扩增汇集的sgRNA文库 张峰

时间2天

18 汇集的sgRNA文库转化。根据制造商的说明，使用Endura Electro Competent细胞以**50–100ng/μ**l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，并包括用于控制Gibson反应的额外电穿孔。

19 每次电穿孔sgRNA文库时，预热1块大型LB琼脂板（245毫米方形生物测定皿，氨苄青霉素），温度为37°C。每块大型LB琼脂板可用10块标准LB琼脂板代替。预热1块标准LB琼脂板（100毫米培养皿，氨苄青霉素），温度为37°C，用于计算电穿孔效率。为了扩增自定义sgRNA文库，请添加一块额外的标准LB琼脂板用于控制Gibson反应。

20 经过1小时的恢复期后，汇集电穿孔细胞并通过颠倒混合均匀。

21 准备用于计算转化效率的稀释液。要准备稀释混合物，请将10 μl汇集的电穿孔细胞加入990μl LB培养基中，进行100倍稀释并充分混合。然后将100μl 100倍稀释液加入900μl LB培养基中，进行1,000倍稀释并充分混合。

22 将100μl 1,000倍稀释液滴在预热的标准LB琼脂平板上（100毫米培养皿，第19步中的氨苄青霉素）。这是完全转化的10,000倍稀释液，将用于评估转化效率。

23 如果您正在扩增自定义sgRNA文库，请重复步骤21和22以对照Gibson反应。

24 为了将汇集的电穿孔细胞接种到平板上，向步骤20中的汇集的电穿孔细胞中添加1倍体积的LB培养基，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琼脂平板上进行接种**

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

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200 μl电穿孔细胞接种到步骤19中预热的每个标准LB琼脂平板上。

**关键一步**

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

25 将所有LB琼脂平板在37°C下孵育过夜，持续12-14小时。

**关键一步**

将细菌生长时间限制在12-14小时可确保有足够的生长来进行sgRNA文库扩增，而不会因菌落间竞争或菌落生长率的差异而导致sgRNA文库分布出现偏差。

26计算电穿孔效率。计数10,000倍稀释板上的菌落数。将菌落数乘以10,000和电穿孔次数，以获得所有板上的菌落总数。如果您正在扩增来自Addgene的现成sgRNA文库，则只有当文库中每个sgRNA的菌落总数大于100个时才继续。如果您正在扩增自定义sgRNA文库，则只有当文库中每个sgRNA的菌落超过500个时才继续。

**关键一步**

获取每个sgRNA的足够数量的菌落对于确保保留完整的文库代表性以及sgRNA在扩增过程中不会掉落至关重要。

27 此外，对于定制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文库条件下每次电穿孔的菌落数至少是对照Gibson反应的20倍时才进行。

28从LB琼脂平板上收获菌落。将10ml LB培养基移液到每个大型LB琼脂平板上或将1ml 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下菌落，并将刮下的菌落液体转移到50 ml 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。

600值来计算所需的最大制备次数，如下所示：最大制备次数=OD600值·（悬浮液总体积）/1,200。根据制造商的说明，使用Macherey-Nagel NucleoBond Xtra Maxi EF Kit对扩增的sgRNA文库进行最大制备。

**关键一步**

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OD 600值，通常约为0.1-0.5，并测量稀释液的OD 600值。然后将OD 600值乘以稀释倍数以获得细菌悬浮液的OD 600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分光光度计定量产物。Maxiprepped sgRNA文库可以分装并在−20°C下保存至少1年。