

## 测序文库构建试剂盒操作指南

### 一、产品信息

PK201 适用于 LentiCRISPRv2 为骨架载体的文库 sgRNA 扩增，PK202 适用于 LentiGuidePuro 为骨架载体的文库 sgRNA 扩增，其它载体骨架需咨询客服。

### 二、产品组分

试剂盒分为 A/B 两个规格，随机发货（图 1），内含组分依次为 Nuclease-free H<sub>2</sub>O、Magic™ PCR Master Mix (2×)、Magic™ Primer Mix、Positive Control A (Plasmid)、Positive Control B (Genomic DNA)（图 2）。

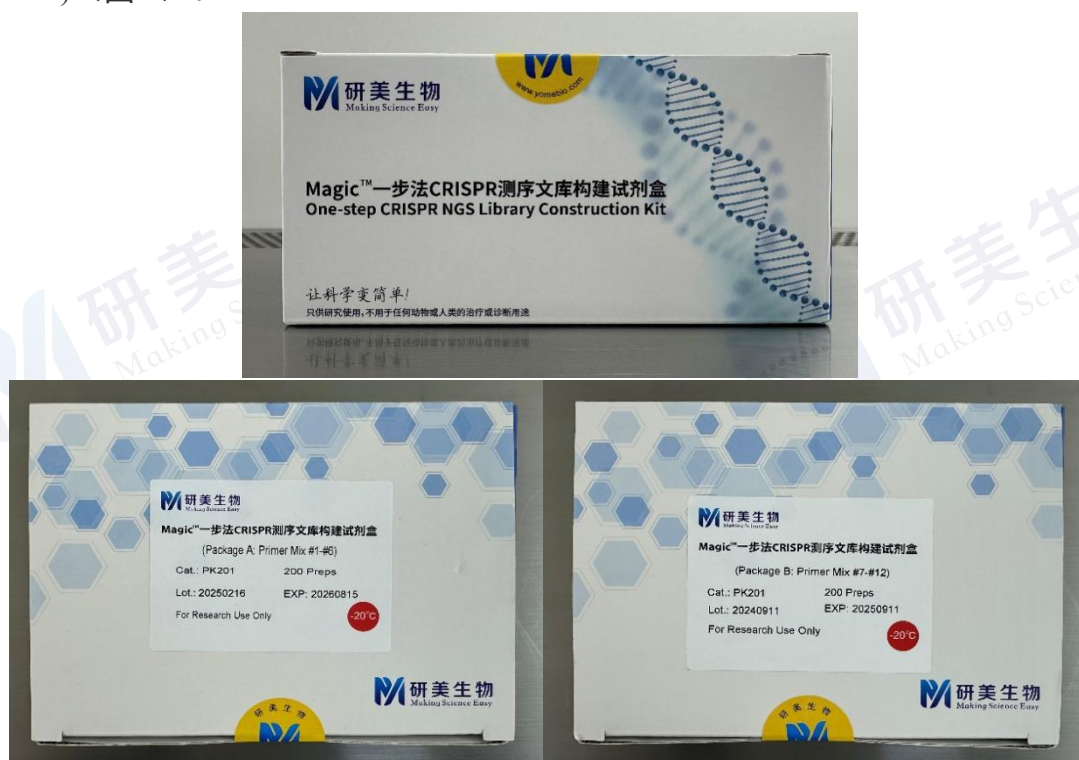


图 1. 试剂盒外包装



图 2. 试剂盒组分

### 三、实验前准备

实验前各组分试剂请于冰上融化（表 1），将融化后的 Magic™ PCR Master Mix（2×）震荡混匀并瞬时离心，避免内部组分不均一导致实验误差。实验对象（基因组 DNA/质粒 DNA）与相对应 Magic™ Primer Mix 做好标记。另外，使用此试剂盒需自备常见实验耗材（表 2）。

**表 1. 试剂盒产品组成**

| 产品组成                             | PK201A<br>(200 Preps) | PK201B<br>(200 Preps) |
|----------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O   | 5 mL                  | 5 mL                  |
| Magic™ PCR Master Mix (2×)       | 5 mL                  | 5 mL                  |
| Magic™ Primer Mix#V1-V6 (10 μM)  | 各 80 μL × 2           | -                     |
| Magic™ Primer Mix#V7-V12 (10 μM) | -                     | 各 80 μL × 2           |
| Positive Control A (Plasmid)     | 10 μL                 | 10 μL                 |
| Positive Control B (Genomic DNA) | 100 μL                | 100 μL                |

推荐使用研美生物基因组提取试剂盒（GK101，肿瘤组织；GK102，细胞）进行基因组高质量提取。将提取出的基因组 DNA 样品稀释 20 倍（19 μL Nuclease-free H<sub>2</sub>O+1 μL 基因组 DNA）并使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 测试基因组 DNA 浓度。若使用 Nanodrop 等基于分光光度法进行浓度测定，一般真实基因组 DNA 浓度约为 Qubit 测得浓度的一半。

**表 2. 自备试剂耗材**

| 试剂及耗材                    | 推荐                    |
|--------------------------|-----------------------|
| Qubit dsDNA HS Assay Kit | Vazyme, Cat.No. EQ121 |
| DNA 胶回收试剂盒               | Tiagen, Cat.No. DP214 |

### 四、实验设计

#### 1、文库质粒质控 NGS 测序文库构建

无论文库 sgRNA 数量多少，文库质粒构建 NGS 测序库建议设置 4 个 50 μL PCR 反应体系，建议每个 PCR 反应体系（50 μL）添加量为 100 ng（Qubit）或 200 ng（Nanodrop）。

## 2、文库基因组 DNA NGS 测序文库构建

CRISPR 筛选文库细胞的需求量最佳实践为文库 sgRNA 数量的 500 倍，500 一般称之为文库的覆盖乘数。理论上  $1.0 \times 10^6$  细胞提取出基因组 DNA 为 6.6  $\mu\text{g}$  数。推荐每个 PCR 反应体系（50  $\mu\text{L}$ ）添加量为 1  $\mu\text{g}$ （Qubit）或 2  $\mu\text{g}$ （Nanodrop）为了方便您的计算，我们列出不同 sgRNA 数应进行 PCR 的模板  $\mu\text{g}$  数（表 3）。

$$\text{应进行 PCR 模板量 } (\mu\text{g}) = \frac{\text{sgRNA 数量} \times 500 (\text{覆盖乘数}) \times 6.6}{10^6}$$

表 3. 不同 sgRNA 数进行 PCR 模板量

| 文库 sgRNA 数 (500×) | PCR 模板量 (Qubit, $\mu\text{g}$ ) | PCR 模板量 (Nanodrop, $\mu\text{g}$ ) |
|-------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| 5000              | 16.5                            | 33.0                               |
| 10000             | 33.0                            | 66.0                               |
| 20000             | 66.0                            | 132.0                              |
| 60000             | 198.0                           | 396.0                              |

在实际实验中因细胞数量有限可能基因组 DNA 得率偏低，可根据具体提取基因组的  $\mu\text{g}$  数或实验要求适量减少文库的覆盖乘数，将其降为 300× 或 200×，但最终仍需符合您的实验要求。

以 Sample 文库为例，假设该文库 sgRNA 数为 6523 条，故该样本应进行 PCR 模板量为：

$$\text{Sample} = \frac{6523 \times 500 \times 6.6 \mu\text{g}}{10^6} = 21.5 \mu\text{g}$$

以 50  $\mu\text{L}$  为一个 PCR 反应体系，则应 PCR 22 管（为保证文库的均一性和覆盖度，实际 PCR  $\mu\text{g}$  数  $\geq$  计算模板量）。假设 Sample 提取基因组 DNA 总量为 12.6  $\mu\text{g}$ ，此时我们可以取全部的基因组 DNA 进行 PCR（注意：取全部的基因组 DNA 进行 PCR 时首先需要进行预实验，以防实验失败基因组全部损失），即 PCR 管数为 13 管（覆盖乘数为 290×）。在实验中还要注意，不同的样品对应使用不同编号的 Magic™ Primer Mix，以避免后续测序时样品之间无法混样测序。

将 PCR 反应液配置在一个 1.5 mL/2.0 mL 离心管中，震荡混匀离心后每 50  $\mu\text{L}$  分装至相应 PCR 管中进行后续 PCR。PCR 结束后，将 PCR 反应液收集到一个新的 1.5 mL/2.0 mL 离心管中并混匀（图 3）。

配置 PCR 反应液时各组分添加量如下：

| 组分                                               | 实际情况           |        | 理想情况            |        |
|--------------------------------------------------|----------------|--------|-----------------|--------|
| Nuclease-free H <sub>2</sub> O                   | 补至 650 $\mu$ L | 13 个反应 | 补至 1100 $\mu$ L | 22 个反应 |
| Magic <sup>TM</sup> PCR Master Mix (2 $\times$ ) | 325 $\mu$ L    |        | 550 $\mu$ L     |        |
| Magic Primer Mix#V1                              | 52 $\mu$ L     |        | 88 $\mu$ L      |        |
| Genomic DNA                                      | 12.6 $\mu$ g   |        | 21.5 $\mu$ g    |        |

PCR 反应程序：

| 步骤  | 温度              | 时间    | 循环数 |
|-----|-----------------|-------|-----|
| 预变性 | 95 $^{\circ}$ C | 3 min | 1   |
| 变性  | 95 $^{\circ}$ C | 15 s  | 25  |
| 退火  | 58 $^{\circ}$ C | 15 s  |     |
| 延伸  | 72 $^{\circ}$ C | 30 s  |     |
| 补延伸 | 72 $^{\circ}$ C | 5 min | 1   |

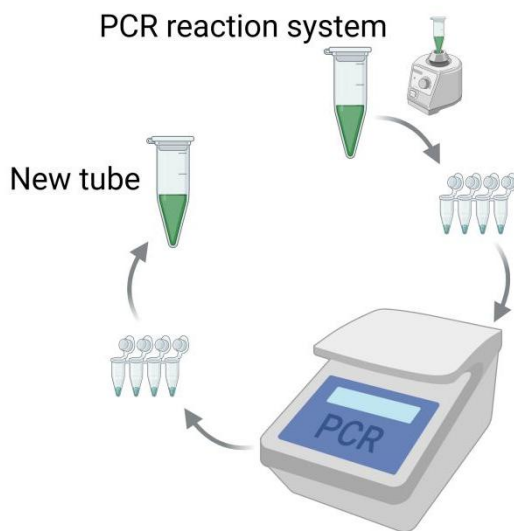


图 3. PCR 流程图

取不少于 100  $\mu\text{L}$  收集的 PCR 反应液进行琼脂糖（1.5%）凝胶电泳。结果见图 4。目的条带大小约 300 bp，跑胶后肉眼观测到的条带大小在 250 bp 附近（略大于 250 bp）。注意每次电泳应该更换新的电泳缓冲液，并使用一次性切胶器，避免样品之间或其他杂质污染，影响后续回收、测序等实验。

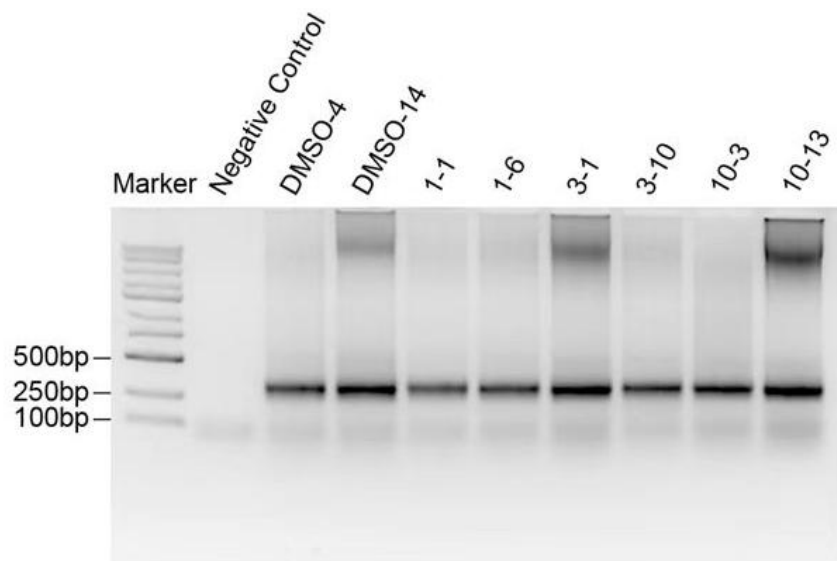


图 4. 构建 NGS 测序库琼脂糖凝胶电泳图

使用 DNA 胶回收试剂盒将切除胶块回收，推荐使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 检测各样本切胶回收后产物的浓度，将产物进行 Illumina 测序，各样本请根据 CRISPR 文库包含的 sgRNA 数量计算测序深度，每 1000 条 sgRNA 测 0.17G，可覆盖每条 sgRNA 500 $\times$ 。

#### 常见问题：

##### 1、正式实验前是否需要进行预实验？

对于未进行 Day0 样本测试的新制备文库细胞而言或者初次进行 CRISPR 筛选测序，建议进行预实验，可以每个样本进行 1-3 个 50  $\mu\text{L}$  PCR 反应，分别加入 1  $\mu\text{g}$ 、2  $\mu\text{g}$  和 5  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 测试样本扩增产量，同时设置阳性基因组对照（1  $\mu\text{g}$ ）。

##### 2、sgRNA 数量很多的全库应如何设置实验？

可通过适当降低覆盖乘数和增加每个反应的基因组量来缩小反应数。以 60000sg 全库为例，按照 300 $\times$  设置实验每组可收获 1800w 细胞，理论上可以获得 118.8  $\mu\text{g}$  基因组 DNA。若每 50  $\mu\text{L}$  反应体系加入 2  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 则需要 60 个 PCR 反应，若每 50  $\mu\text{L}$  反应体系加入 5  $\mu\text{g}$  基因组 DNA 则需要 24 个 PCR 反应。

##### 3、加 1 $\mu\text{g}$ 基因组 DNA 进行 25 个循环扩增较弱怎么办？

说明基因组 DNA 中阳性分子数不足即可能含有未被药杀彻底的野生型细胞。这种情况下覆盖乘数可能偏低，一般应增加基因组 DNA 模板的量至 2  $\mu\text{g}$  或 5  $\mu\text{g}$  增加覆盖乘数并增加目的条带产量。此外，也可以通过增加循环数至 28 个循环增加目的条带产量。无论是增加循环数还是增加基因组 DNA 的量**可能导致副反应增加**（杂带或背景扩增）。