

CRISPR/Cas9基因敲除步骤

1.设计 sgRNA

- 1.1 根据目标基因序列设计特定的单链引导RNA (sgRNA)
- 1.2 退火后形成双链 DNA 片段

2.构建载体

- 2.1 将双链 DNA 片段和Cas9编码序列克隆到适当的载体中，如质粒或病毒载体
- 2.2 测序验证重组质粒正确性

3.细胞转染

- 3.1 将编辑载体导入目标细胞，可以使用电穿孔、脂质体介导转染或病毒介导转导等方法
- 3.2 转染后观察细胞反应

4.筛选验证

- 4.1 筛选获得基因编辑效果的细胞，并通过测序、qRT-PCR及Western blot等方法验证基因敲除效果

5.功能分析

- 5.1 研究敲除基因后细胞的表型变化和功能影响，如细胞增殖、分化、迁移等

常见问题解析

1. 如何防止脱靶效应（Off-target Effects）？

①设计高特异性sgRNA：使用CRISPR设计工具筛选靶点，优先选择PAM序列（NGG）上游20 bp的种子区，避免与其他基因组区域同源。②优化Cas9版本：采用Cas9 Nickase（D10A突变体）或高保真Cas9（如SpCas9-HF1），通过单链切割减少脱靶风险。③验证脱靶位点：通过全基因组测序（WGS）或体外全基因组脱靶检测（如CIRCLE-seq）筛查潜在脱靶位点。

2. 敲除效率低怎么办？

①针对同一基因设计2-3条sgRNA（优先靶向不同外显子或功能域），可以提高获得有效基因敲除的机率，并节省后续克隆筛选阶段的时间。②优化转染方法，针对不同细胞系采用不同化学转染或电转染方法等。对于难转染细胞（如原代细胞、干细胞）可优先采用电转，对于常规贴壁细胞，可通过优化脂质体转染参数提高转染效率。③需用抗生素充分筛选阳性细胞，并挑选有效单克隆，优化细胞生长条件。④使用测序、qRT-PCR和Western blot等多种方法对敲除细胞系进行验证，充分验证目的基因敲除效率。

3. 编辑后细胞生长缓慢怎么办？

有些靶基因参与细胞周期调控或能量代谢，可通过代谢组学分析（如Seahorse检测OCR/ECAR）确定代谢瓶颈，补充相应培养基成分（如谷氨酰胺）。

参考文献

- [1] Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, et al.. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. Science. 2012, 337(6096):816-21.
- [2] Heidi Ledford, Ewen Callaway. Pioneers of revolutionary CRISPR gene editing win chemistry Nobel [J]. Nature. 2020, 586(7829):346-347.