

CRISPR 基因敲除稳定细胞系构建

1. 案例概述	1
2. 实验设计	2
3. sgRNA 设计	2
4. 载体构建	2
5. 质粒扩增与测序验证	3
6. 质粒扩增抽提与质量测定	3
7. 转染与细胞池建立	3
8. 细胞池测序验证	3
9. 单克隆筛选与测序验证	4
9.1. 阳性克隆筛选结果	4
9.2. 单克隆生长情况	4
9.3. 单克隆测序结果	5
10. Western Blot 检测	5
11. 支原体检测	6
12. 服务网址	6

1. 案例概述

与传统的 TALEN (转录激活子样效应物核酸酶) 以及 ZNF (锌指核酸酶) 技术相比, CRISPR 技术能够低成本地实现高效灵活的基因编辑。CRISPR 技术的关键在于 sgRNA 的设计与转染的成功率。

某客户在敲除基因 A 时，无法得到目的基因被敲除的细胞系。根据客户要求，德泰生物选择了 3 个靶位点，设计了 3 条 sgRNA，分别构建载体，增加基因敲除的成功率。除此之外，我们还查阅了客户提供的宿主细胞相关资料，寻找合适的转染以及培养条件。完成整个实验后，测序进行验证。结果显示，目的基因 A 被成功敲除。

2. 实验设计

对客户提交的基因序列进行分析，选择最合适的 3 个靶位点，每个靶位点设计 1 条 sgRNA。分别构建载体，载体中同时包含 sgRNA 与 Cas9 蛋白的基因。将构建完的质粒转入 DH5a 克隆菌株中扩大培养，抽提质粒，测序验证 sgRNA 序列连入载体成功，去除内毒素后检测内毒素水平。

确认质粒内毒素水平达到转染要求后，用化学试剂法转染 HEK293 细胞，合适条件下培养，建立细胞池。PCR 得到目的片段后，测序验证细胞的目的基因是否被敲除。挑选细胞，培养单克隆，测序验证单克隆细胞中的目的基因是否被敲除，确认后 Western Blot 检测敲除基因的表达情况。最后 PCR 检测支原体，确保细胞系没有被污染。

3. sgRNA 设计

选择外显子区域高特异性的位点作为靶位点，生物信息学分析序列，对筛选的位点打分。选择评分最高的 3 个位点作为靶位点，设计 3 条 sgRNA 序列。



图 3-1 sgRNA 设计

4. 载体构建

根据设计的 sgRNA 序列，合成 Oligo DNA，酶切带有 Cas9 基因的空载体得到线性化质粒，混合 Oligo DNA

与线性化空载体，以及 T4 连接酶，添加 buffer 与 ddH₂O，16°C 链接过夜。

5. 质粒扩增与测序验证

利用低温培养和 Inoue 缓冲液孵育大肠杆菌，使其达到感受态。将质粒载体转入 DH5a 克隆菌株，用平板培养筛选，挑选 5 个单菌落测序，确认得到的载体序列与预期一致。

6. 质粒扩增抽提与质量测定

由于细菌中的内毒素会对哺乳动物细胞造成伤害，在质粒抽提时，需要去除内毒素。对抽提的质粒进行检测，确定质粒的检测结果显示达到转染的要求之后，再进行下一步转染实验。

检测内容	转染级质粒标准	质粒检测结果
A260/A280	1.8-2.0	1.88
内毒素	内毒素 < 0.05 EU/μg	LAL 检测，内毒素 < 0.05 EU/μg
无菌检测	无菌	LB 平板检测，无菌落

表 7-1 质粒检测结果

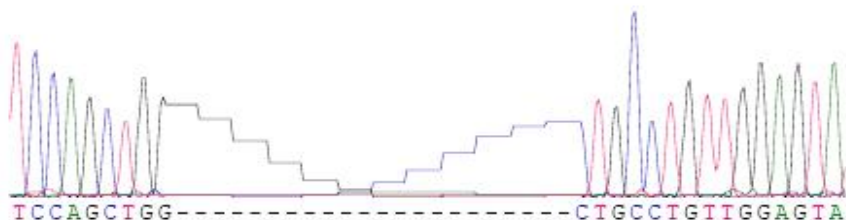
7. 转染与细胞池建立

转染前 2 天，置于培养箱中悬浮培养细胞。110rpm，37°C，5% CO₂ 条件下培养。37°C 预热转染试剂 10~20min。DNA-转染试剂混合物加入待转染细胞中，置于培养箱中培养。

8. 细胞池测序验证

转染后培养 2-3 天，稀释后取 1000 个以上的转染细胞离心，去上清，提取 DNA 并 PCR 检测。纯化目的基因后测序，比对测到的序列与原始序列，确认基因被敲除。

TCCAGCTGGTTACTCAACTTATGCCCATGGCTGCCGTGTGGAGTA

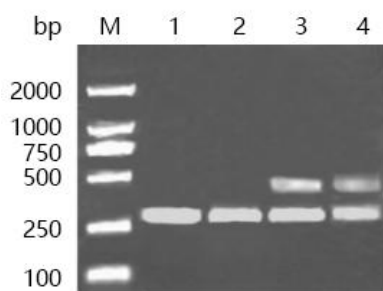


8-1 细胞池测序结果

9. 单克隆筛选与测序验证

等细胞生长至一定数量，消化细胞，细胞计数。将细胞稀释，再取 100 微升细胞稀释液种于 96 孔板中。细胞贴壁后继续加药筛选，待细胞汇合度达到 70% 以上时，依次转至 48 孔板，24 孔板，12 孔板，6 孔板中扩大培养。继续稀释剩余细胞池细胞，分散到 96 孔板中进行单克隆培养，使用突变检测试剂盒筛选阳性克隆，对筛选后的阳性克隆进行测序分析，比对测序结果，分析基因敲除情况。

9.1. 阳性克隆筛选结果



Lane M : DNA marker

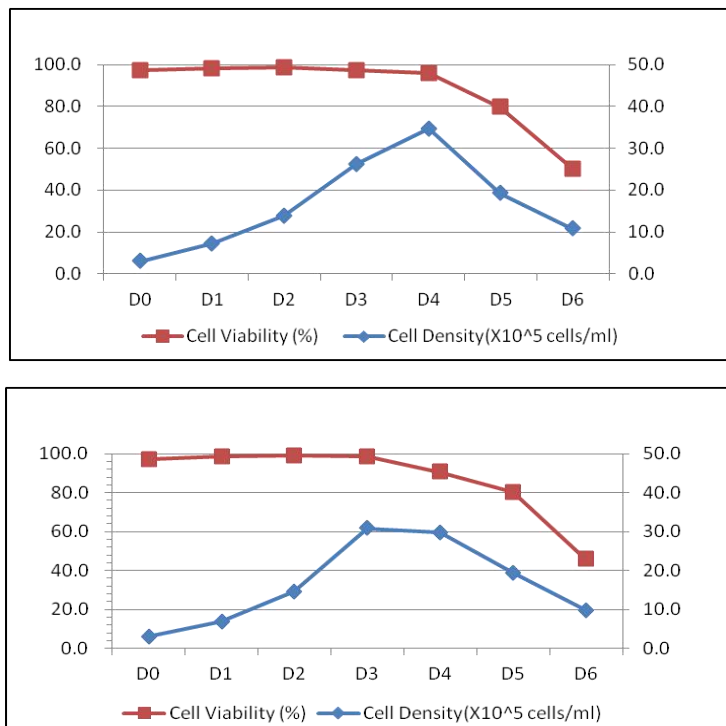
Lane 1~2 : 阴性克隆

Lane 3~4 : 阳性克隆

9-1 突变检测筛选结果

9.2. 单克隆生长情况

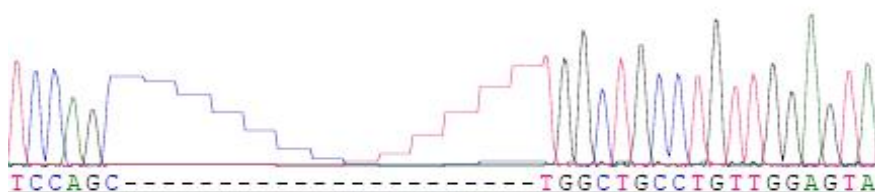
记录单克隆细胞的生长情况，评估细胞系的稳定性。



9-2 单克隆生长曲线

9.3. 单克隆测序结果

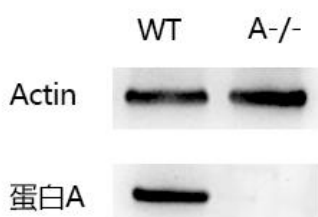
TCCAGCTGGTTACTCAACTTATGCCCATGGCTGCCGTGTTGGAGTA



9-3 单克隆测序结果

10. Western Blot 检测

用基因 A 对应蛋白的单抗检测细胞的表达产物,裂解细胞,提取细胞的总蛋白,SDS-PAGE 电泳后转印到 PVDF 膜上,封闭液封闭 1h 后,用一抗二抗先后孵育,化学发光成像仪下拍照分析。



WT: 基因 A 未敲除的细胞破碎离心后的上清
A^{-/-}: 基因 A 已敲除的细胞破碎离心后的上清
Western Blot 检测结果显示基因 A 在敲除后的细胞系中无表达。

图 10-1 Western Blot 结果

11. 支原体检测

用支原体检测的试剂盒检测细胞培养的上清液，PCR 鉴定，检查细胞是否遭到支原体污染。

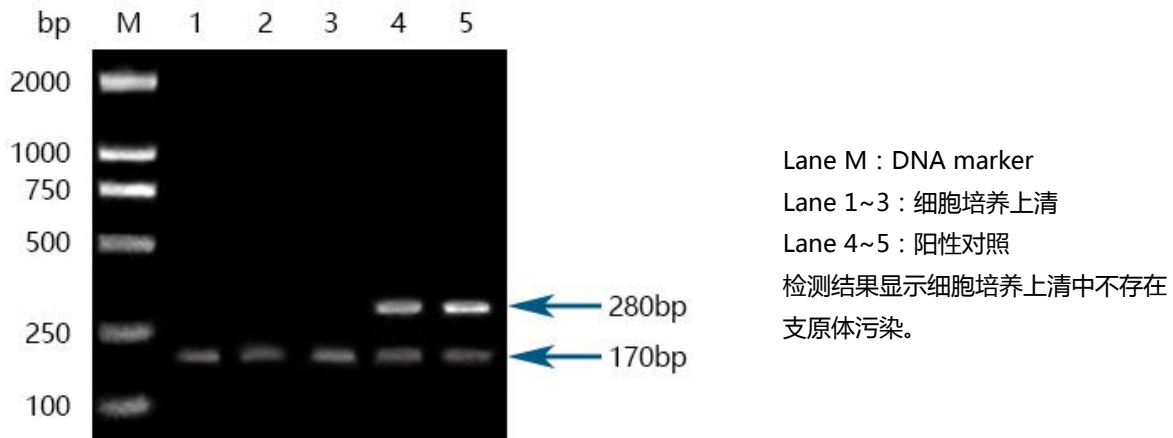


图 11-1 支原体检测结果

12. 服务网址

www.detaibio.com/gene-knock-out-cell-line.html