GenePharma

吉玛 CRISPR/Cas9 基因编辑操作手册

GenePharma CRISPR/Cas9 Gene Editing Operation Manual

吉玛基因
股票代码：430601
www.genepharma.com

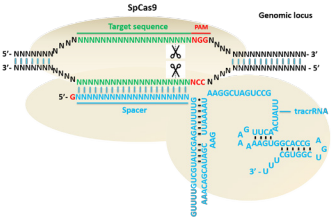
目　录

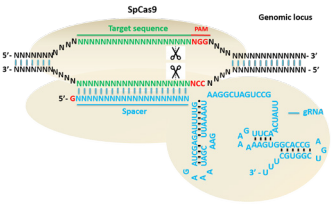
1 CRISPR/Cas9基因编辑简介 1
2 CRISPR/Cas9基因编辑流程 3
2.1 确定基因编辑类型 3
2.2 gRNA靶点及Donor载体设计 3
2.3 选择基因编辑方法 3
2.4 将CRISPR组分导入细胞 4
2.5 基因型鉴定筛选得到需要的基因编辑细胞或动物 4
3 CRISPR/Cas9基因编辑相关产品使用方法 5
3.1 guide RNA和Cas9/Cpf1蛋白体外切割含靶点DNA实验方法 5
3.2 CRISPR组分导入细胞方法 6
3.2.1 基因编辑质粒载体/体外转录RNA转染细胞方法 6
3.2.2 基因编辑慢病毒侵染细胞方法 7
3.2.3 guide RNA与Cas9蛋白（RNP）转染细胞方法 7
3.3 基因型鉴定方法 10
3.3.1 基因组提取 14
3.3.2 PCR检测 15
3.3.3 T7E1突变检测 16
3.3.4 测序分析 17
3.3.5 TIDE分析 17
3.4 基因表达分析 17
4 CRISPR/Cas9基因编辑案例 18
5 运输和储存 25
6 常见问题及解决方案 26
7 附录 27
7.1 质粒载体图谱 27
7.2 CRISPR基因编辑慢病毒（LV）载体 32

1 CRISPR/Cas9 基因编辑简介

CRISPR/Cas 系统是在大多数细菌（40%）和古细菌（90%）中发现的一种天然免疫系统，可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA。CRISPR 指的是规律成簇的间隔短回文重复（Clustered regularly interspaced short palindromic repeats）；Cas（CRISPR-associated genes）为 CRISPR 相关基因。

2013 年 1 月，在 Science 上发表了两篇以链球菌 CRISPR/Cas9 系统为基础对哺乳动物细胞进行基因组编辑新方法，利用一条 gRNA（guide RNA）模拟成熟的 crRNA-tracrRNA 复合体与 Cas9 共同作用切割靶基因组（如下图），由此揭开了该技术的运用高潮。

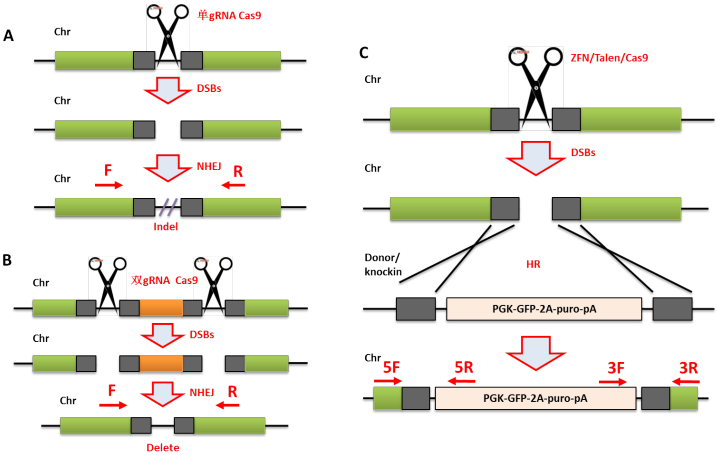




CRISPR/Cas9 相比其它基因组编辑技术，如锌指核酸酶（ZFNs）或转录激活因子样效应物核酸酶（TALENs），操作更简单高效，同时更容易针对同一细胞中的多个基因位点进行编辑，该系统可成为替代目前基因组工程方法的一种更简单，更高效，更安全，毒性更低的新方法。

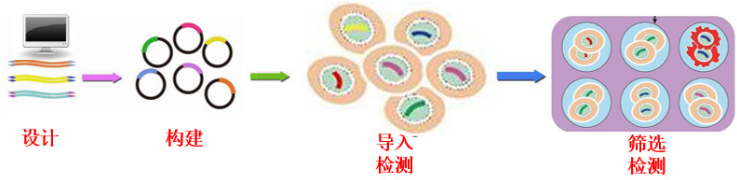
不管是 CRISPR/Cas9 还是 TALENs 或 ZFNs 技术，其基本原理都是对特异基因组序列造成双链断裂，利用细胞本身具有的非同源直接结合（NHEJ）和同源重组（HDR）修复机制，可实现特定基因的基因编辑。运用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可实现基因敲除，基因敲入，基因修饰 / 点突变，还有大量基因编辑以外的运用。

各种类型基因编辑基因检测方法



非同源性末端接合（Non-homologous end joining, NHEJ）　　同源性重组（Homologous recombination，HR）

2 CRISPR/Cas9 基因编辑流程



2.1 确定基因编辑类型

对基因组进行基因编辑，首先需要确定我们要进行的基因编辑类型，基因编辑类型一般包括敲除，敲入，修饰和点突变。

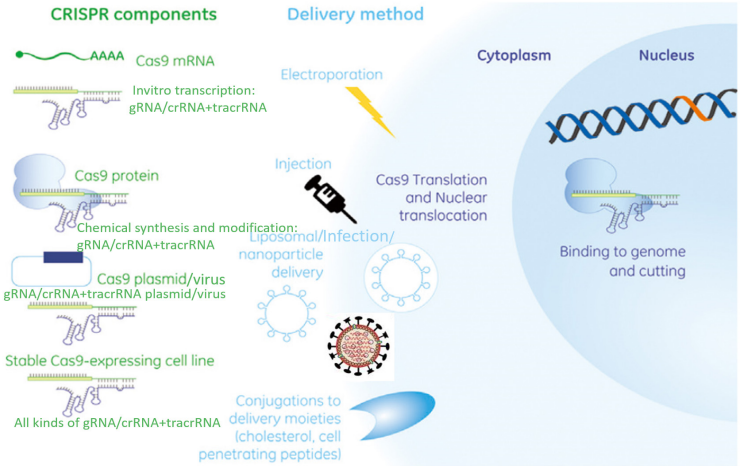
2.2 gRNA 靶点及 Donor 载体设计

根据不同的实验目的，需要设计 gRNA 靶点（用于识别切割靶点）或 Donor 载体（用于同源修复）。

吉玛基因提供免费的 gRNA 靶点及 Donor 载体设计服务。请咨询公司技术支持（support@genepharma.com; szsupport@genepharma.com）客户也可自行设计靶点，常用的设计网站有 Desktop Genetics, Geneious, Benchling, MIT CRISPR online 等。

2.3 选择基因编辑方法

CRISPR/Cas9 基因编辑需要在细胞核内存在含有靶点 gRNA 及 Cas9 蛋白形成的 RNP 复合体。可以选择基因编辑质粒载体、病毒、体外转录 gRNA 和 Cas9 mRNA、化学合成 gRNA 和表达纯化的 Cas9 蛋白，如图。



2.4 将 CRISPR 组分导入细胞

gRNA/Cas9 质粒载体，一般采用转染，电转，注射等方法导入细胞；gRNA/Cas9 病毒采用侵染方法导入细胞；gRNA/Cas9 mRNA 采用转染，电转，注射等方法导入细胞；gRNA/Cas9 蛋白采用转染，电转，注射等方法导入细胞。一般导入效率越高，基因编辑效果越好。可以借助载体或病毒中带有的荧光或抗性标签帮助富集导入后的细胞，去除未导入细胞背景。

2.5 基因型鉴定筛选得到需要的基因编辑细胞或动物

CRISPR 组分导入细胞 / 动物后，要确定细胞 / 动物的基因编辑效果，需要对其进行基因型鉴定（genotyping），整个过程包括提取细胞 / 组织基因组，PCR，T7E1 突变检测，测序，TIDE 分析等。通过基因型鉴定来确定细胞 / 动物基因突变效率及突变情况。对细胞进行有限稀释并鉴定，可以筛选得到纯合基因编辑细胞。

3 CRISPR/Cas9 基因编辑相关产品使用方法

吉玛基因开发了完整的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统，包括基因编辑载体，慢病毒基因编辑系统，体外转录 gRNA 及 Cas9 mRNA，化学合成及修饰 guide RNA 及表达纯化的 Cas9 蛋白，另外还包括突变检测方法 T7E1 突变检测试剂盒。并可提供基因编辑细胞及小鼠服务。

3.1 guide RNA 和 Cas9/Cpf1 蛋白体外切割含靶点 DNA 实验方法

化学合成 crRNA+tracrRNA 及 Cas9 蛋白，化学合成 crRNA 及 Cpf1 蛋白（RNP）体外切割含靶点 PCR 产物实验。实验前需提前 PCR 得到含靶点 PCR 产物（用 DEPC 水进行 PCR）。

按以下表格混合各组分

试剂	体积
5× Cleavage buffer	6 μL
Cas9/Cpf1(1μg/μL)	1 μg
gRNA(或crRNA+tracrRNA)/crRNA	0.25μg(或0.1μg+0.2μg)/0.1μg
DEPC-H_2O	To 25 μL
混合后室温5~10分钟	
底物(PCR产物)	5 μL
总计	30 μL

注：使用无 RNase 枪尖及 EP 管。

1) 加入 5 μL PCR 产物，混合后 37℃反应 1 个小时；
2) 加入 1.0 μL（20 mg/mL）蛋白酶 K，0.5 μL（10 mg/mL）RNase A 室温反应 20 分钟；

3) 加入 DNA loading buffer 混合，跑胶分析检测结果，加入 5 μL PCR 产物作为对照。

3.2 CRISPR 组分导入细胞方法

3.2.1 基因编辑质粒载体 / 体外转录 RNA 转染细胞方法

基因编辑载体/体外转录RNA可以使用多种转染试剂进行转染，具体实验方法请参考试剂说明 这里以使用lipofectamin2000为例。

1) 以 24 孔培养板操作为例（其他孔板各种的试剂用量，请参照“Lipofectamine2000 manual”），转染前一天，将 0.5~2×10^5 个细胞接种于培养板中，每孔中加入约 500 μL 无抗生素的培养基，使转染时的细胞密度能够达到 30~50%；
2) 取 1 μL/ 孔 Lipofectamine2000（使用前轻轻摇匀），用 50 μL Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释。轻轻混和后在室温孵育 5 分钟；
3) 取 1 μg 质粒载体 / 体外转录 RNA，用 50 μL Opti-MEM I Reduced Serum Medium 稀释，轻轻混和均匀；
4) 稀释后的 Lipofectamine2000 经过 5 分钟孵育后，与稀释后的质粒载体 / 体外转录 RNA 轻轻混和，室温静置 20 分钟，以形成载体 - 转染试剂混和物 /RNA- 转染试剂混和物；

注意：稀释后的 Lipofectamine2000 尽量在 25 分钟之内，和质粒载体 / 体外转录 RNA 混和，如果放置时间过长，可能导致转染试剂活性的降低。

5) 将载体 - 转染试剂混和液 /RNA- 转染试剂混和物加入含有细胞及培养液（约含 400 μL）的孔中，轻轻摇晃孔板，使其混和；
6) 在 37 ℃的 CO_2 培养箱中培养，4~6 小时后可将培养基换为含血清的完全培养基（该步骤可以省略）；
7) 如果载体含荧光基因，转染 24 小时后即可在荧光显微镜下观察到荧光，一般转染后 72 小时，收集细胞检测突变。转染 24~48 小时后可利用载体表达荧光，通过流式细胞仪富集转染细胞，或通过载体表达 puro，通过抗性富集转染细胞。

   如果体外转录 RNA 为荧光基因 mRNA，转染 6 小时后即可在荧

光显微镜下观察到荧光，24~48 小时荧光强度较强，48 小时之后荧光强度逐渐降低，到 120 小时基本消失。

注：体外转录 RNA 转染细胞时使用无 RNase 枪尖及 EP 管。

体外转录 Cas9 mRNA 及 gRNA 除用于细胞基因编辑外，还可用于各物种基因编辑。

3.2.2 基因编辑慢病毒侵染细胞方法

1) 靶细胞铺板：24-well ,加入 2.5×10^5 cells/well(根据细胞种类调整)，0.5 mL 完全培养基，37℃，5% CO_2 过夜；
2) 稀释病毒：稀释液（靶细胞维持液培养基）400 μL+5 μg/mL Polybrene（终浓度），将慢病毒原液按 1:9 加入到稀释液中，基因编辑双病毒根据病毒滴度不同，分别稀释后混合，保证混合病毒中 gRNA 病毒和 Cas9 病毒数量接近 1:1（一般 gRNA 病毒稀释 5 倍后与 Cas9 病毒等体积混合后使用，该比例可根据实际情况调整）；
3) 移去 Step1 中细胞培养液，加入 Step2 稀释后的病毒液，同时建立对照，37℃，5% CO_2 过夜；
4) 12~24 小时后移去细胞侵染后的病毒液，加入 0.5 mL 完全培液，37℃，5% CO_2 过夜；
5) 根据细胞状态和类型，如果必要分出 1/3~1/5，加入 0.5 mL 完全培养，继续培养 24~48 小时；荧光倒置显微镜下观察结果。侵染后 72 小时取部分细胞可进行基因型鉴定。

3.2.3 guide RNA 与 Cas9 蛋白（RNP）转染细胞方法

■ RNAiMAX 脂质体转染试剂法

此方法为使用 RNAiMAX 在 293 细胞中转染 Cas9 和 gRNA 形成的 RNP 的方法，为反向转染法，使用终浓度为 10nM RNP/96 孔。

制备 RNP：

1) 将 gRNA 用 DEPC 水稀释到 3 μM（相当于 100 ng/μL），将 Cas9 用 1×Cas9 反应液或 Opti-MEM 稀释到 3 μM（相当于 500 ng/μL）；

2) 配置 RNP 反应（多孔，每个组分多加入 10%）

组分	96孔	24孔
sgRNA (3 μM)	0.5 μL	3.0 μL
EnGen Cas9 NLS (3 μM)	0.5 μL	3.0 μL
Opti-MEM	11.5 μL	69.0 μL
总计	12.5 μL	75.0 μL

轻轻混合后室温放置 10 分钟；

3) 配置 liposome 复合体（多孔可配成大体系，然后直接加入 RNP 反应中）

组分	96孔单孔	24孔单孔
Opti-MEM	11.3 μL	68 μL
RNAiMAX	1.2 μL	7 μL
总计	12.5 μL	75 μL

轻轻混合后室温放置 20 分钟。

准备转染的 293 细胞：

1) 提前铺板，让转染时其汇合率 70~90% 的 293 细胞；
2) 在 RNP/liposome 室温放置 20 分钟期间，使用胰酶消化细胞，并清洗一次细胞，去除迹量胰酶（防止其对 Cas9 蛋白的降解），重悬细胞到适量 media 中并计数；
3) 加入 media 时细胞终密度在 3.2×10^5 cells/mL， 每 96 孔需要 125 μL 细胞，每 24 孔需要 750 μL 细胞。

转染实验：

1) 向 96 孔培养板中加入 25 μL RNP/liposome 复合体，24 孔中加入 150 μL RNP/liposome 复合体；
2) 96 孔板加入 125 μL 细胞（3.2×10^5 cells/mL），24 孔加入 750 μL 细胞，并用枪轻轻吹打混合几次；

3) 将细胞放入细胞培养箱中培养 48~72 小时后，收集部分细胞基因型鉴定。

■ 吉玛电转细胞实验

1) 细胞铺板，使细胞在电转当天有 70~90% 汇合率；
2) 配置 RNP 反应体系

试剂	体积
电转液(EL buffer)	30 μL
Cas9蛋白(1 μg/μL)	2 μL
gRNA	0.5 μg

（如果是两种 gRNA 各加 0.3 μg）
使用无 RNase EP 管加入各组分，混合后，室温放置 20 分钟（不超过 30 分钟）；

3) 20 分钟之内，用胰酶消化细胞，并洗去迹量的胰酶（胰酶残留会造成其对 Cas9 蛋白的降解），重悬细胞到 10 mL 培养基中，并计数；
4) 取 5 倍于 0.2~1×10^6 细胞量到新的 EP 管中，500×g 离心 5 分钟收集细胞，并用 PBS 清洗一次细胞，重新离心；
5) 使用 5 倍于 30 μL 电转液重悬细胞；
6) 准备预先在 24 孔（0.5 mL）或 6 孔（2 mL）板中加入适量培养基，用于后期电转细胞培养；
7) 将 30 μL 电转液重悬细胞加入到各 RNP 反应 EP 管中，并轻轻混合；
8) 取 60 μL RNP 和细胞混合液到吉玛电转仪（96 孔 电转），使用 300V，电击 6 次；

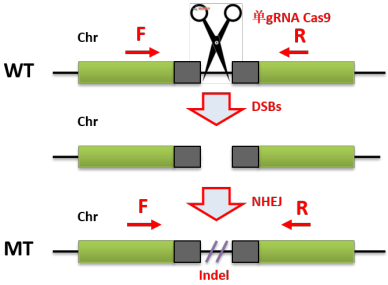
9) 立即将电转后细胞转移到培养板中，在细胞培养箱中培养 48~72 小时。

3.3 基因型鉴定方法

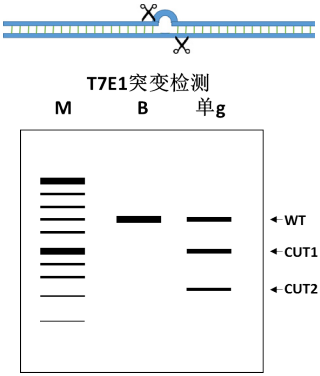
CRISPR 组分导入细胞 / 动物后，要确定细胞 / 动物的基因编辑效果，需要对细胞 / 动物进行基因型鉴定（genotyping），整个过程包括提取细胞 / 组织基因组，含靶点基因组片段的 PCR，T7E1 突变检测，测序，TIDE 分析等。确定细胞 / 动物基因突变效率及突变情况。

基因型鉴定主要分为四种类型，第一种类型单 gRNA Cas9（NHEJ 修复）造成的 Indel 突变，检测办法是提取细胞 / 组织基因组，PCR，T7E1 突变检测，测序，TIDE 分析。由于单 gRNA Cas9 造成的基因突变都是小片段的插入或缺失（一般都在 20 bp 以内），通过 PCR 无法判断基因是否发生突变，利用 T7E1 可对不完全匹配 DNA 进行切割的特点，将 PCR 产物完全变性后复性，如果 PCR 产物靶点处发生 Indel 突变，就会形成两侧匹配，靶点处不匹配的 DNA 结构，T7E1 会识别不匹配位点并切断 DNA。通过切割条带与未切割条带光密度对比计算突变效率，PCR 产物测序结果显示在靶点处出现大量双峰，通过专用软件 TIDE 可分析 Indel 突变类型及突变效率，如图。

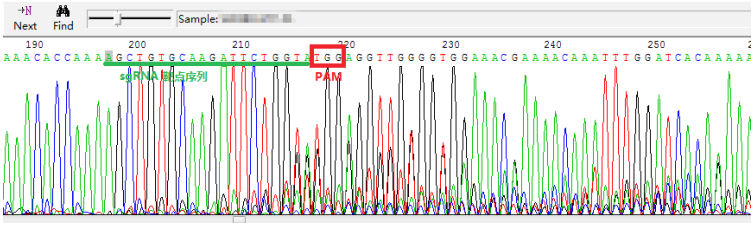
基因型检测-单gRNACas9造成的Indel突变



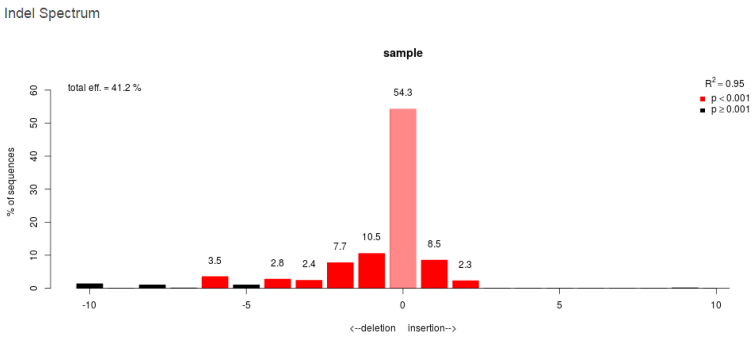
非同源性末端接合（Non-homologous end joining, NHEJ）



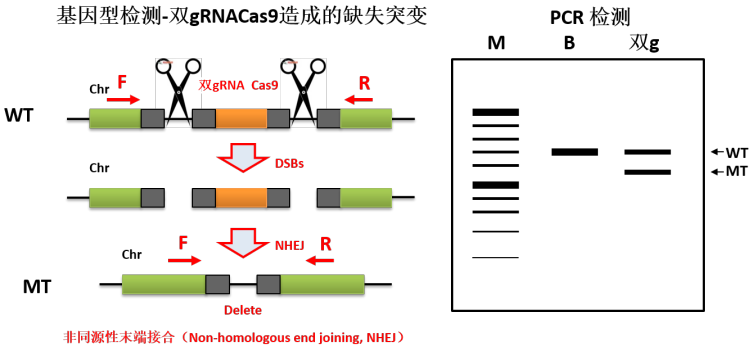
测序结果



TIDE 分析结果

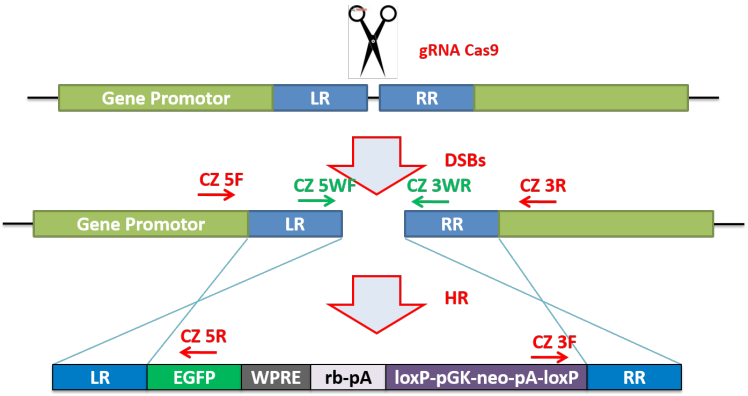


第二种类型是双 gRNA Cas9 造成的基因片段缺失，检测方法是先提取基因编辑细胞基因组，通过靶点两侧设计的引物 PCR 扩增得到野生型条带及突变型条带（突变型条带较野生型条带少一段缺失序列，所以条带比野生型条带小），PCR 产物跑胶即可大致判断敲除效率，进一步通过测序确定缺失突变情况，如图。

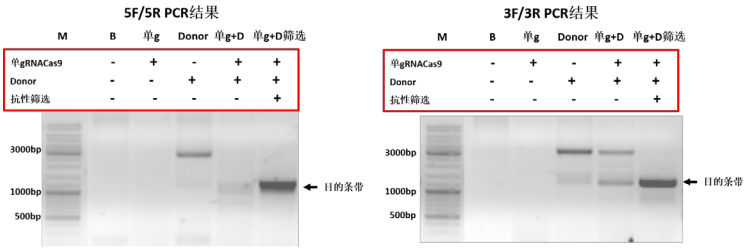


测序结果判断基因突变效率

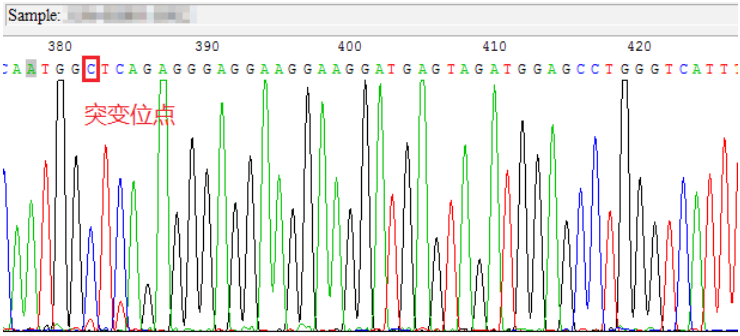
第三种类型是基因敲入，修复，修饰，主要检测基因发生同源重组的情况，一般一条检测引物设计在同源臂以外，一条引物设计在同源臂内，分别检测 5‘端和 3’端重组情况，结合 PCR 产物测序，可确定同源重组及其效率，如下图。



PCR检测某基因同源重组



第四种类型是点突变，点突变相对野生型来说只发生了一个碱基的改变，检测办法是提取细胞 / 组织基因组，PCR，T7E1 突变检测，测序，分析突变位点处是否出现双峰（测序确定靶位点是否发生需要的点突变），如下图。



基因型检测一般是在 CRISPR 组份导入细胞后 48~72 小时，取部分细胞，进行基因型检测，确定基因编辑效率较高后，对细胞进行有限稀释，稀释到 96 孔板中培养，每孔取部分细胞进行基因型检测，筛选得到纯合基因编辑的细胞。

动物基因编辑以小鼠为例，原核注射受精卵后，胚胎培养 16 小时后，移植到假孕小鼠输卵管中，待小鼠出生后（F0），取鼠尾或脚趾进行基因型检测，检测到符合要求的基因型后，待小鼠成年与野生型小鼠进行交配，对子代（F1）进行基因型检测，将 F1 同窝基因编辑杂合（基因型相同）小鼠交配后，可得到基因编辑纯合小鼠（F2）。

3.3.1 基因组提取

进行细胞 / 组织基因组提取。

3.3.2 PCR 检测

PCR 引物需设计在基因组靶点两侧，以提取基因组为模板，PCR 体系及过程参看说明。

■ PCR 反应体系

组分	终浓度	用量
2× Max buffer	1×	25 μL
dNTP Mix (10 mM)	0.2 mM	1 μL
RELN-F212 (10 μM)	0.4 μM	2 μL
RELN-R575 (10 μM)	0.4 μM	2 μL
基因组DNA模板（约100 ng/μL）	—	2 μL
Max DNA聚合酶（2.5 U/μL）	0.05 U/μL	1 μL
dd H_2O	—	17 μL

■ PCR 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	3分钟	1
变性	95℃	15秒	42
退火	60℃	15秒	
延伸	72℃	20秒	
终延伸	72℃	5分钟	1
保存	16℃	1分钟	1

PCR完成后，取5 μL PCR产物，进行1%~2%的琼脂糖电泳分析。

3.3.3 T7E1 突变检测

使用 T7E1 突变检测试剂盒进行检测。具体方法以最新版试剂盒说明为准。

■ 制备待检测 DNA 及阴性、阳性对照 DNA

一般采用 PCR 方法得到待检测 DNA 片段，如果待检测样品本身是纯合突变的，还需要得到野生型 DNA，混合后检测。（突变位点离两侧最好在 100 bp 以上，使切割后片段与未切割片段在胶图中分开。）

阴性、阳性对照 DNA，使用提供的阴性及阳性对照模板和引物，采用 PCR 方法得到。待检测 DNA 及阴性、阳性对照 DNA 需电泳保证条带明亮且单一。

■ 制备杂链 DNA 片段

待检 DNA 或待检 DNA（纯合）与野生型 DNA 等量混合，阴性及阳性对照 DNA，按下列组分配置退火反应体系：

组分	用量
PCR产物（待检样品/对照样品）	5 μL
突变检测buffer	2 μL
ddH_2O	12 μL

混合后进行退火反应。退火反应条件：95℃ 5 分钟，然后缓慢降温（95℃ -85℃，降温速度 1℃ / 秒；85℃ -25℃，降温速度 0.1℃ / 秒）直到 25℃；25℃ 5 分钟，制备好的样品可以 4℃保存一周，-20℃长期保存。

■ T7E1 处理

组分	用量
以上退火DNA样品	19 μL
T7EN1	1 μL

反应条件：37℃ 30 分钟

■ 电泳分析

一般使用 1.8% 浓度的琼脂糖凝胶电泳分析检测产物，小片段使用 0.5×TBE buffer 电泳效果更好，阴性对照结果得到与 PCR 产物一样大小的产物，阳性对照除有 PCR 产物大小条带（灰度为 a）外，还存在 2 个小的剪切条带（灰度为 b 和 c），表明基因含有突变。

酶切片段比例 f_{cut} =(b+c)/(a+b+c)

突变效率 $\text{indel}\ (\%) = 100 \times (1 - \sqrt{1 - f_{cut}})$

3.3.4 测序分析

PCR 检测完成后，可以对 PCR 产物进行测序，以确定靶点处发生的突变及效率，PCR 产物可使用 PCR 引物或 PCR 序列内侧引物进行测序。

3.3.5 TIDE 分析

使用 TIDE 软件，分别导入野生型及突变型测序，并指定靶点，可以分析基因发生 Indel -50bp 到 +50bp 间（包括 0 bp，未发生突变）的具体含量情况。

3.4 基因表达分析

当基因型检测的细胞基因突变率较高时，可对细胞进行有限稀释培养，结合基因型鉴定，筛选基因编辑纯合细胞株。筛选得到的基因编辑纯合细胞株还可使用 qRT-PCR（检测引物需要设计在缺失片段中）或 Westernblot 的方法检测其基因表达情况。

4 CRISPR/Cas9 基因编辑案例

实验材料与方法

一、细胞培养

人宫颈癌细胞 HeLa，常规培养使用含 10% FBS 的 DMEM 培养基（含 1.5 mg/L-Glutamine,100 U/mL Penicillin,100 μg/mL Streptomycin) 中，37ºC 5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

二、基因信息及双 gRNA 设计

基因信息及分析

1. hsa-mir-152 基因信息：
   https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/406943
2. hsa-mir-152 基因位于蛋白编码基因 COPZ2 内含子内，敲除 hsa-mir-152 基因不会影响该蛋白编码
3. hsa-mir-152 precursor 序列（87 bp）：
   TGTCCCCCCCGGCCCAGGTTCTGTGATACACTCCGACTCGGGCTCTGGAGCAGTCAGTGCATGACAGAACTTGGGCCCGGAAGGACC

双 gRNA 设计

使用在线 gRNA 设计软件或吉玛 gRNA designer 1.0
在 hsa-mir-152 precursor 基因组序列两侧设计双 gRNA

编号	序列	靶点方向	理论缺失
dgRNA1	AGCGCAGGTCCAGCCCGGCC AGG	上游 +	132 bp
	GAAGGACCTTCTGCACCCAA CGG	下游 +	
dgRNA2	TCAGCTGGAAGAAGGAGGCT CGG	上游 +	102 bp
	CTGTGCCCGTTGGGTGCAGA AGG	下游 -	
dgRNA3	GTGTATCACAGAACCTGGGC CGG	上游 -	54 bp
	AGTCAGTGCATGACAGAACT TGG	下游 +	

注：dgRNA 即为双 gRNA.

三、慢病毒侵染

实验材料及试剂

DMEM 培养基 + 10% FBS
D-Hank’s Solution
Trypsin-EDTA Solution
96 孔板
24 孔板
Lentivirus- 病毒液（GenePharma）

步骤

靶细胞侵染试验

1. 靶细胞铺板：24-well，加入 2.5×10^5 cells/well（根据细胞种类调整），0.5 mL 完全培养基，37℃，5% CO_2 过夜；
2. 稀释病毒：稀释液（靶细胞维持液培养基）400 μL + 终浓度 5 μg/mL Polybrene，将慢病毒原液按 1:9 加入到稀释液中；
3. 移去 Step1 中细胞培养液，加入 Step2 稀释后的病毒液，同时建立对照（blank、negative），37℃，5% CO_2 过夜；

4. 12~24 小时移去细胞侵染后的病毒液，加入 0.5 mL 完全培养基，37℃，5% CO_2 过夜；
5. 根据细胞状态和类型，如果必要分出 1/3~1/5，加入 0.5 mL 完全培养基，继续培养 24~48 小时，荧光倒置显微镜下观察结果。

四、鉴定引物及突变检测

鉴定引物

PCR引物	序列	WT	MT
hMIR152-dg-F	AGTTCTGGGTCCGTTTGGAGTGG	461 bp	461bp-理论缺失
hMIR152-dg-R	GGCCCTAGGATACATCCTCAGGC		

试剂和仪器

Genomic DNA Extraction kit
PCR 基因扩增仪
电泳仪

基因组 DNA 的提取

1. 将收到的细胞 6000 rpm，离心 2 分钟，去上清；
2. 加入 10 μL 的 ddH_2O，重悬细胞，加入 9 μL 的 GB buffer、1 μL 的 Pro K、0.5 μL 的 RNase A, 充分混匀后，将 EP 管安插在泡沫板上，放至 56℃水浴锅里温浴 10 分钟；
3. 将裂解液转移至新的 0.5 mL 的 EP 管中，放至 PCR 仪上，95℃处理 10 分钟，以失活其中的蛋白酶（Pro K）；
4. 得到细胞的基因组用于 PCR 检测。

PCR 检测

1. PCR 反应体系

组分	终浓度	用量
2×Max buffer	1×	25 μL
dNTP Mix(10 mM)	0.2 mM	1 μL
hMIR152-dg-F (10 μM)	0.4 μM	2 μL
hMIR152-dg-R (10 μM)	0.4 μM	2 μL
基因组DNA 模板	—	2 μL
Max DNA聚合酶(2.5 U/μL)	1 U/μL	1 μL
dd H_2O	—	17 μL

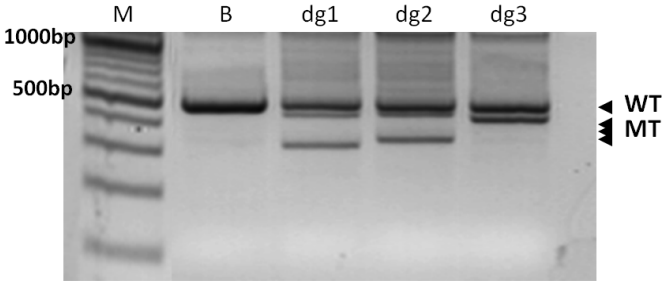
2. PCR 反应程序

循环步骤	温度	时间	循环数
预变性	95℃	3分钟	1
变性	95℃	15秒	42
退火	60℃	15秒	
延伸	72℃	25秒	
终延伸	72℃	5分钟	1
保存	16℃	1分钟	1

3. PCR 产物的测序鉴定

使用 hMIR152-dg-F 和 hMIR152-dg-R 引物进行 PCR 及测序。

hsa-mir-152 敲除PCR检测结果



M：DNA marker；　　B：对照细胞PCR检测结果；
dg1：Cas9慢病毒及hsa-mir-152-dgRNA1病毒共侵染细胞 PCR检测结果；
dg2：Cas9慢病毒及hsa-mir-152-dgRNA2病毒共侵染细胞 PCR检测结果；
dg3：Cas9慢病毒及hsa-mir-152-dgRNA3病毒共侵染细胞 PCR检测结果；

五、最小致死浓度摸索及稳筛株筛选

实验材料及试剂

DMEM 培养基 + 10% FBS
D-Hank’s Solution
Trypsin-EDTA Solution
Puromycin
24 孔板

步骤

1. 细胞在 6 cm dish 中培养至 80~90% 融合时，弃去培养液，用 3 mL D-Hank’s solution 洗涤细胞两次；
2. 加 1 mL Trypsin-EDTA Solution，混匀后，小心吸去胰酶溶液，37ºC 放置 1~3 分钟；
3. 在加入 2 mL 完全培养基，吹打使细胞形成单细胞悬液；

4. 血球计数板计数，将细胞稀释至 3×10^5 cells/mL；
5. 按 1.5×10^5 细胞 / 孔的浓度接种 24 孔板，混匀后于 37°C，5% CO_2 培养 24 小时；
6. 完全培养基稀释 Puromycin 至 4 μg/mL，两倍倍比稀释，最小浓度为 0.25 μg/mL，换入 24 孔板中，同时设置 Blank 孔，一周后观察结果。
7. 用观察到的细胞全部死亡孔中的最小浓度作为稳筛株的筛选浓度。

六、细胞有限稀释和单克隆筛选鉴定

实验材料及试剂

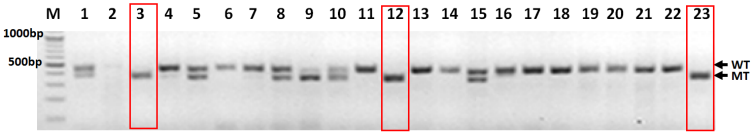
DMEM 培养基 + 10% FBS
D-Hank’s Solution
Trypsin-EDTA Solution
96 孔板
24 孔板

步骤

1. 在 96 孔细胞培养板中分别加入 90 μL 的完全培养基；
2. 将待稀释细胞消化成细胞悬液，计数，用完全培养基稀释至 10^4/mL；
3. 取 10 μL 细胞悬液到 96 孔板的第一排孔，混匀后，从中取 10 μL 稀释的细胞悬液至第二排孔，此排孔内细胞浓度为 10^1/100 μL；
4. 重复上述步骤，第三排孔内细胞数为 1/ 孔，置 37℃，5% CO_2 培养箱，4 天后取出观察，并在板盖上打上标记；
5. 继续培养时，在第 4~5 天更换 1/2 培养基，选择单克隆生长孔，生长良好，转移到 24 孔板再扩大培养。

6. 单克隆筛选 PCR 检测结果

hsa-mir-152 敲除单克隆筛选 PCR检测结果

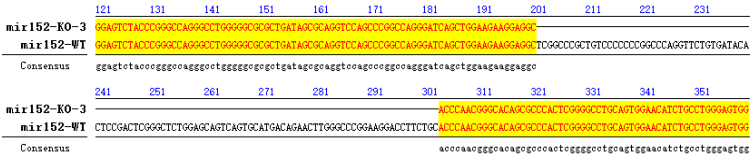


细胞基因组使用hMIR152-dg-F和hMIR152-dg-R引物进行PCR及测序

注：WT-Wild Tpye；MT-Mutation Type

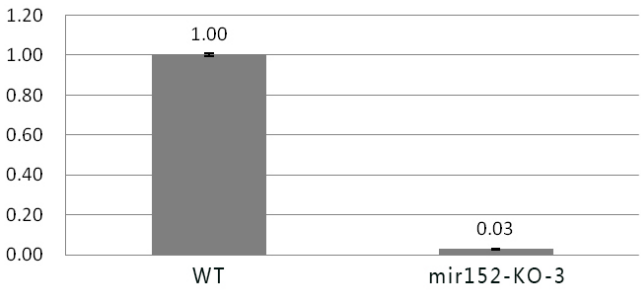
7. 单克隆测序结果

hsa-mir-152 基因敲除 3 号单克隆细胞株测序序列与野生型序列比对结果



8. qRT-PCR 检测结果

野生型 Hela 细胞及 hsa-mir-152 基因敲除 3 号单克隆细胞株 hsa-mir-152 基因及 U6（内参）的相对表达了柱状图



以上案例仅供参考，根据客户实验目的与平台条件，请进一步优化调整。

5 运输和储存

基因编辑质粒载体和甘油菌为常温运输，甘油菌 -70℃以下保存 12 个月，质粒在 -15℃以下保存 1 个月，-70℃以下保存 6 个月。应尽量避免反复冻融（小于 3 次）。

病毒及体外转录 RNA（溶解在无 RNase 水中）采用全程干冰运输，病毒及体外转录 RNA 在 -70℃以下保存 6 个月以上。应尽量避免反复冻融（小于 3 次）。

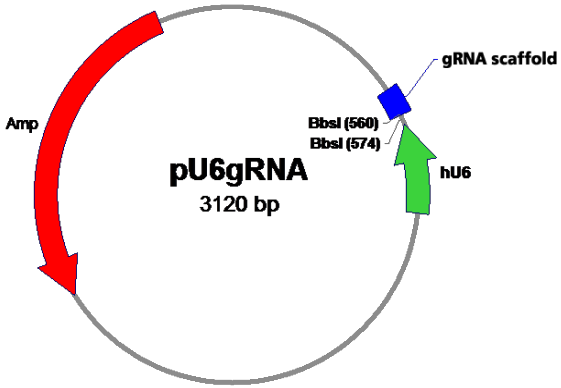
化学合成 guide RNA（干粉）常温运输，-70℃以下保存 6 个月。Cas9 蛋白及 Cpf1 蛋白，采用全程冰盒 / 干冰运输，-15℃以下保存 12 个月。应尽量避免反复冻融（小于 3 次）。

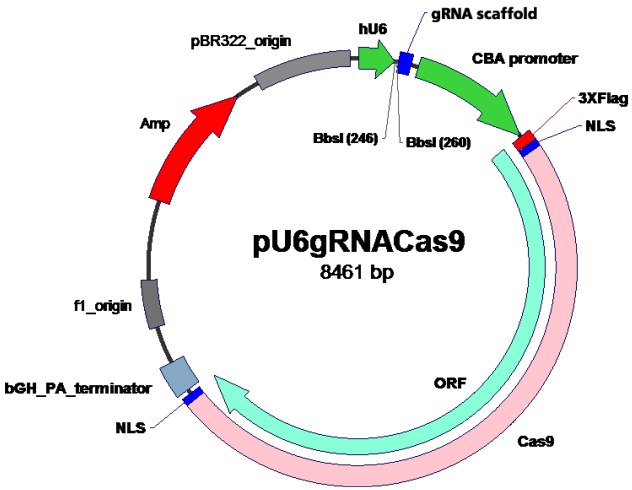
6 常见问题及解决方案

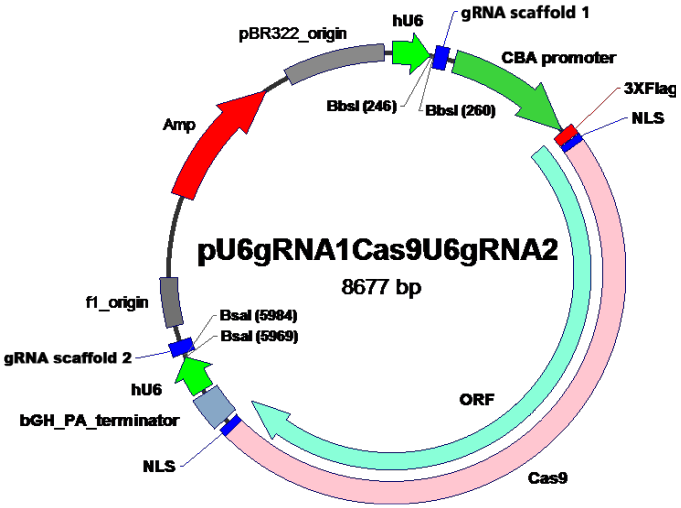
- Q: T7E1 突变检测时，出现条带弥散的现象，应该如何解决？
  A: 由于 T7E1 本身具有弱的非特异切割 DNA 链的能力，所以遇到这种情况，可以增加 DNA 用量，降低酶的用量，减少酶切时间来降低非特异切割现象。

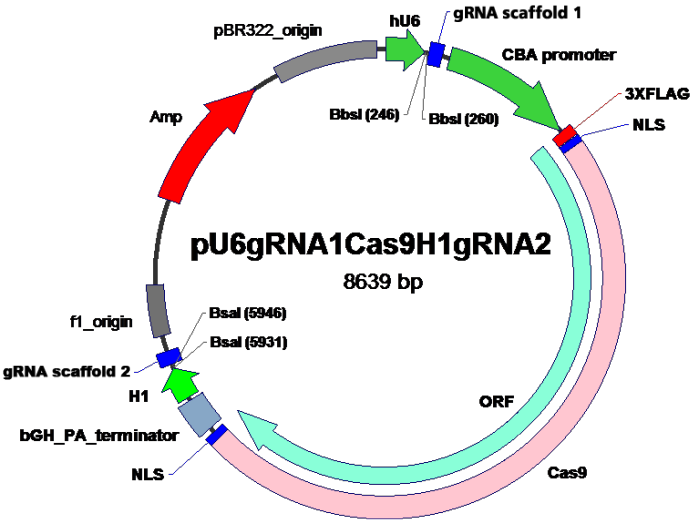
7 附录

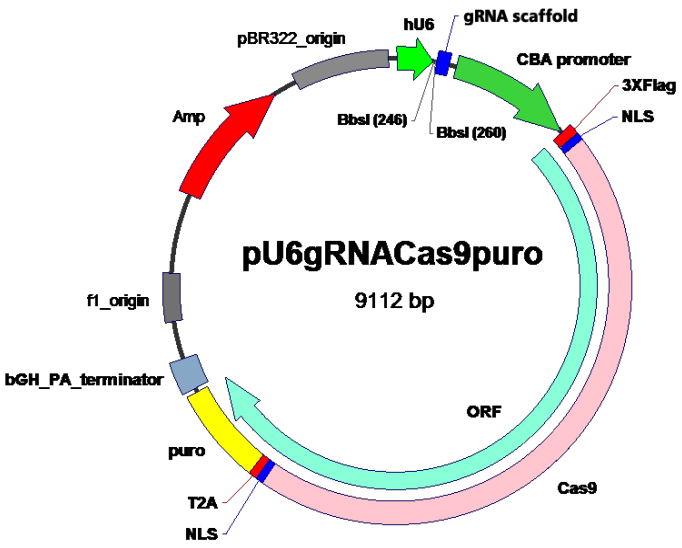
7.1 质粒载体图谱

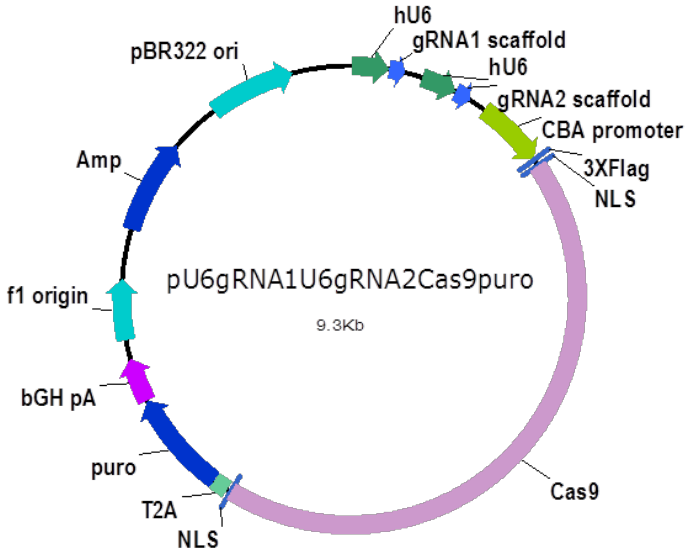


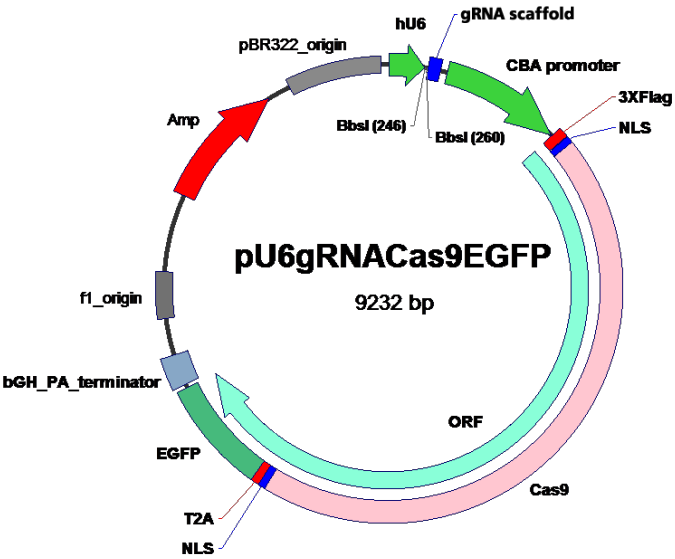


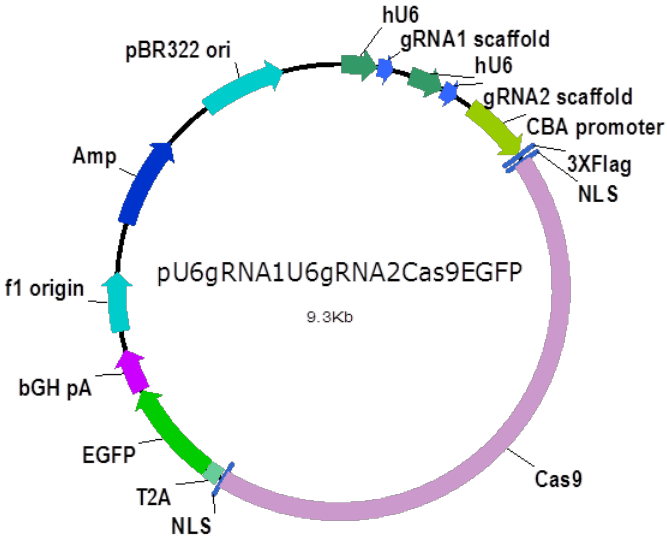

pU6gRNA1Cas9U6gRNA2
8677 bp
hU6
gRNA scaffold 1
pBR322_origin
CBA promoter
3XFlag
NLS
BbsI (246)
BbsI (260)
Amp
f1_origin
BsaI (5984)
BsaI (5969)
gRNA scaffold 2
hU6
bGH_PA_terminator
NLS
ORF
Cas9

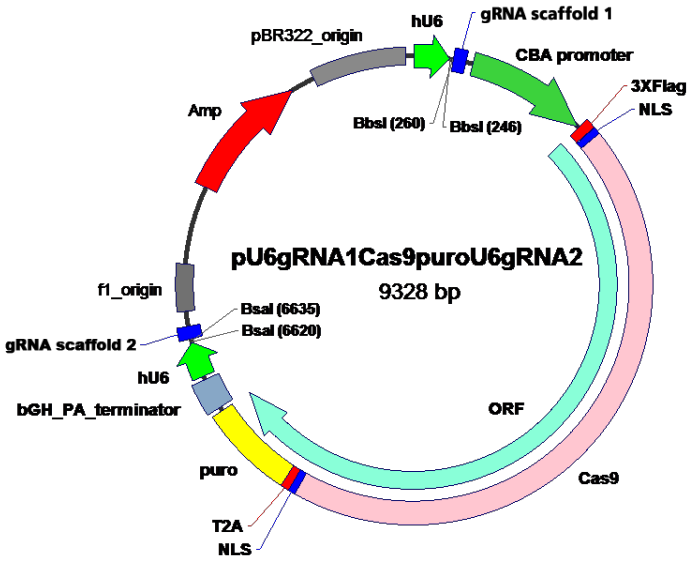

pU6gRNA1Cas9H1gRNA2
8639 bp
hU6
gRNA scaffold 1
pBR322_origin
CBA promoter
3XFLAG
NLS
BbsI (246)
BbsI (260)
Amp
f1_origin
BsaI (5946)
BsaI (5931)
gRNA scaffold 2
H1
bGH_PA_terminator
NLS
ORF
Cas9

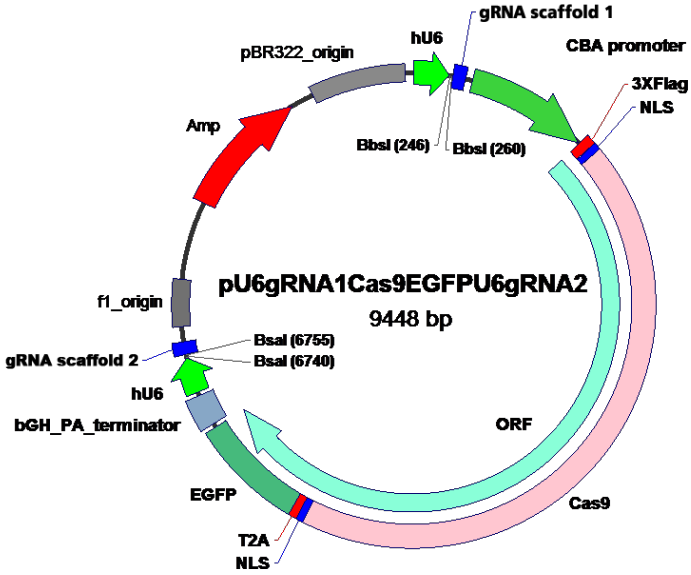

pU6gRNACas9puro
9112 bp
hU6
gRNA scaffold
pBR322_origin
CBA promoter
3XFlag
NLS
Amp
BbsI (246)
BbsI (260)
f1_origin
bGH_PA_terminator
ORF
puro
T2A
NLS
Cas9


hU6
gRNA1 scaffold
pBR322 ori
hU6
gRNA2 scaffold
CBA promoter
Amp
3XFlag
NLS
pU6gRNA1U6gRNA2Cas9puro
9.3Kb
f1 origin
bGH pA
puro
T2A
NLS
Cas9

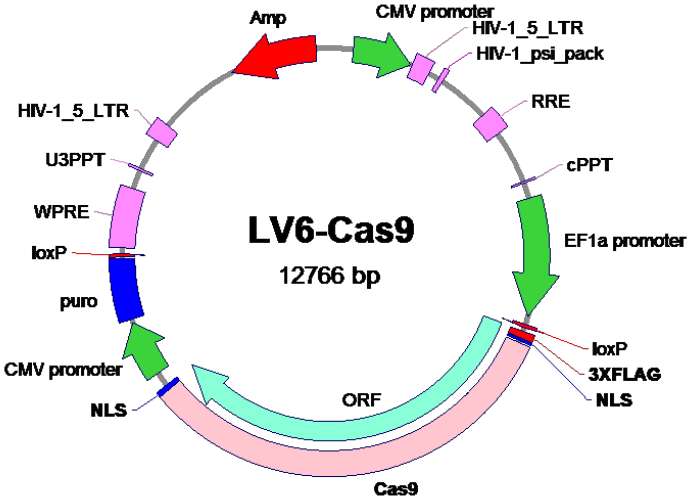

hU6
gRNA scaffold
pBR322_origin
CBA promoter
3XFlag
NLS
Amp
BbsI (246)
BbsI (260)
pU6gRNACas9EGFP
9232 bp
f1_origin
bGH_PA_terminator
ORF
EGFP
Cas9
T2A
NLS

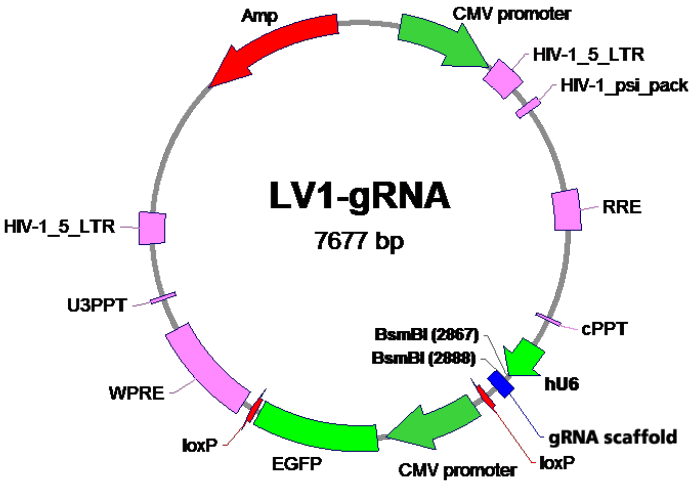

hU6
gRNA1 scaffold
pBR322 ori
hU6
gRNA2 scaffold
CBA promoter
Amp
3XFlag
NLS
pU6gRNA1U6gRNA2Cas9EGFP
9.3Kb
f1 origin
bGH pA
EGFP
Cas9
T2A
NLS

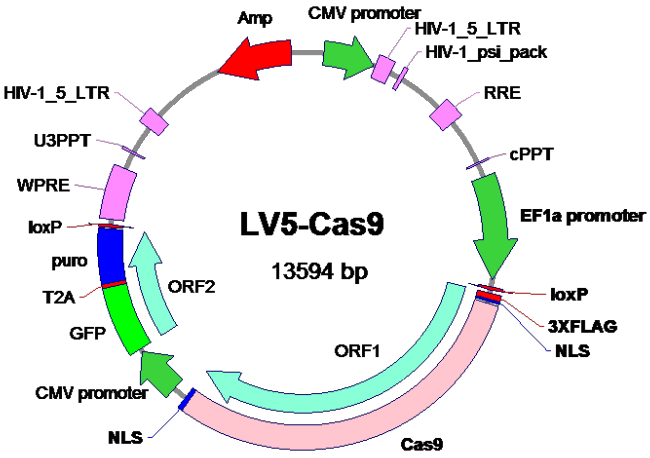

gRNA scaffold 1
hU6
pBR322_origin
CBA promoter
3XFlag
NLS
Amp
BbsI (260)
BbsI (246)
pU6gRNA1Cas9puroU6gRNA2
9328 bp
f1_origin
BsaI (6635)
BsaI (6620)
gRNA scaffold 2
hU6
bGH_PA_terminator
ORF
puro
Cas9
T2A
NLS

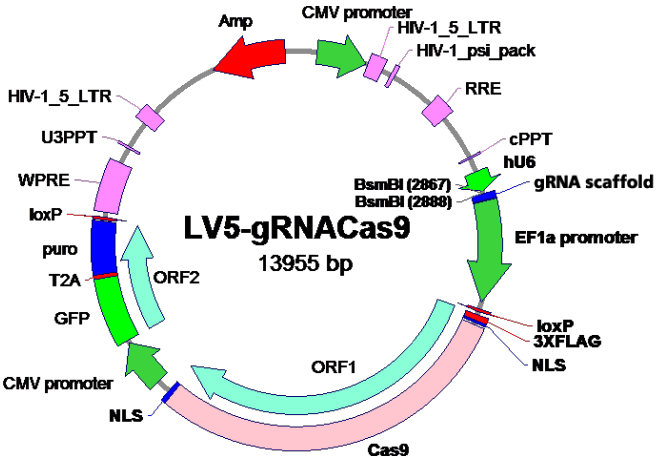

gRNA scaffold 1
hU6
pBR322_origin
CBA promoter
3XFlag
NLS
Amp
BbsI (246)
BbsI (260)
pU6gRNA1Cas9EGFPU6gRNA2
9448 bp
f1_origin
BsaI (6755)
BsaI (6740)
gRNA scaffold 2
hU6
bGH_PA_terminator
ORF
EGFP
Cas9
T2A
NLS

7.2 CRISPR 基因编辑慢病毒（LV）载体






LV5-Cas9
13594 bp
Amp
CMV promoter
HIV-1_5_LTR
HIV-1_psi_pack
RRE
cPPT
EF1a promoter
loxP
3XFLAG
NLS
Cas9
ORF1
ORF2
CMV promoter
NLS
GFP
T2A
puro
loxP
WPRE
U3PPT
HIV-1_5_LTR


LV5-gRNACas9
13955 bp
Amp
CMV promoter
HIV-1_5_LTR
HIV-1_psi_pack
RRE
cPPT
hU6
gRNA scaffold
BsmBI (2867)
BsmBI (2888)
EF1a promoter
loxP
3XFLAG
NLS
Cas9
ORF1
ORF2
CMV promoter
NLS
GFP
T2A
puro
loxP
WPRE
U3PPT
HIV-1_5_LTR

上海吉玛制药技术有限公司

上海张江高科技园区哈雷路 1011 号

rnaisupport@genepharma.com

support@genepharma.com

021-51320195

苏州吉玛基因股份有限公司

苏州工业园区东平街 199 号

bio@genepharma.com

szsupport@genepharma.com

0512-86668828

B020-V001-20180323