且在室温孵育 5 分钟。



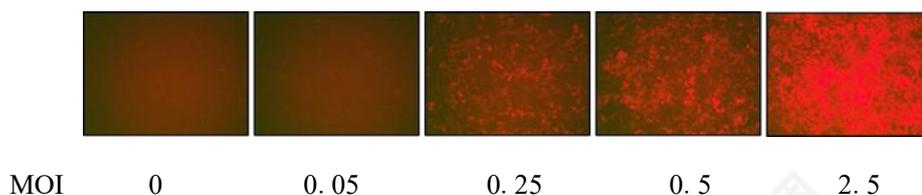


试剂	用量/15-cm 培养皿
pti-MEM	800 μ L
XtremeGENE	948 μ L

- c. 孵育 5 分钟后，按照质粒混合物：XtremeGene 9 复合物=1:3 混合，轻轻混匀且在室温孵育 30 分钟。
 - d. 重复上述步骤直到制备完所有的混合物。提示：先配置<5 组的 XtremeGENE 9，隔 3 分钟后再配下一组。5 分钟后向第一组加 DNA，其余组同样操作，这样可以避免过度孵育。
 - e. 30 分钟孵育后，小心转移转染混合物到每一个培养皿。使用 1mL 移液管，在不破坏细胞单层的情况下，以圆形、Z 字形运动逐滴加入混合物。培养细胞时确保培养箱水平。
- 4) 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养细胞 18 小时。
 - 5) 18 小时后，移除转染培养基，轻柔加入收毒培养基(无血清高 BSA 生长培养基)18-20mL/15cm 皿。
 - 6) 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养细胞 24 小时。Incubate cells for 24 hours (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂).
 - 7) 24 小时后，收集含病毒的培养基，并转移到聚丙烯储存管。
 - 8) 1000 rpm 离心病毒培养基 5-10 分钟以除去细胞等杂质，然后将病毒分装到储存管中。
 - 9) 病毒可以在 4 $^{\circ}$ C 下短暂储存（数小时或数天），长期保存需要储存在-80 $^{\circ}$ C。为了减少冻融次数，可以将病毒分装成小容量再长期储存。

6. sgRNA 文库病毒转染 Cas9+稳转株

获得可用于筛选的 Cas9+/sgRNA+细胞文库的关键是保持 sgRNA 的深度,同时使每个细胞仅表达一条 sgRNA。因此，使用在 Cas9+细胞系中实现约 30%转染效率所需的病毒量转染 cas9 稳转株是十分重要的。30%的转染效率（相当于约 0.4 至 0.6 的 MOI），可以产生最大数量的表达单一 sgRNA 的细胞，同时在潮霉素选择之前保持合理的细胞培养数量。



(A375-Cas9 稳转细胞中 sgRNA 文库转染效率与 MOI 的关系)

6.1. 在目的细胞上滴定病毒使用量

MOI 的确定必须在与正式筛选实验相同的培养条件下进行，包括同样体积的培养容器、培养基成分和体积、细胞密度、同批次病毒。在 6 孔板上做的测试条件不可以应用在正式实验中。

Day 1

- 1) 融化一管病毒，并在冰上保存；
- 2) 细胞计数；





- 3) 设计 0-2ml 梯度稀释病毒;
- 4) 向培养容器中加入细胞、培养基、polybrene (一般终浓度是 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 然后加入病毒。充分混匀然后转移到培养箱。最小化培养体积, 例如 15cm 皿的总体积是 20ml;
- 5) 对于每一个浓度的病毒, 要向两个培养瓶里加入同样体积的病毒;
- 6) 充分混匀 2 分钟;
- 7) 转移到培养箱。

Day 2

- 1) 加入病毒后 24 小时, 细胞看上去已经被感染了, 并且紧紧贴壁在皿上;
- 2) 用移液枪移除培养基;
- 3) 一瓶加入新鲜含有所需浓度的 puromycin 的培养基 (15cm 皿加入 20ml), 另一瓶加入不含 puromycin 的培养基;
- 4) 放回培养箱继续培养;

Day 4

- 1) 48 小时后, 所有没被感染的细胞应该死亡了;
- 2) 消化收集细胞, 确保细胞块都被轻柔地分散开;
- 3) 所有培养皿都进行细胞计数, 并且分别统计+/- puromycin 的结果;
- 4) 通过对比在抗性筛选条件下和无抗性筛选的条件下, 30-40%存活率的病毒量, 这个病毒量则是 MOI 0.3-0.4 的病毒量了;

6.2. 确定目的细胞数量

为了保证 sgRNA 的覆盖度, sgRNA 的代表深度至少要 >200 , 通常我们建议 sgRNA 的代表深度在 400-1000 之间。

此外, 因为所使用的 MOI 的范围是约为 0.4, 我们建议铺板的时候铺 2-3 倍的细胞, 以确保每个细胞仅携带一条 sgRNA。请看下表:

参数	文库筛选
sgRNA 数量	76612
基因数量	19114
400x sgRNA 代表深度所需要的细胞量	3.1×10^7
需要被转染的细胞数	1×10^8
转染效率 (MOI)	0.4
sgRNA 代表深度 (建议 400-1000 cells/sgRNA)	400



此外，维持细胞状态良好也很重要，这样可以更好维持每条 sgRNA 的深度。这一点十分重要，尤其是负向筛选或者需要较高灵敏度的筛选。因此，我们建议在筛选时或筛选后，传代细胞时，剩余的细胞数量应超过 sgRNA 数量的 1000 倍。

6.3. sgRNA 文库病毒转染目的细胞

确定了所需的细胞量后，扩培 cas9 稳转株并转染 sgRNA 文库病毒。转染条件必须跟前面的滴定实验一样。另外，各种条件最好也跟预实验的一样，例如抗生素用量、细胞密度、筛选时间。

(以下步骤是以 15-cm 培养皿为例)

扩培细胞到 $8-9 \times 10^7$ 用于 Day 1 的实验。

Day 1: 感染

- 1) T0 代细胞应该要有 $\sim 1.5 \times 10^8$ 细胞。
- 2) 铺板所需要的细胞量在 15cm 皿上：

$$\text{sgRNA 文库大小} * \text{sgRNA 深度 (至少 200x)} \div 0.3 \text{ MOI} = \text{起始细胞量 (数字取整)}$$
- 3) 确定所需培养皿数量，需要考虑设置额外的培养皿用于 MOI 波动和对照：

	Treatment	培养皿数目
实验组	+文库病毒, + puromycin	$(\text{sgRNA 文库大小} * 200\text{-fold}) \div 0.3 \text{ MOI} \div \text{转染时的细胞密度} = \text{所需平板数量}$
对照 1	无文库病毒, + puromycin (0% survival control)	1
对照 2	+文库病毒, + No puromycin (100% survival control)	1

- 4) 收集细胞并汇集到一个瓶中，每个皿接种所需细胞量。
- 5) 加入病毒和 polybrene $8 \mu\text{g/mL}$ 。
- 6) 均匀混合 2 分钟。
- 7) 转移到培养箱。

Day 2: Puromycin 抗性筛选

- 1) 加入病毒 24 小时后，细胞看上去已经被感染了，并且紧紧贴壁在皿上。
- 2) 用移液枪移除培养基。
- 3) 实验组和对照 1 皿加入新鲜含有所需浓度的 puromycin 的培养基，对照 2 皿加入不含 puromycin 的培养基。

Day 4: T0

- 1) 加入 puromycin 48 小时后，所有未被感染的细胞都死亡了（对照 1）。





- 2) 移除培养基, 用预热的 PBS 润洗培养皿以清除残余的死细胞。
- 3) 消化并收集存活的细胞, 并收集到一个容器中。确保细胞块都被轻柔地分散开。
- 4) 分别对实验组、对照 1、对照 2 进行细胞计数, 并且计算细胞密度 (cells/mL)。
- 5) 离心收集细胞。收集到的细胞应该有至少 200x 的 sgRNA 深度, 推荐 400x。
- 6) 1,200 rpm 离心 5 分钟。
- 7) PBS 润洗
- 8) 移除 PBS, 标记好离心管并把细胞冻存在 -80°C 。这就是 T0 样品。
- 9) 剩余的细胞按三组重复铺板, 从现在开始不要使用 puromycin 筛选。每一个重复组需要有 1.9×10^7 cells (200x 深度)。每一个培养皿的细胞量需要一致, 每一组重复所需要的细胞量也需要一致。例如 A 组铺了 4 个皿, 4.74×10^6 cells/皿, 共 1.9×10^7 个细胞, B 组和 C 组也应该铺一样的细胞量。

Day 5 后续实验(T1, T2, ……T18), 细胞传代

- 1) 大部分贴壁细胞需要每 2-4 天传一次代。当扩培感染后的细胞时, 传代时的密度跟平时传代时的密度一致。可能细胞感染后会有短暂的生长缓慢, 感染后 5-15 天后, 细胞会恢复正常的生长。
- 2) 传代约 2 周后:
 - a. 消化和收集细胞, 把每个重复组各个皿分别收集在一起, 这有助于最大限度地减少重复组内单个培养皿中的随机生长效应。

***注意: 增加铺板细胞量 (例如增加到 2.5×10^7) 可以缓冲下游提取基因组 DNA 时的损耗。**

7. 筛选

7.1. 正向筛选

正向筛选可以筛选出对筛选条件敏感的基因, 当这些基因被敲除时, 细胞就能在筛选条件中存活下来。在这种类型的筛选中, 大多数细胞都会丢失, 只有含有对筛选条件敏感的基因的 sgRNA 的细胞才能存活。预期的结果是剩余的细胞将富集这些 sgRNA。在这些类型的筛选中, 重要的是培养细胞时间足够长, 以允许在测序之前丢失与筛选条件无关的基因。根据经验, 10 天至 2 周通常就足够了。因为这些类型的筛选可能比较 robust, 推荐 NGS 测序深度为 $\sim 1 \times 10^7$ reads。

7.2. 负向筛选

负向筛选可以筛选出在筛选条件的压力下存活所必需的基因。在筛选压力下, 必须基因在 sgRNA 的作用下被敲除或功能缺失, 而携带其它基因的 sgRNA 的细胞则不影响增殖, 具有竞争优势。这种筛选难度相对较大, 因为大多数细胞都能在筛选中存活, 并且需要严格控制参数, 以确保能够检测到统计学上显著的变化。为了检测这些负向筛选中 sgRNA 的细微变化, NGS 测序深度需要高达 $\sim 1 \times 10^8$ reads。





8. gDNA 提取

高质量的基因组 DNA 提取对于维持 sgRNA 的覆盖度和扩增细胞中携带的 sgRNA 都非常重要推荐使用 Qiagen 或者 Omega 的细胞基因组提取试剂盒从细胞中纯化基因组 DNA。重要的是，DNA 纯化柱不能超载，否则会降低样品中 sgRNA 的多样性。每个 sgRNA 的细胞群体应包含约 400 - 1000 个细胞，并且在整个筛选过程（包括 gDNA 的纯化）都需要维持细胞数量稳定。

9. PCR 扩增

为了准确鉴定从筛选中分离的细胞的 gDNA 中存在的 sgRNA，高质量的 NGS 文库制备至关重要。

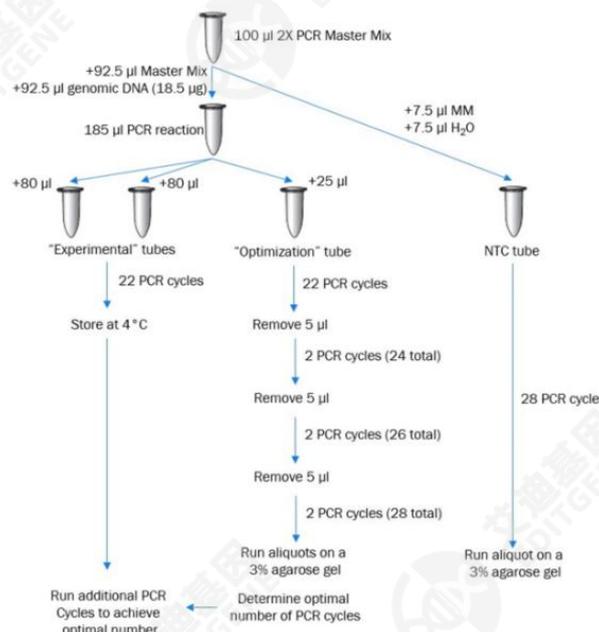
艾迪基因可提供文库扩增引物和相应的用于测序的接头引物。

***我们建议用于文库扩增的 PCR 循环数在产量合适的情况下，不要过度扩增，以避免 PCR 导致的实验误差。请参考下
一点。**

10. gDNA PCR

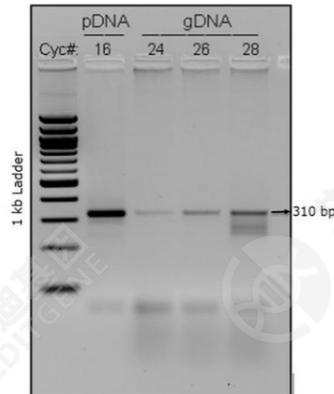
注意：

- 建议提取 gDNA 时，实验组和对照组平行进行；
- 参考下图来优化 PCR 过程。



1) 确定 PCR 产物的条带大小：~310 bp，NTC 应该没有条带。





(PCR 循环数优化的 sgRNA 扩增胶图)

2) 确定最佳 PCR 循环数，例如上图中，24 个循环已经可以获得足够的 PCR 产物且不产生其它杂带了。注意：实验组和对照组的 gDNA 样品的最佳 PCR 循环数可能不一样。

3) 确定不同样品的最佳 PCR 循环数后，将保存在 4°C 的 22 次循环反应的实验材料转移到管中再跑够相应的最佳循环数。

***注意：如果实验组和对照组的最佳循环数不一样，需要暂停 PCR 反应并将已经达到最佳循环数的管子拿出来。**

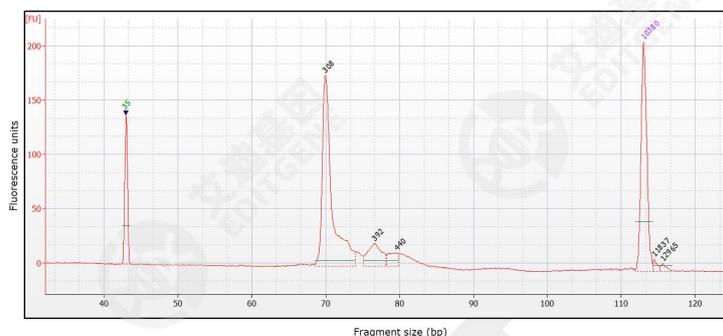
4) 确定实验样品的 PCR 结果与优化样品的结果一致，且适合下一步的实验和分析。

11. PCR 产物提取及定量

将所有的 PCR 产物点样到 2% agarose gel 进行跑胶。将目标大小 (~310 bp) 的条带切下来进行纯化。

11.1. DNA 纯化和定量

- 1) 使用胶纯化试剂盒（比如 takara 的 NucleoSpin Gel 和 PCR Clean-Up kit）来纯化 DNA 片段。
- 2) 使用 20 μ l NE Buffer 洗脱 DNA。
- 3) 将 2 μ l 纯化的 DNA 加入到 98 μ l 无核酸酶水中，进行 1:50 的样品稀释。
- 4) 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 测量 DNA 浓度。
- 5) 将小部分的样品稀释至 0.5 ng/ μ l。在 Agilent High Sensitivity DNA Chip 上分析 1 μ l (0.5 ng) 样品。
- 6) 预期结果：~310bp 处有一个主峰（如下图）。





12. 二代测序文库制备

一般使用 Illumina NextSeq500 或 MiSeq sequencers。可以根据您所使用的仪器的厂家操作指南进行 NGS 文库制备。

13. 分析

测序完成后，可以使用 MAGeCKFlute 软件对测序结果进行质控和分析。

根据我们的筛选数据和其他数据， $>1 \times 10^7$ 个 reads 应该足以在质粒或感染细胞群水平上对由 $\sim 1 \times 10^5$ 个 sgRNA 组成的复杂文库进行分析。对于强选择压力下的正向筛选，几百万个读数就能获得有用的结果。然而，对于负向筛选，大多数细胞都能存活，因此代表性的变化可能很微妙。这可能需要大于 1×10^8 个 reads 的更深度测序。

对于 sgRNA 活性导致细胞毒性的标准筛选，使用转染转染的、未筛选的细胞（对照组）作为对照是一种很好的做法。对照细胞群将考虑到用于制造病毒的原始质粒以及转染后获得的质粒，在转染后不久收获 gDNA 时，质粒文库中编码的 sgRNA 的频率分布与高效转染细胞系中观察到的分布几乎相同。

三、CRISPR 文库筛选常见问题及解决方法

问题	可能原因	解决方法
病毒包装		
低转染效率	细胞铺板过密	铺板密度为 $4 - 5 \times 10^6$ cells/10 cm 培养皿，如果细胞分裂太快，可适当降低铺板细胞数；在汇合度 50 - 80% 时进行实验
	细胞检测转染效率的时间与转染间隔太短	转染后 48 小时目的基因才能达到最大表达量，此时再进行转染效率测试
低滴度 (<105 cfu/ml)	太早收毒	应在转染后 48 - 72 hr 收毒
	未使用 Polybrene，或者不是最佳浓度	转染时加入 $4 \mu\text{g/ml}$ polybrene 或者优化最佳浓度 ($2 - 12 \mu\text{g/ml}$)。
	病毒冻融多次	每一次冻融滴度会下降 2-4 倍，因此应减少冻融次数。
	滴定测量滴度时没有使用最佳筛选浓度	在检滴度前应确定好细胞的抗性杀伤曲线，以确定最佳筛选浓度。
目的细胞转染		
低转染效率	低滴度	在不适用超速离心的情况下浓缩病毒至 100 倍
	转染时细胞活性低	病毒包装培养基可能影响细胞生长；稀释病毒上清或者减少细胞接触病毒时间
		过度使用 polybrene：使用滴定的方法确定最佳用量，或 缩短处理时间
		在转染前先调整好细胞状态





转染时对细胞产生毒性	MOI 过高	滴定法确定最佳病毒用量，稀释病毒
	Polybrene 的毒性	降低或优化 polybrene 浓度；减少感染时间
	包病毒的细胞上清或者培养基对细胞有毒性	使用培养基稀释病毒和收毒
细胞转染 Cas9 病毒后死亡或者生长缓慢	细胞对 Cas9 蛋白表达敏感	使用目的细胞滴定 Cas9 病毒以确保一个病毒进入一个细胞，或者使用另外一种对 cas9 不敏感的细胞
基因组 DNA 提取/PCR		
gDNA 纯化收获量低	纯化柱超载	不要超过 AXG500 最大细胞量 ($\sim 1 \times 10^8$ cells)。细胞量很多的时候要使用多个纯化柱
PCR 扩增后有杂带		优化循环数
低/无 PCR 产物		优化循环数
文库		
低编辑效率	低 Cas9 表达量	滴定法测定最佳 Cas9 病毒浓度；使用已知编辑效率的 sgRNA 进行效率测试
	未优化转染方法	使用小量文库病毒来优化转染效率
筛选后 gRNA 代表深度低	未优化转染方法	使用小量文库病毒来优化转染效率
	过度传代	过度培养会使 pool 产生偏差。在细胞达到最佳筛选数量时就应该实行筛选操作了。

四、Q&A

1. 对于 MOI 本身很高的细胞，应该怎么转染？

如果目标细胞本身的 MOI 很高，可以尝试使用更低的病毒载量进行转染，以避免过度表达 Cas9 对细胞的不利影响。在这种情况下，需要进行 MOI 的优化，以确定最佳的病毒载量。这可以通过逐渐减少病毒载量并测定转染效率来实现。

2. CRISPR 文库构建时涂板菌总是长得太少怎么办？

CRISPR 文库构建时涂板菌长得太少的原因以及建议如下：

- 1) 涂布方法不正确：确保使用新鲜的琼脂和正确的涂布细胞密度。此外，可以尝试使用不同的涂布方法，例如滚涂或喷涂，以提高涂布效率。
- 2) DNA 量或者文库质量差：使用质量更高的 DNA 或文库样品重复转化如果这些方法仍然无法解决问题，可能需要重新评估您的菌株和培养条件。



3. crispr ko 文库质粒怎么转化扩增？是需要电转化吗？可以用核转仪做吗？

crispr ko 文库质粒转化扩增的方法通常使用电穿孔法或化学转化等方法。不建议使用核转仪进行扩增，电穿孔法是目前最高效的质粒转化方法，将质粒 DNA 与电穿孔细胞混合，并施加电脉冲以促进质粒进入细胞内。电穿孔后，将细胞播种在选择性培养基上，以分离目的质粒的菌落。

4. crispr cas9 library 扩增怎么做？序列不出来怎么回事？

CRISPR 文库扩增通常采用 PCR 的方法来扩增 sgRNA 序列，如果序列扩增不出来可能需要重新评估您的 PCR 反应条件，例如引物浓度、PCR 循环参数和反应体系等。此外，如果您使用的是 Illumina 测序平台，可能需要使用适当的引物和测序方法，以确保正确地测序 sgRNA 序列。如果您仍然无法获得所需的序列，建议您检查您的文库构建方法和质量，以确保 sgRNA 序列已正确地插入到文库中。

5. 文库病毒如何确保 sgRNA 的有效性？

确保病毒文库 sgRNA 有效性的措施有：

- 1) 设计高质量的 sgRNA，从而高特异和高效地靶向目的基因。
- 2) 在进行大规模筛选之前先进行试点筛选，来验证 sgRNA 文库系统的有效性。

6. 如何保证文库的 sgRNA 完整性？

确保文库有足够的覆盖度，每个目标基因的细胞覆盖度取决于筛选的目标。对于阳性选择筛选，每个目标基因的覆盖度为 100-200 倍，可以将其分解为每个基因 4 个 gRNA，每个 gRNA 覆盖度为 25-50 倍。对于阴性选择筛选，需要每个目标基因的覆盖度为 500-1000 倍，以高灵敏度检测必需的基因。此外，通过与 Cas9+细胞系滴定病毒，重要的是确定所需的 sgRNA 文库病毒量，以达到大约 30-40%的转染效率。

7. 如何控制进入细胞的病毒数？

为了控制 CRISPR 筛选过程中进入细胞的病毒数，需要确定 MOI（感染率）和感染时的细胞密度。MOI 是指病毒颗粒数与目标细胞数的比值，可以通过调整加入细胞的病毒量来进行调节。最佳的 MOI 可能因细胞类型和病毒种类而异，因此需要为每个实验确定适当的 MOI，以确保高效的转染而不会引起细胞毒性。此外，感染时的细胞密度也会影响转染效率，因此需要优化细胞密度，以确保适当数量的细胞被感染到所需数量的病毒。通过控制 MOI 和细胞密度，可以在 CRISPR 筛选实验中获得一致和可重复的结果。





8. 如何检测存活细胞的 sgRNA?

检测 CRISPR 筛选中存活的细胞的 sgRNA，可以通过收集细胞并提取其基因组 DNA (gDNA)，然后进行 NGS 分析来检测 sgRNA。在 NGS 分析中，可以将 sgRNA 序列扩增并测序，然后使用软件工具对其进行分析，以确定哪些 sgRNA 在筛选过程中频率增加或减少。具体地，可以使用 cutadapt 软件对测序数据进行修剪，然后将 sgRNA 序列 (20 个碱基对) 与参考库或对照组进行比对，使用 CLC Genomics Workbench 确定 sgRNA 频率的折叠变化。最后，可以使用 Excel 等软件对结果进行分析，以确定哪些 sgRNA 对细胞的生存产生了影响。

9. 文库筛选 MOI 值为什么要偏低 (30%上下)，才能实现单个细胞中进入一个病毒，具体是什么原理呢?

在 CRISPR 筛选中，文库筛选 MOI 值偏低 (30%上下) 的原因是为了确保每个细胞中只有一个病毒进入。在 CRISPR 筛选中，每个细胞只需要一个病毒进入才能实现单个细胞的基因编辑。如果 MOI 值过高，即病毒颗粒数与目标细胞数的比值过高，会导致多个病毒进入同一个细胞，从而导致多个基因编辑事件的发生，使筛选结果变得复杂。因此，为了确保每个细胞中只有一个病毒进入，需要将 MOI 值控制在 30% 左右。这可以通过在小规模实验中优化病毒滴加量来实现，以确保在细胞中只有一个病毒进入的情况下，尽可能多地感染细胞。

10. CRISPR 筛选的质量控制标准是什么?

为了保证 CRISPR 筛选结果的准确性，CRISPR 筛选的质量控制标准如下：

- 1) sgRNA 质粒文库质量：确保 sgRNA 文库的质量良好，sgRNA 序列正确，没有错位或错误。验证 sgRNA 序列的准确性和一致性非常重要。
- 2) sgRNA 覆盖度：检查 sgRNA 文库的覆盖度，确保每个目标基因都有足够数量和多样性的 sgRNA。
- 3) 细胞系标准化：使用标准化的细胞系，以确保筛选结果的可比性。细胞系的质量和认证也是重要的。
- 4) 控制实验：进行适当的对照实验，包括阳性和阴性对照，以验证筛选实验的有效性和准确性。
- 5) sgRNA 引入效率：检查 sgRNA 的引入效率，确保足够数量的细胞成功接受 sgRNA。
- 6) 数据分析：使用合适的统计方法和数据分析工具来处理 and 解释筛选数据，以确定显著的靶标基因。

11. 全基因组 CRISPR 文库筛选的周期是多久?

全基因组 CRISPR 筛选的周期根据具体的实验设计和目标而有所变化，通常包括以下主要步骤：

- 1) sgRNA 文库制备：这一步通常需要几周到一个月的时间，具体取决于 sgRNA 的设计、合成和验证。
- 2) 细胞系培养和标准化：在 sgRNA 文库制备期间，需要培养和标准化用于筛选的细胞系。这可能需要几周时间。
- 3) sgRNA 引入和筛选：这个阶段通常需要几天到几周的时间，具体取决于细胞的生长速度以及筛选的持续时间。引入 sgRNA 并进行筛选可能需要一些时间，确保足够多的细胞被感染。



4) 数据采集和分析：一旦筛选完成，数据采集和分析阶段可能需要几周或更长时间

总的来说，全基因组 CRISPR 筛选的周期通常在数月半年之间，具体取决于实验规模和目标。实际周期可能因实验条件和复杂性而有所不同。因此，在进行全基因组 CRISPR 筛选时，要事先制定详细的实验计划，并留出足够的时间来完成每个步骤。

