

## CRISPR文库质粒产品使用方法

储存条件：-20℃保存（干粉可常温运输，液体需冰袋运输）

### 一、确认产品类型（干粉或者液体）

#### 1、质粒干粉（标记为1ug或者100ug）

收到干粉质粒后，于5000 rpm离心1分钟，确保质粒沉降于管底，加入10 μL无菌超纯水（或无菌TE缓冲液，pH 8.0），轻柔振荡至完全溶解。

#### 2、液体质粒（标记为1ug或者100ug，并有具体浓度）

收到液体质粒后，短暂离心（5000 rpm，1分钟），避免质粒吸附管壁。如需反复冻融或分批使用，可以分装使用。

### 二、文库质粒扩增（推荐使用研美生物CRISPR文库质粒扩增试剂盒，PK301）

#### 1. 电转操作

取100 ng（1 μL）文库质粒，加入50 μL STABLE电转感受态细胞（推荐Stbl3或Stbl4菌株，转化效率 $\geq 1 \times 10^9$  CFU/μg）。

参照电转仪说明书设置参数（如电压1.8 kV，电容25 μF，电阻200 Ω），进行电击转化。

#### 2. 复苏培养

电击后立即加入950 μL预热的LB液体培养基（不含抗生素），轻柔吹吸混匀。

转移至摇菌管中，37℃、220 rpm振荡培养1小时（确保菌体充分复苏）。

#### 3. 稀释与涂布

- 取1 mL复苏菌液，依次进行梯度稀释：
- 100倍稀释：10 μL菌液 + 990 μL LB培养基。
- 1000倍稀释：取100 μL 100倍稀释液 + 900 μL LB培养基。
- 取100 μL 1000倍稀释液均匀涂布于含抗生素的LB琼脂10 cm平板（氨苄青霉素终浓度100 μg/mL），37℃倒置培养14小时。

#### 4. 转化效率验证

计数10000倍稀释平板上的菌落数，按公式计算覆盖乘数：覆盖乘数 = 菌落数 \* 10000 / sgRNA数量。

合格标准：菌落总数需 $\geq$  sgRNA数量的500倍，方可进行后续步骤。

## 5. 文库扩增

将剩余990  $\mu\text{L}$  复苏菌液稀释至7.5 mL，每块 15 cm 含抗生素LB平板涂布500  $\mu\text{L}$  菌液（共需15块平板）。37 $^{\circ}\text{C}$  倒置培养14小时，确保单菌落均匀分布。

## 6. 菌体收集

每块15 cm 平板加入500  $\mu\text{L}$  LB培养基，使用 无菌细胞刮刀轻柔刮取菌苔，合并菌液至50 mL 离心管。重复刮取步骤2次，确保最大程度回收菌体。

4 $^{\circ}\text{C}$ 、6000 rpm 离心10分钟，弃上清，称量菌体湿重（推荐每克菌体对应5 mL 试剂盒裂解液）

## 7. 质粒提取

使用商业化无内毒素质粒大提试剂盒，严格遵循说明书操作。

质粒终浓度应  $> 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，建议通过酶切（如EcoRI）及二代测序验证文库完整性。

### 注意事项：

全程严格无菌操作，使用预冷离心管及无菌耗材。

本产品含慢病毒元件，严禁用于基因治疗或人体实验。

### 武汉研美生物科技有限公司

声明：操作不当导致的实验失败，本公司不承担责任。