



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107384894 B

(45)授权公告日 2019.10.22

(21)申请号 201710719879.9

C12N 15/90(2006.01)

(22)申请日 2017.08.21

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 104140981 A, 2014.11.12,

申请公布号 CN 107384894 A

CN 102530935 A, 2012.07.04,

(43)申请公布日 2017.11.24

俞文英等.氧化石墨烯纳米载体的生物相容性研究进展.《中国现代应用药学》.2017,第34卷(第5期),第777-781页.

(73)专利权人 华南师范大学

Li, T等.Hydrothermal Reduction of Polyethylenimine and Polyethylene Glycol Dual-Functionalized Nanographene Oxide for High-Efficiency Gene Delivery.《ACS APPLIED MATERIALS & INTERFACES》.2016,第8卷(第45期),第31311-31319页.

地址 510631 广东省广州市天河区中山大道西55号

(72)发明人 周小明 邢达 乐花花

审查员 徐益君

(74)专利代理机构 广州市华学知识产权代理有限公司 44245

代理人 崔红丽 裘晖

(51)Int.Cl.

C12N 9/22(2006.01)

权利要求书1页 说明书9页

C12N 15/113(2010.01)

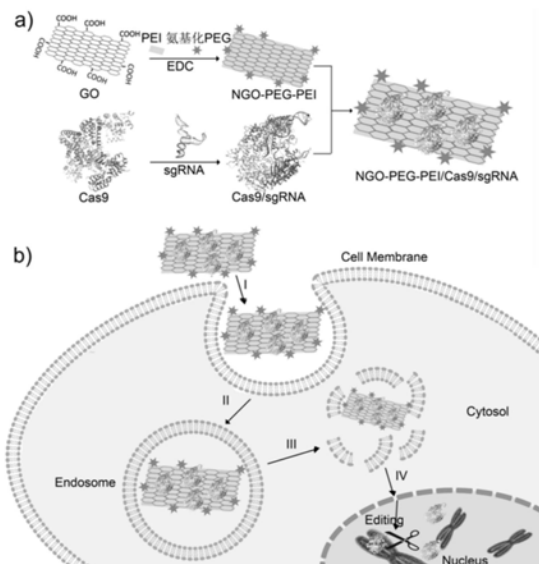
序列表2页 附图3页

(54)发明名称

功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法

(57)摘要

本发明公开一种功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法。本发明的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体是将氨基化PEG和PEI共价修饰到氧化石墨烯上,得到NGO-PEG-PEI;然后将Cas9蛋白和sgRNA在室温条件下组装成Cas9/sgRNA复合体;将NGO-PEG-PEI与Cas9/sgRNA复合体在室温条件下进行混合得到。将该复合体与靶基因进行混合,实现靶基因的编辑。本发明中功能化GO具有生物相容性好,负载效率高的特点,能够高效运载Cas9/sgRNA复合体进细胞来执行其功能;且具有保护Cas9/sgRNA复合体免于酶降解的功能,稳定性高。



1. 一种NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

该复合体是将PEI和氨基化PEG共价修饰到氧化石墨烯上,得到功能化氧化石墨烯NGO-PEG-PEI;然后将Cas9蛋白和sgRNA在室温条件下组装成Cas9/sgRNA复合体;将NGO-PEG-PEI与Cas9/sgRNA复合体在室温条件下进行混合,得到NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体;所述的PEI为聚乙烯亚胺。

2. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的氧化石墨烯为单层氧化石墨烯,浓度为0.5mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的氨基化PEG为六臂聚乙二醇氨基,分子量为1,200,浓度为0.25~0.5mg/mL。

4. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的PEI的分子量为10000,浓度为0.5~2.5mg/mL。

5. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的Cas9蛋白浓度为100nM;

所述的sgRNA浓度为100nM。

6. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的sgRNA体外转录用到的DNA模板中含有靶基因相关序列。

7. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的sgRNA体外转录用到的DNA模板的PCR扩增引物序列如下:

上游引物F:5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGGAGGACGGCAACATCCTGTTTTAGAGCTAGA AATAGC-3';

下游引物R:5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACT TGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3';

所述的sgRNA的序列为:AAGGAGGACGGCAACAUCUGUUUUAGAGCUAGAACGGAAUAAAAUUGAACG AUAUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAGCCACGGUGAAAGUCGGUGCUUUU。

8. 根据权利要求1所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,其特征在于:

所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体中NGO-PEG-PEI的终浓度为30 $\mu$ g/mL,Cas9/sgRNA的终浓度为100nM。

9. 一种功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法,其特征在于包括如下步骤:

将权利要求1~8任一项所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体与靶基因进行混合,实现靶基因的编辑。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在于:

所述的靶基因为靶基因EGFP。

## 功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,特别涉及一种功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法。

### 背景技术

[0002] CRISPR(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats)是在细菌中发现的适应性免疫反应系统,能有效抵抗入侵的病毒及外源DNA等对细菌造成的损伤。由II型CRISPR系统改造而来的CRISPR/Cas9系统由单链的sgRNA和有核酸内切酶活性的Cas9蛋白构成,sgRNA引导Cas9核酸酶在特定的DNA序列进行切割产生双链末端断裂,细胞可以通过HDR或NHEJ两种途径进行修复。CRISPR/Cas9技术作为生命科学领域突破性的研究技术手段,已经广泛的应用于基因编辑,基因表达的调控,基因组筛选,基因组动态的可视化观察,以及哺乳动物活细胞中的RNA的成像等研究中。因此,发展一种有效的CRISPR/Cas9系统运输载体,将源自原核生物的Cas9蛋白运载到真核生物体内,以发挥其多功能的应用价值十分有必要。

[0003] 最传统的方式是将Cas9蛋白和sgRNA共表达的质粒导入进细胞,该方法的操作过程是将sgRNA导向序列克隆到Cas9蛋白表达质粒中,与Cas9共表达。质粒被运输进细胞后,质粒载体在细胞核中分别转录为Cas9的mRNA和sgRNA;随后,mRNA通过核孔进入细胞质,翻译成Cas9蛋白,以组装成Cas9/sgrNA复合体;最终,Cas9/sgrNA复合体剪切靶基因中的特定DNA双链。目前将Cas9蛋白和sgRNA共表达的质粒导入进细胞的方式有两种:一种是机械法,一种是转染试剂法。机械类的导入方式,如电穿孔和细胞膜变形此类方法不需借助运输载体,但是需要借助特定的仪器,操作复杂,并且对细胞的杀伤性很大。使用质粒转染试剂是研究中常用到的手段,虽然此方法操作简单、对细胞的毒性相对上述方法较小,但依然摆脱不了质粒转染的弊端,如免疫应答反应,孵育时间长,以及脱靶效应导致效率低等问题,因此该方法在研究过程中并不是理想的技术手段。

[0004] 随着生物运输纳米载体技术的发展,一些用于直接运输Cas9/sgrNA复合体的载体,如细胞穿透肽(CPP),阳离子脂质体,DNA纳米球(NCs),Cas9En-ArgNP纳米复合物等已被发展起来用于解决质粒导入的问题。细胞穿透肽(CPP)以硫醚键的形式与Cas9核酸酶形成共价连接复合物,与sgRNA以静电吸附的方式,分别将Cas9蛋白和sgRNA运输进细胞,用于人细胞系中内源性基因破坏,然而该方法中Cas9蛋白和sgRNA并不是以组装好的复合体的形式运输进细胞,导致其基因编辑效率不高。基于阳离子脂质体的方法也被开发用来运输Cas9/sgrNA复合体进细胞内对基因组进行编辑,然而阳离子脂质体的不稳定性给Cas9/sgrNA复合体的运输带来了不便;DNA纳米球(NCs)因为其低毒性也被广泛的用作细胞运输载体,但是NCs是由外源的DNA形成,运载Cas9/sgrNA进入细胞后,可能带来新的免疫应答反应;Cas9En-ArgNP纳米复合物虽然可以将Cas9/sgrNA输送进细胞质,但是其对于细胞的毒性还需要进一步的验证。因此,非常有必要发展一种有效的、能够保护蛋白质和RNA免受生

理降解的平台来运输Cas9/sgRNA复合体进生物体内来执行其多方面的功能。

## 发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的首要目的在于提供NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法。

[0007] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0008] 本发明提供一种NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,将氨基化PEG和PEI共价修饰到氧化石墨烯上,得到功能化氧化石墨烯NGO-PEG-PEI;然后将Cas9蛋白和sgRNA在室温条件下组装成Cas9/sgRNA复合体;将NGO-PEG-PEI与Cas9/sgRNA复合体在室温条件下进行混合,得到NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体。

[0009] 所述的氧化石墨烯为单层氧化石墨烯,浓度为0.5mg/mL;

[0010] 所述的氨基化PEG为六臂聚乙二醇氨基(6ARM-PEG-NH<sub>2</sub>),分子量为1,200,浓度优选为0.25~0.5mg/mL,更优选为0.5mg/mL;

[0011] 所述的PEI为聚乙烯亚胺,分子量为10000,浓度优选为0.5~2.5mg/mL,更优选为2.5mg/mL;

[0012] 所述的Cas9蛋白浓度优选为100nM;

[0013] 所述的sgRNA浓度优选为100nM;

[0014] 所述的sgRNA体外转录用到的DNA模板中含有靶基因相关序列。

[0015] 优选的,所述的sgRNA体外转录用到的DNA模板的PCR扩增引物序列如下:

[0016] 上游引物F:5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGGAGGACGGCAACATCCTGTTTTAGAGC TAGAAATAGC-3' (划横线部分为T7启动子区);

[0017] 下游引物R:5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTT AACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'。

[0018] 所述的sgRNA的序列为:AAGGAGGACGGCAACAUCCUGUUUUAGAGCUAGAACGGAAUAAAAUUG AACGAUUAAGUCCGUUAUCAACUUGAAAGCCACGGUGAAAGUCGGUGCUUUU (划横线部分为靶基因相关序列)。

[0019] 优选的,所述的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体中NGO-PEG-PEI的终浓度为30μg/mL,Cas9/sgRNA的终浓度为100nM。

[0020] 本发明还提供一种功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法,包括如下步骤:

[0021] 将上述得到的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体与靶基因进行混合,实现靶基因的编辑。检测NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体细胞外对靶基因EGFP的剪切效果;最后,将NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体孵育AGS.EGFP细胞,用激光扫描共聚焦显微镜,流式细胞仪检测NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体对靶基因的剪切效率。

[0022] 优选的,所述的靶基因为靶基因EGFP。

[0023] 所述的EGFP基因扩增用的特异性引物如下:

[0024] 上游引物EGFP-F:5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3';

[0025] 下游引物EGFP-R:5'-TTACTTGTCAGCTCGTCCATGC-3'。

[0026] 所述的AGS. EGFP细胞为EGFP人胃癌稳转细胞株,由暨南大学石智老师提供。所述的功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法,具体包括如下步骤:

[0027] (1) NGO-PEG-PEI合成

[0028] 称取5mg GO(氧化石墨烯),加入10mL三蒸水,混合均匀后,超声处理1h,得到0.5mg/mL的GO分散液。向GO分散液中加入1.2g NaOH和1g ClCH<sub>2</sub>COOH,混合均匀后再超声处理1h,室温下静置2h。用三蒸水超滤清洗5次以上,至分散液呈中性为止,得到GO-COOH分散液。然后向GO-COOH分散液中加入5mg六臂聚乙二醇氨基,超声处理30min后加入5mg EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺),再超声处理30min。然后向溶液中加入25mg PEI,超声处理30min,最后加入10mg EDC超声处理30min后室温搅拌反应过夜。然后超滤清洗5次以上,得到NGO-PEG-PEI。

[0029] (2) sgRNA体外转录及纯化

[0030] 首先通过PCR扩增的方法得到用于转录sgRNA的DNA模板。在PCR过程中仅用两条长引物:上游引物F长65-nt,包含T7启动子区(TAATACGACTCACTATA)和20-nt与靶DNA相关序列等,下游引物R长80-nt,用于编码sgRNA的3'末端序列,两条引物中有20-nt长的完全互补序列(AAGGAGGACGGCAACATCCT)。PCR扩增得到sgRNA转录模板DNA,PCR产物(125-bp)通过琼脂糖凝胶电泳检测,然后使用PCR产物纯化试剂盒纯化该产物,将该产物用于T7RNA聚合酶介导的转录反应,体外转录出sgRNA(100-nt)。得到的sgRNA产物用RNA纯化试剂盒纯化,聚丙烯酰胺电泳检测后用于后续的实验或在-80℃条件下储存。

[0031] (3) 体外验证Cas9/sgrNA与NGO-PEG-PEI成功组装成NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体

[0032] 首先,设计FAM荧光探针(DNA-FAM)与部分sgRNA序列互补,将DNA-FAM与Cas9/sgrNA混合,组装成Cas9/sgrNA/DNA-FAM复合体,然后Cas9/sgrNA/DNA-FAM复合体与NGO-PEG-PEI在室温下混合。用荧光光谱仪检测Cas9/sgrNA,NGO-PEG-PEI,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA/DNA-FAM,Cas9/sgrNA/DNA-FAM和DNA-FAM的荧光。

[0033] (4) 体外验证NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA对靶基因EGFP的剪切效率

[0034] 以EGFP表达质粒为模板,PCR扩增出EGFP序列。Cas9蛋白与sgRNA以1:1的浓度比在反应缓冲液中于室温条件下孵育10分钟,形成Cas9/sgrNA复合体。然后将该复合体与NGO-PEG-PEI在室温下混合静止孵育10min,得到NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体。最后将NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体与靶DNA相互作用,反应条件为37℃孵育1h后95℃热变性处理10min。电泳检测靶DNA是否被NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体剪切。最终体系中NGO-PEG-PEI的终浓度为30μg/mL,Cas9和sgRNA的终浓度为100nM。

[0035] (5) 激光扫描共聚焦显微镜,流式细胞仪检测NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体对细胞内基因组DNA中EGFP的剪切效率

[0036] AGS. EGFP细胞于含10% (v/v) FBS(胎牛血清)的DMEM培养基,在细胞培养箱培养,培养箱中培养条件为:在CO<sub>2</sub>浓度为5%,湿度为90%,温度为37℃。在NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA孵育细胞前12h,将AGS. EGFP细胞接种到玻底细胞培养皿(约25,000个细胞/孔)中。当细胞密度达到70%时,换用不含FBS的DMEM培养基,用NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体(NGO-PEG-PEI在培养基中的终浓度为30μg/mL,Cas9/sgrNA终浓度为100nM)孵育细胞。4h

后,用含FBS的DMEM培养基替换原来的培养基另外培养2天,PBS缓冲液清洗细胞3次后,用浓度为4%的多聚甲醛在室温下孵育15分钟,然后用0.1%浓度的Triton-100清洗细胞3次。再用RNase A在室温下孵育细胞30分钟,然后用PBS缓冲液清洗细胞3次。再用PI在室温下孵育细胞30分钟,然后用PBS缓冲液清洗细胞3次。最后用激光扫描共聚焦显微镜进行分析。

[0037] 对于流式细胞仪分析,将AGS.EGFP细胞接种到6孔板中(每孔约100,000个细胞),处理条件与以前相同。两天后,PBS缓冲液清洗细胞3次后,用2.5%胰蛋白酶在37℃下消化处理细胞1~2分钟。随后,将细胞轻轻吹下并重悬于PBS中,通过流式细胞仪进行分析。

[0038] 步骤(2)中所述的引物序列如下:

[0039] 上游引物F:5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGGAGGACGGCAACATCCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3'(划横线部分为T7启动子区);

[0040] 下游引物R:5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3'。

[0041] 步骤(2)中所述的PCR扩增体系

[0042] 40μL扩增反应体系:

[0043]

反应物	加入量	终浓度
双蒸水	16μL	—
上游引物F	2μL	0.5μM
下游引物R	2μL	0.5μM
rTaq DNA聚合酶混合液	20μL	1×

[0044] 步骤(2)中所述的PCR反应在热循环PCR仪中进行,PCR扩增反应程序为:首先95℃下变性2分钟;循环条件如下:变性95℃20秒,退火60℃30秒,和72℃延伸15秒,上述程序总共进行35个循环;最后72℃延伸10分钟。

[0045] 步骤(2)中所述的sgRNA体外转录体系

[0046] 20μL体外转录反应体系:

[0047]

反应物	加入量	终浓度
双蒸水	11μL	—
模板DNA	0.5μL	500ng
10×RNA聚合酶缓冲液	2μL	1×
NTP混合物(10mM)	4μL	2mM
RNA酶抑制剂	0.5μL	20U
T7RNA聚合酶	2μL	20U

[0048] 步骤(2)中所述的sgRNA体外转录条件为:37℃恒温6小时。

[0049] 步骤(3)中所述的FAM荧光探针(DNA-FAM)序列为:5'-GGACGGCAACAT-FAM-3'。

[0050] 步骤(4)中所述的PCR扩增的引物序列如下:

[0051] 上游引物EGFP-F:5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3';

[0052] 下游引物EGFP-R:5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'。

[0053] 步骤(4)中所述的PCR扩增体系

[0054] 50 $\mu$ L扩增反应体系:

[0055]

反应物	加入量	终浓度
双蒸水	19 $\mu$ L	—
质粒DNA	1 $\mu$ L	100ng
上游引物EGFP-F	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
下游引物EGFP-R	2.5 $\mu$ L	0.5 $\mu$ M
rTaq DNA聚合酶混合液	25 $\mu$ L	1 $\times$

[0056] 步骤(4)中所述的PCR扩增反应在热循环PCR仪中进行,PCR扩增程序为:首先95 $^{\circ}$ C下变性5分钟;循环条件如下:变性95 $^{\circ}$ C 30秒,退火60 $^{\circ}$ C 30秒,和72 $^{\circ}$ C延伸60秒,上述程序总共进行35个循环;最后72 $^{\circ}$ C延伸10分钟。

[0057] 步骤(5)中激光扫描共聚焦显微镜分析时,EGFP和PI所用的激发光波长为488nm,EGFP的发射光波长为512nm,PI的发射光波长为633nm。流式统计分析所用的激发光波长为488nm。

[0058] 本发明的基本原理如图1所示:

[0059] 在这项研究中,我们首次利用功能化氧化石墨烯NGO-PEG-PEI开发了一种高效、稳定的CRISPR/Cas9运载系统。氧化石墨烯(GO)因为非常好的生物相容性,高的负载效率和低毒性等优点,已经广泛的被用作生物载体来运输药物,蛋白,DNA和RNA等进细胞。并且,功能化GO已经被证明能够保护mRNA和蛋白质免于酶水解,并且mRNA和蛋白质在被运输的过程中能够保持生理活性。其中,氨基化PEG修饰的GO具有良好的生理稳定性和生物相容性,氨基化PEI修饰的氧化石墨烯因为其质子海绵效应可以帮助运载的生物分子从内含体中逃逸。该方法的建立的原理是基于氨基化PEG和PEI同时共价修饰到GO上,使得GO不仅具备保护sgRNA和Cas9蛋白免于酶降解的功能,而且还可以帮助Cas9/sgrNA进细胞后发生内含体逃逸。导致Cas9/sgrNA在Cas9蛋白上的核定位序列的作用下能够被成功进入细胞核,在sgRNA引导识别靶基因序列,然后Cas9核酸酶在特定的DNA序列进行切割产生双链末端断裂。因为载体构造简单,稳定,毒性低并具有对保护Cas9/sgrNA的优势,如果将来Cas9/sgrNA介导的基因编辑成功的应用到临床治疗中,这种氧化石墨烯介导的Cas9/sgrNA复合体运载将为临床治疗提供更多的便携。

[0060] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0061] (1) 该方法利用功能化GO作为运输载体,构建简单,可以达到低毒性的目的;

[0062] (2) 氨基化PEG和PEI共修饰的GO具有生物相容性好,负载效率高的特点,能够高效运载Cas9/sgrNA复合体进细胞来执行其功能。

[0063] (3) 氨基化PEG和PEI共修饰的GO具有保护Cas9/sgrNA复合体免于酶降解的功能,稳定性高。

## 附图说明

[0064] 图1是功能化氧化石墨烯高效运输CRISPR/Cas9用于基因编辑的原理图。

[0065] 图2是NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA的荧光表征。

[0066] 图3是体外对NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA活性的验证。

[0067] 图4是NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体作用于细胞内靶基因的激光扫描共聚焦显微镜分析结果。

[0068] 图5是NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体作用于细胞内靶基因的流式统计结果。

### 具体实施方式

[0069] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0070] 下列实施例中未注明具体实验条件的实验方法,通常按照常规实验条件或按照制造厂商所建议的实验条件。

[0071] 实施例1

[0072] 1. NGO-PEG-PEI合成

[0073] 单层氧化石墨烯片购自南京先丰纳米材料科技有限公司(南京,中国),氨基化PEG(六臂聚乙二醇氨基)从上海金畔生物科技有限公司(上海,中国)购买,PEI从上海阿拉丁生化科技股份有限公司(上海,中国),EDC(N-乙基-N'-(3-二甲基氨丙基)碳二亚胺)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(上海,中国),ClCH<sub>2</sub>COOH从上海麦克林生化科技有限公司(上海,中国)购买,NaOH从生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国)购买。

[0074] 称取5mg单层氧化石墨烯片,加入10mL三蒸水,混合均匀后,用超声处理1h,得到0.5mg/mL的G0分散液。向G0分散液中加入1.2g NaOH和1g ClCH<sub>2</sub>COOH,混合均匀后再超声处理1h,室温下静置2h。用三蒸水超滤离心清洗5次以上,至溶液呈中性,得到G0-COOH分散液。然后向G0-COOH分散液中加入5mg氨基化PEG(六臂聚乙二醇氨基),超声处理30min,然后加入5mg EDC,再超声处理30min。然后向溶液中加入25mg PEI,超声处理30min,最后加入10mg EDC超声处理30min后室温搅拌反应过夜。然后超滤离心清洗5次以上,得到NGO-PEG-PEI溶液。NGO-PEG-PEI溶液直接用于后续实验或者储存于4℃条件下。

[0075] 2. sgRNA体外转录及纯化

[0076] 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国)合成,PCR产物纯化试剂盒和三磷酸核苷酸的(NTP)混合物从生工生物工程(上海)股份有限公司购买。PCR扩增用到的Taq DNA聚合酶混合液是由东胜生物科技有限公司(广州,中国)提供。SYBR Green I染料从赛百盛基因有限责任公司(北京,中国)购买。RNA酶抑制剂,DL 2000DNA Marker,其中包含2000-,1000-,750-,500-,250-和100-bp的DNA片段从宝生物工程有限公司(大连,中国)购买。T7RNA聚合酶及10×RNA聚合酶反应缓冲液从NEB(北京,中国)购买。RNA纯化试剂盒从天根生化科技(北京)有限公司(北京,中国)购买。

[0077] 通过PCR的方法扩增得到用于转录sgRNA的DNA模板。该PCR用到两条长引物:上游引物F长65-nt,包含T7启动子区(TAATACGACTCACTATA)和20-nt与靶DNA相关序列等,下游引物R长80-nt,用于编码sgRNA的3'末端序列,两条引物中有20-nt长的完全互补序列。PCR扩增反应体积为40μL体系,包含:终浓度1×Taq DNA聚合酶混合液,终浓度为0.5μM的每种引物(上游引物F和下游引物R)。用于sgRNA转录模板的PCR扩增产物的长度为125bp。所用引物序列如下:

[0078] 上游引物F:5'-GAAATTAATACGACTCACTATAGGGAAGGAGGACGGCAACATCCTGTTTTAGAGC TAGAAATAGC-3'(划横线部分为T7启动子区);



[0079] 下游引物R:5'-AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTT AACTTGCTA TTTCTAGCTCTAAAAC-3'。

[0080] PCR扩增反应在热循环PCR仪中进行,PCR扩增程序为:首先95℃下变性2分钟;循环条件如下:变性95℃20秒,退火60℃30秒,和72℃延伸15秒,上述程序总共进行35个循环;最后72℃延伸10分钟。PCR产物(125-bp)通过琼脂糖凝胶电泳检测,然后使用PCR产物纯化试剂盒纯化该产物,用于sgRNA转录模板,参与T7RNA聚合酶介导的转录反应,体外转录出sgRNA(100-nt)。

[0081] T7RNA聚合酶介导的转录反应体积为20μL体系,包括终浓度为:20U T7RNA聚合酶,20U RNA酶抑制剂,2mM NTP混合物,1×RNA聚合酶反应缓冲液以及500ng模板DNA。该反应在37℃条件下恒温6小时。得到的sgRNA产物用RNA纯化试剂盒纯化,聚丙烯凝胶电泳检测后用于后续的实验或在-80℃条件下储存。长度为100-nt的sgRNA序列中有连续的20-nt与靶基因EGFP碱基互补配对。

[0082] 3. 验证Cas9/sgrNA与NGO-PEG-PEI成功组装成NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体

[0083] 引物及FAM荧光探针(DNA-FAM)由生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国)合成。

[0084] 首先,设计FAM荧光探针(DNA-FAM)与部分sgRNA序列互补,将DNA-FAM与Cas9/sgrNA混合,组装成Cas9/sgrNA/DNA-FAM复合体,然后Cas9/sgrNA/DNA-FAM复合体与NGO-PEG-PEI在室温下混合。用荧光光谱仪检测Cas9/sgrNA,NGO-PEG-PEI,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA/DNA-FAM,Cas9/sgrNA/DNA-FAM和DNA-FAM的荧光。所述的FAM荧光探针(DNA-FAM)序列为:5'-GGACGGCAACAT-FAM-3'。

[0085] NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA/DNA-FAM的荧光表征,结果如图2所示,荧光基团为FAM。从图2中得知,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA/DNA-FAM的荧光相比较于Cas9/sgrNA/DNA-FAM有明显的淬灭现象因为NGO-PEG-PEI与FAM之间发生了荧光共振能传递效应,可以得出结论:Cas9/sgrNA/DNA-FAM与NGO-PEG-PEI组装成功。

[0086] 4. NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA对靶基因EGFP的剪切效率

[0087] 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国)合成。PCR产物纯化试剂盒从生工生物工程(上海)股份有限公司购买。PCR扩增用到的Taq DNA聚合酶混合液是由东胜生物科技有限公司(广州,中国)提供。Cas9蛋白从NEB(北京,中国)购买。用于EGFP表达的质粒是从Addgene(北京,中国)购买质粒(pLK0.1puro)后,改造成EGFP表达质粒(pLK0.1puro-EGFP)。

[0088] 以EGFP表达质粒(pLK0.1puro-EGFP)为模板,PCR扩增出EGFP序列,长720bp。PCR扩增反应体积为50μL体系,包含:终浓度1×Taq DNA聚合酶混合液,终浓度为0.5μM的每种引物(上游引物EGFP-F和下游引物EGFP-R)以及20ng/μL的模板DNA。所用引物序列如下:

[0089] 上游引物EGFP-F:5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAG-3' ;

[0090] 下游引物EGFP-R:5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'。

[0091] PCR扩增反应在热循环PCR仪中进行,PCR扩增程序为:首先95℃下变性5分钟;循环条件如下:变性95℃30秒,退火60℃30秒,和72℃延伸60秒,上述程序总共进行35个循环;最后72℃延伸10分钟。得到的PCR产物经琼脂糖凝胶电泳检测分析后用PCR纯化试剂盒纯化回收,用于NGO-PEG-PEI/Cas9/sgrNA复合体剪切的靶DNA。Cas9蛋白与sgRNA以1:1的浓度比在

室温条件下,于Cas9蛋白对应的Buffer中孵育10分钟,形成Cas9/sgRNA复合体。然后将Cas9/sgRNA复合体与NGO-PEG-PEI在室温下静止孵育10min,得到NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体。最终溶液中NGO-PEG-PEI的终浓度为30 $\mu$ g/mL,Cas9和sgRNA的终浓度为100nM。将NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体与靶DNA在37 $^{\circ}$ C条件下共孵育1h后,95 $^{\circ}$ C热变性10min,电泳分析剪切后的条带。以不加NGO-PEG-PEI和Cas9作为对照。

[0092] 体外对NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA活性的验证,结果如图3所示,从图3左中得知,当Cas9/sgRNA与NGO-PEG-PEI组装以后,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA对EGFP的剪切活性相比较于Cas9/sgRNA没有发生明显变化;从图3右中得知,Cas9/sgRNA在RNA酶处理后失去了对EGFP的剪切活性,而当Cas9/sgRNA与NGO-PEG-PEI组装成NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体以后,用同样的RNA酶处理NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA对EGFP的剪切活性没有受到影响。可以得出结论:(1) Cas9/sgRNA与NGO-PEG-PEI组装成功以后,得到的NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体对EGFP有剪切活性,并且其活性没有受到影响。(2) NGO-PEG-PEI对Cas9/sgRNA有保护作用,因此可以用来提高CRISPR/Cas9系统的稳定性。

[0093] 5. 激光扫描共聚焦显微镜,流式细胞仪检测NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体对细胞内基因组DNA中EGFP的剪切效率

[0094] PI(碘化丙啶),FBS和DMEM购买自赛默飞世尔科技(中国)有限公司(上海,中国)。AGS. EGFP细胞由暨南大学石智老师提供。RNase A, PBS缓冲液,胰蛋白酶从生工生物工程(上海)股份有限公司(上海,中国)购买。多聚甲醛购买自天津市大茂化学试剂厂(天津,中国)。

[0095] AGS. EGFP细胞于含10% (v/v) FBS的DMEM培养基,在细胞培养箱培养,培养箱中培养条件为:在CO<sub>2</sub>浓度为5%,湿度为90%,温度为37 $^{\circ}$ C。在NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA孵育细胞前12h,将AGS. EGFP细胞接种到玻底细胞培养皿(约25,000个细胞/孔)中。当细胞达到70%密度达到时,换用不含FBS的DMEM培养基,用NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体(NGO-PEG-PEI在培养基中的终浓度为30 $\mu$ g/mL,Cas9/sgRNA终浓度为100nM)孵育细胞。4h后,用含FBS的DMEM培养基替换原来的培养基另外培养2天,PBS缓冲液清洗细胞3次后,用浓度为4%的多聚甲醛在室温下孵育15分钟,然后用0.1%浓度的Triton-100清洗细胞3次。再用RNase A在室温下孵育细胞30分钟,然后用PBS缓冲液清洗细胞3次。再用PI在室温下孵育细胞30分钟,然后用PBS缓冲液清洗细胞3次。最后用激光扫描共聚焦显微镜进行分析,EGFP和PI所用的激发光波长为488nm,EGFP的发射光波长为512nm,PI的发射光波长为633nm。

[0096] 对于流式细胞仪分析,将AGS. EGFP细胞接种到6孔板中(每孔约100,000个细胞),处理条件与以前相同。两天后,PBS缓冲液清洗细胞3次后,用2.5%胰蛋白酶在37 $^{\circ}$ C下消化处理细胞1~2分钟。随后,将细胞轻轻吹下并重悬于PBS中,通过流式细胞仪进行分析,所用的激发光波长为488nm。

[0097] NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体细胞内对靶基因的剪切分析,结果如图4所示,从图4中得知,与对照组的AGS. EGFP细胞相比,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA处理后的细胞的EGFP荧光有明显减弱现象,NGO-PEG-PEI/Cas9/non-targeting sgRNA和Cas9/sgRNA处理的细胞的EGFP荧光没有受到明显影响。可以得出结论:NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体对细胞内EGFP的表达有明显的影 响,即NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体在细胞内对靶基因也有剪切活性。

[0098] NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体作用于细胞内靶基因的流式分析统计结果,如图5所示,从图5中得知,对照组的AGS.EGFP细胞相比,NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA处理后的细胞有接近39%的细胞失去EGFP荧光,而NGO-PEG-PEI/Cas9/non-targeting sgRNA和Cas9/sgRNA处理的细胞没有受到明显影响。流式统计结果与前面激光扫描共聚焦显微镜分析结果一致。进一步验证NGO-PEG-PEI/Cas9/sgRNA复合体在细胞内对靶基因也有剪切活性。

[0099] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] SEQUENCE LISTING
- [0002] <110> 华南师范大学
- [0003] <120> 功能化氧化石墨烯高效运载CRISPR/Cas9用于基因编辑的方法
- [0004] <130> 1
- [0005] <160> 6
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 65
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <220>
- [0012] <223> 上游引物F
- [0013] <400> 1
- [0014] gaaattaata cgactcacta tagggaagga ggacggcaac atcctgtttt agagctagaa 60
- [0015] atagc 65
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 80
- [0018] <212> DNA
- [0019] <213> Artificial Sequence
- [0020] <220>
- [0021] <223> 下游引物R
- [0022] <400> 2
- [0023] aaaagcaccg actcgggtgcc actttttcaa gttgataacg gactagcctt attttaactt 60
- [0024] gctatttcta gctctaaaac 80
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 100
- [0027] <212> RNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <220>
- [0030] <223> sgRNA的序列
- [0031] <400> 3
- [0032] aaggaggacg gcaacauccu guuuuagagc uagaacggaa uaaaauugaa cgauauaguc 60
- [0033] cguuaucaac uugaaagcca cggugaaagu cggugcuuuu 100
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 18
- [0036] <212> DNA
- [0037] <213> Artificial Sequence
- [0038] <220>

- [0039] <223> 上游引物EGFP-F  
[0040] <400> 4  
[0041] atggtgagca agggcgag 18  
[0042] <210> 5  
[0043] <211> 23  
[0044] <212> DNA  
[0045] <213> Artificial Sequence  
[0046] <220>  
[0047] <223> 下游引物EGFP-R  
[0048] <400> 5  
[0049] ttacttgtac agctcgtcca tgc 23  
[0050] <210> 6  
[0051] <211> 12  
[0052] <212> DNA  
[0053] <213> Artificial Sequence  
[0054] <220>  
[0055] <223> FAM荧光探针 (DNA-FAM) 序列  
[0056] <220>  
[0057] <221> FAM修饰  
[0058] <222> (12) .. (12)  
[0059] <400> 6  
[0060] ggacggcaac at 12

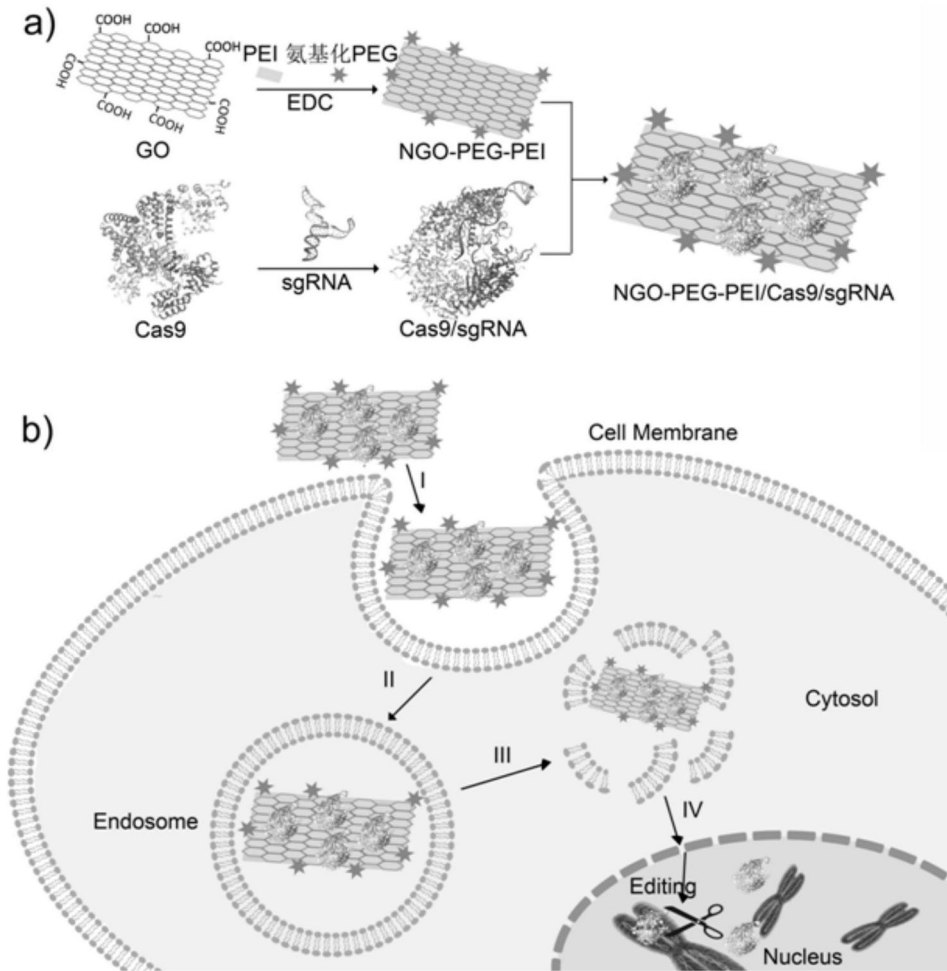


图1

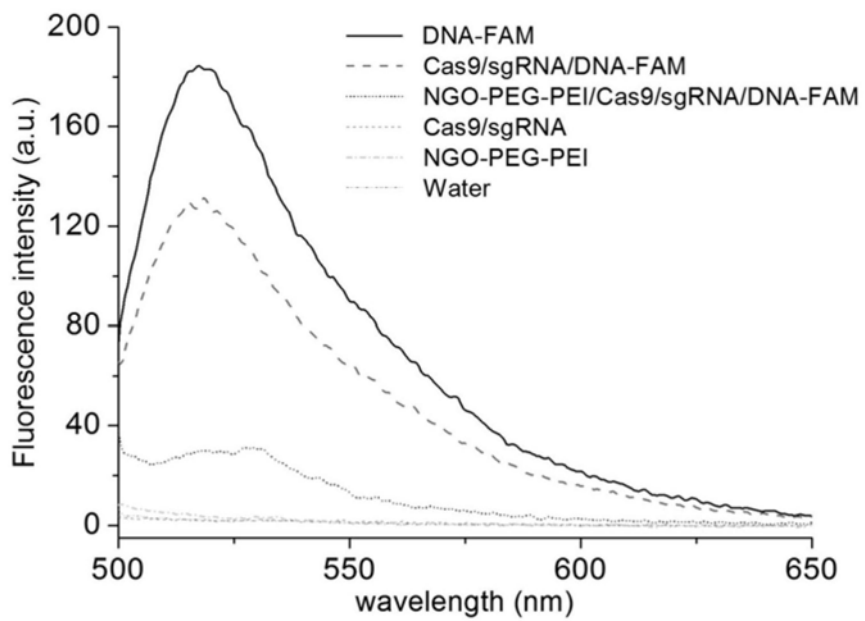


图2

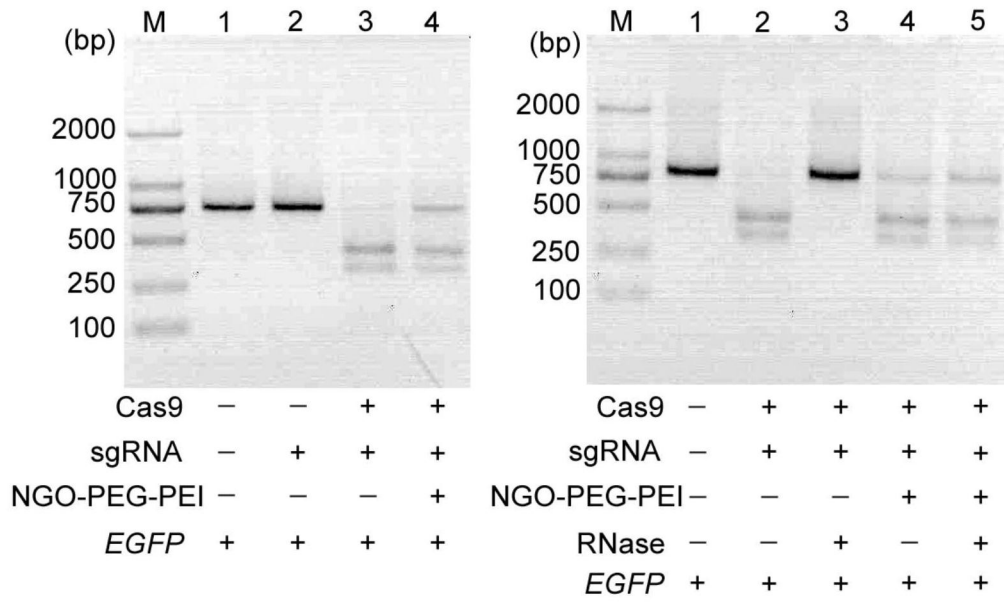


图3

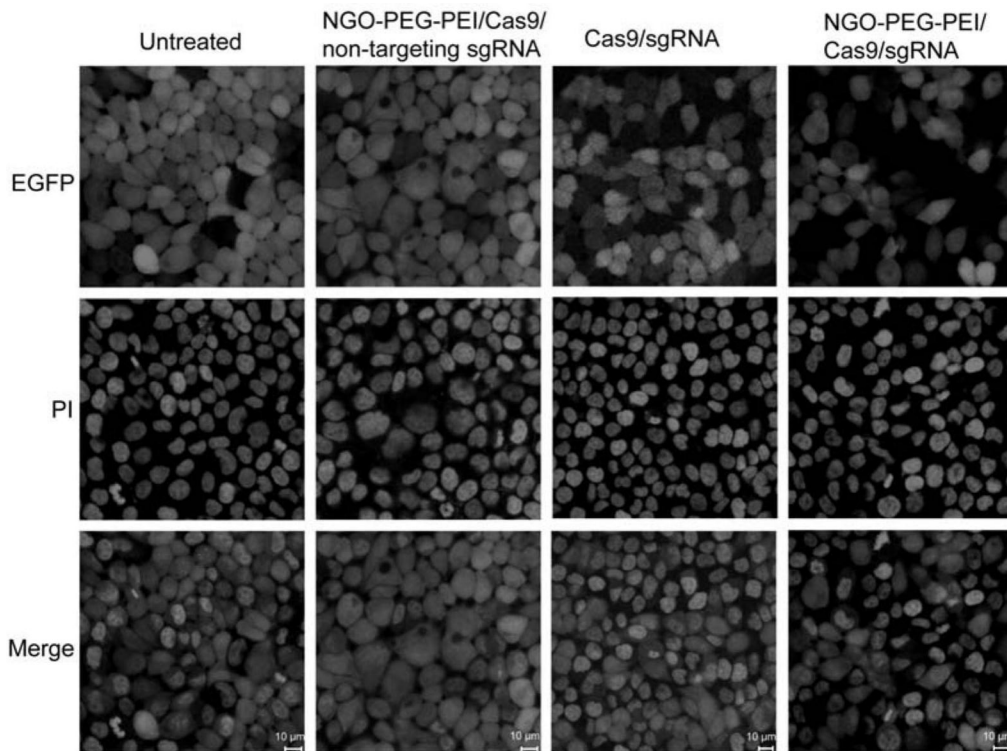


图4

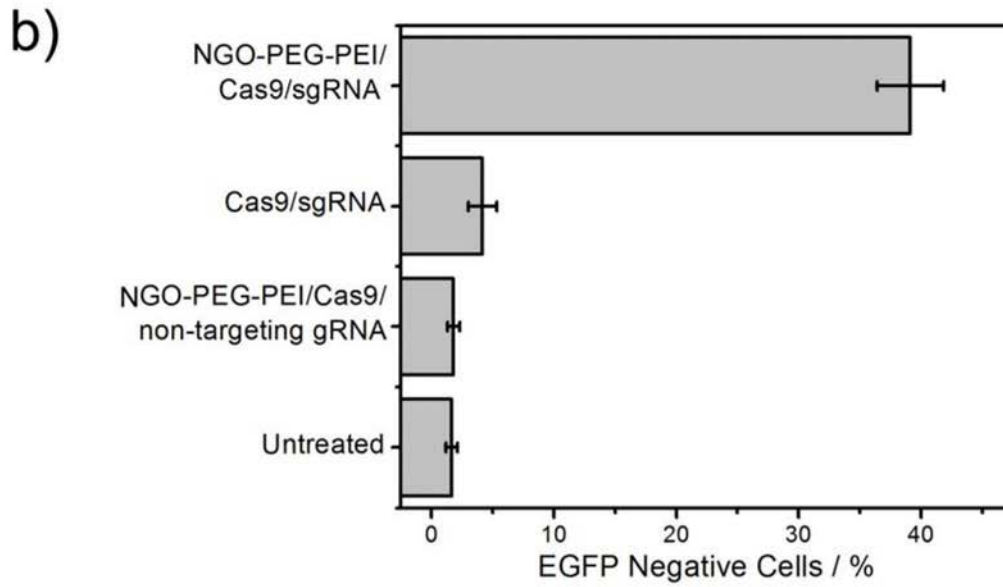
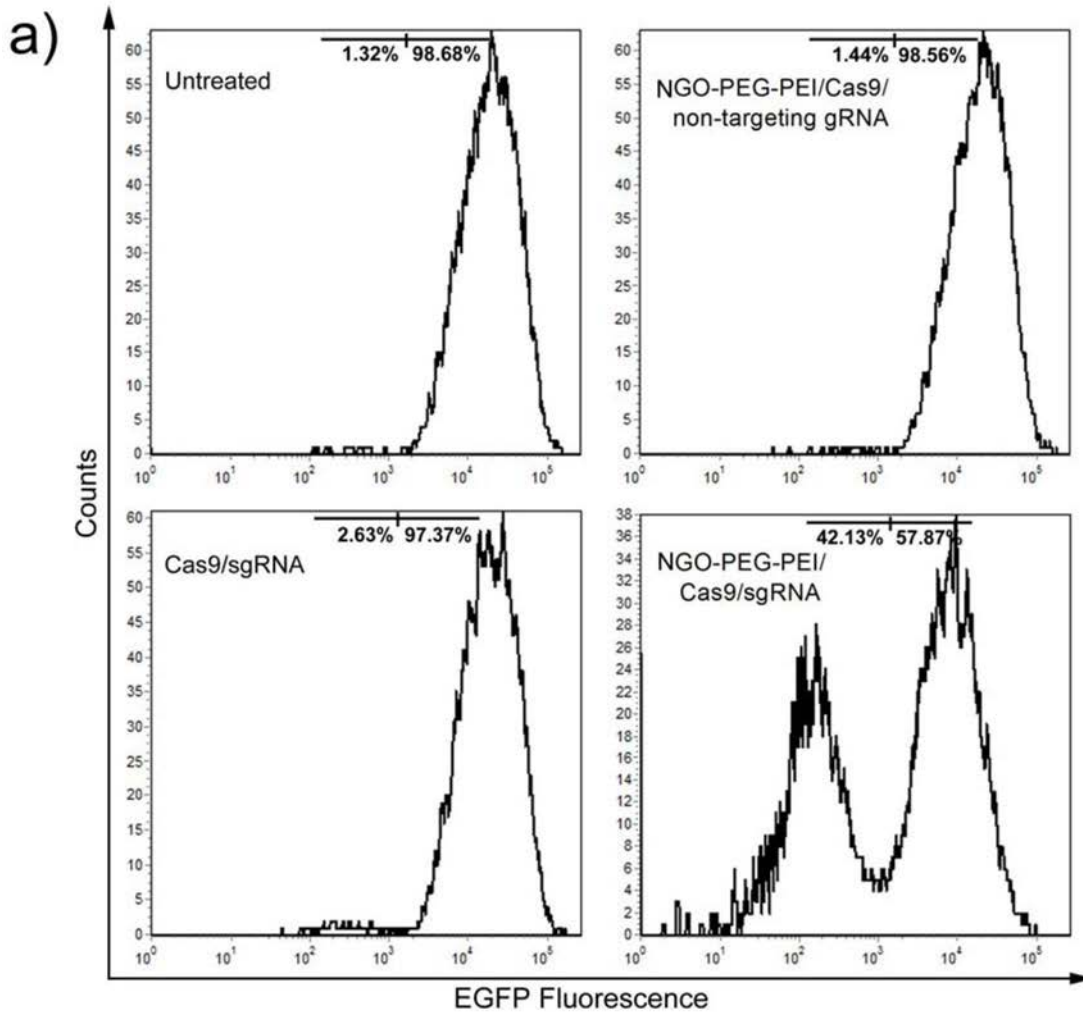


图5