

有限稀释法筛选 CRISPR-Cas9 KO 单克隆细胞

操作指南

RN: R12005.1

当您使用 T7E1 酶完成了 riboEDIT™ CRISPR-Cas9 基因编辑效率的检测后，可根据实验需要参照如下步骤进行 KO 单克隆细胞筛选。

本操作仅供参考，下面以贴壁细胞为例，悬浮细胞注意事项请见注释。

第一步：完成 riboEDIT™ CRISPR-Cas9 基因编辑实验

请根据 riboEDIT™ CRISPR-Cas9 体系的使用说明操作。

1.细胞铺板接种：转染前 18-24h，取对数生长期细胞接种于 24 孔板中，实验前细胞密度达到 50%~70%为宜。

2.细胞转染与基因编辑：进行 riboEDIT™ tracrRNA, riboEDIT™ crRNA, riboEDIT™ Cas9 mRNA 或 riboEDIT™ Cas9 Protein 共转染，即采用全 RNA 体系或 RNP 体系进行共转染，转染后继续培养 48-72h。

注：悬浮细胞细胞推荐用电转以获得理想的转染效率。电转后如出现死细胞，推荐在进行单克隆细胞接种之前，先采用台盼蓝计算细胞活率。

第二步：筛选 KO 单克隆细胞

1.细胞计数及铺板：将经过编辑后的细胞群用 0.25% trypsin 重新消化，用含血清的细胞培养基调整细胞浓度至 5 个/mL，铺至 96 孔板，每孔体积 100μL。

注：按照每孔 0.5 个细胞铺 96 孔板。根据编辑效率可以大概评估获得双等位基因突变的 KO 细胞株所需的最少单克隆细胞的数量。例如：细胞群的编辑效率为 50%，则每个细胞双等位基因 KO 概率为 25% ($50\% \times 50\% = 25\%$)；由 Indel 导致移码突变的概率约 2/3，故由 Indel 引起单个细胞双等位基因突变的概率为 11% ($50\% \times 50\% \times 66\% \times 66\% = 11\%$)。假设挑不中目标单克隆的概率降低至 1% 以下，那么获得双等位基因突变的 KO 细胞株需要的最少的单克隆细胞的数量为 40 ($(1-11\%)^N = 1\%$ ，计算得到 $N=40$)。

由于不同的细胞类型单克隆存活率不同，假设单克隆存活率为 20%，那么铺板时至少需要接种 200 个单克隆 ($40/0.2=200$)，因此至少需要铺 4.2 个 96 孔板（每块 96 孔板理论上可得到 48 个单克隆细胞）。

2. 筛选单克隆：将 96 孔板置于 CO₂ 培养箱培养，大约 7~14 天，在 4X 显微镜下可见单克隆形成，挑选只有一个单克隆的细胞群的孔，去除其余多个克隆或无细胞的孔。

3. 单克隆扩增：继续培养，待形成一定数量的细胞群后将细胞消化下来，转移至 24 孔板里扩大培养。

注：对于悬浮细胞，由于单克隆细胞不贴壁，为防止克隆簇被破坏，更换培养基时推荐每次更换一半体积的培养基。

4. 提取基因组：收集细胞抽提基因组，并用微量紫外分光光度计定量。

5. PCR 扩增：将上述抽提纯化得到的基因组 DNA 稀释至合适的浓度范围，吸取 100ng-500ng 基因组 DNA 用高保真 DNA 聚合酶（**riboENZYME™ High-Fidelity PCR Master Mix, C11021-2**）进行 PCR 扩增，要求 PCR 扩增的目标片段包含编辑区域的基因片段并且可进行测序分析，推荐片段长度 600~700bp。

6. DNA 片段纯化：回收纯化目标 DNA 片段（**riboEXTRACT™ Universal DNA Purification Kit, C11028-2**），确保目标 DNA 片段大小正确且条带单一。

7. 测序分析：纯化的目标 DNA 片段进行 Sanger 测序，双等位基因纯合突变的 KO 细胞株将得到不同于原序列的单一的测序图，双等位基因杂合突变或单等位基因突变的 KO 细胞株，将得到套叠的测序图，可进行 TA 克隆后再测序来进一步分析编辑位点的确切序列。

8. 细胞建库：经鉴定的单克隆细胞进行进一步扩大培养并建库。

免责声明：因研究者的实验路线各不相同，实验条件可能千差万别，如上操作说明仅供参考，可根据实验目的自行调整。