

# 利用Sanger测序使CRISPR和TALEN基因组编辑工作流程更便捷

在本应用说明中，我们阐述了以下内容：

- 毛细管电泳Sanger测序法可用于测定原代转化培养物中的基因组编辑效率
- Sanger测序可有效验证转化培养物中成功的基因组编辑，以及筛选二级克隆中的成功编辑事件
- Applied Biosystems™ Minor Variant Finder软件可用于测定从传代培养物分离出的克隆中的SNP改变频率

## 引言

自从DNA的双螺旋结构被发现，研究人员已开发了操作DNA测序的技术。然而，在用户自定义位点引入精确的序列改变，仍然是一项艰巨繁复的挑战。在这方面，研究人员利用寡核苷酸、小分子或自剪切内含子已经取得了一定的成功，但定点锌指核酸酶(ZFN)和TALEN效应的开发促进了序列特异性操纵。然而，由于蛋白设计、合成和验证中的困难，减慢了这些工程化核酸酶作为常规应用的普及速度。最新的基因编辑技术 — CRISPR-Cas9系统 — 在很大程度上克服了这些难题[1]。实际上，CRISPR-Cas9系统已被证明是一种简单且经济的方法，一位研究者提出该技术带来了“基因靶向的民主化”[2]。因此，CRISPR-Cas9系统正时刻准备着改革基因组编辑。

CRISPR-Cas9技术来源于细菌适应性免疫系统。它是一种双组份系统，依赖于可切割双链DNA的酶(Cas9)和可将酶引导至正确基因组位点上的向导RNA (gRNA)。如果不提供修复模板，则酶造成的断裂会被易错非同源末端连接(NHEJ)过程修复。这会产生异源细胞群体，它们的用户自定义断裂位点周围存在不同插入或缺失。该过程可用于生成敲除特定基因的细胞株。或者，如果提供修复序列，可利用修复序列作为模板，修复断裂位点周围的序列。通过选择作为修复模板的序列，可在基因组内的用户自定义位点引入精准的序列改变。

然而，为获得带有同源基因组编辑的克隆种群，需要对来自细胞原代转化池的多个克隆进行筛选。这需要进行两轮筛选。首先，通过初次筛选确定含有编辑的细胞的相对比例。确定编辑效率后，将能够确定单细胞克隆的数量，它们需要被分离并扩增。接下来，通过二次筛选识别来源于具有所需编辑的单细胞的克隆。在两个筛选阶段，均可采用毛细管电泳(CE) Sanger测序法获取信息。多年来，Sanger测序因其简单、经济的工作流程和简单的数据分析，成为序列测定的金标准。通过CE产生的数据，可清晰识别序列改变，并检测到一个种群中的混合单核苷酸多态性(SNP)。基于上述原因，毛细管电泳Sanger测序是所有基因组编辑工作流程中很有价值的一部分。

## 工作流程概述

Thermo Fisher Scientific已整合了基因编辑和下游分析所需的所有工具(图1)。Invitrogen™ GeneArt™设计工具有助于设计和订购用于CRISPR基因组编辑的靶向gRNAs或用于TALEN基因组编辑的TAL。Invitrogen转染试剂为将基因组编辑工具带入真核细胞提供了多种选择。此外, Invitrogen™ TOPO™ TA克隆载体和感受态细胞有助于对原代转化株进行测序分析。Gibco™培养基可用于原代转化株和克隆扩增后传代培养物的生长。最后, Applied Biosystems™测序仪和试剂可实现对特定基因组编辑事件的检测。在本应用说明中, 我们阐述了该工作流程如何生成和识别人黄嘌呤磷酸核糖转移酶(HPRT)基因中的突变。

图2简单概括了用于生成和分析含HPRT突变的原代培养物的步骤。gRNA中的靶向CRISPR RNA (crRNA) 序列专门针对HPRT特异性位点而设计。gRNA是利用Invitrogen GeneArt精准gRNA合成试剂盒经过体外转录而合成的。利用Invitrogen™ Lipofectamine™ MessengerMAX™转染试剂, 将合成和纯化后的gRNA与Cas9 mRNA一起共转染到293FT细胞中。转染后78小时收获细胞。将细胞裂解物与引物一起作用到HPRT靶点, 生成长度小于600bp的PCR扩增子。然后, 利用Invitrogen™ Zero Blunt™ TOPO™ PCR克隆试剂盒对PCR产物进行亚克隆, 并将其转染到Invitrogen TOP10大肠杆菌细胞中。从每个基因编辑细胞转化池挑选出96个细菌菌落,



图1. CRISPR基因组编辑的总体工作流程。Thermo Fisher Scientific提供了该工作流程每一步所需的工具、试剂和专业知识。

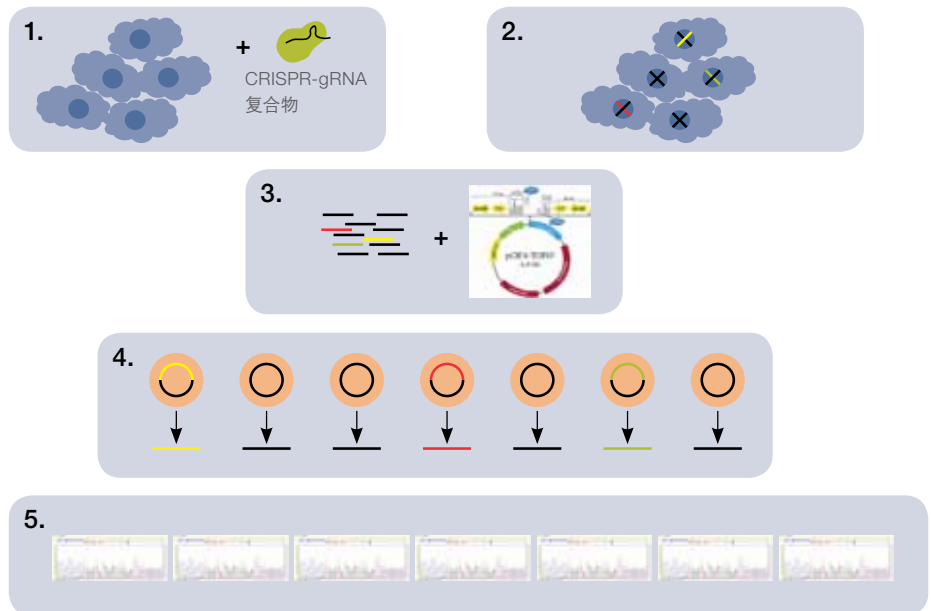


图2. 利用TOPO克隆和CE Sanger测序法检测编辑效率的步骤。1. 将gRNA和Cas9 mRNA转染到细胞中。2. 孵育细胞, 使其发生基因组改变。3. 纯化来自细胞培养物的基因组DNA, 对异源培养物中的工程化位点进行PCR扩增, 将PCR片段克隆到TOPO载体中。4. 从单个菌落中分离质粒, 并对插入片段进行PCR扩增。5. 对插入片段进行测序。编辑效率等于带有工程化改变的插入片段数量与经测序的插入片段总数的比例。编辑效率越高, 则可能产生的二级克隆越少, 这些二级克隆需要被筛选以识别带有改变的特定细胞。

利用Invitrogen™ PureLink™ 96质粒纯化阳离子系统进行处理以分离DNA, 随后进行Sanger测序。对得到的测序数据进行分析, 检测含精确编辑序列的PCR产物的比例, 并选出用于维持的克隆菌株。或者不将PCR产物亚克隆到TOPO细胞中, 而直接对其进行测序, 但本研究不含此项实验。

### 初次筛选中的测序结果解读

在所有基因组编辑实验中，核酸酶切割和修复过程并不是完全有效或准确的。因此，在转向处理工程化细胞的克隆菌株之前，应确定含有编辑的细胞比例。一种方法是对来自原代转化株培养物的编辑区域进行PCR扩增，并亚克隆到质粒中。通过对大量质粒进行测序，得到含有编辑的细胞比例。这也能初步预估总体基因敲除率或编辑效率以及可能发生的缺失类型。

当gRNA和Cas9 mRNA被转染到293FT细胞中后，我们对原代转化株的位点进行亚克隆，并对96个克隆进行测序。在96个克隆中，有84个与目标序列匹配。只有12个克隆的扩增区域中无编辑事件。72个克隆具有至少一个来自野生型序列的序列偏差，总体效率约为86%。这使我们更好地了解需要筛选多少二级单细胞克隆，以找到所需的纯化敲除克隆。有趣的是，有些TOPO克隆具有混合序列(图3)。这可能是由于细菌菌落含有2种不同质粒，或者DNA不是来源于单个菌落。然而，编辑事件是明显存在的。应注意，直至红色箭头所指的位置，都只有一个相同序列。在那之后，每个位置上都有2个峰，表明存在2个不同序列。该水平的序列难以分离；但是，CE测序结果显示，即使下游序列不能被准确读取，编辑对多个不同菌落中的序列进行分析，得到了编辑复合物引入的改变谱(图4)。图中每个不同序列都来源于一个不同的TOPO克隆，代表原代转化株培养物中的一种不同分子。gRNA位点周围存在明显的

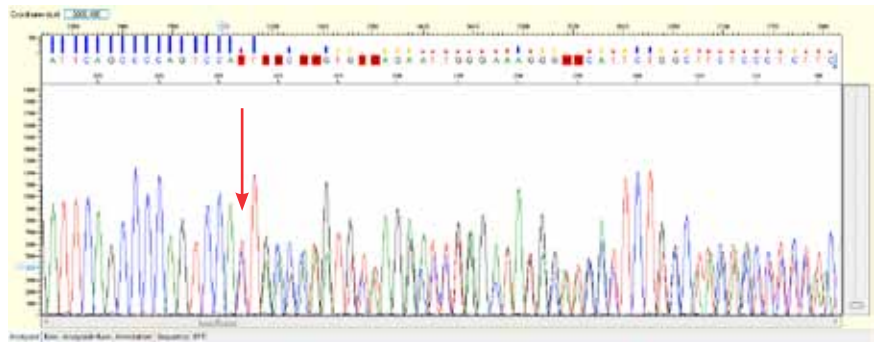


图3. 含有2个不同编辑序列的混合克隆的CE数据实例。应注意，直至红色箭头所指的位置，都只有一个相同序列。在那之后，存在数量基本相同的2个不同序列。由于其中一个序列含有缺失位点，所以它与另一个序列的峰不对齐，并且难以读取。

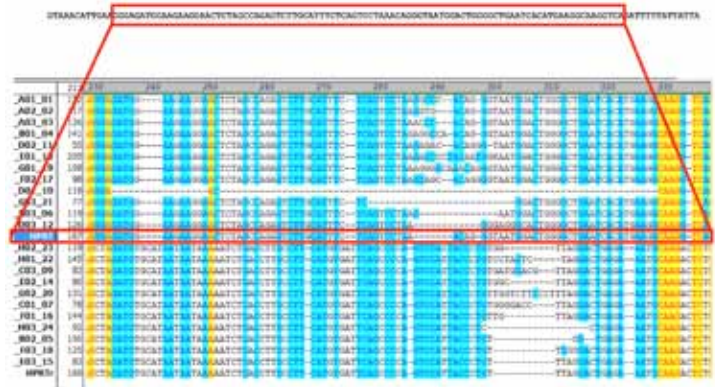


图4 利用CRISPR-Cas9系统切割后，由DNA非同源末端连接(NHEJ)产生的HPRT位点中的序列。基因组编辑事件可产生多种序列改变，特别是在缺少修复模板的情况下。序列的每条线都来自于不同的TOPO克隆，将线对齐可显示出差异。所有使用的向导RNA序列显示在顶部；方框中的序列意在强调下方显示的区域。正常的HPRT位点在左侧以蓝黑色标记。黄色框加红色字体部分表示与野生型HPRT(无改变)相同的核苷酸；蓝色和白色框表示核苷酸差异。

缺失和插入，并且不限于特定碱基。由于编辑复合物可引入多种改变，所以，应该对来源于原代转化株培养物的所有克隆进行测序，从而概括和预测二次筛选中可能会出现编辑。

### 二次筛选中的测序结果解读

生成一种原代转化培养物并对该培养物进行鉴定时，可通过有限稀释法获得来自异源原代培养物的单细胞。克隆生长14天后，使用Invitrogen™ GeneArt™ 基因组切割检测试剂盒并按照使用手册所述将其裂解。使用靶点特异性引物(正向引物: 5'-GTGTTAATTTCAAACATCAGCAGC-3', 反向引物: 5'-GTCTTCTT-GTTTATGGCCTCC-3')，对假定编辑周围位点的序列进行PCR扩增。利用CE Sanger测序法对所得PCR产物进行测序，并使用Applied Biosystems™ Sequence Scanner软件v2进行分析。

多种来源于单个真核细胞的培养物已被建立，并利用Sanger测序分析样品中的HPRT位点。在一个实例中(图5)，编辑后产生一个T碱基插入，这改变了阅读框并且可能产生功能缺失型等位基因。在该实例中，由于出现了一个单峰，细胞株可能是基因工程改变的纯合子，也可能是半合子(其他染色体上的同源位点缺失)。如果细胞是杂合子，可观察到2个不同的核苷酸峰。

当培养物不是纯克隆时，还可观察到重叠峰。我们已经开发出Applied Biosystems™ Minor Variant Finder软件，对来自CE生成的测序数据的等位基因频率进行定量。该软件有助于检测培养物中含修饰等位基因的细胞比例。如果基因组编辑产生了SNP，可利用Minor Variant Finder软件检测培养物中含SNP的细胞比例。例如，在一个培养物中，基因组编辑将A变为G，但依然存在野生型细胞。Minor Variant Finder软件通过将培养物的序列与同源对照序列进行对比，可确定培养物中含有这种改变的位点比例(图6)。此外，Minor Variant Finder软件很灵敏，能够检测二倍体细胞中约为10%的污染序列；也就是，1/10的细胞发生变异(这将显示为等位基因频率5%)。但是，在这种情况下，Minor Variant Finder软件不适用于检测缺失或其他基因组重排频率。但是，TIDE (Tracking of Indels by DEcomposition) 等第三方软件，可能有助于分析缺失克隆[3]。

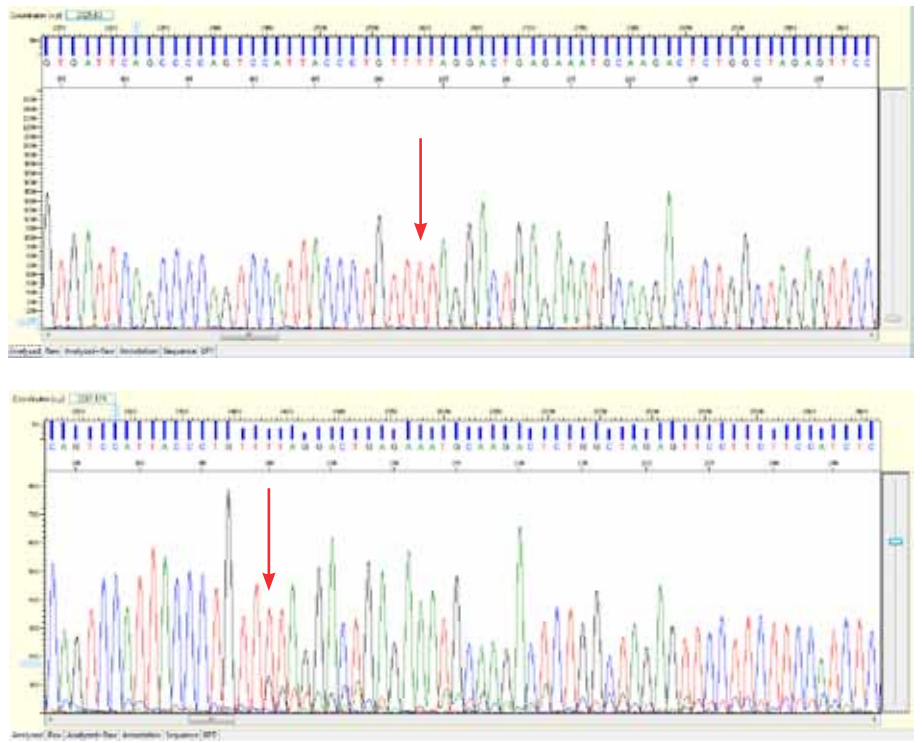


图5. 二次筛选的Sanger测序数据实例。上图：序列是同源和单克隆的。下图：箭头所指序列是异源的，所以不是来自于单克隆。应注意，红色箭头下游每个位置上具有不同的峰。

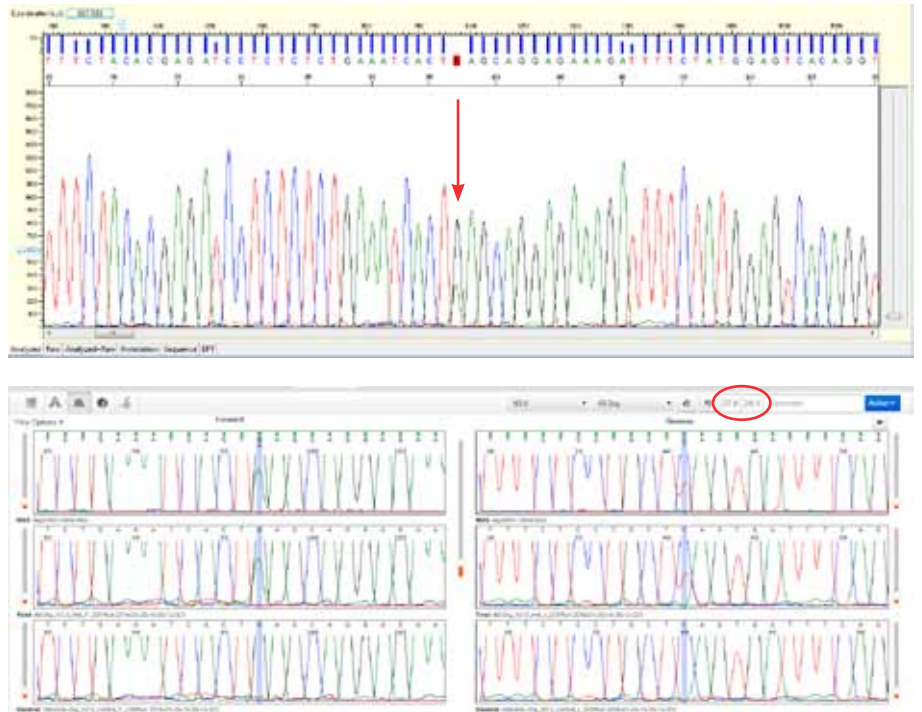


图6. 二级克隆中的SNP检测和分析。上图：含SNP的异源克隆的Sanger测序数据。下图：利用Minor Variant Finder软件对SNP频率进行分析和定量。在该培养物中，SNP的频率约为28%。

## 结论

在本应用说明中，我们阐述了毛细管电泳Sanger测序和Minor Variant Finder软件如何用于基因组编辑工作流程。虽然我们只展示了CRIPR编辑的结果，但其原理也适用于ZFN或TALEN编辑工作流程。Sanger测序因其简单、经济的工作流程和简单的数据分析，成为所有基因组编辑工作流程中很有价值的一部分。

## 参考文献

1. Doudna JA and Charpentier E (2014) The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346:1258096.
2. Travis J (2015) Making the cut: CRISPR genome editing technology shows its power. *Science* 350:1,456–1,457.
3. Brinkman EK, Chen T, Amendola M et al. (2014) Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. *Nucleic Acids Res* 42:e168.

更多信息请见 [thermofisher.com/genomeediting](http://thermofisher.com/genomeediting)

免费服务电话：800 820 8982 / 400 820 8982  
销售服务信箱：sales-cn@thermofisher.com  
技术咨询信箱：cnetechsupport@thermofisher.com

上海办事处 电话：021-61452000  
北京办事处 电话：010-84461800

广州办事处 电话：020-38975100  
成都办事处 电话：028-65545388

**ThermoFisher**  
S C I E N T I F I C

[thermofisher.com](http://thermofisher.com)