

CRISPR-Cas9 基因编辑操作手册

CRISPR-Cas9 技术通过人工设计 tracrRNA/crRNA，改造成具有引导作用的 sgRNA，以引导 cas9 对 DNA 的定点切割，造成 DNA 双链的断裂，然后细胞可以利用 NHEJ 或者同源重组的方式实现基因敲除或对基因精确编辑的目的。

操作步骤

靶基因分析

根据靶基因的名称和种属信息，在 NCBI、Ensembl Genomes 或其他分子生物学网站上进行查找，搜索到该基因的信息，并明确 CDS 外显子部分。

sgRNA 位点设计

确定待敲除位点，对于蛋白编码基因，如果该蛋白具有重要结构功能域，可考虑将基因敲除位点设计在编码该结构域的外显子；如果不能确定基因产物性质，可选择将待敲除位点放在起始密码子 ATG 后的外显子上。如果是 microRNA，可以将待敲除位点设计在编码成熟 microRNA 的外显子或在编码成熟 microRNA 的外显子的 5' 和 3' 侧翼序列。选择好要设计的区域后，再通过预测网站进行序列预测。序列预测的目的主要是避免 Cas9 脱靶效应，以确保设计的 sgRNA 尽可能的减少脱靶效应。

Cas9 载体构建

根据 sgRNA 序列，安排引物合成。引物合成时，需要在引物的 5' 端引入粘性末端。将引物退火形成带粘性末端的双链片段，取 1 μ L 用于后续的连接反应，其余在 -20 $^{\circ}$ C 下保存。对表达载体先进行限制性内切酶酶切，得到线性化载体，再把前面得到的双链片段连接入表达载体。再进行感受态细胞的转化和阳性转化子的鉴定。

Cas9 载体活性检测

对于构建的 Cas9 载体，转染细胞进行重组效率的检测，检测的方法主要是采用特异性片段扩增后进行的 T7E1 酶切处理，这一方法可以特异、定量的检测基因组重组效率。

Cas9 载体系统与病毒结合

CRISPR 与 RNAi 的区别

RNAi 介导 knockdown 是减少细胞中目的基因表达产物，其结果在不改变遗传密码的情况下，转录后基因表达量下调。一些功能 RNA 或蛋白质的翻译水平会保持不变或降低。因

此，用以减少基因功能的 RNAi 技术隶属于基因下调（Knockdown）方法，该方法无法完全去除基因功能。

CRISPR 改变遗传密码从而引起 knockout，其本质是运用核酸酶来切割靶序列，所得到的双链断裂或被修复或导致细胞死亡。

基因编辑手段的选择

根据实验目的和操作难易程度选择合适的基因编辑手段，可参考下表。

表 1 基因编辑手段选择参考

目标	结果	技术手段选择
了解目的基因序列	Only 转录组	RNAi or CRISPR
	带有注释的 TSS 的基因	RNAi or CRISPR
目的基因功能缺失	knockdown	RNAi
	knockout	CRISPR-Cas9
显形时间	短	RNAi (siRNA)
	中	CRISPR-Cas9
	长	TALEN
显形类型	亚等位基因	RNAi
	Null (complete KO)	CRISPR-Cas9
实验成本	低	RNAi (shRNA) / CRISPR-Cas9
	高	RNAi (siRNA)
实验难易程度	易	RNAi (siRNA)
	一般	RNAi (shRNA) & CRISPR-Cas9
	难	TALEN
脱靶效应	低	CRISPR-Cas9
	高	RNAi (siRNA & shRNA)