

# 实用CRISPR/Cas9技术手册

第三版

- > CRISPR技术与应用知识
- > CRISPR基因编辑案例分析
- > CRISPR实验一站式解决方案

✓ sgRNA/ssDNA  
✓ 慢病毒包装

✓ gRNA文库  
✓ 细胞系构建

 **GenScript**  
Scripting Possibilities

# 金斯瑞CRISPR/Cas9试剂和服务



## 定制化CRISPR gRNA质粒构建服务

提供SpCas9, eSpCas9, SpCas9 Nickase, SaCas9, SAM共5种不同的gRNA和Cas9表达系统, 满足多样的客户需求。



## 定制化crRNA、tracrRNA、gRNA合成服务

提供高质量定制化crRNA、tracrRNA和gRNA合成服务, 提供多种现货Cas9蛋白。



## CRISPR gRNA文库

提供由博德研究所 (Broad Institute) 设计并验证的GeCKO v2.0和SAM文库, 以及定制化gRNA文库合成服务。



## ssDNA合成服务

提供序列100%正确、定制化、高纯度ssDNA合成服务, 可作为CRISPR试验中同源重组修复的绝佳模板, 显著提升基因编辑效率和准确性。



## 慢病毒包装服务

提供高滴度慢病毒包装服务, 滴度涵盖 $10^7$ - $10^9$  IFU/mL, 可满足不同实验需求。



## 哺乳动物细胞系基因编辑

提供从质粒构建、病毒包装、转染、慢病毒感染、RNP转染到敲除菌株筛选的一站式哺乳动物基因敲除细胞系构建, 成功率高达100%, 周期最短至10周。



## 微生物基因编辑

使用高效的 $\lambda$  Red和CRISPR相结合的基因编辑技术, 可精确到碱基, 可同时敲除多达3个基因, 同时保证无痕编辑, 最快短至4周。

如需下载PDF版手册, 请登录

<https://www.genscript.com.cn/crispr-handbook.html>



# 目录

---

## CRISPR/Cas9基因编辑技术的发现和发展

1.1 基因编辑的原理 .....	1
1.2 基因编辑技术的发展 .....	2
1.3 CRISPR/Cas9在细菌免疫系统中的发现 .....	3
1.4 CRISPR/Cas9靶向序列范围的扩大 .....	5
1.5 CRISPR/Cas9系统的特异性和脱靶效应 .....	6
1.6 CRISPR文库用于全基因组和通路特异性筛选 .....	9
1.7 CRISPR技术应用于RNA编辑 .....	10
1.8 CRISPR基因编辑的优势 .....	10

## CRISPR/Cas9技术应用领域的拓展

2.1 CRISPR介导的染色质免疫沉淀 .....	12
2.2 CRISPR技术用于转录激活和抑制 .....	13
2.3 利用CRISPR/Cas9进行表观遗传学编辑 .....	14
2.4 利用CRISPR/Cas9进行DNA/mRNA活体成像 .....	15
2.5 CRISPR/Cas9的医学性应用 .....	15

## CRISPR/Cas9基因编辑常规流程和案例分享

3.1 CRISPR常规工作流程 .....	17
3.2 模式系统中CRISPR介导的基因编辑 .....	21
3.3 CRISPR/Cas9文库筛选工作流程 .....	24
3.4 案例分享1: 利用RNP和ssDNA实现基因敲入 .....	25
3.5 案例分享2: 利用CRISPR生成敲除细胞系 .....	27
3.6 案例分享3: 利用CRISPR技术构建敲除细胞池 .....	28
3.7 案例分享4: 利用CRISPR技术进行微生物基因组编辑 .....	28
3.8 案例分享5: 利用化学合成成长单链sgRNA提升基因编辑效率 .....	30

CRISPR/Cas9技术展望 .....	32
-----------------------	----

参考文献 .....	33
------------	----

金斯瑞一站式CRISPR定制化试剂和服务 .....	39
----------------------------	----

# CRISPR/Cas9基因编辑技术的发现和发展

基因编辑（Gene editing），又称基因组编辑（Genome editing）是一种对生物体基因组特定目标基因进行修饰的基因工程技术。生物学家通过对特定基因进行敲入、敲除等操作，可以确定基因、mRNA、蛋白产物与各种细胞功能之间的关系。通过抑制基因功能或改变基因表达，可以直观深入的了解疾病机理或鉴别出新的医疗干预靶点。在过去20年中，基因组编辑技术不断发展，目前已经可以在细胞系和动物模型中实现精确的基因组操作。在这些新技术中，CRISPR/Cas9技术因其设计简单、实施快捷、成本低廉，效率高等优点已成为目前最具潜力的基因编辑工具。

## 1.1 基因编辑的原理

基因编辑的完成依赖于核酸酶在基因组中特定位置产生双链断裂（DSB）以及细胞本身的修复机制，该过程基本分成三个步骤：靶向目标序列，形成DNA断裂，修复断裂同时引入敲除或敲入（图1）。

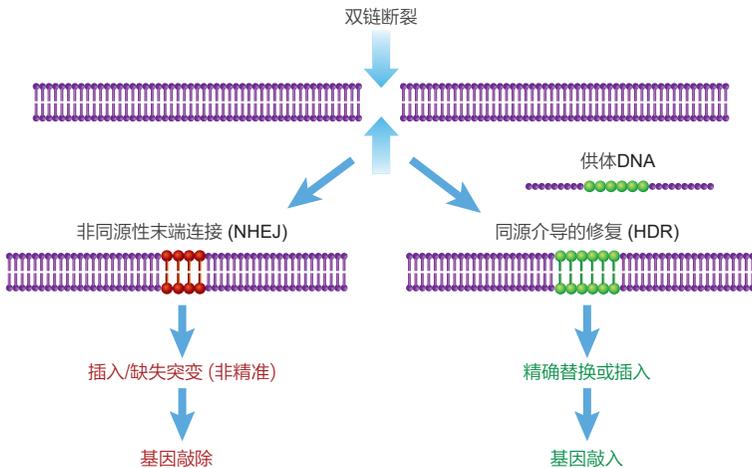


图1: DNA损伤修复的两种途径

靶向目标序列：基因编辑的第一步也是最重要的一步就是在基因组上找到需要进行编辑的位置。基因组数据庞大复杂，例如人类的基因组DNA大小达到3GB。在庞大的基因组中定位到需要剪切的部位需要一个高效、精准的定位方法。

形成DNA断裂：定位到目标基因组位置以后，借助核酸内切酶在DNA双链上形成双链DNA断裂，以此激发细胞本身的DNA修复机制。

修复断裂同时引入敲除或敲入：DNA双链断裂后，会激发细胞本身的DNA修复机制。细胞的DNA损伤修复包含两种主要途径，一种是非同源性末端结合（Non-homologous End Joining, NHEJ），即易错修复。NHEJ途径会在修复位点引起随机插入或缺失，造成移码突变，使得基因不再表达，由此形成基因敲除。另一种是同源重组介导的修复（Homology directed repair, HDR），即精准修复。HDR途径能借助外源引入的单链或双链DNA为模板介导基因替换或插入，这种方式可以将一段DNA序列精准地插入特定的基因组位点，由此完成基因敲入或替换。

## 1.2 基因编辑技术的发展

基因编辑技术的首次运用是在1989年，研究人员利用同源重组在小鼠胚胎干细胞的特定基因上引入敲入和敲除突变<sup>1</sup>。但由于哺乳动物细胞中同源重组发生频率很低，且外源序列很容易随机整合到基因组的其他位点造成脱靶效应，因此当时基因编辑的成功率很低。后续的研究表明，通过在靶向位点附近引入双链断裂（Double-strand break, DSB）能够激活细胞本身的损伤修复机制，进而提高基因编辑效率。

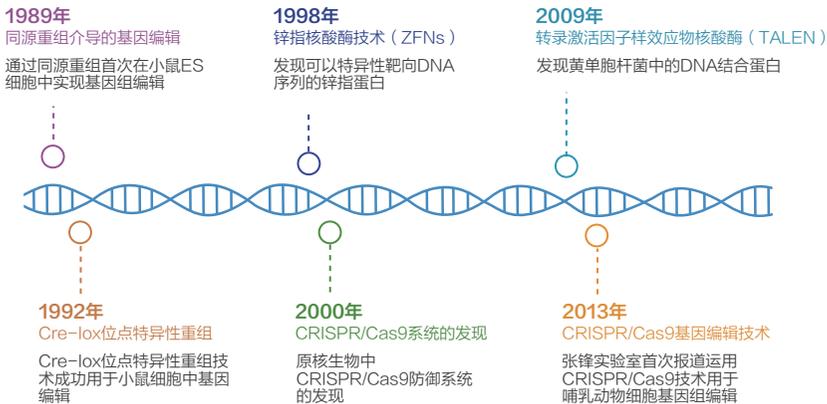


图2：基因编辑技术的发展历程

1998年报道的锌指核酸酶技术（ZFN）被称为传统意义上的第一代基因编辑技术，该技术通过靶向特定位点形成双链DNA断裂（DSB），显著提高了基因编辑的效率<sup>2-4</sup>。锌指核酸酶（ZFN）由锌指蛋白（ZFP）和FokI核酸内切酶组成。其中ZFP能识别DNA特异位点并与之结合，FokI核酸内切酶能执行对DNA双链的剪切，两者结合可使靶位点的双链DNA断裂。

2011年报道的转录激活因子样效应物核酸酶技术（TALEN）被称为第二代基因编辑技术<sup>2-4</sup>。TALEN的工作原理与ZFN类似，核心元件仍然由DNA识别域和DNA剪切域组成。但是，在ZFN中每个锌指蛋白识别一个DNA三碱基序列，而在TALEN中每2个氨基酸组合对应着一个特定的碱基。因此通过人为删减、添加和自由组合不同的氨基酸，可以构造出识别和结合不同DNA序列的TALEN，从而实现对人类基因组DNA不同位点的精确定位。

相对于ZFN，TALEN技术的可编辑性明显增加，但TALEN蛋白复杂的组装特性导致使用者需要扎实的蛋白质工程专业知识，这也成为限制TALEN技术广泛应用的主要原因<sup>5</sup>。因此，新的基因编辑技术要想得到广泛的应用需要具备操作简单、实施快捷、成本低廉，突变效率高等特性。

### 1.3 CRISPR/Cas9在细菌免疫系统中的发现

1987年，大阪大学的研究人员在研究大肠杆菌*iap*基因时，无意中在该基因的3'端发现一系列断裂成簇的重复序列<sup>6</sup>。当时人们并不知道这些重复序列究竟有什么作用。之后的几年中，研究人员在其它多种细菌和古细菌中也陆续发现这类重复性序列<sup>7</sup>。

2002年研究人员将这些重复序列称为CRISPR（Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats），并在其附近发现相关基因，这些基因被称为*cas*（CRISPR-associated）<sup>8</sup>。*cas*基因始终与CRISPR位点相邻，并表现出解螺旋酶和核酸内切酶的基序特征<sup>8</sup>。2005年，研究人员证实CRISPR间隔序列来源于病毒等染色体外组织，并且他们发现与病毒同源的间隔序列都具有一种类似的尾巴，称为PAM（Protospacer adjacent motif）序列<sup>9-11</sup>。多个染色体CRISPR位点和相邻核酸内切酶的存在表明，CRISPR是可移动元件，且Cas蛋白在其基因组整合中发挥着重要作用。这

些发现使研究人员得出结论，CRISPR/Cas系统可能在细菌对抗外源遗传物质入侵的适应性免疫防御中发挥重要功能。

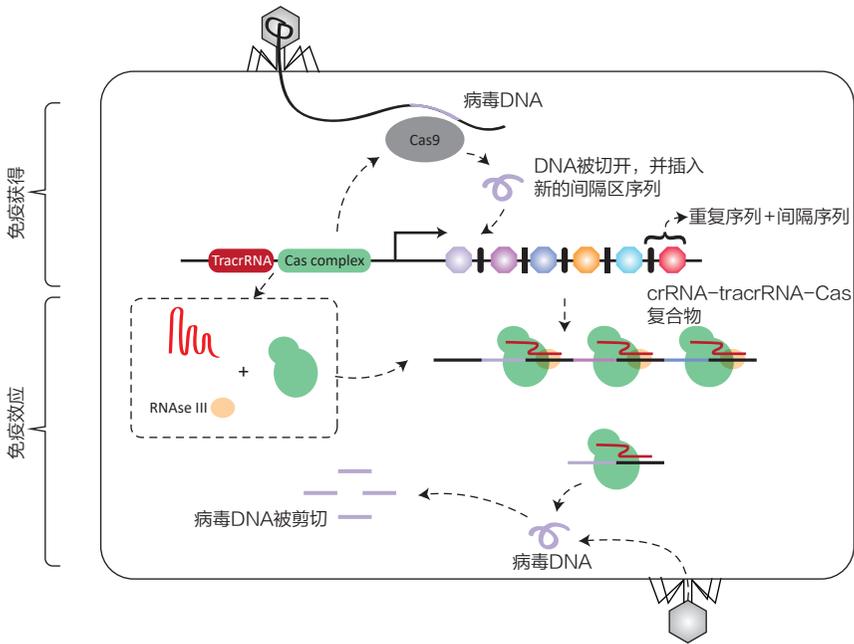


图3: CRISPR介导的细菌免疫机制

后续研究成果揭示了CRISPR/Cas介导的适应性免疫作用机制。CRISPR/Cas适应性免疫系统分为两个主要阶段：免疫获得和免疫效应（图3）。在免疫获得阶段，Cas蛋白剪切外源性病毒DNA，然后将该外源性DNA作为间隔序列（Spacer）插入细菌基因组重复间隔区序列之间<sup>12</sup>。在免疫效应阶段，当细菌再次感染病毒后，重复间隔区序列转录形成前体crRNA（Pre-crRNA）<sup>13</sup>。随后Cas核酸内切酶在反式激活crRNA（tracrRNA）指导下与前体crRNA结合，经RNase III剪切后形成成熟的crRNA-Cas-tracrRNA复合物。成熟的crRNA作为gRNA（Guide RNA, gRNA）与病毒DNA配对，触发Cas剪切活性进而干扰病毒DNA正常复制的<sup>14-16</sup>。

2013年，美国麻省理工学院Feng Zhang和哈佛大学George Church课题组首次在哺乳动物细胞系中利用CRISPR/Cas9实现了基因编辑<sup>17,19</sup>。Feng Zhang及其同事构

建的CRISPR/Cas9系统主要由两种组分组成，即Cas9核酸内切酶和gRNA (Guide RNA, gRNA)。其中gRNA是将成熟的crRNA和tracrRNA融合而成，其既有crRNA的靶向特异性序列的功能，同时还有tracrRNA作为Cas9核酸内切酶骨架的功能。通过改变gRNA的5'端的碱基序列就可以使该系统靶向基因组不同的区域<sup>17, 20</sup>。该系统所使用的Cas9蛋白是来源于化脓性链球菌的SpCas9蛋白，其识别的PAM为5'-NGG-3'，在人类基因组中大约每8到12个核苷酸就会出现一次<sup>21</sup>。

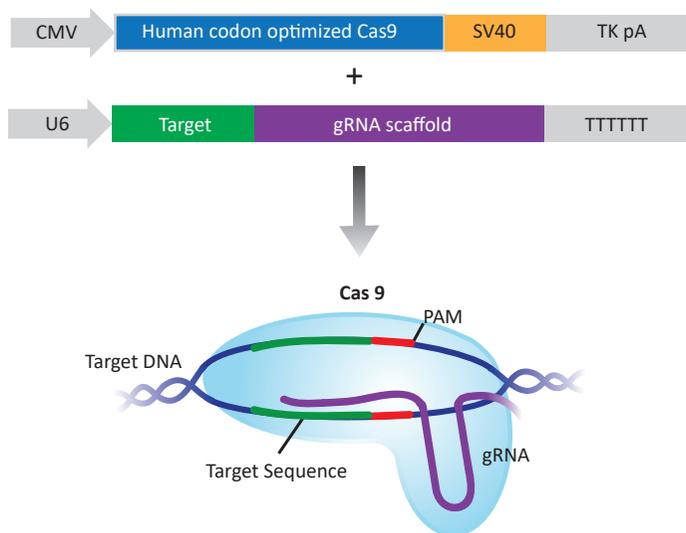


图4: CRISPR/Cas9系统用于哺乳动物细胞基因编辑

由此，CRISPR系统在多种生物的基因定点编辑、基因组筛选、基因转录调控、基因组成像、基因诊疗、生态应用等领域的研究与应用开始并喷。2013年CRISPR技术被Science杂志评为十大科学突破之一。

## 1.4 CRISPR/Cas9靶向序列范围的扩大

早期CRISPR/Cas9技术在使用过程中受到许多限制。其原因，一方面是由于SpCas9蛋白要求在gRNA识别序列的下游存在NGG的保守PAM序列<sup>21</sup>，另一方面是由于为了保证转录起始效率，gRNA的表达需要使用人源U6 pol III启动子启动，而U6 pol III

的转录起始位点为鸟苷酸（G），迫使gRNA只能从符合GN<sub>19</sub>NGG模式的基因组序列中选择。以上的因素都极大的限制了CRISPR/Cas9技术使用。

扩展CRISPR/Cas9靶向序列的一种策略是使用不同的启动子来驱动gRNA表达。H1启动子的转录起始位点为A或G；因此，H1驱动的gRNA也可以靶向AN<sub>19</sub>NGG序列，其在人类基因组中出现的频率比GN<sub>19</sub>NGG高约15%。gRNA表达框中的这种微小变化使CRISPR/Cas9在人和其他真核生物基因组中的靶向位点数翻了一倍以上。

另一种策略是消除PAM序列限制。其中一种方法就是利用蛋白质工程技术改造产生全新的Cas9突变体，使其识别其他PAM序列<sup>23</sup>。通过蛋白结构信息分析、定向进化筛选以及组合设计，研究人员开发出几种可识别其他PAM序列的Cas9变异体，这些变异体可以识别NGA、NGCG、NNGRRT和NNHRRT等PAM序列<sup>22</sup>。

除在SpCas9基础上开发识别其他PAM序列的突变体外，寻找SpCas9的替代物也成为新的研究方向。其中来源于弗朗西斯菌的Cpf1（FnCpf1）就是一个例子。Cpf1是一种缺乏SpCas9中HRH结构域的Ⅱ型核酸酶，与传统的SpCas9不同，Cpf1识别的PAM序列为5'-TTN-3'，且其对应的crRNA较短，不需要tracrRNA。且由于Cpf1分子量较小，更容易包装到病毒载体内，Cpf1因此成为体内基因编辑应用的理想之选<sup>23</sup>。

## 1.5 CRISPR/Cas9系统的特异性和脱靶效应

CRISPR/Cas9系统的特异性主要取决于gRNA序列的N20序列与基因组序列的碱基互补作用。但由于基因组极为复杂，gRNA可能与非靶向序列局部匹配，这种局部匹配也会激活Cas9内切酶活性，从而产生脱靶效应（Off-target effects）<sup>24</sup>。此外，Cas9不仅识别标准PAM，也可识别非标准PAM，这也可能会引起一定程度的脱靶。脱靶可能影响正常基因的功能表达，甚至激活致癌因子、抑制抑癌基因，造成安全隐患，这极大的阻碍了该技术在临床的进一步应用。目前主要通过优化gRNA设计，改造Cas9蛋白，使用RNP递送方式等策略来提高CRISPR/Cas9系统特异性以降低脱靶现象。

### 提高 gRNA 特异性

gRNA 靠近 PAM 的 10~12 bp 的碱基，又被称为种子区，决定了 gRNA 与靶点识

别的特异性。研究结果显示，设计gRNA序列时控制种子区的GC含量在40%~60%能显著提高gRNA与靶点识别的特异性。此外，gRNA长度、种子区第一位的碱基种类等也与gRNA的特异性密切相关。

2014年，MIT博德研究所与哈佛率先开展了一项针对gRNA结合特异性建模的研究<sup>25</sup>。研究人员检测了6个小鼠和3个人的基因中所有可能的可靶向位点，共生成1841条gRNA，并对它们敲除基因表达的能力进行了量化分析，从而在此基础上建立了一个gRNA活性预测模型<sup>26</sup>。基于该模型，研究人员开发了gRNA设计工具，该工具可通过以下网址访问：

<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design>。

2016年下半年，博德研究所与微软合作设计出第二代模型，第二代模型利用优于模型中靶活性的算法以及切割频率测定（CFD）评分来预测脱靶效率<sup>27</sup>。这些新工具可通过以下网址访问：<http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/software/sgrna-scoring>。

## 使用Cas9突变体

传统的Cas9蛋白包含RuvC和HNH两个催化结构，RuvC和HNH可分别剪切DNA的两条链形成双链断裂，如gRNA与非目标区域结合就有造成不必要插入突变的可能。博德研究所的研究人员对Cas9进行突变使RuvC和HNH两个催化结构域中的一个缺失核酸酶活性形成Cas9n，Cas9n与DNA双链作用时仅产生单链切口。应用CRISPR/Cas9n系统进行基因编辑需要使用两个相邻且相反链上的gRNA序列。虽然所用的每条gRNA的脱靶结合位点可能出现在全基因组范围内，但是Cas9n仅催化每个位置的单链断裂（Single-strand break, SSB）。SSB优先通过HDR进行修复，而不是NHEJ，这可降低不必要的插入缺失突变的发生。应用CRISPR/Cas9n系统进行基因编辑能将脱靶活性降低50-1000倍<sup>28</sup>。

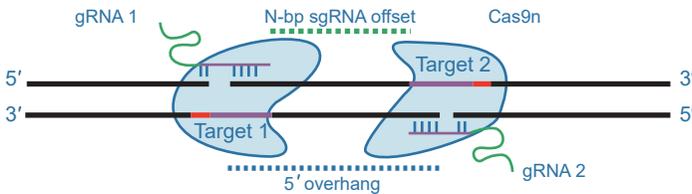


图5. 通过Cas9n提高剪切特异性

博德研究所的研究人员通过分析Cas9蛋白结构还发现HNH和RuvC结构域之间有带正电荷的沟槽，这种结构可能会使Cas9结合非目标DNA，最终提高脱靶剪切的可能性<sup>29</sup>。为此该研究小组将沟槽内带正电荷的氨基酸替换为丙氨酸，这种Cas9突变体称为“增强型” SpCas9或eSpCas9，后续研究发现eSpCas9能够在不影响靶向剪切效率的情况下减少脱靶效应<sup>29</sup>。

## 选择合适递送载体，使用RNP

相关研究结果显示，细胞持续表达 Cas9 将增加脱靶风险，Pattanayak 等发现高浓度的 gRNA-Cas9 复合物可以切割 PAM 序列附近或内部位点，形成脱靶效应。通过调节 gRNA 和 Cas9 核酸酶的浓度可降低脱靶风险，但浓度过低，相应的基因组编辑能力也会减弱。因此选择合适的递送载体将Cas9-gRNA复合物传递到细胞内，并使 Cas9-gRNA 复合物在细胞中维持合适的浓度，同时在细胞中发挥作用后又能快速消除是控制脱靶效应的一个重要策略。

金斯瑞可提供五种不同的CRISPR/Cas9系统作为gRNA克隆的载体骨架满足客户不同需求。同时金斯瑞还提供定制化crRNA， tracrRNA， gRNA合成和多种Cas9蛋白，客户可直接使用RNP形式转化细胞提高编辑效率，降低脱靶效率。

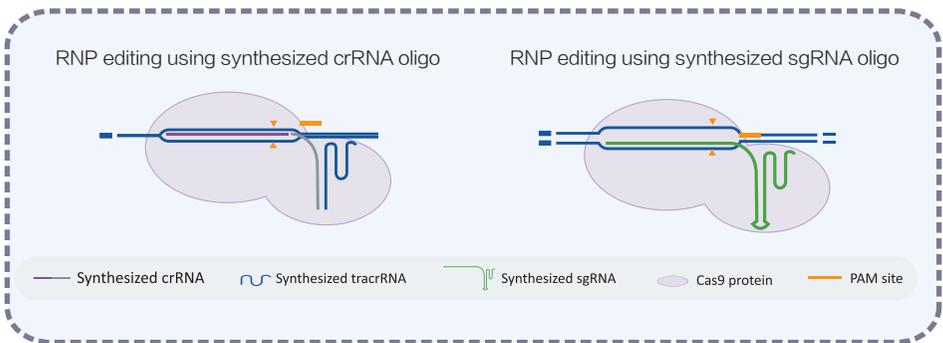


图6. 利用Cas9/gRNA核糖核蛋白（RNP）进行基因编辑

通过在体外表达或合成gRNA，然后将gRNA和Cas9蛋白结合形成Cas9/gRNA核糖核蛋白（Cas9/gRNA Ribonucleoproteins，RNP）直接转染目的细胞可以显著降低脱

靶效率。RNP复合物能够在导入细胞后快速发挥剪切染色体靶DNA的作用，然后细胞的内源性降解机制能快速清除RNP复合物，限制脱靶剪切（图6）<sup>30,31</sup>。最近的实验发现，Cas9的脱靶效应和导入细胞的Cas9浓度直接相关<sup>32</sup>。通过优化导入Cas9蛋白的浓度，可以限制Cas9表达的持续时间和水平，进一步限制脱靶剪切。

此外使用Cas9的天然蛋白质抑制剂来调节Cas9活性，使用细胞渗透性化合物激活的Cas9融合体并添加细胞渗透性化合物来稳定CRISPR基因组编辑等都可以起到降低脱靶效率的作用。

## 1.6 CRISPR文库用于全基因组和通路特异性筛选

CRISPR/Cas9基因编辑技术与第一、二代基因编辑技术相比，其最大的突破是CRISPR/Cas9技术不仅可以对单个基因进行编辑，更可以同时多个基因进行编辑，即CRISPR文库筛选。CRISPR文库筛选实验中，使用靶向多基因甚至全基因组的gRNA文库替代靶向单一基因的gRNA质粒，然后通过高通量筛选就可快速筛选到符合预期表型的细胞。

gRNA文库的质量是高通量筛选获得预期表型细胞的重要因素。目前市面上有一些设计好并经过验证的文库可直接使用。例如，张锋实验室构建的靶向人和小鼠的全基因组范围的GeCKO v2.0文库就可用于功能丧失突变的快速筛选<sup>33</sup>。GeCKO v2.0文库中每条gRNA都克隆在经优化的慢病毒载体上，以实现高滴度病毒生产和高效转染原代细胞或培养细胞。GeCKO v2.0文库转染细胞后，可在筛选前进行深度测序，评估gRNA在细胞中的表现。筛选之后，还需进行第二轮测序，鉴定在筛选过程中缺失或富集的gRNA。通过鉴定哪些基因对应的gRNA被富集以得到真正的阳性克隆。详细的GeCKO筛选实验方案可在GeCKO基因组工程网站上找到：<http://genome-engineering.org/gecko/>。

使用全基因组文库对应的后续筛选工作会比较繁重，而定制化gRNA文库可以根据需求，设计针对特定信号通路的文库，减少下游筛选工作压力，用于开展小规模的研究。

金斯瑞提供GeCKO v2.0或SAM gRNA文库，同时可提供定制化gRNA文库构建服务，定制化gRNA文库覆盖率可达到100%。

目前，CRISPR文库技术在药物靶点确认，肿瘤功能基因筛选，病毒感染基因筛选，代谢通路调节机制分析，基因环路调控机制分析，非编码基因功能筛选等研究领域都有所应用。

## 1.7 CRISPR技术应用于RNA编辑

基于CRISPR的RNA编辑技术是将具有靶向RNA的Cas13替换传统的Cas9蛋白演变而来。传统的CRISPR基因编辑针对DNA进行修改，其修改是不可逆的，因此也会造成不可避免的安全风险，同时也存在伦理问题。RNA编辑技术只对DNA转录出来的中间产物RNA进行修改，从而实现对突变蛋白质的纠正。

2017年，张锋团队将一种能高效靶向RNA且失活的Cas13b酶与ADAR2酶融合在一起形成融合蛋白（ADAR2酶是细胞内RNA转录进程中重要调控酶，能催化腺嘌呤（A）转化为肌苷（I））<sup>34</sup>。这个融合蛋白能够被引导至特定的RNA位置，同时将RNA上的A修改为I，张锋等人将其称为REPAIR。2019年张锋实验室进一步开发了RESCUE系统，该系统使用一种改进后的全新ADAR2酶能把不需要的胞嘧啶碱基（C）精确地修改为尿嘧啶碱基（U）<sup>35</sup>。

2019年，北京大学魏文胜课题也报道了一种名为LEAPER的新型RNA单碱基编辑技术<sup>36</sup>。与传统的核酸编辑技术需要向细胞同时递送编辑酶（如Cas蛋白）及向导RNA不同，LEAPER系统通过转入一条特殊设计的RNA（arRNA, ADAR-recruiting RNA）就能够通过招募细胞内源的ADAR1蛋白对靶向基因转录本上特定的腺苷产生高效精准的编辑，并不需要引入任何外源效应蛋白。

## 1.8 CRISPR基因编辑的优势

CRISPR自问世以来为基因编辑领域带来了重大变革。原因不仅在于CRISPR技术的低成本高效益和高特异性的特点，还因其简单易用。无论使用者本身的分子生物学专业知识水平如何，都可以快速了解和使用该技术。与ZFN和TALEN技术不同，CRISPR/Cas9系统只需根据靶向位点设计靶点特异性的gRNA，而无需根据每一个靶向的基因对ZFN或TALEN蛋白质改造。此外，利用CRISPR技术可同时编辑多个基因，大

幅提高实验效率。下表列出了CRISPR技术与第一二代基因编辑技术的主要区别和劣势分析（表1）。

表1: TALEN、ZFN技术和CRISPR/Cas9技术的主要区别

技术类别	ZFN	TALEN	CRISPR/Cas9
靶点识别模式	蛋白质 : DNA	蛋白质 : DNA	(gRNA-Cas9) : DNA
细胞毒性	大	较小	较小
DBS复合物的组成	ZF Array : FokI	TALE Array : FokI	Cas9 : gRNA
基因编辑数量	单基因	单基因	多基因
操作可行性	困难: 需要为每一个基因序列定制蛋白	容易: 只需根据每个基因设计靶点特异性的gRNA	

CRISPR/Cas9技术除用于基因组编辑外，还适用于其他研究领域，如：

- 利用CRISPR/Cas9进行染色质免疫沉淀
- 利用CRISPR/Cas9进行转录激活和抑制
- 利用CRISPR/Cas9进行表观遗传学编辑
- 利用CRISPR/Cas9进行DNA/mRNA活体成像
- CRISPR/Cas9的医学性应用

### 2.1 CRISPR介导的染色质免疫沉淀

染色质免疫沉淀技术（Chromatin immunoprecipitation assay, CHIP）是研究DNA与蛋白质相互作用的主要方法。传统的ChIP是靶定特定蛋白质，在活细胞状态下固定蛋白-DNA复合物，将其随机切断为片段，然后通过免疫学方法特异性地富集目的蛋白结合的DNA片段，通过对目的片段的纯化与检测，从而获得蛋白质与DNA相互作用的信息。

CRISPR/Cas9介导的ChIP是反向的，即靶定基因组区域然后鉴定哪种蛋白质在那里<sup>37</sup>。通过将细胞核定位信号和表位标签引入催化失活的Cas9（dCas9），可形成通过gRNA靶向的DNA结合蛋白<sup>37, 38</sup>。现有gRNA数据库和设计工具能够靶向任何目的基因。而dCas9与染色质形成的复合物可以用传统的染色质免疫沉淀（ChIP）技术进行纯化，并通过质谱进一步鉴定。

CRISPR介导的CHIP技术已被用于识别与干扰素调节因子1（IRF-1）的启动子区域相关的蛋白，其受到干扰素 $\gamma$ 刺激会产生反应<sup>39</sup>。在该研究中，研究人员纯化了15种相关蛋白，包括组蛋白脱乙酰基酶复合物以及转录因子、组蛋白和其他DNA相关蛋白<sup>40</sup>。

相比传统的CHIP方法，CRISPR介导的CHIP具有众多优势。传统的ChIP的大规模分析需要使用靶向每种DNA结合蛋白的多个抗体或者生成并表达表位标记蛋白，但CRISPR/Cas9系统的模块化特性只需靶向Cas9蛋白的单个抗体进行纯化。此外，CRISPR/Cas9系统不受基因表达水平低、差异基因表达或毒性基因表达等问题的影响。

## 2.2 CRISPR技术用于转录激活和抑制

利用dCas9无核酸内切酶活性但仍能与DNA结合的特点设计的CRISPR/dCas9系统，可按照预先设计的gRNA靶向特定基因的转录起始位点上游，同时结合转录激活或抑制相关因子启动或终止靶向基因的转录来调控靶基因的表达<sup>41</sup>。

博德研究所的张锋实验室率先将CRISPR/Cas9协同转录激活调节子（SAM）系统应用于基因激活试验。SAM系统能够强效激活内源性基因的转录，其通过gRNA靶向结合到转录起始位点上游200 bp内的位置<sup>42</sup>。利用SAM系统激活基因表达方面的研究表明，通过转录激活，可使部分基因的转录提高到原来的3000倍<sup>42, 43</sup>。同时SAM系统具有多重基因激活能力，可同时激活10个基因的转录。此外研究还证明SAM可激活非编码元件，如基因间区长链非编码RNA。

使用靶向全基因组的SAM gRNA文库进行功能获得性筛选，可快速鉴定出疾病模型或发育/分化过程中控制目的表型出现的关键基因<sup>42</sup>。博德研究所设计的靶向人全基因组SAM文库针对每个基因设计3种不同的gRNA，每个gRNA靶向23430个编码亚型中的一个，这些亚型包含人类基因组中独特的转录起始位点，该SAM文库总共包含70290条gRNA。

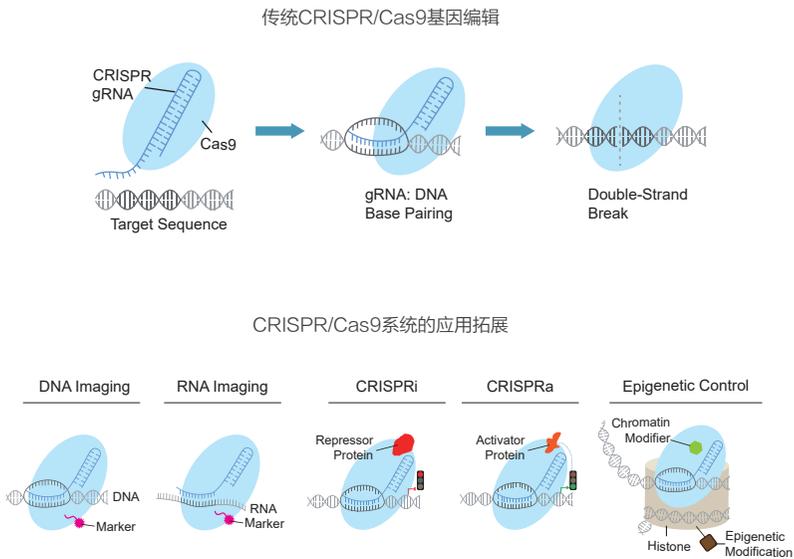


图7. CRISPR/Cas9的应用拓展

## 2.3 利用CRISPR/Cas9进行表观遗传学编辑

表观遗传学是与遗传学相对应的概念，是指基于非基因序列改变所致基因表达水平变化，如DNA甲基化和染色质构象变化等。特定基因位点和组蛋白残基的表观遗传学标记可通过遗传或后天获得，且会影响基因表达。

研究人员利用CRISPR/Cas9对人胚胎干细胞中的三种DNA甲基转移酶基因进行了敲除，以鉴定出存活的多能性细胞系在DNA甲基化方面的不同作用<sup>44</sup>。

但研究人员更倾向于通过诱导目标基因组位点发生表观遗传学修饰的方法构建疾病模型，对潜在的治疗策略进行测试。

借助CRISPR/Cas9系统，表观遗传学编辑现已成为可能。简单来讲就是在dCas蛋白上融合一个特殊的蛋白结构域，dCas9和gRNA完成靶向的功能，而特殊结构域完成靶向位点的修饰（比如甲基化）。修饰的位点可以是DNA，也可以是DNA附近的组蛋白；修饰方式可以是甲基化、乙酰化，也可以是DNA单位点编辑。Cas9表观遗传学效应物也可用于全基因组筛选，研究表观遗传修饰、染色质状态以及诸如细胞分化或疾病进程等表型之间的新关系<sup>46, 47</sup>。

## 2.4 利用CRISPR/Cas9进行DNA/mRNA活体成像

DNA可视化是了解各种细胞过程 (如复制、转录和重组) 以及DNA与关联蛋白和RNA之间相互作用的重要应用。此前常用的DNA成像技术分别是原位荧光杂交 (FISH) 和DNA结合蛋白的荧光标记。FISH利用结合荧光标记的核酸探针来显示DNA。尽管这种技术可通过核酸探针的碱基对灵活地靶向特异性序列, 但因为需要样本固定而无法用于活体成像。相反, 带有荧光标记的蛋白质可用于活体成像, 但受限于其固定的靶序列, 主要用于重复DNA序列, 如端粒<sup>48-50</sup>。

CRISPR/Cas9技术可用于活体成像。例如, 可用荧光基团标记dCas9, 用于重复DNA元件和蛋白编码基因的成像, 从而使我们能够在整个细胞周期中观察染色质组织<sup>51</sup>。除活体DNA成像外, CRISPR/Cas9系统还可用于活体RNA成像。对gRNA序列进行修饰可以实现mRNA的识别和示踪<sup>52</sup>。利用CRISPR介导的RNA成像技术, 研究人员能够观察到ACTB、CCNA2和TRFC mRNA在RNA颗粒中的聚集<sup>52</sup>。这些新应用可改进现有的细胞内活体成像方法, 便于对涉及DNA和RNA的动态细胞过程进行研究。

## 2.5 CRISPR/Cas9的医学性应用

自CRISPR技术问世以来, 知名制药公司以及初创生物技术公司都在竞相开发基于CRISPR的疗法。与其他基因治疗方法相比, CRISPR基因组编辑被公认为速度更快、成本更低且更加安全的方法。利用基因组编辑对病人自身细胞中的突变进行校正, 可以避免使用匹配供体进行移植治疗时出现的排斥问题。CRISPR基因组编辑在那些可通过修饰病人自体细胞来治愈自身疾病方向的应用前景尤为可观。此外, CRISPR基因组编辑还允许进行额外的筛选, 以确保基因编辑过程中不会出现脱靶基因修饰。

表2: CRISPR/Cas9的治疗性应用

<p><b>肿瘤免疫疗法</b></p>	<p>CRISPR/Cas9可以用于定向敲除肿瘤免疫检查点分子或者快速简便地进行基因编辑,从而显著降低肿瘤免疫治疗的操作难度。例如,肿瘤免疫疗法中最热门的CAR-T技术即可通过基因编辑获得修饰后的T细胞,使其能够特异性识别肿瘤细胞表面特异性受体,并增强其对肿瘤细胞的防御能力。CRISPR技术可以用于提高CAR-T细胞的制备效率,敲除免疫共抑制通路或信号分子的相关基因(如CTLA4、PD1)来提高CAR-T细胞的功效等研究中<sup>53-55</sup>。</p>
<p><b>组织再生</b></p>	<p>近期的研究报告表明,CRISPR/Cas9可能是改善细胞分化的重要工具。CRISPR技术已被用于衍生多种类型的细胞供移植使用,包括用于治疗肌营养不良的肌肉细胞以及用于治疗镰刀形红细胞贫血症的造血干细胞<sup>56</sup>。57。这些结果共同表明,CRISPR/Cas9技术可应用于定向细胞分化和移植。</p>
<p><b>基因治疗</b></p>	<p>亨廷顿氏(Huntingtons)病是一种遗传性神经疾病,由突变亨廷顿蛋白在脑内积聚而引起,可导致认知功能障碍、痴呆和死亡。研究人员利用小鼠模型发现,CRISPR/Cas9基因编辑可敲除这些突变蛋白<sup>58</sup>。CRISPR/Cas9编辑足以将突变蛋白产量降低达90%,有望成为治疗方案。</p>
<p><b>疟疾和虫媒传染病</b></p>	<p>诸如疟疾和寨卡等虫媒传染病会在全球范围内造成严重的健康问题。为了防止虫媒传染病的传播,研究人员对CRISPR/Cas9进行修饰,构建出高效的“基因驱动”系统,该系统可将抗病基因扩散到整个群体。为了构建基因驱动,研究人员将抗病基因与CRISPR系统的gRNA及Cas9组分一起包装到一个DNA重组体内。完成转染后,基因驱动抗病基因自主复制到两个亲本染色体中,并能按照99.5%的概率由后代遗传下去<sup>59</sup>。60。</p>
<p><b>HIV和病毒性疾病</b></p>	<p>基因编辑可针对病毒性传染病提供新的治疗方法。利用基因治疗删除对病毒细胞侵入和感染至关重要的受体,可以有效清除患者体内的HIV。近期利用CRISPR技术方面的研究显示,诱导多能性干细胞(iPSC)和原代CD4+细胞中的CCR5和CXCR4受体突变会使这些细胞衍生的谱系获得HIV抵抗力<sup>61</sup>。62。</p>
<p><b>肥胖与代谢病</b></p>	<p>FTO是与肥胖最密切相关的基因之一。某些FTO基因变异体与肥胖和体重过重显著相关。研究人员表明,CRISPR/Cas9介导的敲入技术可将脂肪前体细胞中促进肥胖的FTO变异体转变为普通的变异体<sup>63</sup>。经过处理的细胞表现为代谢活性增强以及IRX3和IRX5表达降低,这两种基因决定了细胞命运,即是否成为用于储存脂肪的白色脂肪细胞。</p>

# CRISPR基因编辑常规流程和案例分享

利用CRISPR/Cas9技术进行基因编辑，从开始设计gRNA到获得修饰后的克隆细胞系仅需2-3周，并且CRISPR/Cas9技术可以实现在第一代即获得转基因动物品系。以下工作流程和分享案例介绍了在实验室使用CRISPR的最佳操作规范。

## 3.1 CRISPR常规工作流程

CRISPR基因编辑可按以下步骤进行：

### 确定需要使用的CRISPR基因修饰系统

CRISPR技术发展至今已经演变出不同的系统，不仅可以用于基因敲除敲入，还可以用于基因表达的激活和抑制等（表3）。根据具体实验目的，需要选择不同的CRISPR/Cas9基因修饰系统。

表3：不同的CRISPR/Cas基因修饰系统

基因修饰类型	实验目的	Cas核酸酶类型	gRNA靶向位点
敲除	永久性破坏基因功能	Cas9或Cas9n	gRNA靶向5'外显子或重要的蛋白结构域
敲入	生成特定的序列改变	Cas或Cas9n	gRNA靶向目的区域
干扰	降低基因表达	dCas-抑制子	gRNA靶向基因启动子元件
激活	提高基因表达	dCas-激活子	gRNA靶向基因启动子元件

### 选择Cas9/gRNA递送系统

CRISPR系统的Cas9和gRNA组分可使用非病毒质粒或病毒载体以及RNP形式导入细胞内（表4）。

表4：不同的Cas9/gRNA递送系统

表达系统	组分	应用
质粒载体	组成型或诱导型Cas9 组成型或诱导型 gRNA 报告基因/选择性标记	Cas9和gRNA的表达 用于易转染细胞的基因编辑
慢病毒载体	组成型或诱导型Cas9 组成型或诱导型gRNA 报告基因/选择性标记	Cas9和gRNA的表达 用于难以转染的细胞的转染
AAV载体	组成型或诱导型Cas9 组成型或诱导型gRNA 报告基因/选择性标记	SaCas9和/或gRNA的瞬时或稳定表达 用于分裂和非分裂细胞的无毒转染
Cas9 mRNA和gRNA	通过体外转录反应生成Cas9 mRNA和gRNA 通过显微注射或电穿孔导入	CRISPR基因编辑组分的瞬时表达 快速发挥基因编辑效应
sgRNA/Cas9 核糖核蛋白复合物 (RNP)	Cas9蛋白和体外合成sgRNA形成RNP 通过显微注射或电穿孔导入	CRISPR基因编辑组分的瞬时表达 快速产生基因编辑作用

生物医学研究中一些使用最广泛的模式系统包括原代哺乳动物细胞，其转染效率可能非常低。对于这些细胞类型，可以尝试使用慢病毒载体。

腺病毒载体（AAV）具有低免疫原性且能感染静止期细胞和分裂期细胞，很适合应用于体内治疗等基因编辑领域<sup>64</sup>。但是AAV包装容量有限，很难将长度为4kb左右的SpCas9编码基因克隆进AAV载体并进行AAV包装。使用更小的来自金黄色葡萄球菌的SaCas9，可以使SaCas9和gRNA表达框一起包装到一个AAV载体内，从而成功完成转导<sup>65</sup>。

直接化学合成gRNA，再与Cas9蛋白结合形成核糖核蛋白（Ribonucleoprotein, RNP）转染进入细胞能快速靶向目标序列和切割DNA双链，发挥基因编辑效应。运用RNP进行基因编辑操作能显著简化CRISPR/Cas9基因编辑实验流程，降低脱靶效应，同时还能提高转染效率，避免免疫干扰反应。RNP形式已逐渐成为CRISPR/Cas9基因编辑的一种趋势。

金斯瑞可提供五种不同的CRISPR/Cas9系统作为gRNA克隆的载体骨架满足客户不同需求。同时金斯瑞还提供定制化crRNA, tracrRNA, gRNA合成和多种Cas9蛋白, 客户可直接使用RNP形式转化细胞提高编辑效率, 降低脱靶效率。

## 基因序列分析

为保证基因编辑的效率, 建议对目标细胞系或动物模型的目的区域进行测序, 而不是假定它与该种属/菌株的NCBI参照序列相匹配。等位基因数量也可能因种属/菌株不同而异, 这些差异会导致剪切效率降低。

## 选择靶向序列

如实验目的在于破坏基因功能, 可设计靶向该基因第一外显子的gRNA, 以阻止截短型蛋白异构体的表达。对于含有多个剪接变异体的基因, 如果目标是敲除所有剪接变异体, 则应注意确保靶向组成型外显子。如使用Cas9n, 需设计一对相对的分别位于正反链的gRNA序列, 且两个gRNA序列对应的PAM应相距40–60 bp。如需干扰和激活目的基因, 应靶向转录起始位点200 bp内的启动子元件。

金斯瑞提供免费在线的人和小鼠全基因组gRNA数据库, 其中的gRNA序列由博德研究所研究人员设计并验证, 可通过以下网址搜索和访问:

<http://www.genscript.com.cn/gRNA-database.html>。金斯瑞还提供免费在线gRNA设计工具, 该设计工具同样由博德研究所研究人员开发, 可通过以下网址访问:

<http://www.genscript.com.cn/gRNA-design-tool.html>。

## 预测中靶/脱靶效率

确定目的区域内的所有PAM序列, 当使用不同的Cas9变体, 其PAM序列也不同(表5)。如果目标区域没有PAM序列, 则应考虑靶向其他的区域。设计过程中应考虑潜在的脱靶位点, 基因组序列较长的情况下会存在很多同源位点, 因此可能造成脱靶现象。

表5：不同Cas9变体及其PAM序列

Cas9及变体	PAM序列
SpCas9	NGG
SpCas9 VRER变体	NGCG
SpCas9 EQR变体	NGAG
SpCas9 VQR变体	NGAN或NGNG
SaCas9	NNGRRT
Cpf1	TTN

## 设计敲入供体DNA

如需在细胞中进行基因插入、置换和修正操作，当Cas9蛋白在基因组上产生DSB后须提供供体DNA做为同源重组修复（HDR）的模板。HDR模板可使用双链质粒或单链寡核苷酸（ssDNA）的形式。为了后续验证敲入效率，设计供体模板时需较野生型基因组有几个同义突变以区分野生型。同时，为了防止HDR成功后供体DNA被剪切，供体模板在设计时应在PAM序列中引入突变。

金斯瑞提供序列100%正确、高纯度的长单链DNA（single-stranded DNA, ssDNA）合成服务，ssDNA是CRISPR试验中同源重组修复（homology directed repair, HDR）模板的绝佳选择，能显著提升基因编辑效率和准确性。

## 合成CRISPR gRNA/Cas9载体或合成RNP

一旦确定了表达系统、使用的Cas蛋白和gRNA序列，就可以构建gRNA/Cas9表达载体或直接合成gRNA或ssDNA。

### 3.2 模式系统中CRISPR介导的基因编辑

CRISPR/Cas9已在多种不同种属和模式细胞中成功实现基因组编辑。虽然各种不同模式生物中CRISPR/Cas9组分都基本相同，但不同模式生物中Cas9和gRNA的导入方法却有很大差异，为宿主选择最合适的Cas9和gRNA导入方式对基因编辑成功与否至关重要（表6）。

表6：不同模式生物中Cas9和gRNA的导入方法

宿主	Cas9和gRNA导入方式
哺乳动物细胞	基于脂质体的质粒DNA转染 电穿孔导入质粒DNA或RNP 基于慢病毒或AAV病毒的质粒DNA转染
细菌	转化质粒进入感受态细胞
酵母	电穿孔转化质粒DNA
小鼠：生殖细胞系突变	直接注射至胚胎 电穿孔至受精卵
小鼠：体细胞突变	直接注射AAV至目的组织
斑马鱼	直接注射至单细胞胚胎
果蝇	直接注射至胚胎生殖细胞系
秀丽隐杆线虫	直接注射至两性生殖细胞系
植物	农杆菌介导的gRNA/Cas9载体转化

### 体外基因组编辑

体外基因编辑即将CRISPR/Cas9系统组分导入分离至体外的非生殖细胞内完成基因编辑。

对于易转染细胞系基因编辑，可通过脂质体高效导入gRNA和Cas9表达质粒。通常情况下gRNA和Cas9的编码质粒包含选择性标记（如抗生素抗性基因）或包含可通过

FACS轻松检测的荧光蛋白，可以用于转染成功细胞的首筛。

对于较难转染的细胞系或原代细胞，可使用慢病毒载体完成转导。其中将编码gRNA与Cas9的基因克隆到一个慢病毒质粒完成导入的形式称为单质粒系统，将编码gRNA与Cas9的基因分别克隆到不同的质粒上，先完成Cas9的导入，再导入gRNA表达质粒的形式称为双质粒系统（图8）。

直接转染RNP复合物替代外源载体，通过脂质体、电转染、显微注射或细胞传膜肽等途径直接转入宿主细胞，具有快捷安全、脱靶效应更低、编辑效率更高等优势，已经逐渐成为CRISPR/Cas9技术更高效的实现途径。

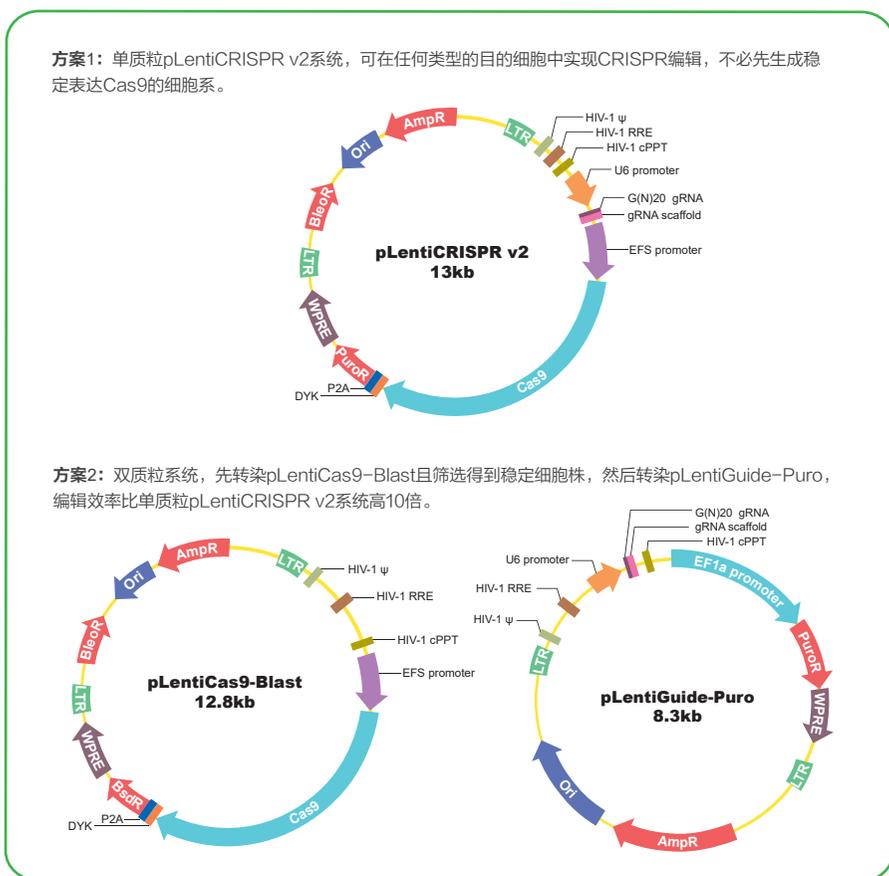


图8: 优化的慢病毒载体，用于哺乳动物细胞CRISPR基因组编辑

## 体内基因组编辑

体内基因编辑即将CRISPR/Cas9系统组分导入至生殖系细胞，完成基因编辑产生遗传性突变。使用CRISPR/Cas9可以在第一代小鼠中实现多个位点的稳定纯合突变<sup>66</sup>。CRISPR介导的基因组编辑也同样可用于在成体动物体细胞组织中产生精确突变，并在同一细胞中一次修饰多个基因。这些工具极其适合构建临床相关体内癌症模型，因为人类肿瘤细胞通常包含原癌基因功能获得突变和肿瘤抑制基因功能丧失突变。

## KO/KI及脱靶效应的验证

为了验证CRISPR介导的KO/KI是否成功，以及是否产生了功能丧失或功能获得突变，可以通过对编辑后细胞的mRNA和蛋白等基因产物进行分析。通常可运用定量PCR、RNA印迹和蛋白质免疫印迹等技术来确定mRNA和蛋白浓度是否大量减少，或分子量是否有所改变来验证。但是，对于难以转染的细胞，仅需通过NGS测序来测定基因组编辑效率，证明已获得高的KO/KI效率即可，而无需分离单细胞进行验证。通过NGS的结果，我们可以检测到一系列独特的插入和缺失。

### 控制脱靶效应的一些方法：

- 针对每个靶向基因设计多个不同的gRNA序列，不同的gRNA造成脱靶的概率会不同；
- 针对导入同种gRNA的细胞，分离多个单克隆细胞，在每个单克隆中造成完全相同的脱靶效应的概率非常低；
- 在不具备全基因组测序验证资源的情况下，可以针对每个gRNA选择少数几个预测的脱靶序列进行测序验证。

通常为了确定脱靶效应，会对预测的脱靶位点进行测序，尤其是那些与gRNA识别位点种子区匹配的位点。如果条件允许，也可以使用全基因组测序对脱靶效应进行更全面的检测。

### 3.3 CRISPR文库筛选工作流程

CRISPR/Cas9介导的文库筛选可按以下步骤进行：

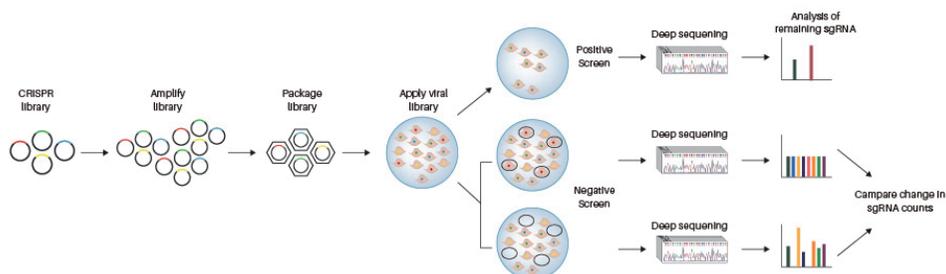


图9：CRISPR文库筛选流程

#### 选择商业化gRNA文库或构建定制化gRNA文库

根据需要，可以选择商业化的靶向人或鼠全基因组的gRNA质粒文库，例如GeCKO v2.0或SAM gRNA文库。也可根据需求设计定制化gRNA文库，比如想筛选宿主的某一类蛋白，则可仅针对这一类蛋白的基因设计gRNA。为提高后续实验的成功率，需要确保文库的覆盖率，文库覆盖范围不全会导致假阴性和假阳性。

金斯瑞提供GeCKO v2.0或SAM gRNA文库，同时可提供定制化gRNA文库构建服务，定制化gRNA文库覆盖率达到100%。

#### gRNA文库的病毒包装

混合文库因为质粒量大，转染效率较低且转染试剂对某些细胞系的毒性较大，因此一般使用慢病毒包装后转导细胞。研究表明，使用双质粒系统的慢病毒包装比单质粒系统的慢病毒包装的病毒滴度明显增加，因此双质粒系统在文库筛选工作中的应用更加广泛。

#### 构建混合细胞库和抗性筛选

将gRNA文库包装慢病毒后，应以较低的MOI值转染目标细胞，用来降低一个细胞中进入多个gRNA的概率，避免同一个细胞多个基因被敲除的现象。为了评估细胞池中

gRNA的表达情况，在进行筛选工作之前，可以进行一轮NGS深度测序对gRNA的表达情况进行评估。

## 压力筛选

高通量的筛选分为阳性筛选和阴性筛选，阳性筛选是施加一定的筛选压力，使少数目的表型的细胞存活，达到富集关键基因的目的。阴性筛选与之相反，存活的细胞并不是目的表型细胞，因此需要比较不同时间点gRNA的丰度找出差异gRNA来确定。以耐药性基因筛选实验为例，采用高浓度药物处理感染后的细胞，经过筛选后存活的细胞则具有一定的耐药性，将这些细胞扩增并收集下来，耐药性的来源就是对相应基因的修饰产生的。

## PCR扩增和高通量测序验证

提取经压力筛选后富集的细胞的基因组DNA，对gRNA的靶向区域进行PCR扩增，将PCR产物进行高通量测序以量化靶向不同基因的gRNA的相对丰度。分析富集的细胞中gRNA的丰度数据可以分析得到表型相关基因，这些基因可以作为后续深入研究的待选基因进行单基因研究。

## 3.4 案例分享1：利用RNP和ssDNA实现基因敲入

相关研究显示使用RNP形式递送Cas9/gRNA可以降低脱靶效应，而采用ssDNA替换传统的dsDNA作为同源重组的修复模板也被证明可以降低脱靶效应和细胞毒性。本案例中RAB11A被选为报告基因GFP的敲入位点，分别使用dsDNA和ssDNA作为GFP基因敲入的同源重组模板。最终结果显示，使用ssDNA或dsDNA协同RNP可以实现高效基因敲除，使用ssDNA的脱靶效率相对于使用dsDNA的脱靶效率更低。

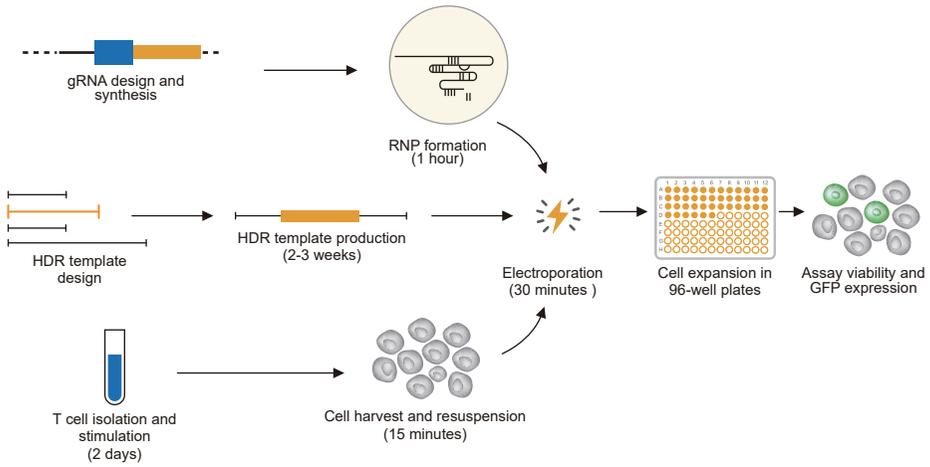


图10: 使用RNP和ssDNA进行基因敲入流程

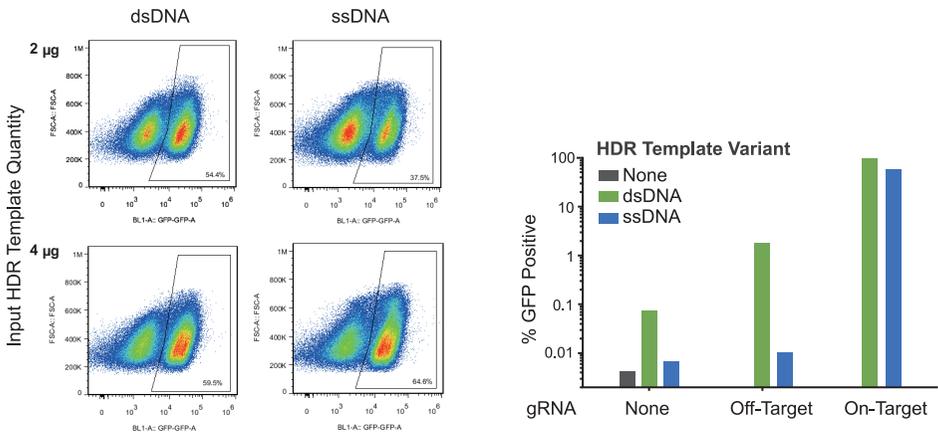


图11: ssDNA或dsDNA协同RNP进行基因敲除

金斯瑞提供高质量gRNA合成, crRNA合成, Cas9蛋白, 以及ssDNA合成服务。

### 3.5 案例分享2: 利用CRISPR生成敲除细胞系

K-Ras蛋白是一个重要的细胞分裂调节因子，其编码基因为*KRAS*。*KRAS*是一种原癌基因，与多种恶性肿瘤有关，包括白血病、胰腺癌、结肠癌和肺癌。在本案例中我们需要敲除人结肠癌细胞系HCT116中的*KRAS*基因(图12)。案例中，外显子4作为CRISPR/Cas9介导的基因敲除的靶点。在没有供体DNA的情况下，DSB被NHEJ修复，形成插入缺失。最后我们使用Sanger测序和蛋白质免疫印迹来确认*KRAS*基因被成功敲除(图13)。

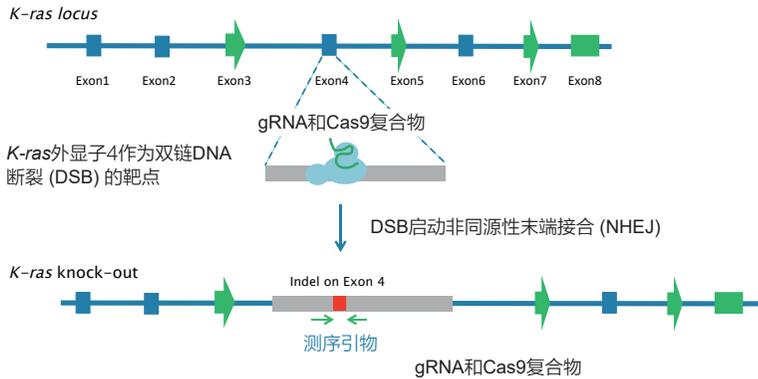


图12: 靶向*KRAS*的基因敲除策略

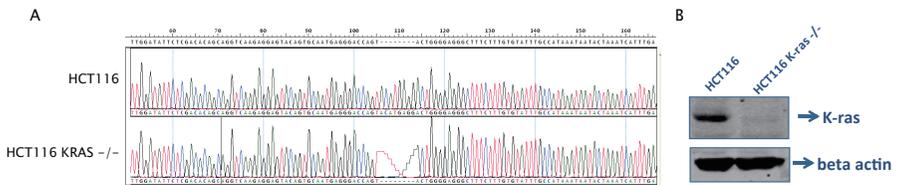


图13: 通过Sanger测序和蛋白质免疫印迹验证*KRAS*功能缺失

金斯瑞的哺乳动物细胞系基因编辑服务可为客户提供靶向哺乳动物细胞任何基因的基因编辑，且所有克隆均提供靶序列测序验证，并提供详细的克隆生成报告。

### 3.6 案例分享3: 利用CRISPR技术构建敲除细胞池

在本案例中, 需要在HEK293细胞中敲除热休克蛋白家族一员DNAJC3的编码基因 *dnajc3*。为了构建 *dnajc3* 敲除的细胞池, 我们设计了5条靶向 *dnajc3* 基因共享外显子的gRNA。将这些gRNA克隆至带有嘌呤霉素抗性的一体化gRNA/Cas9载体中, 转染HEK293细胞, 并进行抗生素抗性筛选。通过Sanger测序对细胞池中细胞进行检测。通过对测序峰图进行分析, 可以验证插入缺失突变效率为89.7% (图14)。

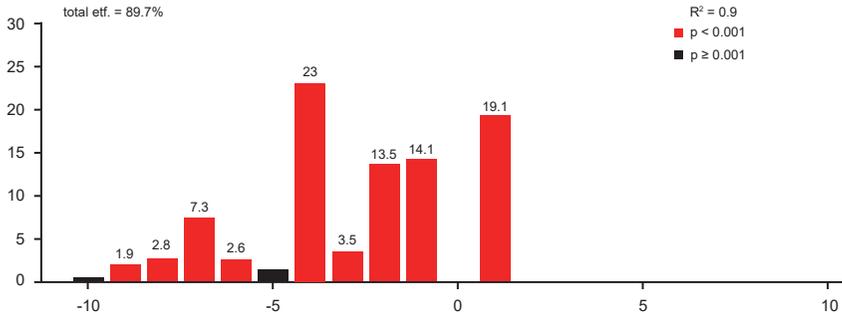


图14: *dnajc3* CRISPR细胞池的插入缺失突变效率

金斯瑞CRISPR基因敲除细胞池服务可实现难转染哺乳动物细胞系中基因敲除。

### 3.7 案例分享4: 利用CRISPR技术进行微生物基因组编辑

CRISPR/Cas9技术还可用于在微生物中产生敲入和敲除突变。但是微生物中发生同源重组的频率较低, 需要利用  $\lambda$  Red等技术来提高重组效率。通过将CRISPR/Cas9技术与  $\lambda$  Red重组技术相结合, 可实现高效的微生物基因编辑。 $\lambda$  Red系统利用噬菌体重组酶可使重组臂短至30bp时实现同源序列的重组<sup>67</sup>。

在本案例中,  $\lambda$  Red-CRISPR/Cas9系统被用于敲除BL21菌株中的 *cadA* 基因。CadA蛋白是赖氨酸脱羧酶的一个组分, 该酶有助于细菌在酸性环境下存活<sup>68</sup>。基因编辑完成后, 我们使用Sanger测序和菌落PCR筛选来确认 *cadA* 基因被成功敲除 (图15)。

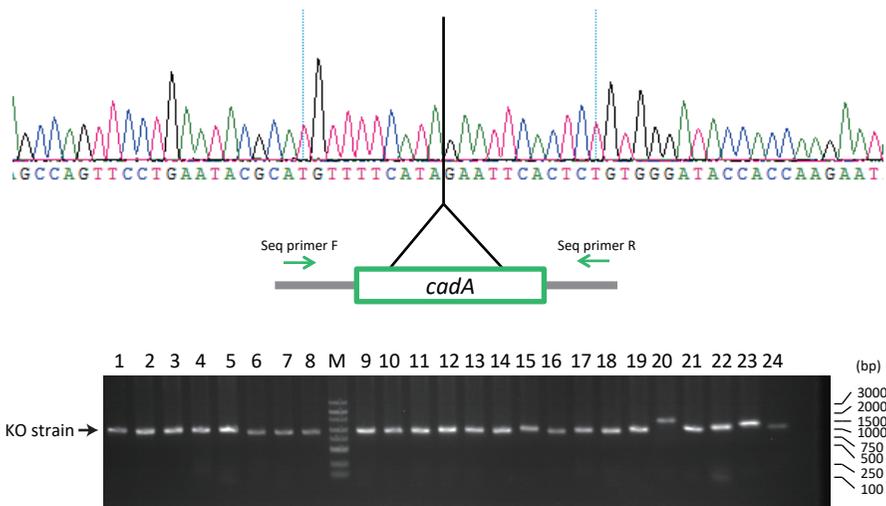


图15: Sanger测序和菌落PCR验证*cadA*的敲除

金斯瑞的微生物基因编辑服务采用  $\lambda$  Red-CRISPR/Cas 编辑技术，该技术是目前最精确、最高效且最经济的细菌基因编辑方法之一。

### 3.8 案例分享5：利用化学合成长单链sgRNA提升基因编辑效率

CRISPR/Cas9基因编辑技术中，利用Cas9和sgRNA形成的核糖核蛋白（RNP）替代质粒的转染模式，具有快捷安全、脱靶效应更低、编辑效率更高等优势，逐渐成为CRISPR/Cas9技术更高效的实现途径。

在本案例中，通过实验比较化学合成长单链sgRNA和传统体外转录sgRNA（IVT sgRNA）在多个宿主细胞、多种转染模式上的细胞毒性、编辑效率和稳定性。

#### 基因编辑效率

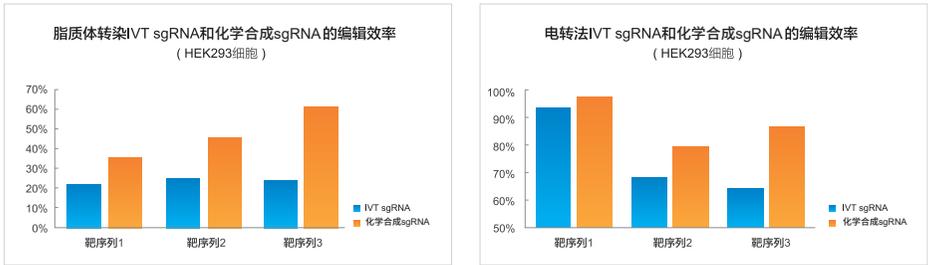


图16：化学合成sgRNA和IVT sgRNA细胞水平的基因编辑效率

**实验证明：**采用脂质体转染模式和电转模式，针对3组不同靶序列进行基因敲除实验，化学合成sgRNA都可以提供更优越的编辑效率，该结论与文献报道一致<sup>69</sup>。

#### 细胞毒性

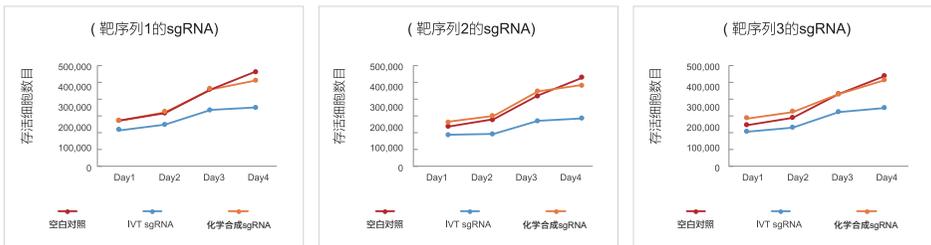
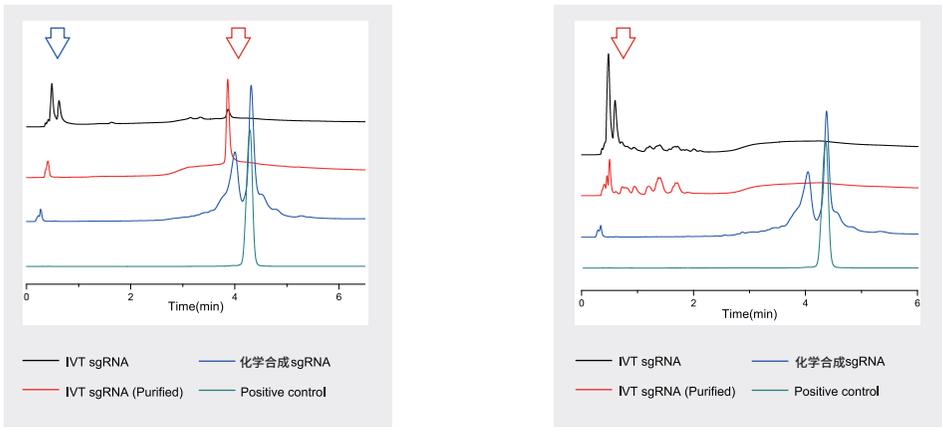


图17：化学合成sgRNA和IVT sgRNA的细胞毒性

**实验证明：**将不同靶序列的3组sgRNA样品和宿主细胞（HEK293细胞）共孵育，化学合成sgRNA细胞毒性更低，对宿主细胞正常增殖和细胞活性的影响较小，该结论与文献报道一致<sup>70</sup>。

IVT sgRNA存在5'三磷酸修饰，会引起细胞免疫反应，造成细胞毒性，干扰后续实验，而化学合成sgRNA则不存在该干扰因素。

## sgRNA的稳定性



(37°C 储存8 h)

(37°C 储存7 Days)

图18：化学合成sgRNA和IVT sgRNA稳定性比较

**实验证明：**化学合成sgRNA产物稳定性优于IVT sgRNA，IVT sgRNA在储存中出现分解（红色箭头），因为IVT sgRNA无法修饰，而化学合成sgRNA可添加硫代和甲氧基修饰，保证sgRNA在储存和实验中更稳定。

IVT sgRNA涉及多步生物合成，产物存在Buffer、酶等杂质（蓝色箭头），而化学合成sgRNA工艺稳定，批次间稳定性优于IVT sgRNA生物合成工艺，保证后续实验间结果的可重复性和一致性。

金斯瑞提供不同类型的化学合成长单链sgRNA，助力CRISPR技术应用不同阶段：

**EasyEdit sgRNA：**即买即用、编辑效率高、性价比领先，用于研发筛选

**SafeEdit sgRNA：**纯度≥90%、毒性低，用于细胞/动物模型上有效性和安全性评估

**IND sgRNA：**从合成、纯化、质检到分装，提供定制化检测报告和批次记录，支持临床实验申报

## CRISPR基因编辑技术发展前景

CRISPR使用简便且广泛适用于哺乳动物细胞、微生物和动物模型，为基因编辑带来了重大变革。CRISPR不仅能够增强我们分析和理解基因功能的能力，也正在快速改变生物医药行业。易于操作的基因组编辑技术可以用于校正导致遗传性疾病或其他疾病的基因突变，也可用于新药的大规模筛选。2016年，CRISPR/Cas9基因编辑首次在人类患者中进行测试，用于治疗恶性肺癌。

目前CRISPR系统应用于哺乳动物和微生物基因编辑的时间不长，CRISPR系统本身仍有很大改进空间。随着对Cas9蛋白结构的深入了解，可以构建出更小、更高效的Cas9突变体，提升转染和剪切效率。同样，随着研究人员对Cas9与DNA结合的机制进一步研究，可以设计出更加高效的Cas9-gRNA的重组体。

未来，CRISPR/Cas9技术将在生命科学研究和工业领域的创新中发挥重要作用。CRISPR/Cas9基因编辑仍是目前为止基因组工程中最简便、最经济高效且最激动人心的技术。毋庸置疑，这仅仅只是开始，这项革命性的技术将会继续受到未来几代科学家们的青睐。

1. Capecchi, M. R. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244, 1288-1292 (1989).
2. Beerli, R. R., Segal, D. J., Dreier, B. & Barbas, C. F., 3rd. Toward controlling gene expression at will: specific regulation of the erbB-2/HER-2 promoter by using polydactyl zinc finger proteins constructed from modular building blocks. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14628-14633 (1998).
3. Boch, J. *et al.* Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326, 1509-1512, doi:10.1126/science.1178811 (2009).
4. Moscou, M. J. & Bogdanove, A. J. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* 326, 1501, doi:10.1126/science.1178817 (2009).
5. Perez-Pinera, P., Ousterout, D. G. & Gersbach, C. A. Advances in targeted genome editing. *Curr Opin Chem Biol* 16, 268-277, doi:10.1016/j.cbpa.2012.06.007 (2012).
6. Ishino, Y., Shinagawa, H., Makino, K., Amemura, M. & Nakata, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol* 169, 5429-5433 (1987).
7. Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Soria, E. & Juez, G. Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol* 36, 244-246 (2000).
8. Jansen, R., Embden, J. D., Gaastra, W. & Schouls, L. M. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 43, 1565-1575 (2002).
9. Pourcel, C., Salvignol, G. & Vergnaud, G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 151, 653-663, doi:10.1099/mic.0.27437-0 (2005).
10. Mojica, F. J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J. & Soria, E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 60, 174-182, doi:10.1007/s00239-004-0046-3 (2005).
11. Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A. & Ehrlich, S. D. Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* 151, 2551-2561, doi:10.1099/mic.0.28048-0 (2005).
12. Barrangou, R. *et al.* CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315, 1709-1712, doi:10.1126/science.1138140 (2007).
13. Brouns, S. J. *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321, 960-964, doi:10.1126/science.1159689 (2008).
14. Deltcheva, E. *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471, 602-607, doi:10.1038/nature09886 (2011).

15. Jinek, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337, 816-821, doi:10.1126/science.1225829 (2012).
16. Marraffini, L. A. & Sontheimer, E. J. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 322, 1843-1845, doi:10.1126/science.1165771 (2008).
17. Mali, P. *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 339 823-826, doi:10.1126/science.1232033 (2013).
18. Makarova, K. S. *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 13, 722-736, doi:10.1038/nrmicro3569 (2015).
19. Cong, L. *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823, doi:10.1126/science.1231143 (2013).
20. Ran, F. A. *et al.* Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 8, 2281-2308, doi:10.1038/nprot.2013.143 (2013).
21. Ranganathan, V., Wahlin, K., Maruotti, J. & Zack, D. J. Expansion of the CRISPR-Cas9 genome targeting space through the use of H1 promoter-expressed guide RNAs. *Nat Commun* 5, 4516, doi:10.1038/ncomms5516 (2014).
22. Kleinstiver, B. P. *et al.* Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature* 523, 481-485, doi:10.1038/nature14592 (2015).
23. Zetsche, B. *et al.* Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. *Cell* 163, 759-771, doi:10.1016/j.cell.2015.09.038 (2015).
24. Kuscu, C., Arslan, S., Singh, R., Thorpe, J. & Adli, M. Genome-wide analysis reveals characteristics of off-target sites bound by the Cas9 endonuclease. *Nat Biotechnol* 32, 677-683, doi:10.1038/nbt.2916 (2014).
25. Tsai, S. Q. *et al.* GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. *Nat Biotechnol* 33, 187-197, doi:10.1038/nbt.3117 (2015).
26. Doench, J. G. *et al.* Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9-mediated gene inactivation. *Nat Biotechnol* 32, 1262-1267, doi:10.1038/nbt.3026 (2014).
27. Doench, J. G. *et al.* Optimized sgRNA design to maximize activity and minimize off-target effects of CRISPR-Cas9. *Nat Biotechnol* 34, 184-191, doi:10.1038/nbt.3437 (2016).
28. Ran, F. A. *et al.* Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell* 154, 1380-1389, doi:10.1016/j.cell.2013.08.021 (2013).
29. Slaymaker, I. M. *et al.* Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science* 351, 84-88, doi:10.1126/science.aad5227 (2016).
30. Wu, X. *et al.* Genome-wide binding of the CRISPR endonuclease Cas9 in mammalian cells.

*Nat Biotechnol* 32, 670-676, doi:10.1038/nbt.2889 (2014).

31. Kim, S., Kim, D., Cho, S. W., Kim, J. & Kim, J. S. Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. *Genome Res* 24, 1012-1019, doi:10.1101/gr.171322.113 (2014).

32. Liang, X. *et al.* Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J Biotechnol* 208, 44-53, doi:10.1016/j.jbiotec.2015.04.024 (2015).

33. Sanjana, N. E., Shalem, O. & Zhang, F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 11, 783-784, doi:10.1038/nmeth.3047 (2014).

34. Cox, D.B.T. *et al.* RNA editing with CRISPR-Cas13. *Science* 358, 1019-102, doi: 10.1126/science.aaq0180 (2017) .

35. Abudayyeh, O.O. *et al.* A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing. *Science* 365, 382-386, doi: 10.1126/science.aax7063 (2019).

36. Liang, Q. *et al.* Programmable RNA editing by recruiting endogenous ADAR using engineered RNAs. *Nat Biotechnol* 37, 1059-1069, doi: 10.1038/s41587-019-0178-z (2019).

37. Gilbert, L. A. *et al.* CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell* 154, 442-451, doi:10.1016/j.cell.2013.06.044 (2013).

38. Fujita, T. & Fujii, H. Efficient isolation of specific genomic regions and identification of associated proteins by engineered DNA-binding molecule-mediated chromatin immunoprecipitation (enChIP) using CRISPR. *Biochem Biophys Res Commun* 439, 132-136, doi:10.1016/j.bbrc.2013.08.013 (2013).

39. Perez-Pinera, P. *et al.* RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods* 10, 973-976, doi:10.1038/nmeth.2600 (2013).

40. Fujita, T. & Fujii, H. Identification of proteins associated with an IFN $\gamma$ -responsive promoter by a retroviral expression system for enChIP using CRISPR. *PLoS One* 9, e103084, doi:10.1371/journal.pone.0103084 (2014).

41. Bikard, D. *et al.* Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system. *Nucleic Acids Res* 41, 7429-7437, doi:10.1093/nar/gkt520 (2013).

42. Konermann, S. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 517, 583-588, doi:10.1038/nature14136 (2015).

43. Zhang, Y. *et al.* CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs. *Sci Rep* 5, 16277, doi:10.1038/srep16277 (2015).

44. Liao, J. *et al.* Targeted disruption of DNMT1, DNMT3A and DNMT3B in human embryonic

stem cells. *Nat Genet* 47, 469-478, doi:10.1038/ng.3258 (2015).

45. Yao, S., He, Z. & Chen, C. CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing of Epigenetic Factors for Cancer Therapy. *Hum Gene Ther* 26, 463-471, doi:10.1089/hum.2015.067 (2015).

46. Hilton, I. B. *et al.* Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol* 33, 510-517, doi:10.1038/nbt.3199 (2015).

47. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell* 157, 1262-1278, doi:10.1016/j.cell.2014.05.010 (2014).

48. Lichter, P. *et al.* High-resolution mapping of human chromosome 11 by in situ hybridization with cosmid clones. *Science* 247, 64-69 (1990).

49. Pinkel, D. *et al.* Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 9138-9142 (1988).

50. Wang, X. *et al.* Rapid telomere motions in live human cells analyzed by highly time-resolved microscopy. *Epigenetics Chromatin* 1, 4, doi:10.1186/1756-8935-1-4 (2008).

51. Chen, B. *et al.* Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell* 155, 1479-1491, doi:10.1016/j.cell.2013.12.001 (2013).

52. Nelles, D. A. *et al.* Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9. *Cell* 165, 488-496, doi:10.1016/j.cell.2016.02.054 (2016).

53. Sheridan, C. *et al.* CRISPR therapeutics push into human testing, *Nat Biotechnol* 35, 3-5, doi: 10.1038/nbt0117-3 (2017).

54. Justin, E. *et al.* Targeting a CAR to the TRAC locus with CRISPR/Cas9 enhances tumour rejection. *Nature* 543, 113-117, doi:10.1038/nature21405 (2017).

55. Pablo, M.D. *et al.* Gene Editing of CCR5 in Autologous CD4 T Cells of Persons Infected with HIV. *N Engl J Med* 370, 901-910, DOI: 10.1056/NEJMoa1300662 (2014).

56. Loperfido, M., *et al.* Pluripotent Stem Cells for Gene Therapy of Degenerative Muscle Diseases. *Curr Gene Ther* 15, 364-380 (2015).

57. Song, B. *et al.* Improved hematopoietic differentiation efficiency of gene-corrected beta-thalassaemia induced pluripotent stem cells by CRISPR/Cas9 system. *Stem Cells Dev* 24, 1053-1065, doi:10.1089/scd.2014.0347 (2015).

58. Armitage, H. Gene-editing method halts production of brain-destroying proteins. (2015).

59. Gantz, V. M. *et al.* The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science* 348, 442-444, doi:10.1126/science.aaa5945 (2015).

60. Gantz, V. M. *et al.* Highly efficient Cas9-mediated gene drive for population modification of the malaria vector mosquito *Anopheles stephensi*. *Proc Natl Acad Sci USA* 112, E6736-6743, doi:10.1073/pnas.1521077112 (2015).
61. Hou, P. *et al.* Genome editing of CXCR4 by CRISPR/cas9 confers cells resistant to HIV-1 infection. *Sci Rep* 5, 15577, doi:10.1038/srep15577 (2015).
62. Ye, L. *et al.* Seamless modification of wild-type induced pluripotent stem cells to the natural CCR5Delta32 mutation confers resistance to HIV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 9591-9596, doi:10.1073/pnas.1407473111 (2014).
63. Clausnitzer, M. *et al.* FTO Obesity Variant Circuitry and Adipocyte Browning in Humans. *N Engl J Med* 373, 895-907, doi:10.1056/NEJMoa1502214 (2015).
64. Deyle, D. R. *et al.* Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther* 11, 442-447 (2009).
65. Truong, D. J. *et al.* Development of an intein-mediated split-Cas9 system for gene therapy. *Nucleic Acids Res* 43, 6450-6458, doi:10.1093/nar/gkv601 (2015).
66. Ran, F. A. *et al.* *In vivo* genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9. *Nature* 520, 186-191, doi:10.1038/nature14299 (2015).
67. Wang, H. *et al.* One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell* 153, 910-918, doi:10.1016/j.cell.2013.04.025 (2013).
68. Zhang, Y. *et al.* A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. *Nat Genet* 20, 123-128, doi:10.1038/2417 (1998).
69. Hendel, A. *et al.* Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells. *Nat. Biotechnol.* 33 (2015).
70. Kim *et al.* CRISPR RNAs trigger innate immune responses in human cells. *Genome Res.* 28 (2018).

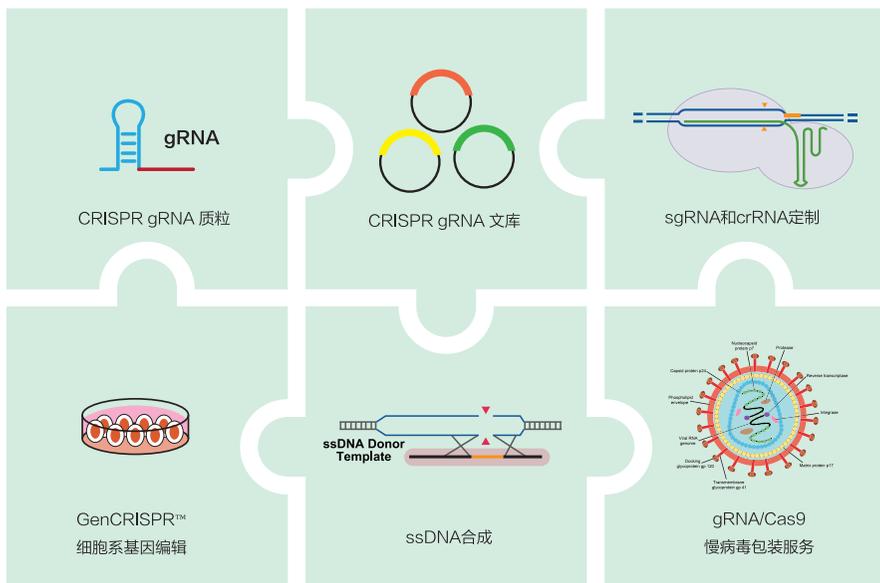
**更多CRISPR相关资源，请访问[www.genscript.com.cn/CRISPR.html](http://www.genscript.com.cn/CRISPR.html)**

- CRISPR/Cas9常见问题
- CRISPR网上研讨会
- CRISPR研究应用
- CRISPR参考文献

### **GenCRISPR服务和产品的法律声明：**

GenCRISPR™ 服务和产品受到US 8,697,359、US 8,771,945、US 8,795,965、US 8,865,406、US 8,871,445、US 8,889,356、US 8,889,418、US 8,895,308、US 8,906,616及多国同等专利保护，并获得马萨诸塞州剑桥市Broad Institute, Inc.的许可。

GenCRISPR™ 产品和该服务中生成的试剂只能作为工具用于科学研究目的，不得用于以下用途：（1）任何人体或临床的使用，包括但不限于，任何人类施用或任何诊断或预后用途；（2）修改任何人类生殖体系，包括改变人类胚胎或人的生殖细胞的DNA；（3）任何作为兽药或在牲畜体内的使用；（4）制造、批发、进口、出口、运输、销售、许诺销售、市场营销及推广，或其他开发，对人类或动物的测试服务、治疗或诊断。GenCRISPR服务和产品的购买者仅获得所购产品、仅获得有限的不可转让的使用权，且仅供研究之用，不得用于任何商业目的。



邮箱发送至[gene@genscript.com.cn](mailto:gene@genscript.com.cn)或拨打400-025-8686转5820，专业技术支持为您服务。

更多详情欢迎访问金斯瑞官网

[www.GenScript.com.cn](http://www.GenScript.com.cn)



[www.GenScript.com.cn](http://www.GenScript.com.cn)

△ 江苏省南京市

江宁高新园雍熙路28号

Tel: 400-025-8686-5820/5828

Email: [gene@genscript.com.cn](mailto:gene@genscript.com.cn)