



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111979226 B

(45) 授权公告日 2022. 11. 08

(21) 申请号 202010906645.7

(22) 申请日 2020.09.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111979226 A

(43) 申请公布日 2020.11.24

(73) 专利权人 广州鼓润医疗科技有限公司
地址 510000 广东省广州市黄埔区(国际生物岛)螺旋3路6号第2层202-2单元

(72) 发明人 程欢欢 陈莹 谢红娴 兰凯
黄龙

(74) 专利代理机构 哈尔滨市松花江专利商标事务所 23109
专利代理师 岳泉清

(51) Int. Cl.
C12N 15/10 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2017088833 A1, 2017.03.30

CN 109971842 A, 2019.07.05

US 2017204407 A1, 2017.07.20

US 2016251648 A1, 2016.09.01

Shengdar Q Tsai等.CIRCLE-seq: a highly sensitive in vitro screen for genome-wide CRISPR-Cas9 nuclease off-targets.《Nat Methods》.2017,第14卷(第6期),第607-614页.

Cicera R Lazzarotto等.Defining CRISPR-Cas9 genome-wide nuclease activities with CIRCLE-seq.《Nat Protoc》.2018,第13卷(第11期),第2615-2642页.

审查员 郭鑫鑫

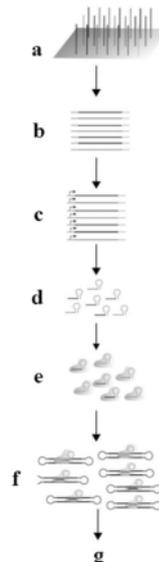
权利要求书3页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法

(57) 摘要

一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,涉及基因工程技术领域。本发明的目的是要解决现有sgRNA脱靶检测方法每次只能检测一条sgRNA是否脱靶,以及如何筛选切割效率高、脱靶低的sgRNA的问题。本发明提供一种高通量的sgRNA脱靶检测方法,以sgRNA pool形式进行体外转录,能够同时检测成千上万条sgRNA的在靶或脱靶情况;根据在靶reads数判断切割效率,进而根据脱靶位点及脱靶reads数判断脱靶效应的高低。本发明可获得一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法。



1. 一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,其特征在于该方法按以下步骤完成:

一、收集 $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个细胞至离心管,离心,弃去培养基,PBS洗涤一次,再离心,弃去上清液,提取离心后固相物的细胞基因组DNA;

二、将步骤一提取的基因组DNA打断成为300bp~700bp片段,然后以DNA纯化磁珠进行纯化;

三、对步骤二纯化的DNA进行末端修复、加A尾、加茎环结构接头,然后采用核酸外切酶处理,再使用ddNTP处理;

步骤三中ddNTP处理的反应体系和程序:

10×Thermopol缓冲液	5μL
ddATP (10mM)	0.5μL
Therminator DNA聚合酶	0.5μL
酶切后的DNA	44μL
总体积	50μL

反应程序:75℃,30min;然后用1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积25μL,Qubit测量DNA浓度 $>6.4\text{ng}/\mu\text{L}$;

四、设计并合成sgRNA oligo文库,进行PCR扩增及体外转录,得到sgRNA pool;

五、采用Cas酶及步骤四得到的sgRNA pool对步骤三经ddNTP处理后的DNA进行体外切割;

六、对体外切割后的DNA进行末端修复、加A尾、加线性接头,线性接头的5'端带有生物素修饰;

步骤六中采用ABclonal快速DNA建库试剂盒进行DNA末端修复、加A尾、加线性接头;DNA末端修复、加A尾的具体反应体系及反应程序如下:

步骤五处理后的DNA	37μL
末端修复缓冲液	10μL
末端修复酶	3μL
总体积	50μL

反应程序:20℃反应30min;65℃反应30min,得到末端修复混合物;

末端修复混合物	50μL
Ligase MM	16.5μL
退火的线性接头(5μM)	8μL
Ligase Mix	3μL
总体积	77.5μL

反应程序:22℃反应1h,然后用1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积41μL;

七、将链霉亲和素磁珠重悬,然后加入1×Bind and wash buffer室温旋转混匀洗涤,离心,去除上清,重复洗涤、离心、去除上清3次,利用2×Bind and wash buffer重悬链霉亲和素磁珠,然后加入步骤六切割处理后的DNA,室温旋转混匀,置于磁力架,去除上清,得到链霉亲和素磁珠吸附的DNA;

八、利用USER酶处理链霉亲和素磁珠吸附的DNA,切开接头的茎环结构,然后以USER酶

处理后的DNA为模版,进行回收PCR扩增,然后进行索引PCR,得到待上机文库,进行文库质检及测序;

九、文库下机后进行生物信息学分析,将生物信息学分析得到的各个脱靶位点与每个sgRNA进行比对,得到每个sgRNA对应的在靶reads和脱靶位点、个数及对应reads信息。

2. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,其特征在于步骤二中利用仪器Bioruptor进行DNA打断,参数:DNA 50ng/ μ L;体积100 μ L;15sON-90sOFF;6-8次循环;打断后的DNA以DNA纯化磁珠进行纯化,洗脱体积37 μ L。

3. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,其特征在于步骤三中采用试剂盒进行DNA末端修复、加A尾、加茎环结构接头,其中DNA末端修复、加A尾的具体反应体系及反应程序如下:

试剂盒:ABclonal 快速DNA建库试剂盒

步骤二纯化后DNA (1-5ug)	37 μ L
末端修复缓冲液	10 μ L
末端修复酶	3 μ L
总体积	50 μ L

反应程序:20 $^{\circ}$ C 30min;65 $^{\circ}$ C 30min,得到末端修复混合物;

加茎环结构接头的具体反应体系及反应程序如下:

末端修复混合物	50 μ L
LigaseMM	16.5 μ L
退火后的接头 (40 μ M)	7.5 μ L
LigaseMix	3 μ L
总体积	77 μ L

反应程序:22 $^{\circ}$ C 1h,然后1 \times DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积30 μ L。

4. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,其特征在于步骤三中核酸外切酶酶切的反应体系和程序如下:

10 \times 核酸外切酶 I 缓冲液	5 μ L
Lambda 核酸外切酶	8 μ L
核酸外切酶 I	2 μ L
核酸外切酶 III	1 μ L
加入接头的DNA (1 ug)	34 μ L
总体积	50 μ L

反应程序:37 $^{\circ}$ C 2h;75 $^{\circ}$ C 10min,然后用1 \times DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积44 μ L。

5. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,其特征在于步骤五中Cas酶体外切割的反应体系如下:

10 \times Cas9 Nuclease Reaction缓冲液	5 μ L
Cas9 Nuclease,S. pyogenes (1uM)	4.5 μ L
体外转录的gRNA (3uM)	1.5 μ L
总体积	11 μ L

反应程序如下:室温结合10min,然后加入步骤三处理后的DNA 50ng~1000ng,以无酶水

补齐体积至50 μ L, 37 $^{\circ}$ C 孵育1h, 再用50 μ L DNA 纯化磁珠纯化, 洗脱体积37 μ L。

6. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法, 其特征在于步骤八中USER酶处理的方法为, 向步骤七中的DNA 中加入USER酶, 在37 $^{\circ}$ C 下反应30min, 然后置于磁力架2min, 去除上清, 加入10mM Tris-HCl 室温旋转混匀洗涤5min, 置于磁力架2min, 去除上清, 共用10mM Tris-HCl 洗涤2次; 然后加入20 μ L 10mM Tris-HCl 重悬。

7. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法, 其特征在于步骤八中回收PCR反应体系及反应程序如下:

USER酶处理后DNA	20 μ L
巢式PCR 正向引物 (10 μ M)	2.5 μ L
巢式PCR 反向引物 (10 μ M)	2.5 μ L
KAPA HiFi 热启动mix (2x)	25 μ L
总体积	50 μ L

反应程序: 98 $^{\circ}$ C 45s; 12 cycles of (98 $^{\circ}$ C 15s, 61 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min), 72 $^{\circ}$ C 2min, 4 $^{\circ}$ C 保持, 然后置于磁力架2min, 将上清转移至新Ep管, 取1 μ L~10 μ L 上清液加水稀释50倍。

8. 根据权利要求1所述的一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法, 其特征在于步骤八中索引PCR的反应体系和程序如下:

稀释后的DNA	12 μ L
H ₂ O	4 μ L
I50x接头引物 (10 μ M)	2 μ L
I70x接头引物 (10 μ M)	2 μ L
KAPA HiFi 热启动mix (2x)	20 μ L
总体积	40 μ L

反应程序: 98 $^{\circ}$ C 45s; 12 cycles of (98 $^{\circ}$ C 15s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 2min), 72 $^{\circ}$ C 2min, 4 $^{\circ}$ C 保持, 0.7 \times DNA 纯化磁珠纯化, 洗脱体积50 μ L, 0.6 \times - 0.2 \times DNA 纯化磁珠双端筛选, 洗脱体积20 μ L, 得到200-600bp的DNA文库。

一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,具体涉及一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法。

背景技术

[0002] CRISPR-Cas9系统源自细菌及古生菌的获得性免疫系统,由于操作简单高效而成为一种强大的基因编辑工具。自2013年初发现CRISPR/Cas9在细胞内实现DNA精确编辑开始,近年来呈现井喷式发展。相对于ZFN、TALEN等基因编辑技术来说,其更加简单、经济、容易操作,令其成为迄今为止最为有效、低廉和容易的基因编辑方法,其在基因编辑(包括基因敲除、敲入、点突变)、基因治疗(镰状细胞贫血HBB基因修复等)、活细胞成像(如Cas-FISH)、功能基因筛选(CRISPRi/a正负向筛选)、靶向捕获(CRISPR-capture)等方面具有极重要的应用意义。但是,在其广泛应用的背后,CRISPR/Cas9系统有一个致命的缺点——容易脱靶,即在预期靶点以外的位点上产生额外的DNA剪切或编辑。脱靶可引起非预期的基因突变,甚至导致癌变发生,限制了CRISPR基因编辑的临床应用。

[0003] 然而脱靶是CRISPR/Cas9系统应用于基因治疗和常规应用的一大弊端。导致脱靶的发生主要有两方面因素。第一是sgRNA序列的容错性,即sgRNA不仅能与完全互补配对的靶点相结合并切割,同时也会与基因组上其他相似序列结合而发生切割,容错性可高达8个碱基甚至更多;第二是Cas9蛋白的持续表达易造成对非靶标位点的切割。因此,无论是在CRISPR基因治疗的临床转化,还是常规的实验应用中,脱靶都是影响临床治疗效果和实验结果可靠性的关键。而如何筛选出切割效率最高、脱靶反应最低的sgRNA是关键。另一方面,对于某些单基因遗传疾病,突变位点位置固定,可用sgRNA数量有限,需要预先明确sgRNA的脱靶效应,尽可能的避免采用引起严重脱靶的sgRNA,而这些都依赖于脱靶检测。

[0004] 目前用于全基因组范围的脱靶位点检测技术大致分为三类:1. 软件预测+测序验证,如利用Cas-OFF finder软件预测sgRNA可能的脱靶,再进一步进行Sanger测序验证;2. 基于细胞转染技术的脱靶检测方法,包括GUIDE-seq、BLESS、HTGTS、DISCOVER-seq等;3. 不依赖细胞技术,体外检测的方法,包括Digenome-seq、SITE-seq和CIRCLE-seq。然而以上技术均存在一定的局限性:

[0005] 1) 软件预测:早期的脱靶检测技术是由软件预测和测序组成(如Sanger测序、NGS测序、全外显子组测序等),该类技术是利用Cas-OFF finder等脱靶预测软件先进行预测,获得可能的脱靶位点,然后对预测的脱靶位点进行PCR扩增、测序,从而确定该位点是否发生脱靶突变。其原理是在获知的脱靶位点基础上进行测序,以确定哪些位点发生了编辑。该类技术存在的不足之处是通量低,而且存在明显的偏向性。

[0006] 2) 体内脱靶检测:基于细胞转染技术的体内脱靶检测方法对于不易转染的细胞系缺乏可操作性。GUIDE-seq依赖供体序列dsODN整合入基因组,HTGTS依赖染色体易位,二者均受细胞系DNA修复特异性和时效性、目标位点特异性、细胞周期等因素的影响,同时因切割位点处dsODN未整合或未发生染色体易位而遗漏突变频率低于0.1%的脱靶位点。

DISCOVER-Seq利用ChIP-seq的手段检测Cas酶切割后产生的DSB修复因子MRE11在切割位点的富集,从而获取切割位点信息。但是由于Cas酶并不是在同一时间内切割不同位点,而是有时间先后顺序,所以同一时间点MRE11因子富集的差异检测结果并不能真实反映全部的切割位点。另外,由于细胞内本身存在不少的非Cas酶切割产生的DSB,这部分DSB也会成为检测时的假阳性位点。

[0007] 3) 体外脱靶检测:与体内脱靶检测方法相比,体外检测脱靶的方法可提高检测的可重复性,避免了细胞转染效率及细胞修复对检测的影响,并且体外实验可大幅度提高sgRNA及Cas酶的浓度,有利于检测出低频突变位点。目前的3种体外全基因组范围的脱靶检测方法,最早的Digenome-seq检测方案是由Cas酶体外切割目标DNA,对所有游离断端(无论是否由Cas酶切割产生的DSB)进行加接头处理,并通过高通量全基因组测序分析出由Cas酶切割产生的在靶和脱靶位点。但是由于该方法需要很高的测序深度,有大量非Cas酶切割产生的随机背景信号,而且缺乏全面检测包含低频位点在内的全部脱靶位点的灵敏度,不适合用于大批量筛选sgRNA。而随后出现的SITE-seq检测方案采用高分子量基因组DNA作为Cas酶切割底物,对切割后的基因组DNA进行生物素标记、富集、测序并比对得到全面的切割位点信息。该方法消除部分非Cas酶切割产生的DSB,且所需的测序深度较Digenome-seq明显下降,但缺点在于高分子量基因组DNA只能来源于新鲜组织和细胞,提取困难,DNA完整性难以保证,在提取DNA过程中可能会产生大量的DSB,最终导致分析结果的假阳性率高。与SITE-seq同期出现的CIRCLE-seq检测方案利用环化DNA作为切割底物以去除背景DSB。该方法对打断的基因组DNA连接一特殊的发夹样接头后酶切茎环结构,再使用DNA连接酶将DNA首尾自身连接成环状,之后采用Cas酶体外切割该环状DNA,线性化的DNA加测序接头后形成可测序文库进行测序比对。

[0008] 除了上述方法各自存在的缺点之外,还存在另外一个不可忽视的问题——单条sgRNA检测模式,每次仅能检测1条sgRNA的脱靶,成本高昂、通量低、实验周期长,大大的限制了CRISPR基因编辑的应用。

发明内容

[0009] 本发明的目的是要解决现有sgRNA脱靶检测方法每次只能检测一条sgRNA是否脱靶,以及如何筛选切割效率高、脱靶低的sgRNA的问题,而提供一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法。

[0010] 一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,按以下步骤完成:

[0011] 一、收集 $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个细胞至离心管,离心,弃去培养基,PBS洗涤一次,再离心,弃去上清液,提取离心后固相物的细胞基因组DNA;

[0012] 二、将步骤一提取的基因组DNA打断成为300bp~700bp片段,然后以DNA纯化磁珠进行纯化;

[0013] 三、对步骤二纯化的DNA进行末端修复、加A尾、加茎环结构接头1,然后采用核酸外切酶处理,再使用ddNTP处理;

[0014] 四、设计并合成sgRNA oligo文库,进行PCR扩增及体外转录,得到sgRNA pool;

[0015] 五、采用Cas酶及步骤四得到的sgRNA pool对步骤3经ddNTP处理后的DNA进行体外切割;

[0016] 六、对体外切割后的DNA进行末端修复、加A尾、加线性接头2,线性接头2的5'端带有生物素修饰;

[0017] 七、将链霉亲和素磁珠重悬,然后加入1×Bind and wash buffer室温旋转混匀洗涤,离心,去除上清,重复洗涤、离心、去除上清3次,利用2×Bind and wash buffer重悬链霉亲和素磁珠,然后加入步骤五切割处理后的DNA,室温旋转混匀,置于磁力架,去除上清,得到链霉亲和素磁珠吸附的DNA;

[0018] 八、利用USER酶处理链霉亲和素磁珠吸附的DNA,切开接头1的茎环结构,然后以USER酶处理后的DNA为模版,进行回收PCR扩增,然后进行索引PCR,得到待上机文库,进行文库质检及测序;

[0019] 九、文库下机后进行生物信息学分析,将生物信息学分析得到的各个脱靶位点与每个sgRNA进行比对,得到每个sgRNA对应的在靶reads和脱靶位点、个数及对应reads信息。

[0020] 本发明的有益效果:

[0021] 1、本发明一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,提供一种高通量的sgRNA脱靶检测方法,以sgRNA pool形式进行体外转录,能够同时检测成千上万条sgRNA的在靶或脱靶情况;可以根据在靶reads数判断切割效率,进而根据脱靶位点及脱靶reads数判断脱靶效应的高低;相较于传统的低通量的单条sgRNA脱靶检测模式,通量高。

[0022] 2、周期短:由于目前的脱靶检测方法大都操作复杂,每次实验最多能完成8-12条sgRNA检测,若需要检测成千上万条sgRNA的脱靶,则需要多次实验,实验周期长。且实验批次不一,导致结果不可靠。

[0023] 3、成本低:既往单条sgRNA脱靶检测实验成本约1万元/例,若要进行多条sgRNA的脱靶检测,则成本非常昂贵;而采用sgRNA pool脱靶检测策略,可以一次性检测所有需要检测的sgRNA的脱靶,只需要进行单个反应,实验成本大大降低。

[0024] 4、实验结果可靠:由于所有的sgRNA都是在统一的实验条件下进行的,因此不存在实验批次间的差异,可通过单次实验结果进行sgRNA之间的筛选和比较。

[0025] 5、适用性广:目前常用的CRISPR文库筛选是最好的示例之一,并且目前的CRISPR文库大都是上万条sgRNA,每个基因有4条sgRNA覆盖。但是这些sgRNA都是未经过筛选的,因此有的sgRNA存在大量的脱靶,这会极大的影响实验结果的准确性。因此利用sgRNA pool策略筛选每个基因切割效率最高、脱靶反应最低的sgRNA非常重要,可以大大的减少脱靶反应带来的实验偏差。

[0026] 6、可用于临床治疗靶点筛选:CRISPR基因疗法近年来越来越热,多种传统方法无法企及的疾病有望采用CRISPR基因疗法进行治疗。但是首先是需要进行靶点筛选,筛选切割效率最高、脱靶反应最低的靶点。例如抗HIV、HBV、HPV等病毒,靶点需要覆盖到病毒全长基因组。若采用传统方法则非常的耗时耗力的,而通过sgRNA pool脱靶检测策略可一次性完成靶点筛选。

[0027] 7. 不受物种限制:无论是植物还是动物都可进行检测;而且不仅能检测SpCas9的脱靶,还能检测SaCas9,AsCpf1和LbCpf1的脱靶。

[0028] 本发明可获得一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法。

附图说明

[0029] 图1为本发明一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法的流程示意图;a代表寡聚合成,b代表PCR扩增,c代表体外转录,d代表sgRNA池,e代表与Cas9或CPF1孵育,f代表体外切割,g代表AID-seq;

[0030] 图2为实施例一中检测74230条人基因组sgRNA的第一个位点的数据示意图;

[0031] 图3为实施例一中检测74230条人基因组sgRNA的第二个位点的数据示意图;

[0032] 图4为实施例一中检测74230条人基因组sgRNA的第三个位点的数据示意图。

具体实施方式

[0033] 具体实施方式一:本实施方式一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,按以下步骤完成:

[0034] 一、收集 $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个细胞至离心管,离心,弃去培养基,PBS洗涤一次,再离心,弃去上清液,提取离心后固相物的细胞基因组DNA;

[0035] 二、将步骤一提取的基因组DNA打断成为300bp~700bp片段,然后以DNA纯化磁珠进行纯化;

[0036] 三、对步骤二纯化的DNA进行末端修复、加A尾、加茎环结构接头1,然后采用核酸外切酶处理,再使用ddNTP处理;

[0037] 四、设计并合成sgRNA oligo文库,进行PCR扩增及体外转录,得到sgRNA pool;

[0038] 五、采用Cas酶及步骤四得到的sgRNA pool对步骤3经ddNTP处理后的DNA进行体外切割;

[0039] 六、对体外切割后的DNA进行末端修复、加A尾、加线性接头2,线性接头2的5'端带有生物素修饰;

[0040] 七、将链霉亲和素磁珠重悬,然后加入 $1 \times$ Bind and wash buffer室温旋转混匀洗涤,离心,去除上清,重复洗涤、离心、去除上清3次,利用 $2 \times$ Bind and wash buffer重悬链霉亲和素磁珠,然后加入步骤五切割处理后的DNA,室温旋转混匀,置于磁力架,去除上清,得到链霉亲和素磁珠吸附的DNA;

[0041] 八、利用USER酶处理链霉亲和素磁珠吸附的DNA,切开接头1的茎环结构,然后以USER酶处理后的DNA为模版,进行回收PCR扩增,然后进行索引PCR,得到待上机文库,进行文库质检及测序;

[0042] 九、文库下机后进行生物信息学分析,将生物信息学分析得到的各个脱靶位点与每个sgRNA进行比对,得到每个sgRNA对应的在靶reads和脱靶位点、个数及对应reads信息。

[0043] 具体实施方式二:本实施方式与具体实施方式一不同点是:步骤二中利用仪器Bioruptor进行DNA打断,参数:DNA 50ng/ μ L;体积100 μ L;15sON-90sOFF;6-8次循环;打断后的DNA以DNA纯化磁珠进行纯化,洗脱体积37 μ L。

[0044] 其他步骤与具体实施方式一相同。

[0045] 具体实施方式三:本实施方式与具体实施方式一或二不同点是:步骤三中采用试剂盒进行DNA末端修复、加A尾、加茎环结构接头1,其中DNA末端修复、加A尾的具体反应体系及反应程序如下:

[0046] 试剂盒:ABclonal快速DNA建库试剂盒

- | | | |
|--------|--|--------|
| | 步骤二纯化后DNA(1-5ug) | 37μL |
| | 末端修复缓冲液 | 10μL |
| [0047] | 末端修复酶 | 3μL |
| | 总体积 | 50μL |
| [0048] | 反应程序:20℃30min;65℃30min,得到末端修复混合物; | |
| [0049] | 加茎环结构接头1的具体反应体系及反应程序如下: | |
| | 末端修复混合物 | 50μL |
| | LigaseMM | 16.5μL |
| [0050] | 退火后的接头1 (40μM) | 7.5μL |
| | LigaseMix | 3μL |
| | 总体积 | 77μL |
| [0051] | 反应程序:22℃1h,然后1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积30μL。 | |
| [0052] | 其他步骤与具体实施方式一或二相同。 | |
| [0053] | 具体实施方式四:本实施方式与具体实施方式一至三之一不同点是:步骤三中核酸外切酶酶切的反应体系和程序如下: | |
| | 10×核酸外切酶 I 缓冲液 | 5μL |
| | Lambda 核酸外切酶 | 8μL |
| | 核酸外切酶 I | 2μL |
| [0054] | 核酸外切酶 III | 1μL |
| | 加入接头1的DNA (1 ug) | 34μL |
| | 总体积 | 50μL |
| [0055] | 反应程序:37℃2h;75℃10min,然后用1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积44μL。 | |
| [0056] | 其他步骤与具体实施方式一至三相同。 | |
| [0057] | 具体实施方式五:本实施方式与具体实施方式一至四之一不同点是:步骤三中ddNTP处理的反应体系和程序: | |

	10×Thermopol缓冲液	5μL
	ddATP (10mM)	0.5μL
[0058]	Therminator DNA聚合酶	0.5μL
	酶切后的DNA	44μL
	总体积	50μL

[0059] 反应程序:75℃,30min;然后用1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积25μL,Qubit测量DNA浓度>6.4ng/μL。

[0060] 其他步骤与具体实施方式一至四相同。

[0061] 具体实施方式六:本实施方式与具体实施方式一至五之一不同点是:步骤五中Cas酶体外切割的反应体系和程序,首先设计并合成sgRNA oligo文库,经过PCR扩增后进行体外转录,得到有活性的sgRNA pool,其余如下:

	10×Cas9 Nuclease Reaction缓冲液	5μL
	Cas9 Nuclease, <i>S. pyogenes</i> (1uM)	4.5μL
[0062]	体外转录的gRNA (3uM)	1.5μL
	总体积	11μL

[0063] 反应程序:室温结合10min,然后加入步骤三处理后的DNA 50ng~1000ng,以无酶水补齐体积至50μL,37℃孵育1h,再用50μLDNA纯化磁珠纯化,洗脱体积37μL。

[0064] 其他步骤与具体实施方式一至五相同。

[0065] 具体实施方式七:本实施方式与具体实施方式一至六之一不同点是:步骤六中采用ABclonal快速DNA建库试剂盒进行DNA末端修复、加A尾、加线性接头2;DNA末端修复、加A尾的具体反应体系及反应程序如下:

	步骤四处理后的 DNA	37μL
[0066]	末端修复缓冲液	10μL
	末端修复酶	3μL
[0067]	总体积	50μL

[0068] 反应程序:20℃反应30min;65℃反应30min,得到末端修复混合物;

	末端修复混合物	50 μ L
	Ligase MM	16.5 μ L
[0069]	退火的线性接头2 (5 μ M)	8 μ L
	Ligase Mix	3 μ L
	总体积	77.5 μ L

[0070] 反应程序:22 $^{\circ}$ C反应1h,然后用1 \times DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积41 μ L。

[0071] 其他步骤与具体实施方式一至六相同。

[0072] 具体实施方式八:本实施方式与具体实施方式一至七之一不同点是:步骤七中USER酶处理的方法为,向步骤五中的DNA中加入USER酶,在37 $^{\circ}$ C下反应30min,然后置于磁力架2min,去除上清,加入10mM Tris-HCl室温旋转混匀洗涤5min,置于磁力架2min,去除上清,共用10mM Tris-HCl洗涤2次;然后加入20 μ L 10mMTris-HCl重悬。

[0073] 其他步骤与具体实施方式一至七相同。

[0074] 具体实施方式九:本实施方式与具体实施方式一至八之一不同点是:步骤八中回收PCR反应体系及反应程序如下:

	USER酶处理后DNA	20 μ L
	巢式PCR 正向引物(10 μ M)	2.5 μ L
[0075]	巢式PCR 反向引物(10 μ M)	2.5 μ L
	KAPA HiFi 热启动mix (2x)	25 μ L
	总体积	50 μ L

[0076] 反应程序:98 $^{\circ}$ C45s;12cycles of (98 $^{\circ}$ C15s,61 $^{\circ}$ C30s,72 $^{\circ}$ C2min) ,72 $^{\circ}$ C2min,4 $^{\circ}$ C保持,然后置于磁力架2min,将上清转移至新Ep管,取1 μ L~10 μ L上清液加水稀释50倍。

[0077] 其他步骤与具体实施方式一至八相同。

[0078] 具体实施方式十:本实施方式与具体实施方式一至九之一不同点是:步骤八中索引PCR的反应体系和程序如下:

	稀释后的 DNA	12 μ L
	H ₂ O	4 μ L
[0079]	I50x 接头引物(10 μ M)	2 μ L
	I70x 接头引物(10 μ M)	2 μ L
	KAPA HiFi 热启动 mix(2x)	20 μ L
	总体积	40 μ L

[0080] 反应程序:98°C45s;12cycles of (98°C15s,60°C30s,72°C2min),72°C2min,4°C保持,0.7×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积50μL,0.6×-0.2×DNA纯化磁珠双端筛选,洗脱体积20μL,得到200-600bp的DNA文库。

[0081] 其他步骤与具体实施方式一至九相同。

[0082] 采用以下实施例验证本发明的有益效果:

[0083] 实施例一:一种可批量进行体外脱靶检测及sgRNA筛选的方法,按以下步骤完成:

[0084] 一、收集 $4 \times 10^6 \sim 8 \times 10^6$ 个细胞至离心管,离心,弃去培养基,PBS洗涤一次,再离心,弃去上清液,提取离心后固相物的细胞基因组DNA;

[0085] 二、将步骤一提取的基因组DNA打断成为500bp片段,然后以DNA纯化磁珠进行纯化;

[0086] 步骤二中利用仪器Bioruptor进行DNA打断,参数:DNA 50ng/μL;体积100μL;15sON-90sOFF;6-8次循环;打断后的DNA以DNA纯化磁珠进行纯化,洗脱体积37μL。

[0087] 三、对步骤二纯化的DNA进行末端修复、加A尾、加茎环结构接头1,然后采用核酸外切酶处理,再使用ddNTP处理;

[0088] 步骤三中采用试剂盒进行DNA末端修复、加A尾、加茎环结构接头1,其中DNA末端修复、加A尾的具体反应体系及反应程序如下:

[0089] 试剂盒:ABclonal快速DNA建库试剂盒,购买自武汉爱博泰克;

步骤二纯化后DNA(1-5ug)	37μL
------------------	------

末端修复缓冲液	10μL
---------	------

[0090]

末端修复酶	3μL
-------	-----

总体积	50μL
-----	------

[0091] 反应程序:20°C30min;65°C30min,得到末端修复混合物;

[0092] 加茎环结构接头1的具体反应体系及反应程序如下:

末端修复混合物	50μL
---------	------

LigaseMM	16.5μL
----------	--------

[0093] 退火后的接头1 (40μM) 7.5μL

LigaseMix	3μL
-----------	-----

总体积	77μL
-----	------

[0094] 反应程序:22°C1h,然后1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积30μL。

[0095] 步骤三中核酸外切酶酶切的反应体系和程序如下:

	10×核酸外切酶 I 缓冲液	5μL
	Lambda 核酸外切酶	8μL
[0096]	核酸外切酶 I	2μL
	核酸外切酶 III	1μL
	加入接头1的DNA (1 ug)	34μL
	总体积	50μL
[0097]	反应程序:37°C 2h;75°C 10min,然后用1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积44μL。	
[0098]	步骤三中ddNTP处理的反应体系和程序:	
	10×Thermopol缓冲液	5μL
	ddATP (10mM)	0.5μL
[0099]	Therminator DNA聚合酶	0.5μL
	酶切后的DNA	44μL
	总体积	50μL
[0100]	反应程序:75°C, 30min;然后用1×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积25μL,Qubit测量DNA浓度>6.4ng/μL。	
[0101]	四、设计并合成sgRNA oligo文库,进行PCR扩增及体外转录,得到sgRNA pool;	
[0102]	步骤五中Cas酶体外切割的反应体系和程序,首先设计并合成sgRNA oligo pool,经过PCR扩增后进行体外转录,得到有活性的sgRNA pool,其余如下:	
	10×Cas9 Nuclease Reaction缓冲液	5μL
	Cas9 Nuclease, <i>S. pyogenes</i> (1uM)	4.5μL
[0103]	体外转录的gRNA (3uM)	1.5μL
	总体积	11μL
[0104]	反应程序:室温结合10min,然后加入步骤三处理后的DNA 250ng,以无酶水补齐体积至50μL,37°C 孵育1h,再用50μLDNA纯化磁珠纯化,洗脱体积37μL。	
[0105]	五、采用Cas酶及步骤四得到的sgRNA pool对步骤3经ddNTP处理后的DNA进行体外切割;	
[0106]	六、对体外切割后的DNA进行末端修复、加A尾、加线性接头2,线性接头2的5' 端带有生物素修饰;	
[0107]	步骤六中采用ABclonal快速DNA建库试剂盒进行DNA末端修复、加A尾、加线性接头	

2,所述ABclonal快速DNA建库试剂盒购买自武汉爱博泰克;DNA末端修复、加A尾的具体反应体系及反应程序如下:

	步骤四处理后的 DNA	37 μ L
	末端修复缓冲液	10 μ L
[0108]	末端修复酶	3 μ L
	总体积	50 μ L
[0109]	反应程序:20 $^{\circ}$ C反应30min;65 $^{\circ}$ C反应30min,得到末端修复混合物;	
	末端修复混合物	50 μ L
	Ligase MM	16.5 μ L
[0110]	退火的线性接头2 (5 μ M)	8 μ L
	Ligase Mix	3 μ L
	总体积	77.5 μ L

[0111] 反应程序:22 $^{\circ}$ C反应1h,然后用1 \times DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积41 μ L。

[0112] 七、将链霉亲和素磁珠重悬,然后加入1 \times Bind and wash buffer室温旋转混匀洗涤,离心,去除上清,重复洗涤、离心、去除上清3次,利用2 \times Bind and wash buffer重悬链霉亲和素磁珠,然后加入步骤五切割处理后的DNA,室温旋转混匀,置于磁力架,去除上清,得到链霉亲和素磁珠吸附的DNA;

[0113] 步骤七中USER酶处理的方法为,向步骤五中的DNA中加入USER酶,在37 $^{\circ}$ C下反应30min,然后置于磁力架2min,去除上清,加入10mM Tris-HCl室温旋转混匀洗涤5min,置于磁力架2min,去除上清,共用10mM Tris-HCl洗涤2次;然后加入20 μ L10mMTris-HCl重悬。

[0114] 八、利用USER酶处理链霉亲和素磁珠吸附的DNA,切开接头1的茎环结构,然后以USER酶处理后的DNA为模版,进行回收PCR扩增,然后进行索引PCR,得到待上机文库,进行文库质检及测序;

[0115] 步骤八中回收PCR反应体系及反应程序如下:

	USER酶处理后DNA	20 μ L
	巢式PCR 正向引物(10 μ M)	2.5 μ L
[0116]	巢式PCR 反向引物(10 μ M)	2.5 μ L
	KAPA HiFi 热启动mix (2x)	25 μ L
	总体积	50 μ L

[0117] 反应程序:98°C45s;12cycles of (98°C15s,61°C30s,72°C2min),72°C2min,4°C保持,然后置于磁力架2min,将上清转移至新Ep管,取3μL上清液加水稀释50倍。

[0118] 步骤八中索引PCR的反应体系和程序如下:

	稀释后的 DNA	12μL
	H ₂ O	4μL
[0119]	I50x 接头引物(10μM)	2μL
	I70x 接头引物(10μM)	2μL
	KAPA HiFi 热启动 mix(2x)	20μL
	总体积	40μL

[0120] 反应程序:98°C45s;12cycles of (98°C15s,60°C30s,72°C2min),72°C2min,4°C保持,0.7×DNA纯化磁珠纯化,洗脱体积50μL,0.6×-0.2×DNA纯化磁珠双端筛选,洗脱体积20μL,得到200-600bp的DNA文库。

[0121] 九、文库下机后进行生物信息学分析,将生物信息学分析得到的各个脱靶位点对回每个sgRNA,得到每个sgRNA对应的在靶reads和脱靶位点、个数及对应reads信息。

[0122] 试验:如图2~图4所示,为采用sgRNA pool策略同时检测74230条人基因组sgRNA的其中3个位点的数据,最上面的碱基为靶点序列,最右侧的数字为每个在靶及脱靶位点对应的reads数。reads数越多,代表切割的越多。

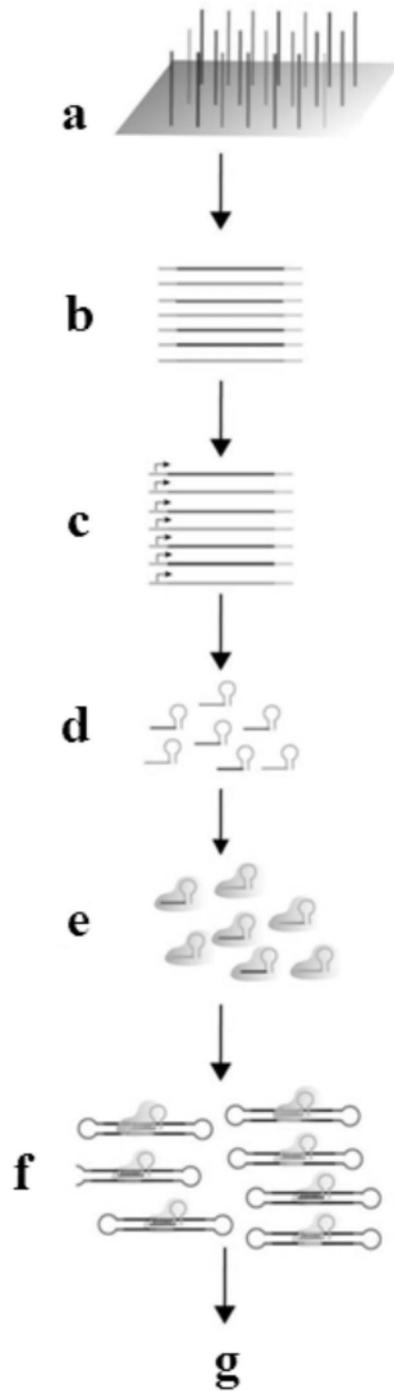


图1

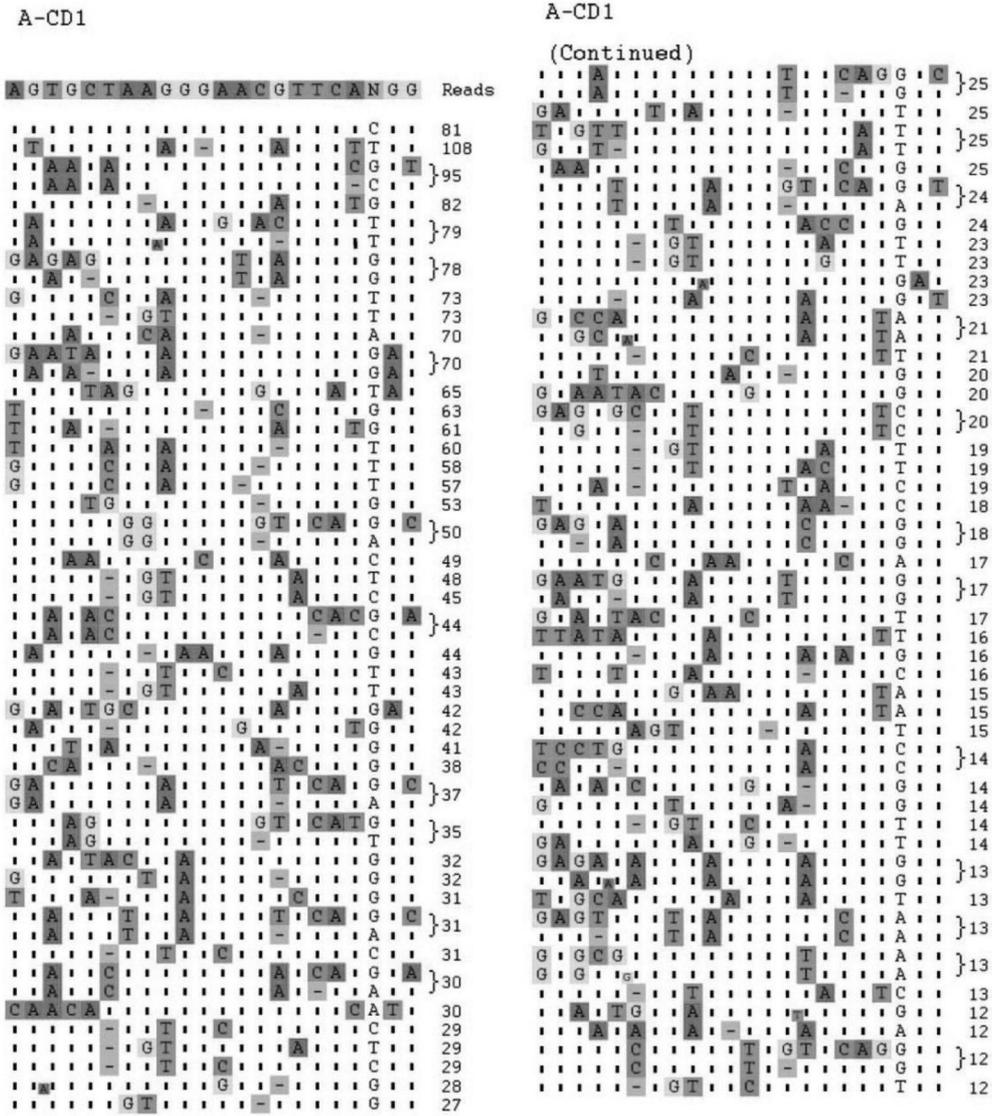


图2

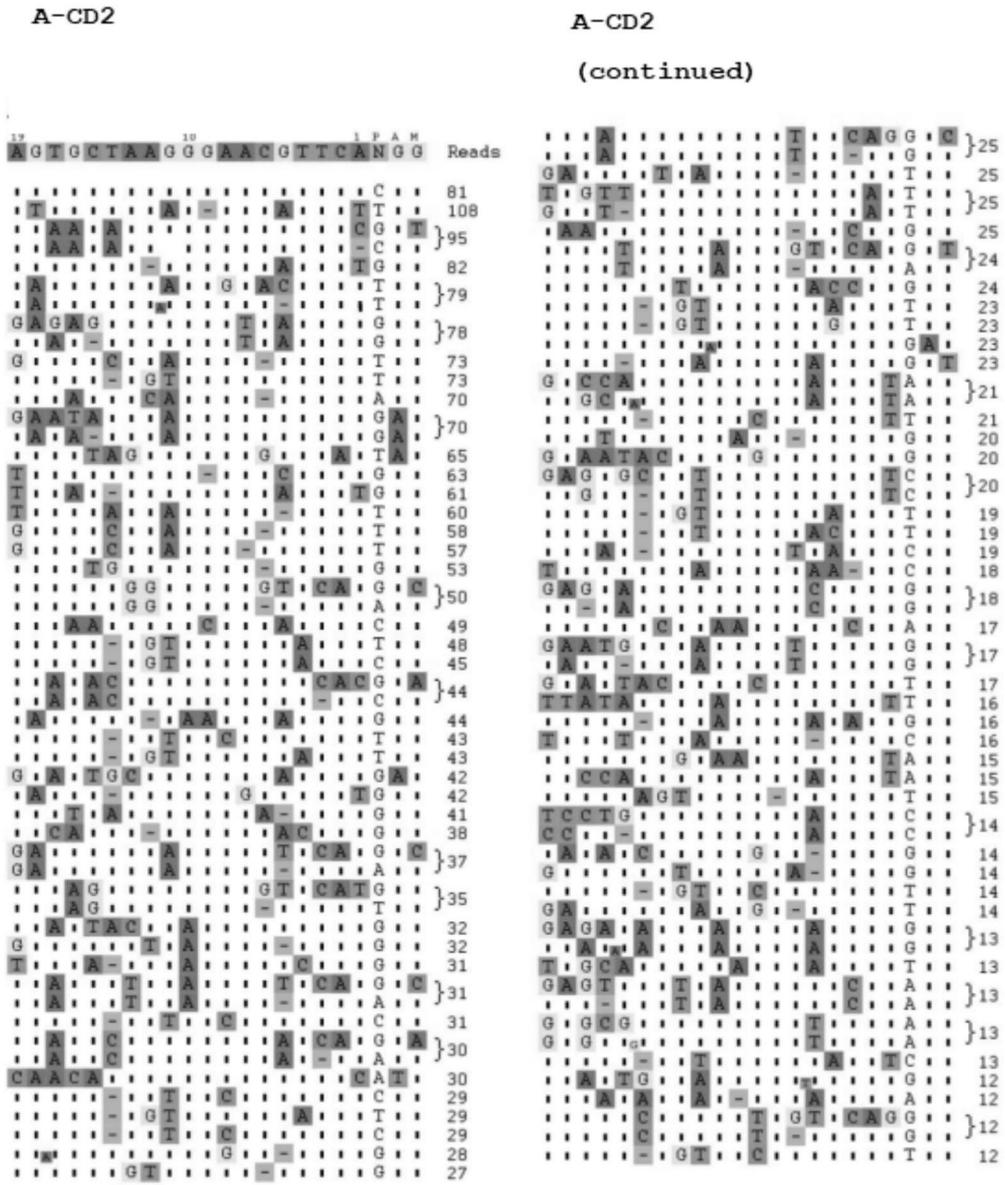


图3

A-CD3

A-CD3

(continued)

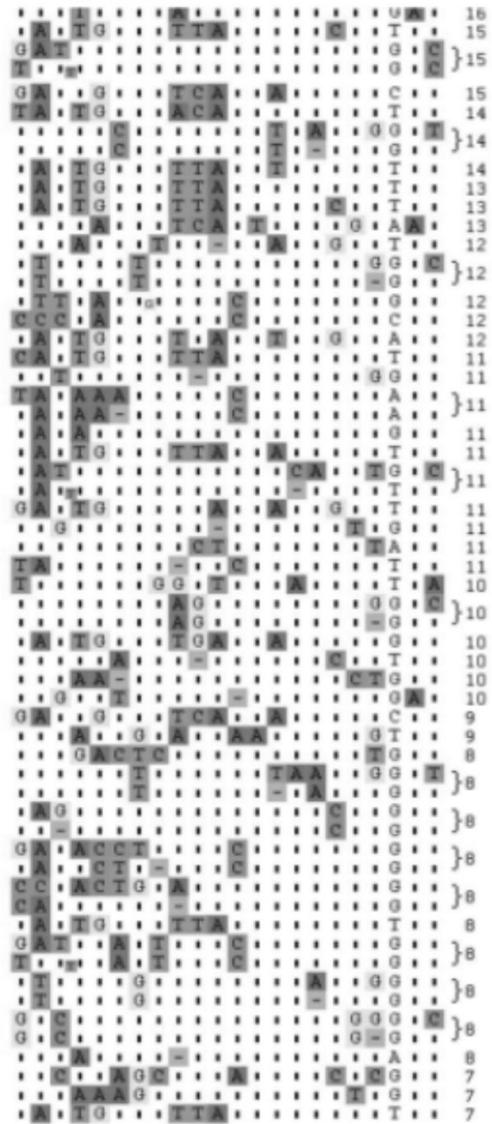
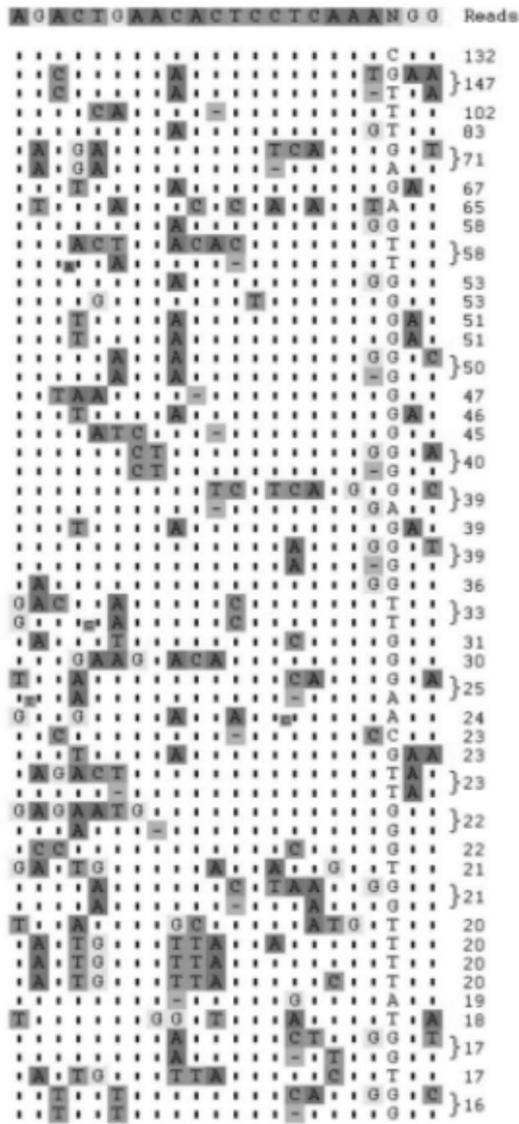


图4