**慢病毒滴度检测与慢病毒规模感染**

常规条件培养感染Cas9-BSD后的生长状态良好的HCT116 p53-EGFP报告细胞单克隆株，使用TrypLE酶对细胞进行消化，加入培养液中和消化后离心并使用含有10 ug/mL Polybrene的完全培养基重悬细胞。使用细胞计数器对细胞进行计数，将重悬后的细胞铺入六孔板内，每孔内含2ml含有10 ug/mL Polybrene的完全培养基，每孔加入5×105细胞。

加入细胞后，使用37℃水浴快速融化保存在-80℃的慢病毒浓缩液。在六孔板内分别加入0、0.5ul、1ul、2ul、4ul、8ul融化完全的浓缩病毒，加入病毒后均匀摇晃六孔板2 min，随后将六孔板置于37℃，含5%二氧化碳的细胞培养箱中培养24小时。24小时后，弃去原有培养基，换成普通完全培养基培养。

慢病毒感染48小时后，对六孔板内细胞进行消化传代。每孔使用1 ml完全培养液重悬消化后的细胞。每孔取等量的细胞，将细胞分别传到两个六孔板中，其中杀伤组六孔板中每孔为2ml含有1.5ug/mL的嘌呤霉素的完全培养基，另一个对照六孔板中的培养液则不含嘌呤霉素。

铺板24小时后，对培养液进行更换，此后每24小时对培养液进行一次更换。在加入0ul浓缩病毒的杀伤组的细胞完全死亡后，使用Cell Titer-Glo试剂盒检测每个孔中存活的细胞数量。MOI的计算公式为：

经过计算拟合，得到慢病毒MOI滴定曲线（如下图），使MOI = 0.3的感染病毒量为1.03ul/5×105细胞。



**慢病毒规模侵染**

选择生长良好的细胞进行铺板，感染规模同滴定一致。在培养液中预先加入10ug/ml polybrene。本研究使用的Brunello人类CRISPR敲除文库共含有76,441条sgRNA，本研究设计每个sgRNA的覆盖度超过400×，单次生物学实验细胞总数为：细胞总量=76,441×400/0.3≈1.02×108.

将1.02×108个细胞以5×105个细胞/孔的规模铺入6孔板中，共铺板204孔，每孔内预先添加2 mL含10ug/mL Polybrene的完全培养基。同时以相同规模铺板2个不转染病毒的六孔板，作为随后杀伤组的对照。往六孔板内铺入细胞后，将贮存在-80℃的浓缩病毒液置于37℃水浴锅中快速融化，待病毒完全融化后，每孔加入1.03ul浓缩病毒液，摇匀2min，随后将六孔板置于37℃，含5%二氧化碳的细胞培养箱中培养24小时。24小时后，弃去原有培养基，换成普通完全培养基培养。

慢病毒感染48小时后，对六孔板内细胞进行消化传代。将一个六孔板内所有的细胞接种到1个100 mm的细胞培养皿中，使用含有1.5ug/ml 嘌呤霉素的完全培养基培养。同时在2个100 mm细胞培养皿中，接种相同量未转染病毒的细胞。此后每24小时更换一次培液，待接种未转染病毒细胞的培养皿中细胞完全死亡后，继续使用含抗生素的培养基培养慢病毒转染的细胞3-5天，随后改用不含抗生素的完全培养基进行培养与进一步筛选操作。