

# 使用工程化限制性酶切位点估计 CRISPR 同源定向修复效率

## 作者

Kyle Luttgaharm,  
Chava Pocerich,  
Kit-Sum Wong  
安捷伦科技有限公司

## 摘要

Agilent 5200 片段分析仪系统与 Agilent CRISPR Discovery 凝胶试剂盒相结合，可提供高通量分析，用于检测 CRISPR 诱导的限制性内切酶新位点的同源定向修复 (HDR) 敲入。当使用 CRISPR 基因编辑时，该方法可用于确定混合和单个细胞系系统中 HDR 修复的近似频率。

## 简介

CRISPR 基因编辑正迅速成为基因敲除研究的首选方法。CRISPR 基因编辑使用 Cas9 核酸内切酶结合向导 RNA 来裂解目标基因组序列并诱导双链断裂<sup>[1,2]</sup>。裂解后，剪切的 DNA 通过非同源末端连接 (NHEJ) 途径或同源定向修复 (HDR) 途径进行修复。更为常用但容易出错的 NHEJ 途径会产生随机插入或缺失的 DNA 碱基 (InDel) 以修复双链断裂<sup>[3]</sup>。这些修饰可以通过引入移码突变或提前终止密码子导致基因功能丧失<sup>[4]</sup>。最常见的 InDel 是 ±1 或 2 个碱基对 (bp)，但也可能出现大片段 InDel<sup>[5,6]</sup>。与容易出错的 NHEJ 途径相比，HDR 途径使用的供体序列包含由新 DNA 序列隔开的侧翼同源末端。在修复双链断裂期间，细胞识别同源序列，并在双链断裂位置插入包含新序列的供体模板。

为了加快构建基因敲除细胞系，许多研究者正使用 HDR 修复来敲入新的限制性内切酶位点，从而允许在破坏开放阅读框的同时快速鉴定/定量基因编辑的细胞系。可以通过扩增基因编辑的基因座，然后经限制性内切酶处理来定量 HDR 事件。由于只有包含 HDR 事件的扩增子才会被裂解，因此裂解百分比应等于 HDR 百分比。在 Agilent 5200 片段分析仪系统上使用 Agilent CRISPR Discovery 凝胶试剂盒对限制性酶切后的样品进行分析，以确定实际裂解百分比。

## 实验部分

本研究中的实验采用 Agilent 5200 片段分析仪系统完成，但也可以在 Agilent 5300 和 5400 片段分析仪系统上获得类似的结果。

### 扩增和限制性酶切

将代表野生型 (WT) 基因和各种 NHEJ 事件 (±1、±2、±10 和所有可能的 SNP) 的合成基因与包含代表 HDR 事件的 BamHI 限制性内切酶位点 (pHDR) 的基因混合。将质粒以不同的百分比混合，模拟存在和不存在 NHEJ 事件的各种百分比 HDR 修饰。根据制造商的说明，使

用 DreamTaq (Thermo Fisher Scientific, #EP0701) 将 410 bp 片段扩增 30 个 PCR 循环或 15 个 PCR 循环。在 30 个 PCR 循环后，在 20 μL 反应中用 1 μL Fast Digest BamHI (Thermo Fisher Scientific, #FD0054) 对 200 ng 未纯化的 PCR 产物进行酶切，并在 37 °C 下孵育 15 分钟。对于 15 个 PCR 循环的有限扩增，使用 Monarch PCR 和 DNA 纯化试剂盒 (New England Biolabs, #T1030) 浓缩 PCR 产物，并用 10 μL NEB 洗脱缓冲液洗脱。纯化后，如前所述完成 BamHI 酶切。

### 限制性酶切分析

所有酶切样品分别取 2 μL 用 100 μL 0.1X TE 稀释，在 5200 片段分析仪系统上使用 CRISPR Discovery 凝胶试剂盒 (部件号 DNF-910-K1000CP) 进行分析。裂解百分比是使用 Agilent ProSize 数据分析软件的 CRISPR 主插件工具计算的。CRISPR 主插件使用公式 1 计算裂解百分比。

使用 2% 琼脂糖凝胶上样约 200 ng DNA 进行琼脂糖凝胶电泳。将琼脂糖凝胶用 0.5 μg/mL 溴化乙锭后染色 30 分钟，然后用紫外透照仪在 300 nm 条件下观察条带。

$$\text{裂解率}\% = \frac{\frac{\text{nmol 酶切片段 1} + \text{nmol 酶切片段 2}}{2}}{\frac{\text{nmol 酶切片段 1} + \text{nmol 酶切片段 2}}{2} + \text{nmol 未酶切的片段}}$$

公式 1.

## 结果与讨论

虽然已经开发了一些技术来提高 HDR 整合的频率，但 NHEJ 修复仍是更高效的修复途径，从而导致 HDR 整合和 NHEJ 修复事件的混合发生。为了对此进行模拟，WT 和 NHEJ 基因按 1:1 (m/m) 混合。然后将这些基因混合物与 pHDR 混合，使最终溶液含有 0%、6%、11%、25% 和 40% (m/m) pHDR，然后扩增 30 个 PCR 循环。用 BamHI 酶切扩增子获得了以下裂解百分比：分别为 0%、0.7%、1.8%、7.0% 和 24.9%，远低于理论值（图 1）。对电泳图的进一步检查显示，存在通过混合模板 PCR 产生的同源双链 DNA。因此，导致了 BamHI 限制性酶切位点不可接近和难以酶切的 HDR 事件（图 2）。这些数据表明，由于存在难以酶切的同源双链 DNA，限制性酶切产生的裂解百分比小于细胞混合物中存在的 HDR 事件的实际数量。

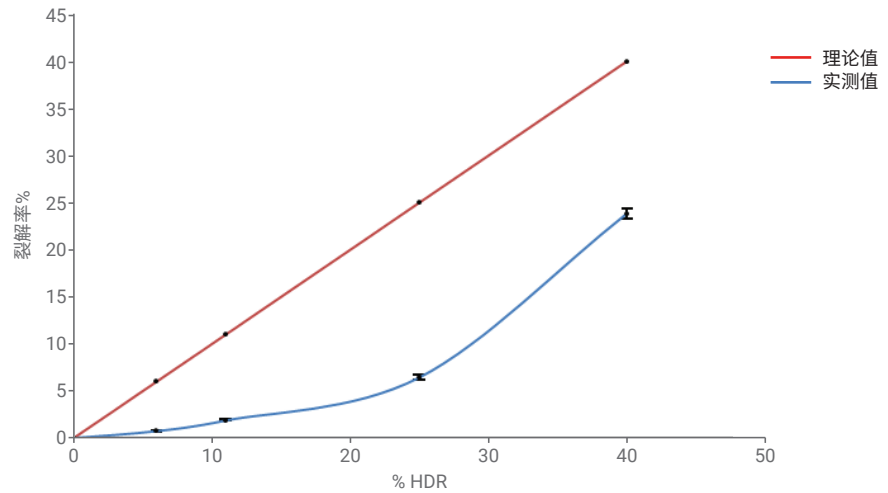


图 1. 实测 HDR 百分比水平与各种 %pHDR 混合模板 PCR 的 BamHI 酶切理论值比较。实测 HDR 百分比明显低于 HDR 的理论水平，可能是由于在混合模板 PCR 过程中形成大量难以酶切的同源双链。所有 PCR 反应均使用包含不同 HDR 比例的各种 NHEJ 事件基因混合物完成。扩增使用 30 个循环完成。数据显示为平均值 ± 标准误差 (n = 8)

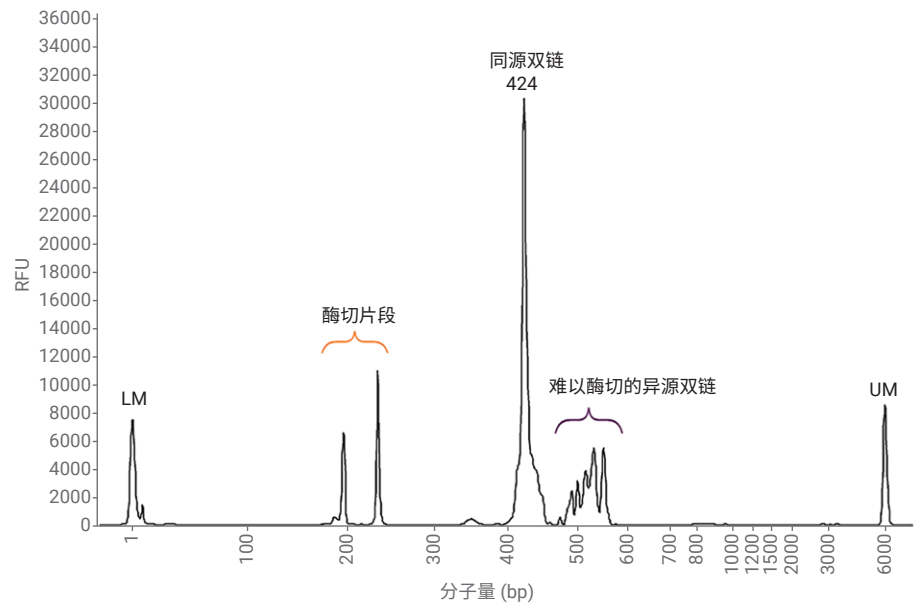


图 2. 使用 Agilent 5200 片段分析仪系统与 Agilent CRISPR Discovery 凝胶试剂盒，分析 40% pHDR 混合模板 PCR 的 BamHI 酶切产物。使用 5200 片段分析仪系统很容易看到同源双链的形成，从而实现快速准确的裂解评估。LM = 下位内标，UM = 上位内标

比较琼脂糖凝胶电泳和 5200 片段分析仪系统之间相同的 6%、11% 和 25% pHDR 酶切混合物的分离。与 5200 片段分析仪系统相比，琼脂糖凝胶电泳不够灵敏，无法检测来自 6%、11% 和 25% pHDR 酶切混合物的裂解产物（图 3）。只有 40% 的 pHDR 酶切混合物产生了足够的裂解产物，可通过琼脂糖凝胶电泳检测，但同源双链和异源双链条带彼此无法区分。5200 片段分析仪系统结合 CRISPR Discovery 凝胶试剂盒提高了灵敏度，可用于检测低水平的裂解产物，并能够出色分离同源双链和异源双链，这是琼脂糖凝胶电泳无法实现的。

为了确定在没有 NHEJ 事件存在的情况下，异源双链自发形成如何影响裂解百分比，对 WT 和 HDR 基因进行了混合，pHDR 百分比从 0% 到 100% 不等（图 4）。实测裂解百分比与理论百分比 HDR 达到一致的唯一点是 50% pHDR。有趣的是，所有低于 50% pHDR 的点都被低估了，所有高于 50% 的点都被高估了，而 50% 的 pHDR/50% WT 混合物测得了大约 50% 的裂解。

在高于或低于 50% pHDR 混合物的任何点，异源双链形成对可裂解 HDR 同源双链的数量有很大影响。这可以通过以下理论数学示例来解释（表 1）。例如，如果具有 20% pHDR 的 100 nmol/L 样品导致半数的异源双链形成，则仅剩下 10 nmol 可裂解同源双链，代表可裂解片段减少 50%。在这种情况下，最初有 80 nmol 的 WT 片段，其中 20 nmol 与

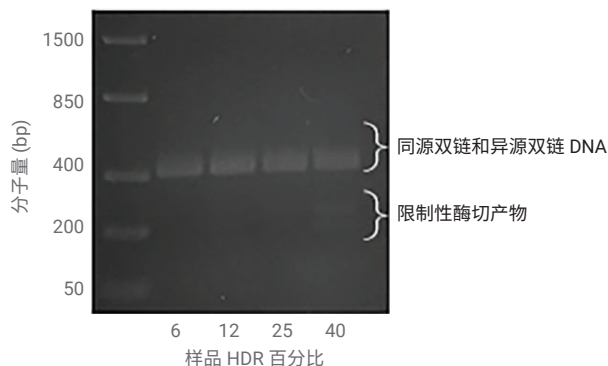


图 3. 6%、12%、25% 和 40% pHDR 的混合模板 PCR 的 BamHI 酶切产物的琼脂糖凝胶电泳分析。仅 40% pHDR 样品检测到限制性酶切产物。异源双链和同源双链片段之间没有明显的分离

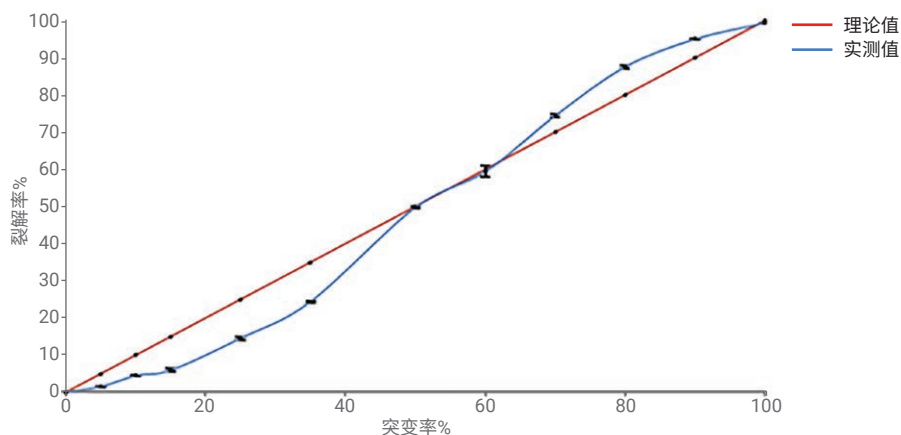


图 4. 当仅存在 WT 和不同比例的 HDR 事件时，实测 HDR 百分比与理论值的比较。50% pHDR 以下时，实测 HDR 百分比明显低于预期值；50% pHDR 以上时，实测值高于预期值。仅 50% pHDR 模型返回的值与预期值一致。所有 PCR 反应均使用包含不同 HDR 比例的各种 NHEJ 事件基因混合物完成。扩增使用 30 个 PCR 循环完成。数据显示为平均值 ± 标准误差 (n = 5)

表 1. 一种 HDR 理论数学模型，说明了混合模板 PCR 产生的异源双链自发形成如何影响实测 HDR 整合水平

% pHDR	nmol HDR	nmol WT	nmol 自发形成的异源双链	nmol 同源双链 HDR	nmol 同源双链 WT	%HDR 实测值 (裂解率%)
20	20	80	20	10	70	13%
50	50	50	20	40	40	50%
80	80	20	20	70	10	88%

HDR 事件形成异源双链，剩下 70 nmol WT 同源双链。裂解百分比基于同源双链 DNA 的量，等于 13%，而不是预期的 20%（表 1）。相反，当 HDR 百分比大于 50% 时，将与上述情况相反，实测裂解百分比高于实际 HDR 事件（表 1）。在 50% pHDR/50% WT 比值下，无论异源双链形成的百分比如何，总会得到 50% 的裂解率（表 1）。

由于混合模板 PCR 异源双链形成具有随机性，不可能根据裂解百分比值确定确切的突变 DNA 百分比。可以采取降低异源双链形成的可能性，确保裂解百分比值更好地反映理论 HDR 事件。尽可能减少异源双链形成的最简单解决方案是大幅减少 PCR 循环次数。这可能导致 PCR 扩增子含量偏低，因此需要一个浓缩步骤。为了测试这一点，PCR 循环次数从 30 减少至 15，然后进行浓缩步骤。酶切这些样品后，5200 片段分析仪系统显示形成更少的异源双链（图 5B）。15 个循环的 PCR 样品得到的裂解百分比更接近理论值，并且与 30 个循环的 PCR 数据有统计学差异（图 5A）。此外，与 30 个循环的 PCR 数据相比，误差百分比降低了 40%（表 2）。

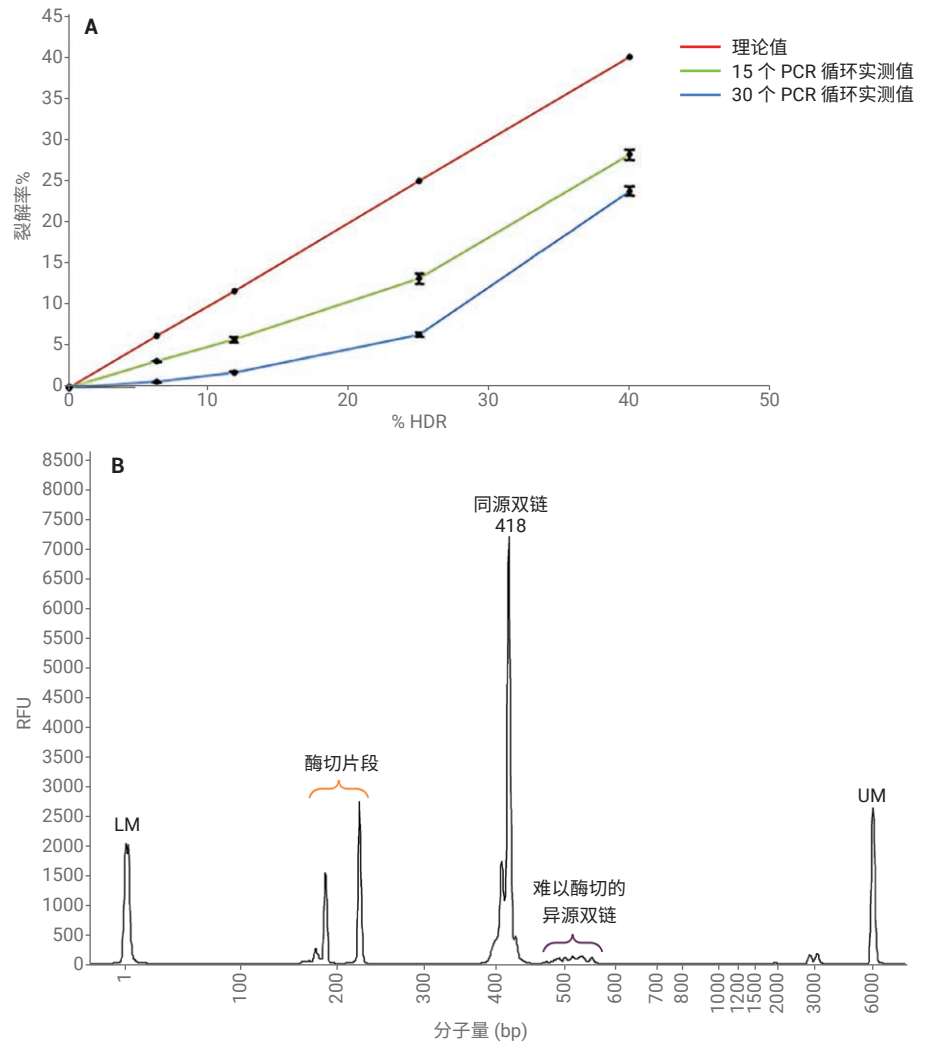


图 5. (A) 实测 HDR 百分比水平与理论值比较。当采用较少的 PCR 循环时，实测 HDR 百分比显著更高 ( $P < 0.01$ )。所有 PCR 反应均使用包含不同 HDR 比例的各种 NHEJ 事件基因混合物完成。扩增使用 15 或 30 个循环完成。数据显示为平均值  $\pm$  标准误差 ( $n = 8$ )。 (B) 与 30 个循环相比，采用 15 个 PCR 循环时实测的异源双链形成数量较少（见图 2）。LM = 下位内标，UM = 上位内标

表 2. 15 和 30 个 PCR 循环得到的实测裂解百分比和误差百分比汇总<sup>[1]</sup>

% HDR	15 个 PCR 循环		30 个 PCR 循环	
	平均裂解率%	误差%	平均裂解率%	误差%
6.25%	3.22% $\pm$ 0.06	48%	0.74% $\pm$ 0.02	88%
11.76%	5.82% $\pm$ 0.34	51%	1.87% $\pm$ 0.07	84%
25%	13.05% $\pm$ 0.68	47%	6.42% $\pm$ 0.26	74%
40%	28.2% $\pm$ 0.64	30%	23.79% $\pm$ 0.53	41%

与裂解率% 预期值的误差为 1%

除了估计混合细胞系中 HDR 事件的数量外，限制性内切酶新位点的存在也为单个二倍体细胞系和生物体的快速基因分型提供了条件。当二倍体生物体中的两个等位基因都被修饰为包含新的限制性酶切位点时，用限制性内切酶进行酶切将裂解所有片段，产生 100% 裂解。在高于或低于 50% pHDR 混合物的任何点，异源双链形成对可裂解 HDR 同源双链的数量有很大影响（图 4，100% HDR 点）。单等位基因突变将显示约 50% 的裂解，而当 HDR 事件不存在时，无法观察到裂解。

## 结论

此处展示的数据证明了 Agilent 5200 片段分析仪系统结合 Agilent CRISPR Discovery 凝胶试剂盒能够快速对单个细胞系进行基因分型，并能粗略估计混合细胞样品中的 HDR 百分比，同时说明了混合模板 PCR 的异源双链形成对估计 HDR 修饰百分比的影响。具有高分离度的 5200 片段分析仪系统能够分离形成的同源双链和异源双链，从而有助于优化 PCR 条件，以减少混合模板 PCR 导致的异源双链自发形成带来的影响。此外，与琼脂糖凝胶电泳分析相比，5200 片段分析仪系统的灵敏度更高，可检测低水平的 HDR 事件，从而减少筛查样品的时间。

## 参考文献

1. L. Cong *et al.*, Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas System, *Science*, **2013**, 339, 819–824
2. M. Jinek *et al.*, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*, **2012**, 337, 816–821
3. F. A. Ran *et al.*, Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, **2013**, 8, 2281–2308
4. E. E. Perez *et al.*, Establishment of HIV-1 resistance in CD4+ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases, *Nat. Biotechnol.*, **2008**, 26, 808–816
5. C. Pan *et al.*, CRISPR/Cas9-mediated efficient and heritable targeted mutagenesis in tomato plants in the first and later generations, *Sci. Rep.*, **2016**, 6, 24765
6. Y. Santiago *et al.*, Targeted gene knockout in mammalian cells by using engineered zinc-finger nucleases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2008**, 105, 5809–5814

查找当地的安捷伦客户中心：

[www.agilent.com/chem/contactus-cn](http://www.agilent.com/chem/contactus-cn)

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

[LSCA-China\\_800@agilent.com](mailto:LSCA-China_800@agilent.com)

在线询价：

[www.agilent.com/chem/erfq-cn](http://www.agilent.com/chem/erfq-cn)

[www.agilent.com](http://www.agilent.com)

仅供科研使用。不用于临床诊断用途。

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2019  
2019 年 2 月 7 日，中国出版  
5994-0524ZHCN