**铁死亡-文库扩增**

时间：2-3天

1. 在冰上解冻ElectroMAX Stbl4细胞。
2. 将1μL文库DNA（50ng/μL）添加到1.7 mL Eppendorf管中。
3. 将50μL Stbl4细胞加入含有文库DNA的管中，轻轻混合，在冰上孵育1分钟。
4. 将 DNA/细胞混合物吸入2毫米比色皿中，然后将比色皿放入Bio-Rad Gene Pluser Xcell电穿孔系统中。

注：电穿孔条件：2.4 kV、25 μF、200 Ω。

1. 从腔室中取出比色皿并立即添加1 mL预热（37°C）的SOC肉汤。
2. 用巴斯德吸管轻轻地重新悬浮细胞，并将溶液转移到15毫升离心管中。
3. 将试管在37°C下孵育1小时，并以225–250 rpm的速度摇动。
4. 在37°C下预热LB琼脂平板（15厘米培养皿）以形成菌落并测定转化效率。
5. 转化恢复期后，首先将转化细胞稀释，将10 μL汇集细胞添加到990 μL SOC肉汤中，进行100倍稀释，然后将100 μL 100倍稀释液添加到900 μL SOC肉汤中，进行1,000倍稀释。
6. 将100μL 1,000倍稀释液置于预热的LB琼脂平板上。

注意：这是对总转化物的10,000倍稀释，用于估算转化效率。我们建议进行三次10,000倍稀释，以确保确定准确的转化效率。

1. 将4 mL SOC肉汤与汇集的转化细胞混合。
2. 将电穿孔后的细胞涂布于预热的含有100μg/mL氨苄青霉素的15cm LB平板上，37°C孵育20小时。

注意：所用平板数量取决于文库中的sgRNA数量。我们建议刘氏人类CRISPR基因敲除文库H2使用100个15厘米LB平板，人类CRISPR代谢基因敲除文库使用35个15厘米LB平板。

1. 计数10,000倍稀释平板上的菌落数。

注意：菌落数×10,000=菌落总数。只有当文库中每个sgRNA的菌落总数大于20时，才可以继续下一步。例如，对于Liu Human CRISPR Knockout Library，每板菌落超过185（92817×20/10000）可以定义为效率高。如果没有达到这个效率，请丢弃板并再次转化文库。

1. 收集所有菌落：将2mL LB培养基吸取到每个15厘米LB平板上，并用细胞刮刀刮掉所有菌落。
2. 收集后，称量细菌并将其分成每个样品每管0.4克。
3. [https ://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiagen-plasmid-kits](https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/dna-purification/plasmid-dna/qiagen-plasmid-kits) ）执行文库质粒提取步骤。
4. 使用NanoDrop测定文库DNA浓度，并按照“[高通量测序的准备](#sec3.4)”中的方法将制备好的文库送去深度测序**。**
5. 按照**步骤35分析文库的sgRNA覆盖率**，将sgRNA覆盖率定义为100%减去文库中缺失的sgRNA百分比。

关键：有效筛选需要文库中sgRNA的高覆盖率（通常高于 95%）。