

CRISPR / Cas9 Genome Editing 專刊

前言

CRISPR 起源.....	2
已知基因修補技術介紹.....	3
CRISPR 優點及原理.....	5
CRISPR 機制及應用.....	6
CRISPR/Cas9 實驗組成.....	7
Cas9 表現載體轉染.....	8
Cas9 mRNA/protein 轉染.....	9
Cas9 蛋白產品.....	10
轉染試劑.....	11

起源：

1987 年，日本大阪大學(Osaka University)的科學家在對一種細菌的鹼性磷酸酶(alkaline phosphatase)基因片段進行研究時，發現在這個基因片段的附近存在一種特殊的小片段 DNA，這些片段是由簡單的重複序列組成，且在片段的兩端也包含著特殊的基因序列。不過當時並沒有太過注意這部分的研究，甚至於當時對於這個研究的評論是說——“我們目前也不太清楚這些序列在生物學上的意義。

不過，就在 30 年後，這個發現卻展現出了令人驚豔的成就。因為現在許多的科學研究正是利用這種特殊序列的 DNA 基因片段來進行基因重組及遺傳工程相關的研究，而且操作起來方便又快速。

—CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

重要性：

基因轉殖鼠的育成一開始，科學家利用顯微注射的方式將 DNA 片段注入小鼠受精卵的原核中，而成功的創造出所謂的基因轉殖鼠，然而此方法只能將外在 DNA 片段導入動物基因中，無法對體內基因的特定序列進行特定的修飾。後來，由於幹細胞研究的興起，而根據小鼠胚胎幹細胞和同源基因重組(Homologous recombination, HR)的技術發展下，基因標靶技術(gene targeting)便油然而生；此技術使得科學家可以在小鼠的體內針對任何有興趣的基因進行修飾。基因標靶技術的發展使生命科學以及基因工程的研究有了突破性的改變。

然而，利用基因標靶技術進行基因轉殖鼠的培育需要較長的時間以及巨額的花費。例如，基因轉殖鼠在研究基因功能和疾病的發上是相當重要的，所以基因標靶技術則成為了基因轉殖鼠培育中的重要技術。而使用此技術使小鼠的基因產生突變則是通過在小鼠的胚胎幹細胞或受精卵基因中的特殊片段造成雙股基因斷裂(double strand break, DSB)，進而引發同源基因重組(homologous recombination, HR)或非同源基因重組(non-homologous end join, NHEJ)。但是光是生產單一突變的基因轉殖鼠不管在時間或金錢上都有著相當大的花費，如果要進一步生產雙基因、三基因突變的轉殖基因鼠則更加的困難。

然而，CRISPR/Cas9 的出現使得基因轉殖鼠的培育時間大大的降低，並且也降低了操作難度及花費上的困境。例如在 2013 年 Wang⁽¹⁾ 團隊利用 CRISPR/Cas9 系統成功的培育出含有 5 個基因突變的基因轉殖鼠，這足以證明此技術在基因修飾上的巨大潛力(Fig 1)。

CRISPR Handles Multiple Types of Genome Modification

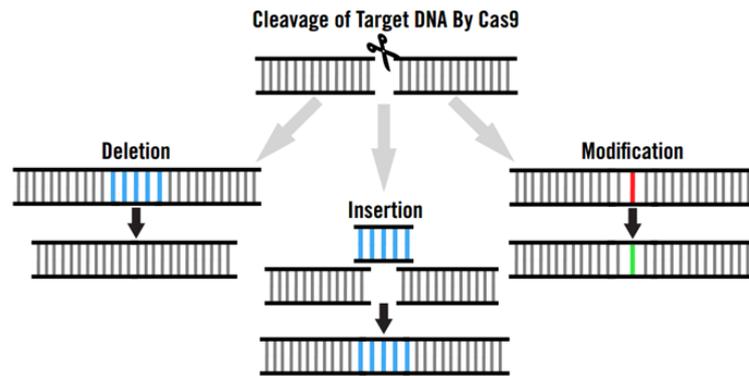


Fig. 1. 利用 Cas9 可實現在小鼠體內進行多重基因修飾的動作。

1. Wang H, Yang H, Shivalila C S, et al. Cell, 2013, 153(4) : 910-918

已知基因修補技術介紹

鋅手指核酸酶 (Zinc-Finger Nuclease, ZFN)

是由 Fok I 限制性核酸內切酶當中的非特異性的 DNA 切割結構區域和鋅指蛋白 (zinc-finger protein) 組合而成(Fig. 2)，能夠對基因組中的特定位點進行修補。ZFN 二聚體 (dimers) 能夠促使 DNA 斷裂形成 DNA 雙鏈斷裂缺口 (double-strand breaks; DSB)，進而誘發 DSB 修復機制，具有專一性，但仍有報告指出 ZFNs 也會造成其他相似序列的斷裂，造成非標的基因不正常表現，導致細胞死亡。因其為轉錄因子，當過度表現時，仍會影響部分基因表現，且一個基因的突變需要 6 或 8 組 ZFPs，同時進行二個基因以上的突變則至少需要 12 或 16 組以上的 ZFPs，在質體的設計上較複雜。

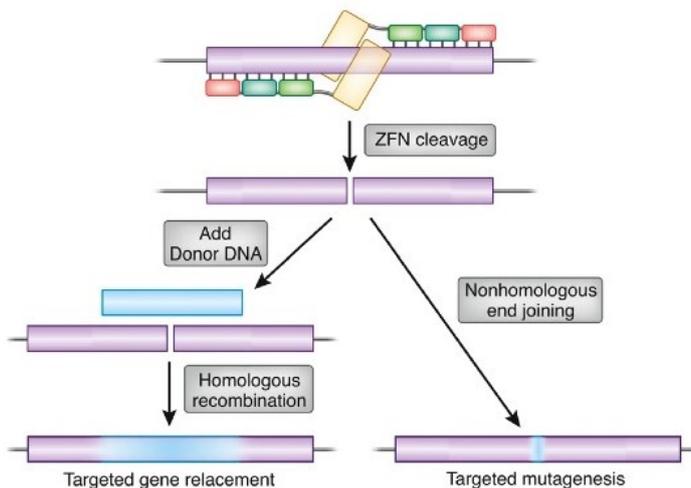


Fig. 2. 一對鋅手指核酸酶會導至 DNA 雙股的斷裂。此機制會經由細胞內的 DNA 修補機制，同源基因重組(Homologous recombination, HR)和非同源基因重組(non-homologous end join, NHEJ)進行修補。

TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases)

此種標的基因修補工具主要由 Fok I 內切酶結構域和 TALE 蛋白的 DNA 結合結構域組合而成，含有多個 33-35 個氨基酸組成的重複肽段，而每一段肽段都能辨識一個鹼基，具有 15-20 個 RVDs (可變雙胺基酸 repeat-variable di-residues, RVD)。與 ZFN 一樣可使 DNA 目標序列斷裂形成 DSB，誘發修復機制，相較於 ZFN，可大幅簡化質體設計、應用且專一性較好，可辨識 30 個以上的 DNA 序列，唯一缺點是蛋白質體序列較長且片段重複性高，約含有 950-1,900 鹼基，轉殖效率較低。

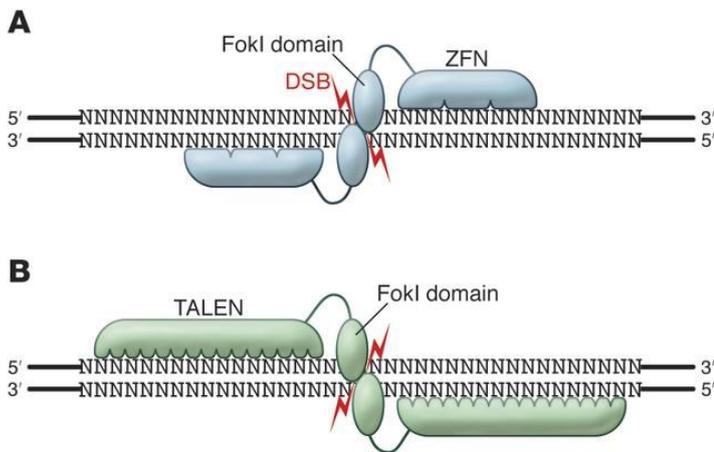


Fig. 3. ZFNs 和 TALENs 和 DNA 結合的專一性

(A) ZFN 結合到 DNA 上之後，兩邊的 Fok I 會坐落到要進行雙股 DNA 斷裂的位置進行作用。

(B) TALENs 結合後，會和 ZFN 很類似的機制，進行結合後，進行雙股 DNA 的裂解。

J Clin Invest. 2014;124 (10) :4154-4161

基因修補技術中：ZFN & TALEN 都必須經由繁複步驟的基因工程，組合出能夠辨認標的序列的蛋白質區域，用來辨認切割特定序列 (Gaj, Gersbach, & Barbas, 2013)。相較之下，CRISPR/Cas9 因合成特定序列 DNA 或 RNA 的技術，較組裝重組蛋白更為有效率，僅需數日便可得到特定序列產物，因此 CRISPR/Cas9 的修補技術較 ZFN 或 TALEN 更為方便快捷 (詳見 Table 1.)。

Table 1. 基因修補技術比較

項目	NFN	TALEN	CRISPR
來源	廣泛存在自然界	植物病原菌	<i>S.pyogenes</i>
決定 DNA 位置	蛋白質	蛋白質	RNA
核酸酶	FokI	FokI	Cas9
單次修改基因數	1 個	1 個	多個
成功率	低	高	高
效率	數月	數月	數週
毒性	高	低	低
價格	高	中	低

CRISPR 優點

1. 無物種限制，載體構築簡單快速，幾天內即可完成構築，失敗率低。
2. 靶位點設計容易，Cas9 辨識 DNA 序列效率高，成功率較 ZFN 或 TALEN 高，還可同時放入兩個以上的 sgRNA 來進行多個基因同時剔除的目的。
3. 雙合一或三合一載體簡化細胞轉染的難度。配多種報導基因，如螢光蛋白或抗生素篩選基因，可使實驗設計更有彈性。
4. 可以直接作用於 DNA 上，讓基因默化更容易，將可漸漸取代 RNA(RNAi) 或 Morpholino 等基因干擾技術。

原理：

CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 是近年來相當熱門的一種 RNA 帶領 Cas9 nuclease 對目標基因 DNA 進行修飾的技術。

CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) 系統是一種廣泛存在於細菌與古生菌中的一套防衛系統，由 RNA 領導、可進行基因遺傳的免疫系統。這種免疫系統主要是細菌提供了對外來 DNA (如噬菌體、質體) 的免疫功能。標準的 CRISPR/Cas9 是由 Cas9 以及重復的間隔序列(Repeat spacer)所組成。間隔序列可以專一性的辨識外來 DNA。

CRISPR/Cas9 系統可分為三種類型：CRISPR/Cas9 type I, II 和 III，每個類型又可根據其所包含的 Cas9 蛋白基因的不同再進行區分。大至上的區分及作用如下：

CRISPR/Cas9 type I：在發揮作用時，只需要 crRNA(CRISPR RNA)和 Cas9 的參與。

CRISPR/Cas9 type II：在作用時，除了需要 crRNA 和 Cas9 的參與，還需要 tracrRNA 的參與。

CRISPR/Cas9 type III：在發揮作用時，只需要 crRNA 和 Cas9 的參與。

=> crRNA(CRISPR RNA) 在三種 CRISPR/Cas9 類型中扮演著舉足輕重的角色，但是在其修飾的過程中仍存在著些許的差異；CRISPR/Cas9 類型 I 和 II，一開始是由 CRISPR 序列中轉錄出 pre-crRNA 後，經過修飾後得到完整的 crRNA。CRISPR/Cas9 類型 II 則是因為其所含有的 Cas9 本身除了包有分解外來 DNA 的功能外，也具有加工修飾產生 crRNA 的功能。

=> CRISPR/Cas9 type II 為目前科學家進行基因修飾所使用的系統。

作用機制：

一、間隔序列 (Repeat spacer) 取得：

當細菌被外來 DNA 入侵時，CRISPR/Cas9 系統可以辨識入侵 DNA 的特殊片段 (PAM, proto-spacer-associated motif)，並將 PAM 旁邊的特殊序列修飾後併入自身的 CRISPR 序列中。

二、pre-crRNA 生成及修飾：

CRISPR 的轉錄產生 pre-crRNA 後會和 tracrRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 形成復合物。此復合物會在 Cas9 的存在下被修飾成產生具有功能的 crRNA。

三、CRISPR 系統對外來 DNA 的防護：

crRNA，tracrRNA 和 Cas9 結合形成一個復合物後，會在 crRNA 的帶領下和外來 DNA 中的序列進行結合，接著由 Cas9 對外來 DNA 進行分解。

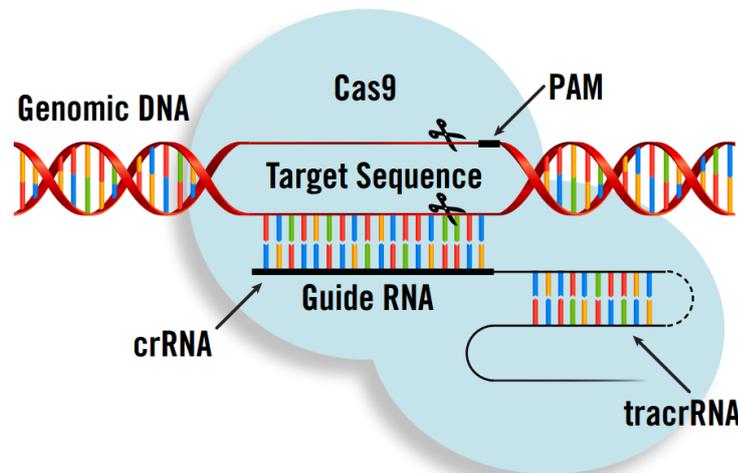


Fig. 4. Cas9 會藉由 guide RNA (gRNA) 的幫助下和 DNA 進行結合。而 gRNA 可以分為兩部分，1. CRISPR RNA (crRNA) 和 trans-activating crRNA (tracrRNA) 或 single guide RNA (sgRNA)，其中 crRNA 和 tracrRNA 是經由一個序列進行連結(虛線)。在 protospacer-adjacent motif (PAM) 的幫助下可增加和標的 DNA 的結合，最後在 PAM 上游 3 bps 的部分進行雙股 DNA 斷裂。

應用：

CRISPR/Cas9 type II 由於只需要 tracrRNA、pre-crRNA、Cas9、RNase III 此四個組成，所以被科學家進行改造成為對哺乳動物基因修飾的系統。在哺乳動物細胞中，由於本身具有內生性的 RNase，此可以取代細菌中 CRISPR/Cas9 type II 所需要的 RNase III；並且為了使操作過程更加容易，科學家又根據 crRNA 和 tracrRNA 的結構和序列，設計出 sgRNA (single guide RNA, sgRNA)，其具備兩者的功能，並能和 Cas9 結合並引導其至正確位置進行基因裂解。所以最後在科學家的努力之下，CRISPR/Cas9 type II 類型的基因修飾只需要在細胞中將 Cas9 和 sgRNA 兩者經由轉染、感染的方式進行導入，則可以進行標靶基因的修飾。

CRISPR Gene Editing Workflow



CRISPR/Cas9 實驗組成：

在科學家的努力之下，要進行 CRISPR/Cas9 基因修飾只需要 sgRNA 以及 Cas9 即可以進行研究，然而，這兩者的要從何而來？

sgRNA：在標靶基因的實驗中，sgRNA 最簡單的取得方法即利用合成的方式；也可利用表現載體的方式進行 sgRNA 的表現。目前許多研究是利用 U6 或 T7 的啟動子(Promotor)的方式進行 sgRNA 的表現。

Cas9：Cas9 在細胞中會使 DNA 進行雙股 DNA 斷裂，而如果使細胞內存在此蛋白則是科學家要面臨的課題。

目前已知的方法有：

病毒感染：利用病毒感染細胞，使細胞能夠穩定表現 Cas9

轉染(transfection)：根據轉染的 Cas9 特性，又分為三種：

表現載體、mRNA、蛋白質，而這三種的效率、花費、專一性的比較表如下：

Comparison of Cas9 Formats: DNA, RNA and Protein

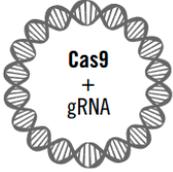
	pDNA	mRNA	Protein
High Efficiency	++++	++++	++++
Low Cost	++++	++++	++++
Specificity	++++	++++	++++

Fig. 5. CRISPR/Cas9 進行基因修飾時，Cas9 利用導入細胞中的模式(plasmid DNA、mRNA 和蛋白質)的比較表

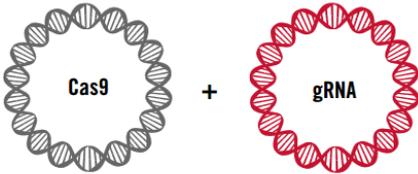
表現載體(plasmid)：用轉染試劑轉染 Cas9 表現質體，使細胞能表現 Cas9 蛋白。

-轉染 Cas9 的表現質體 + sgRNA 表現質體

A. All in one plasmid expressing Cas9 and guide RNA



B. Separate plasmids expressing Cas9 and guide RNA



C. Separate plasmids expressing Cas9 nickase and guide RNAs

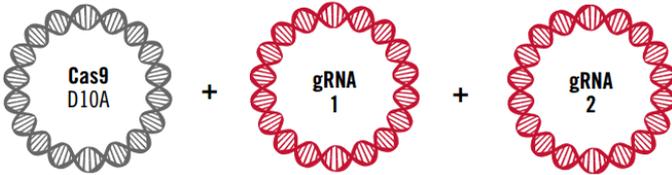


Fig. 6. Cas9 + Guide RNA Plasmids.

- (A) Cas9 和 guide RNA 存在同一個 plasmid.
- (B) (B,C) Cas9 和 guide RNA(s) 分別存在各別的 plasmids DNA 上
- (C) 突變型的 Cas9(D10A) 可以在標的 DNA 上造成單股 DNA 斷裂。為了增加專一性，Cas9 (D10A)可以配對兩個 gRNA，進而在標的 DNA 上造成雙股 DNA 斷裂。

-轉染 Cas9 的表現質體 + sgRNA

A. Cas9 (plasmid DNA) + guide RNA (RNA oligonucleotide)



B. Cas9 nickase (plasmid DNA) + guide RNAs (RNA oligonucleotide)



Fig. 7. Cas9 Plasmid + Guide RNA Oligonucleotides.

Cas9 存在 plasmid DNA 上而 guide RNA(s) 是利用合成或是胞外轉錄 (IVT, in vitro transcription) 的方式進行生成。

- (A) Cas9 加上合成或是胞外轉錄 (IVT, in vitro transcription) 的方式進行生成 gRNA 一起進行轉染。
- (B) 突變型的 Cas9(D10A) 可以在標的 DNA 上造成單股 DNA 斷裂。為了增加專一性，Cas9(D10A)可以配對兩個 gRNA，進而在標的 DNA 上造成雙股 DNA 斷裂。

mRNA：利用轉染試劑轉染 Cas9 的 mRNA，使細胞能表現 Cas9 蛋白。

A. Cas9 (mRNA) + guide RNA (RNA oligonucleotide)



B. Cas9 nickase (mRNA) + guide RNAs (RNA oligonucleotide)



Fig. 8. Cas9 mRNA + Guide RNA Oligonucleotides.

Cas9 以 mRNA 的方式進和利用合成或是胞外轉錄 (IVT, in vitro transcription) 的方式進行生成 gRNA 一起進行轉染

(A) Cas9 以 mRNA 的方式進和利用合成或是胞外轉錄 (IVT, in vitro transcription) 的方式進行生成 gRNA 一起進行轉染。

(B) 突變型的 Cas9(D10A) 以 mRNA 的型式和兩個合成或 IVT 來的 gRNA 一起進行轉染，進而在標的 DNA 上造成雙股 DNA 斷裂。

蛋白質：用轉染試劑轉染 Cas9 蛋白和 sgRNA，在細胞中直接開始進行基因修飾。

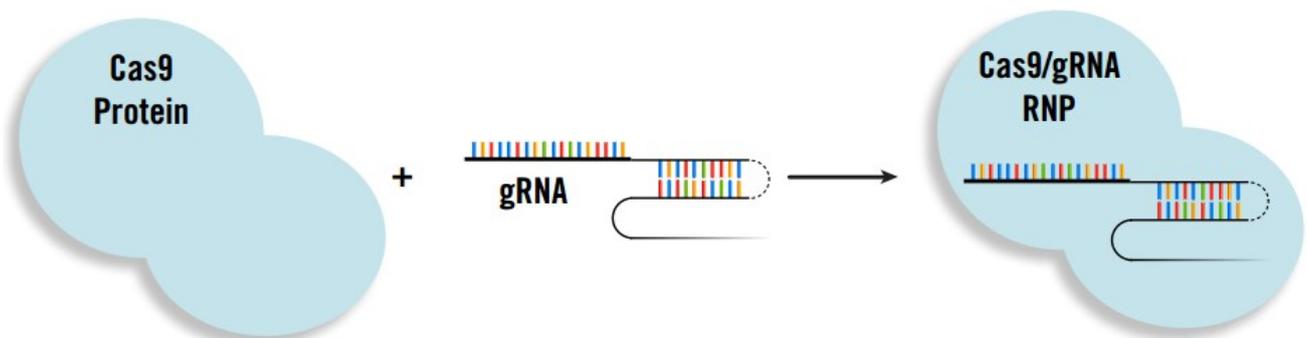


Fig. 9. Cas9 蛋白可以和 gRNA 形成 RNP (Ribonucleoprotein) complex 後，進行轉染。可以快速、高效率的進行基因修飾。

- 高效率的轉染 - 可以轉染 RNP complexes 至多種細胞。
- 高專一性 - 由於已經形成了 RNP complex，所以進入細胞後，可以即時進行基因修飾。
- 無 DNA - 沒有胞內突變的相關問題。

Introducing BioVision's CRISPR-Cas9 Products



BioVision 提供高純度及效率的 Cas9 蛋白, 以及利用 CRISPR/Cas9 進行基因修飾所需的小分子應用:

應用:

- 由 RNA 為主的基因修飾
- 基因調控

產品特色:

- 高純度, 高效率的 Cas9 Proteins
- 快速, 低細胞毒性的 CRISPR/Cas9 產品
- 使用 Cas9 蛋白具有高度的基因修飾效率
- 高專一性、高活性的 Cas9 產品
- 高專一性的 Cas9 抗體
- CRISPR 實驗中需要的小分子 (HDR Blockers 或 Enhancers)

Product Name	Cat. No.	Size
Gene Snipper™ Cas9 Protein	M1094-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 NLS	M1095-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 Nickase (D10A)	M1096-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 (D10A) NLS	M1097-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 Nickase (H840A)	M1098-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 (H840A) NLS	M1099-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 Null	M1100-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Gene Snipper™ Cas9 Null NLS	M1103-50, -250	50 pmol, 250 pmol
Cas9 Monoclonal Antibody	A1069-50	50 µg
HDR (Homology-Directed Repair) Enhancers	B1114-B1117; 1560; 2185	Varies
HDR (Homology-Directed Repair) Blockers	B1113-10, -50; B1126-10, -50	10 mg, 50 mg

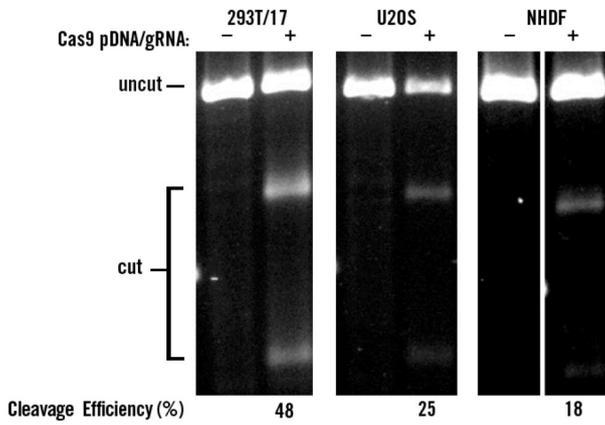


Fig. 10. 利用 Cas9 Plasmid DNA + Guide RNA Oligonucleotides 進行基因修飾. HEK293T/17, U2OS and NHDF cells were co-transfected with 0.5 μ g of Cas9 encoding pDNA (MilliporeSigma) and 50nM PPIB targeting two-part gRNA (Dharmacon) using *TransIT-X2*[®] (2 μ l/well of a 24-well plate, Mirus Bio). A T7E1 mismatch detection assay was used to measure cleavage efficiency at 48 hours post-transfection.

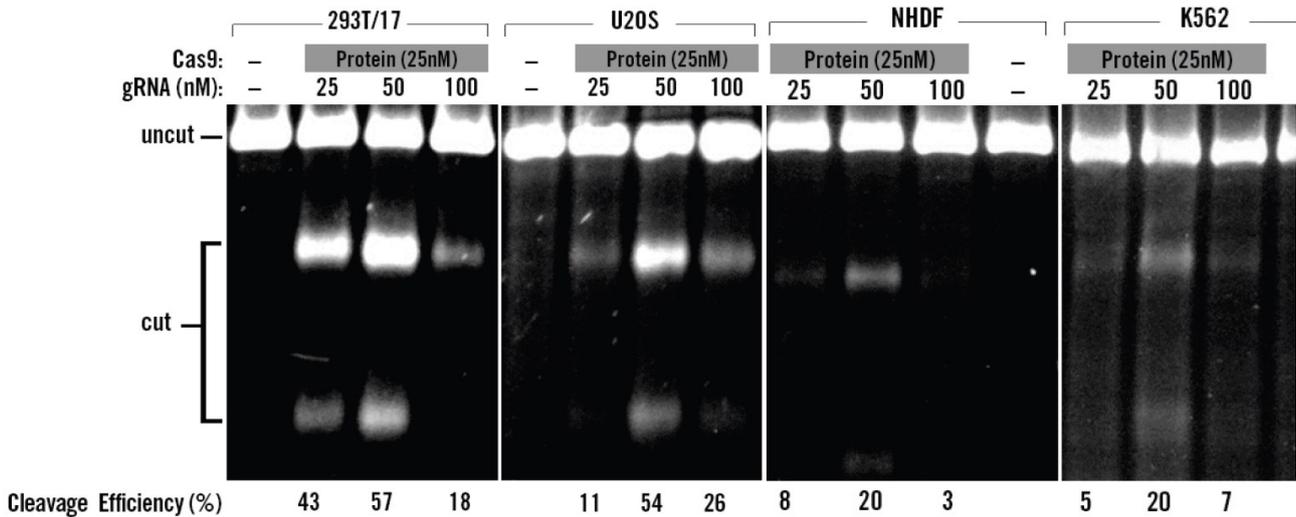


Fig. 11. 利用 Cas9 蛋白 + Guide RNA 形成 RNP Complexes. The RNP complex of PPIB targeting two-part gRNA (Dharmacon) and Cas9 protein (PNA Bio) was delivered into HEK293T/17, U2OS, NHDF and K562 cells using *TransIT-X2*[®] (1 μ l/well of a 24-well plate, Mirus Bio). A T7E1 mismatch detection assay was used to measure cleavage efficiency at 48 hours post-transfection. High levels of gene editing can be achieved in cells that were transfected with an RNP complex comprised of 50nM of gRNA and 25nM of Cas9 protein.

TransIT-X2[®] Dynamic Delivery System



MIR 6003	0.3 ml
MIR 6004	0.75 ml
MIR 6000	1.5 ml
MIR 6005	5 x 1.5 ml
MIR 6006	10 x 1.5 ml

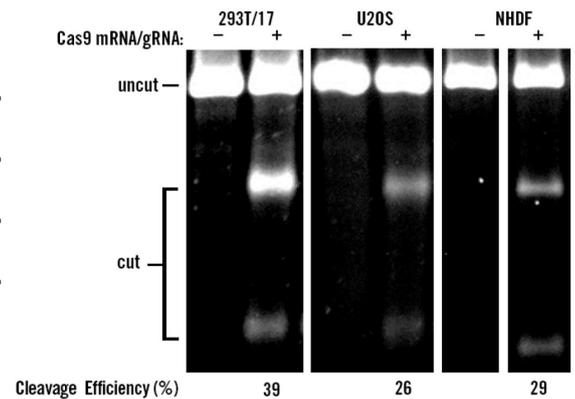


Fig. 12. 利用 Cas9 mRNA + Guide RNA Oligonucleotides 進行轉染. HEK293T/17, U2OS and NHDF cells were co-transfected with 0.5 μ g of Cas9 encoding mRNA, 5meC, (Trilink Biotechnologies) and 25nM of PPIB targeting two-part gRNA (Dharmacon) using *TransIT*[®]-mRNA Transfection Kit (0.5 μ l/well of 24-well plate of both mRNA Reagent and Boost, Mirus Bio). A T7E1 mismatch detection assay was used to measure cleavage efficiency at 48 hours post-transfection.

TransIT[®]-mRNA Transfection Kit



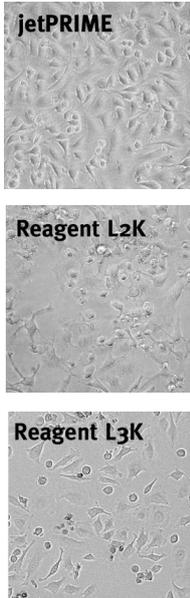
MIR 2225	0.4 ml
MIR 2250	1 ml
MIR 2255	5 x 1 ml
MIR 2256	10 x 1 ml

Superior transfection efficiency

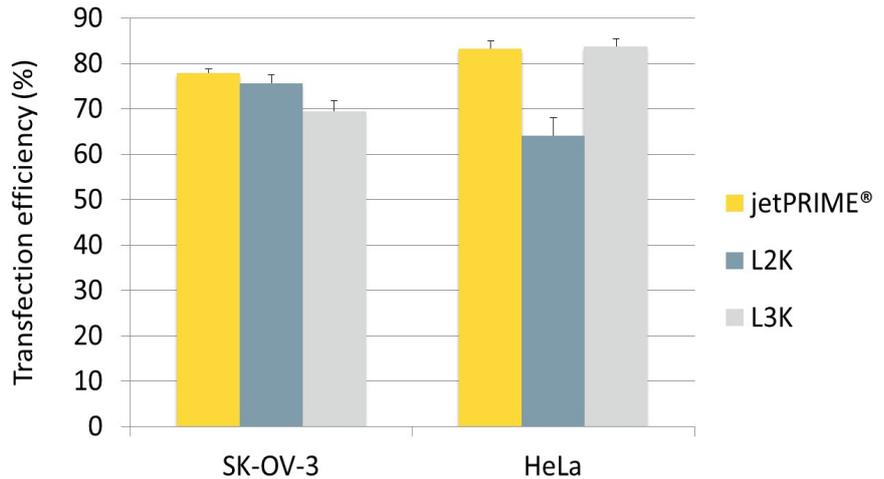
jetPRIME® is a **powerful transfection reagent** for day-to-day experiments. It leads to unusually high percentage of transfected adherent cell lines of various origins as well as primary cells.

Superior transfection efficiencies ranging between 70 and 90% were obtained with jetPRIME® reagent versus the top competitor's reagent for several commonly used cell lines (Fig.1).

★ Better cell viability



★高轉染效率 – 更多的轉殖基因表現量



★ jetPRIME 適用的部分細胞轉染效率

Cell Type	Cell Line	Transfected Molecule	Transfection Efficiency
Epithelial	A-549	DNA	70- 90%
		siRNA	90-95% at 10 nM siRNA
		siRNA and DNA cotransfection	90% silencing efficiency
	4T1	DNA	55%
	ADR	DNA	50%
	CHO	DNA	70%
	HeLa	DNA	70-90%
Epithelial	OVCAR-8	DNA	70%
	SK-OV-3	DNA	70- 80%
	HEK-293	DNA	80-90%
Fibroblast	NIH-3T3	DNA	Good
		siRNA	90% silencing efficiency at 20 nM siRNA
Myoblast	C2C12	DNA	70-90%
		siRNA	80 % silencing efficiency at 50 nM siRNA
Neuronal	SH-SY-5Y	DNA	70-80%
Trophoblast		DNA	50%
		siRNA	80-90% at 50 nM siRNA

★高效益 更節省!

減少單次試劑及 DNA 的用量

試劑	試劑 per well (µl)	DNA per well (µg)	轉染次數 per 1.5 ml
jetPRIME®	2-4 µl	1-2 µg	375-750
L2K	5-12.5	2.5	120-300
L3K	3.75-7.5	2.5	200-400

Cat. no	jet PRIME®	Buffer
114-15	1.5 ml	2 x 60 ml
114-75	5 x 1.5 ml	10 x 60 ml