

基因组规模的 Cas9 基因敲除和转录激活筛选首先要构建一个编码效应蛋白和 sgRNA 的质粒文库。将这些质粒文库包装成慢病毒，然后转导到感兴趣的细胞类型中，产生用于筛选的稳定表达株，同时产生用于激活筛选的辅助转录激活复合物（MS2-p65-HSF1）慢病毒。根据筛选的性质施加选择压力，并在给定的时间点收获基因组 DNA。从基因组 DNA 中扩增出 sgRNA 区域（彩条），然后进行新一代测序分析，再通过统计分析（如 RIGER）确定候选基因。然后通过各种形式的分析对候选基因进行验证，包括测试单个 sgRNA 的筛选表型、通过靶向测序形成嵌合体以及通过 qPCR 上调转录本。

**sgRNA文库的设计和选择**

虽然每个sgRNA库都是针对特定目的进行计算设计的，但各个库的基本设计过程是一致的。首先，基于已知的sgRNA靶向规则，确定了靶向sgRNA文库的基因组区域(例如基因敲除的5'保守外显子；转录起始位点的上游或下游分别进行转录激活或抑制)。其次，基于四个标准识别和选择所有可能的具有Cas9同源特异性原间隔序列相邻基序的sgRNA靶点：(i)脱靶活性最小化，(ii)在靶活性最大化，(iii)避免均聚物延伸(例如，AAAA, GGGG)和(iv) GC含量。

最近的工作已经开始阐明控制sgRNA特异性和效率的特征。尽管特异性和效率可能会因实验设置不同而有所不同，但在文库中纳入冗余sgRNA，以及在识别筛选命中点时要求靶向相同基因的多个不同sgRNA显示相同表型，仍然可以减少筛查中的假阳性sgRNA。选择靶向sgRNA后，应纳入不靶向基因组的其他非靶向指南作为阴性对照。非靶向引导对于评估筛选的噪声和成功是至关重要的。在筛选结束时，与对照条件相比，实验条件下的顶部命中目标guides应该有明显的富集或缺失，而非命中目标guides在实验和对照条件下应该保持相对不变。

我们提供了几个基因组规模的文库，用于通过Addgene进行敲除和激活筛选(参见reagent)。在敲除筛选中，GeCKO v2文库以每个基因6个sgRNA的5'保守的编码外显子为目标。除了靶向编码基因，GeCKO v2文库还靶向1864个人类miRNA或1175个小鼠miRNA，每个miRNA有4个sgRNA。每个物种特异性文库包含1000个非靶向对照sgRNA。GeCKO库有1-vector（lentiCRISPR v2）或2-vector （lentiCas9-Blast和lentiGuide-Puro）格式。在**激活筛选**中，SAM文库靶向23430人或23439小鼠RefSeq编码亚型的转录起始位点上游200 bp区域，每个亚型含有3个sg RNA。文库必须以2-vector（lentiSAM v2和lentiMPH v2）或3-vector （lenti dkas - vp64\_blast、lentiMPH v2和lenti sgRNA（MS2）\_Puro或lenti sgRNA（MS2）\_Zeo）格式与其他SAM效应蛋白结合。GeCKO v2和SAM文库都优先考虑脱靶活性最低的sgRNA。

The human CRISPR/Cas9 Synergistic Activation Mediator (SAM) pooled libraries use an engineered protein complex for the transcriptional activation of endogenous genes. 人 CRISPR/Cas9 协同激活介质 （SAM） 混合文库使用工程蛋白复合物进行内源性基因的转录激活。

为了设计自定义文库，我们提供了一个 Python 脚本（补充数据 1），该脚本可生成针对特定基因组区域内一组基因的 sgRNA。该脚本通过考虑候选间隔序列与基因组中类似位点之间的错配位置和分布，优先考虑具有较少潜在脱靶位点的 sgRNA。可以很容易地调整此 Python 脚本来设计不同基因组、核酸酶或目标区域（例如饱和诱变筛选的非编码区域或蛋白质功能域）的文库。在已知一组基因参与筛选表型和/或细胞数量有限的情况下，可以考虑执行靶向筛选，以捕获所提供的基因组规模筛选中的一组基因。我们提供了一个 Python 脚本（补充数据 2），用于分离与靶向筛选中的基因相对应的 sgRNA 靶序列并添加用于克隆的侧翼序列。此外，可以考虑根据筛选的需要调整 sgRNA 文库质粒骨架。例如，在复杂组织中进行体内筛选时，可以使用细胞类型特异性启动子来确保只有目标细胞类型受到干扰。要通过 FACS 选择成功转导，可以用荧光标记替换抗生素选择标记。对于这些情况，我们在下面提供了克隆自定义 sgRNA 库的协议。

sgRNA文库构建和交付方案

在整个sgRNA文库克隆和扩增过程中，重要的是尽量减少可能影响筛选结果的任何潜在偏差。例如，应限制合并寡核苷酸文库合成初始扩增中的PCR循环数，以防止在扩增过程中引入偏差。根据文库的大小缩放提供的克隆程序的每个步骤，以减少sgRNA代表性的损失。在sgRNA文库转化后，限制生长时间以避免菌落间竞争，这可能导致质粒扩增偏差。在这里，我们提供了一个协议和随附的Python脚本（补充数据3），用于在筛选前通过NGS评估sgRNA文库分布。

根据所需应用，sgRNA 文库可通过慢病毒、逆转录病毒或腺相关病毒（AAV） 递送。慢病毒和逆转录病毒会整合到基因组中，而AAV不会整合，因此对于筛选，AAV递送仅限于非分裂细胞。相比之下，逆转录病毒仅转导分裂细胞。此外，与慢病毒和逆转录病毒相比，AAV的插入片段容量较小。因此，迄今为止，大多数筛选都依赖于慢病毒递送，我们提供了两种慢病毒生产和转导方法。

选择

由于每个筛选的参数根据筛选表型而不同，因此，我们没有提供筛选选择方案，而是在方框 2 中概述了设置相关筛选参数的一般考虑因素，以及进行筛选选择的技术建议。方框 3 中描述了其他体内筛选考虑因素。我们还在方框 4 中提供了饱和诱变筛选设计和分析的指南。

筛选结果分析

为了举例说明预期结果，我们提供了基因组规模敲除和转录激活筛选的数据，这些筛选结果针对的是 BRAFV600E（A375）细胞系中赋予 BRAF 抑制剂维莫非尼（PLX）抗性的基因。由于筛选选择压力，在成功筛选结束时，实验条件下的 sgRNA 文库分布应与基线和对照条件相比更加倾斜，其中一些sgRNA富集，而另一些则耗尽（经NGS测定）。与非靶向sgRNA表示相比，靶向sgRNA表示应该更加倾斜，后者应该相对不变。此外，实验和对照条件下sgRNA的相对富集或耗尽应与不同的感染重复相关。根据筛选类型（阳性、阴性或标记基因选择），sgRNA的富集或耗尽将用于识别赋予筛选表型的候选基因。

RNAi 基因富集排名(RIGER)、冗余siRNA活性(RSA)、基于模型的全基因组CRISPR/Cas9敲除分析(MAGeCK)和STARS等筛选分析方法通常会选择具有多个富集或耗尽sgRNA的候选基因，以降低观察到的sgRNA分布变化是由于单个 sgRNA的脱靶活性造成的可能性。RIGER根据sgRNA的富集或耗尽对其进行排序，并针对每个基因检查针对该基因的sgRNA在排序的sgRNA列表中的位置。然后，该算法使用Kolmogorov-Smirnov统计量评估位置集是否偏向列表顶部，并根据置换检验计算富集分数和基因排名。RSA与RIGER类似，不同之处在于它根据迭代超几何分布公式分配统计显着性。另一种筛选分析方法MAGeCK使用负二项模型评估sgRNA排名的统计显著性，然后使用稳健的排名聚合算法识别正向和负向选择的基因和通路。STARS使用二项分布的概率质量函数对基因进行评分并生成错误发现率。

这些筛选分析方法可适用于非编码筛选，方法是将非编码区域划分为较小的部分，并将sgRNA分配到每个部分。由于插入/缺失的长度可能不同，因此具有多个sgRNA一致富集或消耗的部分表明存在潜在功能的调控元件。在此方案中，我们详细描述了如何使用RIGER识别候选基因。通过筛选分析确定的每个候选基因在实验条件下相对于对照应该具有多个显著富集或消耗的sgRNA。候选基因的RIGER P值也应该显著低于其余基因的P值。

候选基因的验证

鉴于筛选过程可能存在噪声，并且分析会产生候选基因的排序列表，因此有必要验证已识别候选基因的扰动是否会产生感兴趣的表型。为了进行验证，可以将针对候选基因的每个sgRNA单独克隆到sgRNA文库的质粒主干中，并验证筛选表型。此外，将分别量化每个sgRNA引起的扰动、插入/缺失率以及敲除和激活筛选的转录激活，以建立表型与基因型的关系。

插入/缺失率可通过SURVEYOR核酸酶检测或NGS检测

与我们之前描述的SURVEYOR相比，NGS更适合对大量sgRNA靶位点进行采样，因此在此进行描述。为了测量插入/缺失率，重要的是设计距离靶切割位点至少50 bp的引物，以便检测更长的插入/缺失。我们的靶向NGS方案概述了两步PCR，其中第一步使用定制引物扩增感兴趣的基因组区域，第二步使用通用条形码引物在Illumina平台上进行多重深度测序。相对于建议用于为NGS制备sgRNA文库的一步PCR方法，两步PCR方法在评估许多不同的靶位点方面更通用且成本更低，因为每个靶位点的定制引物可以很容易地与不同的通用条形码引物结合。

NGS之后，可以通过运行提供的Python脚本（补充数据4）来计算插入/缺失率，该脚本实现了两种不同的算法。第一种方法使用Ratcliff–Obershelp算法对读取进行比对，然后从该比对中找到插入或删除的区域。第二种方法改编自Geneious比对器，扫描读取中的k-mer并映射比对以检测插入/缺失。实际上，Ratcliff–Obershelp比对算法更准确，而基于k-mer的比对算法更快。然后通过最大似然估计(MLE)校正调整这些插入/缺失率以考虑背景插入/缺失率。MLE校正将观察到的插入/缺失率建模为Cas9切割产生的真实插入/缺失率和单独测量的背景插入/缺失率的组合。真实插入/缺失率是在假设它们服从与背景率的二项分布的情况下最大化观察到的读取计数的概率的比率。

转录激活的测量通常需要分离RNA、将RNA逆转录为cDNA以及定量PCR(qPCR)。该过程的每个步骤都描述了各种方法。在此方案中，我们提供了一种逆转录后进行qPCR的方法，该方法快速、高通量且经济高效，因此非常适合量化上调倍数以进行验证。我们的方法涉及直接裂解在96孔板上生长的细胞，然后进行逆转录和TaqMan qPCR。基于TaqMan的检测比基于SYBR的检测更具特异性和可重复性，因为它依赖于针对目标基因的荧光探针，而SYBR依赖于dsDNA结合染料。TaqMan还允许与控制探针进行多路复用，以测量管家基因表达作为总RNA浓度的代理。

在验证筛选表型和干扰后，我们建议分别验证敲除或转录激活筛选的蛋白质表达的下调或上调。免疫组织化学和蛋白质印迹是验证蛋白质表达的两种最常用方法。免疫组织化学需要固定验证细胞系并使用特异性抗体检测目标蛋白，而蛋白质印迹则涉及收获蛋白质并通过电泳分离，然后用特异性抗体染色。虽然免疫组织化学提供了有关蛋白质定位的更多信息，但它通常需要比蛋白质印迹更特异的抗体，因为蛋白质不是按大小分离的。因此，蛋白质印迹更适合验证候选基因的蛋白质表达。

程序

设计自定义sgRNA库

时间3-5周；5天动手操作

1 通过设计和克隆自定义sgRNA库（步骤1-17）或扩增来自Addgene的现成库（跳至步骤 18）来构建汇集的sgRNA库。我们提供了用于设计针对任何一组基因组坐标（选项A，补充数据1）或现有库的子集（选项B，补充数据2）的库的Python脚本。

A 生成针对一组自定义基因组坐标的库

i 安装库生成Python脚本的要求。Python脚本design\_library.py生成针对一组指定基因组坐标的sgRNA（补充数据1）。安装Python2.7、twobitreader、biopython和seqmap。对于seqmap，安装所有平台的1.0.13版本源代码，并使用命令g++ -O3 -m64 -o seqmap match.cpp进行编译。将seqmap放在与Python脚本design\_library.py相同的文件夹中。

ii 输入目标基因组坐标以进行文库设计。一旦确定了自定义sgRNA文库的一组基因和坐标，就准备一个目标基因.csv文件，其中包含从左到右每列中的基因名称、染色体、目标区域的起点和目标区域的终点。目标基因.csv文件应包含标题名称、染色体、起点和终点。提供的Python脚本将识别针对基因组区域内每个基因的潜在sgRNA，如目标基因.csv文件中所述。请参阅下表以获取示例输入文件：

iii 设计自定义库

从UCSC基因组浏览器(http://hgdownload.cse.ucsc.edu/downloads.html)下载目标基因坐标对应的基因组2 bit文件。基因组2 bit文件将用于构建脱靶分数数据库，该数据库基于每个间隔序列与基因组中相似序列之间的错配位置和分布。对于目标基因.csv文件中的每个区域，Python脚本将识别潜在的sgRNA，并使用此数据库为自定义库选择具有较少潜在脱靶位点的指定数量的sgRNA。要设计自定义库，请使用以下可选参数运行Python design\_library.py：

B 从现有库生成目标库

i 输入目标基因进行库设计

Python脚本design\_targeted\_library.py（补充数据2）从针对指定基因集的现有库中提取sgRNA间隔序列。安装Python 2.7（https://www.python.org/downloads/）。一旦确定了目标筛选的一组基因，就准备一个包含目标基因名称的.csv文件，每行对应一个基因。为带注释的基因组规模库准备另一个.csv文件，第一列中是每个基因的名称，第二列中是相应的间隔序列。每行包含不同的间隔序列。目标基因文件中的基因名称应与带注释的库文件的名称格式相同。

ii 设计目标自定义库

通过使用以下可选参数运行design\_targeted\_library.py，从与目标基因相对应的基因组规模库中分离出间隔子子集：

2

通过DNA合成平台（如Twist Bioscience或Custom Array）将寡核苷酸文库合成为阵列上的池。合成通常需要2-4周，具体取决于寡核苷酸文库的大小。将池化的寡核苷酸包裹在保鲜膜中，并储存在−20°C下。

克隆自定义sgRNA文库

时间2天

3

合并寡核苷酸文库的PCR扩增。在整个sgRNA文库克隆过程中，请参阅下表了解每个克隆步骤中建议的反应次数（文库大小为100,000个sgRNA），并根据自定义sgRNA文库的大小调整反应次数：

使用Oligo-Fwd和Oligo-Rev引物（表2）扩增步骤2中的混合寡核苷酸文库。按照以下反应比例制备预混液：

!为了最大限度地减少寡核苷酸扩增中的错误，使用高保真聚合酶（如NEB Next）非常重要。其他高保真聚合酶（如PfuUltra II (Agilent)或Kapa HiFi (Kapa Biosystems)）可作为替代品。

4

将PCR主混合物分成25μl反应，并使用以下循环条件进行PCR：

!扩增过程中将PCR循环数限制在20个循环，以减少扩增过程中引入的潜在偏倚。

5

反应完成后，汇集PCR反应，并根据制造商的说明使用QIA quick PCR纯化试剂盒纯化PCR产物。使用Nano Drop UV分光光度计对产物进行定量分析。

6

将步骤5中PCR纯化的寡核苷酸文库与50-bp ladder一起在凝胶上运行：在含有SYBR Safe染料的TBE缓冲液中浇铸2%(wt/vol)琼脂糖凝胶。将一半寡核苷酸文库在凝胶中以15V cm−1运行45分钟。

！在2%(wt/vol)琼脂糖凝胶上电泳足够长的时间，以将目标文库(140 bp)与可能的∼120 bp引物二聚体分开。在上述建议的优化PCR条件下，引物二聚体的存在应该最少。

7

根据制造商的说明，使用QIA quick凝胶提取试剂盒对纯化的PCR产物进行凝胶提取，并使用NanoDrop UV分光光度计对最终产物进行定量分析。

8

质粒骨架的限制性消化。使用限制性酶Esp3I (BsmBI)消化所需的文库质粒骨架，该酶会切割sgRNA靶区域。有关反应比例，请参阅下面的主混合物设置：

9

从主混合物中制备20μl反应的等分试样，并在37°C下孵育限制性消化反应1小时。

10

反应完成后，汇集第9步中的限制性消化反应，并在凝胶上运行整个汇集的限制性消化反应。在含有SYBR Safe染料的TBE缓冲液中浇注2%(wt/vol)琼脂糖凝胶，并在15V cm−1的凝胶中运行反应30分钟。根据制造商的方案，使用QIA quick凝胶提取试剂盒对文库质粒骨架进行凝胶提取，并使用NanoDrop UV分光光度计对产品进行量化。请注意，GeCKO文库主干包含1880bp填充序列，应以丢失的形式可见。SAM文库主干不包含填充序列，预计丢失的20 bp通常不易看到。

11

Gibson组装

根据以下反应比例在冰上设置Gibson反应的预混液。务必包括不含sgRNA文库插入物的反应作为对照。

12

从主混合物中制备20μl反应物，并在50°C下孵育Gibson反应1小时。

完成的Gibson反应可以在−20°C下保存至少1周。

13

异丙醇沉淀

分别汇集克隆和对照反应。通过混合以下物质纯化和浓缩sgRNA文库：

除了浓缩文库之外，通过异丙醇沉淀进行纯化还可以去除Gibson反应中可能干扰电穿孔的盐。

14

将混合物在室温下涡旋并孵育15分钟，然后在室温下以>15000g的速度离心15分钟以沉淀质粒DNA。沉淀的质粒DNA应在微量离心管底部呈现为小的淡蓝色颗粒。

15

吸出上清液，用1 ml冰冷（−20°C）80%（vol/vol）乙醇（溶于Ultra Pure水）轻轻清洗沉淀两次，不要搅动。

16

小心去除残留乙醇，风干1分钟。

17

将质粒DNA沉淀悬浮在5μl TE中（每份Gibson反应液）。在55°C下孵育10分钟，然后使用Nano Drop UV分光光度计定量定制sgRNA文库。异丙醇纯化的sgRNA文库可在−20°C下保存数月。

**合并sgRNA文库的扩增**

**时间2天**

18

合并sgRNA文库的转化。根据制造商的说明，使用Endura Electro Competent细胞以50–100 ng μl−1的浓度对文库进行电穿孔。如果您要扩增来自Addgene的现成基因组规模文库，请重复此操作，使文库中每10,000个sgRNA总共进行1次电穿孔。如果您要扩增自定义sgRNA文库，请重复此操作，使文库中每5,000个sgRNA总共进行1次电穿孔，并包括用于对照Gibson反应的额外电穿孔。

19

在37摄氏度下预热1个大型LB琼脂板（245毫米方形生物测定皿，氨苄青霉素）以进行sgRNA文库的电穿孔。每个大型LB琼脂板可以用10个标准LB琼脂板代替。预热1个标准LB琼脂板（100毫米培养皿，氨苄青霉素），用于在37摄氏度下计算电穿孔效率。为了扩增自定义sgRNA库，请添加一个额外的标准LB琼脂板用于对照Gibson反应。

20

1小时恢复期后，汇集电穿孔细胞并通过倒置充分混合。

21

准备稀释液以计算转化效率。要准备稀释混合物，请将10μl汇集的电穿孔细胞添加到990μl LB培养基中，进行100倍稀释并充分混合。然后将100μl 100倍稀释液添加到900μl LB培养基中，进行1000倍稀释并充分混合。

22

将100μl 1000倍稀释液接种到预热的标准LB琼脂平板（100毫米培养皿，步骤19中的氨苄青霉素）。这是完全转化的10000倍稀释液，将用于估计转化效率。

23

如果您要扩增自定义sgRNA文库，请重复步骤21和22以进行对照Gibson反应。

24

要接种汇集的电穿孔细胞，请将1体积的LB培养基添加到步骤20中的汇集的电穿孔细胞中，充分混合，然后将混合物接种到大型LB琼脂平板（选项 A）或标准LB琼脂平板（选项B）上。

A

在大型LB琼脂平板上接种

i

使用细胞铺板器将2ml电穿孔细胞铺板到步骤19中预热的大型LB琼脂平板上。铺开液体培养物，直到其大部分被琼脂吸收，并且在倒置平板时不会滴落。同时，确保液体培养物不会完全干燥，因为这会导致存活率低。

B

在标准LB琼脂平板上接种

i

或者，使用与步骤24A(i)中描述的相同技术，将200μl电穿孔细胞铺板到步骤19中预热的大型LB琼脂平板上。

均匀地接种电穿孔细胞对于防止可能偏倚sgRNA文库分布的菌落间竞争非常重要。

（\*使用GeCKO慢病毒库转化Endura电感受态细胞可能需要额外的恢复培养基。Zhang实验室协议（可从Addgene获取）建议每次转化使用约2mL恢复培养基。Lucigen Endura试剂盒每次转化包含1 mL恢复培养基。）

附：endura competent cells

转化准备

转化是在0.1 cm间隙比色皿中使用25µL Endura电转化细胞进行的。

下表列出了电穿孔的最佳设置。典型的时间常数为3.5到4.5毫秒。

|  |  |
| --- | --- |
| 最佳设置 | 替代设置（效率降低约20-50%） |
| 1.0 mm cuvette | 1.0 mm比色皿 |
| 10 µF | 25µF |
| 600 Ohms | 200欧姆 |
| 1800 Volts | 1400–1600伏 |

建议的电穿孔系统：

Bio-Rad微脉冲发生器#165-2100；Bio-Rad大肠杆菌脉冲发生器#165-2102；Bio-Rad基因脉冲发生器 II #165-2105；BTX ECM630 电穿孔系统；Eppendorf电穿孔仪2510。可选的转化对照反应包括用1µL (10pg)超螺旋pUC19 DNA进行电穿孔。

为确保转化成功，必须采取以下预防措施：

使用Lucigen的CloneDirect连接缓冲液（包含在Lucigen的克隆或连接试剂盒中）进行的连接反应必须在转化前在70ºC下加热灭活15分钟。连接反应可以在热灭活后直接使用，无需纯化连接产物。

其他缓冲液中的DNA样本必须纯化并溶解在水或低离子强度的缓冲液中，例如TE。电穿孔样本中含有盐会导致高压电弧，从而导致细胞和DNA损失。

使用前，必须在冰上彻底预冷微量离心管和电穿孔比色皿。使用多种来源的比色皿均可获得成功的结果，包括BTX（型号610）、Eppendorf（目录号 #940001005）和BioRad（目录号#165-2）

使用前，必须在冰上完全解冻细胞。

为了获得最高的转化效率，请使用提供的恢复培养基在电穿孔后重新悬浮细胞。使用SOC或其他培养基会导致效率降低。

准备营养琼脂和适当的抗生素。建议使用低盐培养基，例如LB Lennox。高盐培养基（例如LB Miller）可能会导致菌落大小发生变化。（Compared to the LB Miller Modification, the Lennox Modification of LB is considered the low salt version, containing only 5 g/L of sodium chloride, while the Miller Modification contains 10 g/L sodium chloride.）

注意⚠️本实验室用的是LB Miller 要换成LB Lennox！！

Formulas of LB Broth (g/L)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Ingredient | Luria | Lennox | Miller |
| Tryptone | 10 | 10 | 10 |
| Yeast Extract | 5 | 5 | 5 |
| NaCl | 0.5 | 5 | 10 |

转化方案

1.在室温下准备好恢复培养基和17 mm\*100 mm无菌培养管（每个转化反应一个管）。使用SOC或其他培养基可能会降低转化效率。

2.将电穿孔比色皿（0.1cm间隙）和微量离心管放在冰上（每个转化反应一个比色皿和一个微量离心管）。

3.从-80度冰箱中取出细胞并放在湿冰上，直到它们完全解冻（10-20分钟）。

4.细胞解冻后，轻轻拍打混合。将25µL细胞分装到冰上的冷冻微量离心管中。（如果使用E. cloni SOLO，则省略此步骤，每个管含有25µL细胞）。

5.如果使用任何Lucigen克隆试剂盒中的连接缓冲液，请将1µL热变性连接反应物加入冰上的25µL细胞中。未对连接反应进行热灭活将阻止转化。用移液器尖头短暂搅拌；不要上下移液混合，否则会产生气泡并使细胞变热。使用超过2µL的连接混合物可能会在电穿孔过程中引起电弧。对于使用其他商业试剂盒的连接反应，请参阅制造商的说明。

6.小心地将25µL细胞/DNA混合物移入冷却的电穿孔比色皿中，不要产生气泡。用手腕快速向下轻弹比色皿，使细胞沉积在孔底。根据上述推荐的条件进行电穿孔。

7.在脉冲10秒内，向比色皿中加入975µL恢复培养基，上下移液三次以重新悬浮细胞。将细胞和恢复培养基转移到培养管中。

8.将管放入37摄氏度的振荡培养箱中，以250rpm的速度培养1小时。

9.将转化细胞铺展到含有适当抗生素的营养琼脂平板上，最多100µL。

10.将平板在37摄氏度下孵育过夜。

11.转化克隆可在任何丰富培养基中进一步生长。

关键步骤

获得足够数量的每个sgRNA菌落对于确保完整文库代表性得以保留以及 sgRNA在扩增过程中不会丢失至关重要。

27

此外，对于自定义sgRNA文库的扩增，计算对照Gibson反应的电穿孔效率，并且只有当sgRNA文库条件下每个电穿孔的菌落至少是对照Gibson反应的20倍时才继续。

28

从LB琼脂平板上收获菌落。将10毫升LB培养基移液到每个大型LB琼脂平板上或将1毫升LB培养基移液到每个标准LB琼脂平板上。用细胞涂布器轻轻刮掉菌落，并将刮下的菌落液体转移到50毫升Falcon管中。

29

对于每个LB琼脂平板，重复步骤28，总共进行2次LB培养基清洗，以捕获任何残留的细菌。

30

通过测量收获的细菌悬浮液的OD600值来计算所需的大提量，如下所示：大提量= OD600值·(悬浮液总体积)/1200。根据制造商的说明，使用Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Maxi EF Kit对扩增的sgRNA文库进行大提。

使用无内毒素质粒纯化试剂盒对于避免病毒生产和哺乳动物细胞培养中的内毒性非常重要。为确保质粒制备物不含内毒素，重要的是将细菌悬浮液稀释至分光光度计线性范围内的OD600值，通常为∼0.1-0.5，并测量稀释液的OD600值。然后将OD600值乘以稀释倍数以获得细菌悬浮液的OD600值。两个密集铺板的大型LB琼脂平板大约需要一个maxiprep。

31

汇集所得质粒DNA，并使用NanoDrop UV分光光度计对产物进行定量分析。Maxiprepped sgRNA文库可以分装并在−20°C下保存至少1年。

对扩增的sgRNA文库进行下一代测序以确定sgRNA分布

时间3-5天

32

NGS文库PCR。我们提供了使用Illumina接头序列扩增sgRNA靶区域的NGS引物（表3）。要为NGS准备sgRNA文库，请为10个NGS-Lib-Fwd引物和1个NGS-Lib-KO-Rev或NGS-Lib-SAM-Rev条形码引物中的每一个设置一个反应，如下所示：

为每个文库使用具有唯一条形码的不同反向引物，可以在单个NextSeq或HiSeq运行中汇集和测序不同的文库。这比在多个MiSeq运行中运行相同数量的文库更高效且更具成本效益。

为了最大限度地减少扩增sgRNA时的错误，使用高保真聚合酶（如NEBNext）非常重要。其他高保真聚合酶（如PfuUltra II (Agilent)或Kapa HiFi (Kapa Biosystems)）可作为替代品。

33

使用以下循环条件进行PCR：

34

反应完成后，汇集PCR反应物，并根据制造商的说明使用QIAquick PCR纯化试剂盒纯化PCR产物。

35

定量纯化的PCR产物，并在2% (wt/vol)琼脂糖凝胶上运行2μg产物。成功的反应应产生约260至270bp的产物用于敲除文库，约270至280bp的产物用于激活文库。根据制造商的说明使用QIAquick凝胶提取试剂盒进行凝胶提取。

凝胶提取的样品可以在−20°C下保存数月。

36

根据制造商的说明，使用Qubit dsDNA HS检测试剂盒对凝胶提取的样品进行定量分析。

37

根据Illumina用户手册，在Illumina MiSeq或Next Seq上对样品进行测序，读取1（正向）循环80次，索引1循环8次。我们建议在MiSeq上使用5% PhiX对照或在Next Seq上使用20% PhiX对照进行测序，以提高文库多样性；我们建议将文库中每个sgRNA的覆盖率设为>100次读取。

38

使用count\_spacers.py分析测序数据。我们提供了一个Python脚本，用于分析sgRNA表示的NGS结果（补充数据3）。安装Python2.7 <https://www.python.org/> downloads/和biopython（http://biopython.org/DIST/docs/install/Installation.html）。准备一个包含引导间隔序列的.csv文件，每行对应一个序列。

39

要确定间隔分布，请使用以下可选参数运行python count\_spacers.py：

运行count\_spacers.py后，间隔读取计数将写入输出.csv文件。相关统计数据（包括完美匹配的指导序列数量、不完美匹配的指导序列数量、没有密钥的测序读取数量、处理的读取数量、完美匹配的指导序列百分比、未检测到的指导序列百分比和倾斜率）将写入statistics.txt。理想的sgRNA文库应具有>70%完美匹配的指导序列、<0.5%未检测到的指导序列和小于10的倾斜率。