

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620121152446

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

秀丽隐杆线虫中 CRISPR/Cas9 介导的基因
编辑及 sgRNA 有效性检测系统的构建

CRISPR/Cas9 mediated genome editing and construction of
sgRNA efficiency testing system in *C. elegans*

张丹丹

指导老师姓名: 王亚梅副教授

专业名称: 细胞生物学

论文提交时间: 2015 年 5 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予时间: 2015 年 月

答辩委员会主席:

评 阅 人:

2015 年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

()1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
年 月 日解密，解密后适用上述授权。

()2.不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年 月 日

缩略词表

| 英文缩写 | 英文名称 | 中文名称 |
|------------|--|--------------------|
| Amp | Ampicillin | 氨苄青霉素 |
| CCD camera | Charge-Coupled Device Camera | 电荷耦合元件 图像传感器 |
| cm | centimeter | 厘米, 长度单位 |
| CRISPR | Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats | 成簇规律间隔 的短回文重复序列 |
| DIC | Differential Interference Contrast | 微分干涉相差 |
| DNA | Deoxyribonucleic acid | 脱氧核糖核酸 |
| HR | homologous reCombination | 同源重组 |
| GFP | Green Fluorescent Protein | 绿色荧光蛋白 |
| L | liter | 升, 体积单位 |
| L1 | Larva 1 | 第一期幼虫 |
| L2 | Larva 2 | 第二期幼虫 |
| L3 | Larva 3 | 第三期幼虫 |
| L4 | Larva 4 | 第四期幼虫 |
| LB | Luria-Bertani culture medium | 溶菌肉汤培养基 |
| mL | milliliter | 毫升, 体积单位 |
| mm | millimeter | 毫米, 长度单位 |
| NGM | Nematode Growth Medium | 线虫生长培养基 |
| NHEJ | non-homologous end joining | 非同源末端插入 |
| RNA | RiboNucleic Acid | 核糖核酸 |
| RNAi | RNA interference | RNA 干扰 |

目录

| | |
|--|-----------|
| 摘要..... | 1 |
| Abstract..... | 1 |
| 前言..... | 1 |
| 1 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术..... | 1 |
| 1.1 CRISPR/Cas9 的发现和 研究历史..... | 1 |
| 1.2 CRISPR/Cas9 的基因结构及其介导基因编辑的机制..... | 3 |
| 1.3 CRISPR/Cas9 的优势和应用价值..... | 4 |
| 2 秀丽隐杆线虫作为模式生物的优点及秀丽隐杆线虫中常见的基因功能..... | 7 |
| 2.1 秀丽隐杆线虫作为模式生物的优势..... | 7 |
| 2.2 秀丽隐杆线虫中常见的基因功能研究方法..... | 10 |
| 2.3 秀丽隐杆线虫中 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑的研究现状..... | 11 |
| 3 本文的研究目的和意义..... | 14 |
| 第一章 在秀丽隐杆线虫中进行 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术的尝试..... | 15 |
| 1. 材料与方法..... | 15 |
| 1.1 材料..... | 15 |
| 1.2 方法..... | 16 |
| 2 结果与分析..... | 27 |
| 2.1 CRISPR/Cas9 介导的基因敲入..... | 27 |
| 2.1.1 CRISPR/Cas9 介导的感兴趣基因敲入..... | 27 |
| 2.1.2 尝试在有效 sgRNA 靶位点处进行 CRISPR/Cas9 介导的基因敲入..... | 33 |
| 2.2 CRISPR/Cas9 介导的条件性敲除系统的构建..... | 37 |
| 3 讨论..... | 38 |
| 第二章 秀丽隐杆线虫 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术中 sgRNA 有效性检测系统的构建..... | 40 |
| 1 材料与方法..... | 40 |
| 1.1 材料..... | 40 |

| | |
|------------------------------|-----------|
| 1.2 方法..... | 41 |
| 2 结果与分析..... | 43 |
| 2.1 sgRNA 有效性检测系统的构建策略..... | 43 |
| 2.2 sgRNA 有效性检测系统的可行性检测..... | 48 |
| 2.3 sgRNA 有效性检测系统的完善与改进..... | 51 |
| 3 讨论..... | 55 |
| 结论和展望..... | 56 |
| 结论..... | 56 |
| 展望..... | 56 |
| 参考文献..... | 56 |
| 附录..... | 63 |
| 致谢..... | 68 |

Content

| | |
|---|-----------|
| Abstract in Chinese..... | 1 |
| Abstract in English..... | 1 |
| Preface..... | 1 |
| 1 CRISPR/Cas9 mediated genome editing..... | 1 |
| 1.1 The discovery and study history of the CRISPR/Cas9..... | 1 |
| 1.2 The structure of CRISPR/Cas9 and CRISPR/Cas9 mediated gene editing..... | 3 |
| 1.3 The advantage and application of CRISPR/Cas9 system..... | 4 |
| 2 The advantages of the <i>C. elegans</i> as model organism and the methods used to study gene in <i>C. elegans</i>..... | 7 |
| 2.1 The advantages of <i>C. elegans</i> as a model organism..... | 7 |
| 2.2 The conventional methods used to study gene function in <i>C. elegans</i> | 10 |
| 2.3 The recent development of CRISPR/Cas9 mediated gene editing in <i>C. elegans</i> | 12 |
| 3 Research purpose and meaning..... | 14 |
| Chapter1 CRISPR/Cas9 mediated gene editing techniques In <i>C. elegans</i>..... | 15 |
| 1 Materials and methods..... | 15 |
| 1.1 Materials..... | 15 |
| 1.2 Methods..... | 16 |
| 2 Results and analysis..... | 27 |
| 2.1 CRISPR/Cas9 mediated gene editing..... | 27 |
| 2.1.1 CRISPR/Cas9 mediated targeted genome knock-in..... | 27 |
| 2.1.2 Knock-in gene into an effective sgRNA targeting site..... | 27 |
| 2.2 Construction of conditional knock-out system mediated by CRISPR/Cas9..... | 37 |
| 3 Discussion..... | 38 |
| Chapter2 Construct the sgRNA efficiency testing system of CRISPR/Cas9 mediated gene editing in <i>C. elegans</i>..... | 40 |
| 1 Materials and methods..... | 40 |
| 1.1 Materials..... | 40 |
| 1.2 Methods..... | 41 |

| | |
|--|-----------|
| 2 Results and analysis..... | 43 |
| 2.1 The strategy to construct the sgRNA efficiency testing system in <i>C. elegans</i> | 43 |
| 2.2 Examination of the sgRNA efficiency testing system..... | 48 |
| 2.3 The improvement of the sgRNA efficiency testing system..... | 51 |
| 3 Discussion..... | 55 |
| Conclusion and outlook..... | 56 |
| Conclusion..... | 56 |
| Outlook..... | 56 |
| References..... | 56 |
| Appendixes..... | 61 |
| Acknowledgements..... | 68 |

摘要

CRISPR/Cas9 做为第三代人工核酸内切酶，由于其操作简单、特异性强、及效率高的特性，目前已被广泛用于多种生物的基因组编辑。CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术不仅可以用于基因敲除，而且也可以用于精确的基因插入，成为基因功能研究非常有前途的工具。在短短的两年里，已有二十几篇文章先后报道了在秀丽隐杆线虫中利用 CRISPR/Cas9 对不同基因进行的精确编辑。

本研究中，我们利用 CRISPR/Cas9 系统，通过 Cas9 切割导致 DNA 断裂诱导同源重组，在对 *dpy-13* 基因敲除的同时，成功进行了 1.8kb 基因片段的精确插入。虽然我们尝试在 *dpy-13* 基因上进行更大片段（3.8kb）的敲入没有获得成功，但是至少标志着我们有可能在后续实验中插入 1.8kb 及更小的基因片段。

我们通过构建热激启动子启动 Cas9 表达，构建了一个条件性基因敲除系统，用于研究必需基因缺失后代的表型，以及其在胚后发育过程中的作用。实验结果表明，在 L1 时期进行热激诱导 Cas9 的表达，进而对 *dpy-13* 靶序列的切割，确实可以达到绕过早期胚胎发育阶段，并产生相应表型。这个条件性基因敲除系统将使我们有可能研究必需基因在不同发育阶段的功能。

一个有效的 sgRNA 是 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑成功的关键。本文尝试构建了一个 sgRNA 有效性检测系统，用以检测 sgRNA 是否能有效地指导 Cas9 对靶序列进行切割。在这一系统中，我们将 sgRNA 靶序列连接到绿色荧光蛋白基因序列前面，在 Cas9 切割 sgRNA 靶序列后会导致绿色荧光的表达，进而来检测 sgRNA 的有效性。实验结果表明，这一系统可以快速检测 sgRNA 的有效性，将极大地减少在无效 sgRNA 上所花的时间，并且在检测 sgRNA 有效性的同时还可以富集基因编辑事件，其富集率高于 Co-CRISPR 方法。

关键词： CRISPR/Cas9；基因编辑；sgRNA 有效性；

Abstract

CRISPR/Cas9 is the third generation of artificial endonucleases. It has been successfully applied in a variety of organisms for genome editing, due to its easiness and specificity. It has become a very promising tool for studying gene function, not only because it could be used to knock out genes but also knock in genes precisely.

DNA damage created by CRISPR/Cas9 system would lead to homologous recombination during DNA damage repair, which could be used for precise gene knock-in. In this study, we successfully knocked in a 1.8kb DNA fragment into *dpy-13* locus by CRISPR/Cas9 system. Although we failed to knock in larger (3.8kb) DNA fragment, it demonstrated we could knock in DNA fragment as large as 1.8kb in future experiments.

To study the function of essential genes, we constructed a conditional knock-out system by expressing Cas9 driven by heat shock gene promoter. Our results showed that when we induced the expression of Cas9 by heat shock at the L1 stage, somatic expression of Cas9 could cut *dpy-13* targeting site and lead to expecting phenotypes. Our result also suggested that this conditional knock-out system mediated by CRISPR/Cas9 could help us to analyze functions of essential genes after embryonic stages.

The results from us and other researchers suggested that an efficient sgRNA is the key factor for successful gene knock-out mediated by CRISPR/Cas9 system. We attempted to construct a sgRNA efficiency testing system in *C. elegans* to examine whether a sgRNA targeting site could be cut by CRISPR/Cas9 system efficiently. In this system, we inserted sgRNA targeting site sequence in front of GFP gene fragment and cut of sgRNA targeting site by Cas9 would lead to glowing of GFP. Our results showed that our sgRNA efficiency testing system could be used not only to test the efficiency of sgRNAs quickly, but also to enrich gene editing events. Compared to recently reported Co-CRISPR method, it showed even higher enrichment of gene editing events.

Key Words: CRISPR/Cas9; genome editing; sgRN efficiency

厦门大学博硕士学位论文摘要库

前言

1 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术

1.1 CRISPR/Cas9 的发现和 research 历史

CRISPR/Cas9 来源于很多细菌和大部分古生菌的天然免疫系统，由 RNA 对入侵的病毒和核酸进行特异性的识别，通过 Cas 蛋白进行切割，导致入侵的病毒和核酸的降解，从而达到自身的免疫作用^[1]。

早在 1987 年，日本大阪大学（Osaka University）在对一种细菌编码的碱性磷酸酶基因进行研究时，发现在这个基因编码区域的附近存在一小段不同寻常的 DNA 片段，这些片段是由简单的重复序列组成的，而且在片段的两端还存在一段不太长的特有的序列。随后的研究发现这种间隔重复序列广泛存在于细菌和古细菌的基因组中。这就是很多细菌和大部分古生菌的天然免疫系统 CRISPR/Cas 系统^[2, 3]。

在细菌或大部分古生菌中，CRISPR 基因座在没有受到外界压力即入侵的病毒和核酸进攻的情况下表达水平很低，一旦外源的质粒或是噬菌体入侵宿主菌，CRISPR 的表达很快就会被诱导上调。图 1 是产脓链球菌 CRISPR/Cas9 干扰噬菌体或外源质粒入侵示意图。CRISPR/Cas9 干扰噬菌体或外源质粒主要分为三个步骤：第一步是 CRISPR 的高度可变的间隔区的获得，第二步是 CRISPR 基因座的表达(包括转录和转录后的成熟加工)，第三步是 CRISPR/Cas 系统活性的发挥或者是对外源遗传物质的干扰。CRISPR 的高度可变的间隔区(spacer)的获得，即外来入侵的噬菌体或是质粒 DNA 上 19bp 的一小段 DNA 序列被整合到宿主菌的基因组，整合的位置位于 CRISPR 的 5' 端的两个重复序列之间(repeats)。因此，CRISPR 基因座中的间隔序列从 5' 到 3' 的排列也记录了外源遗传物质入侵的时间顺序。噬菌体或是质粒上与间隔序列对应的序列被称为 protospacer，通常 protospacer 的 3' 端延伸 3 个碱基序列很保守，一般为 NGG，被称为 PAM(protospacer adjacent motifs)。新间隔序列的获得可能分为三步：首先识别入侵的核酸和扫描外源 DNA 潜在的 PAM，将临近 PAM 的序列作为候选 protospacer；然后在 CRISPR 基因座的 5' 端合成重复序列；最后新的间隔序列整

合到两个重复序列之间，目前只有第一个步骤被证实^[4-8]。

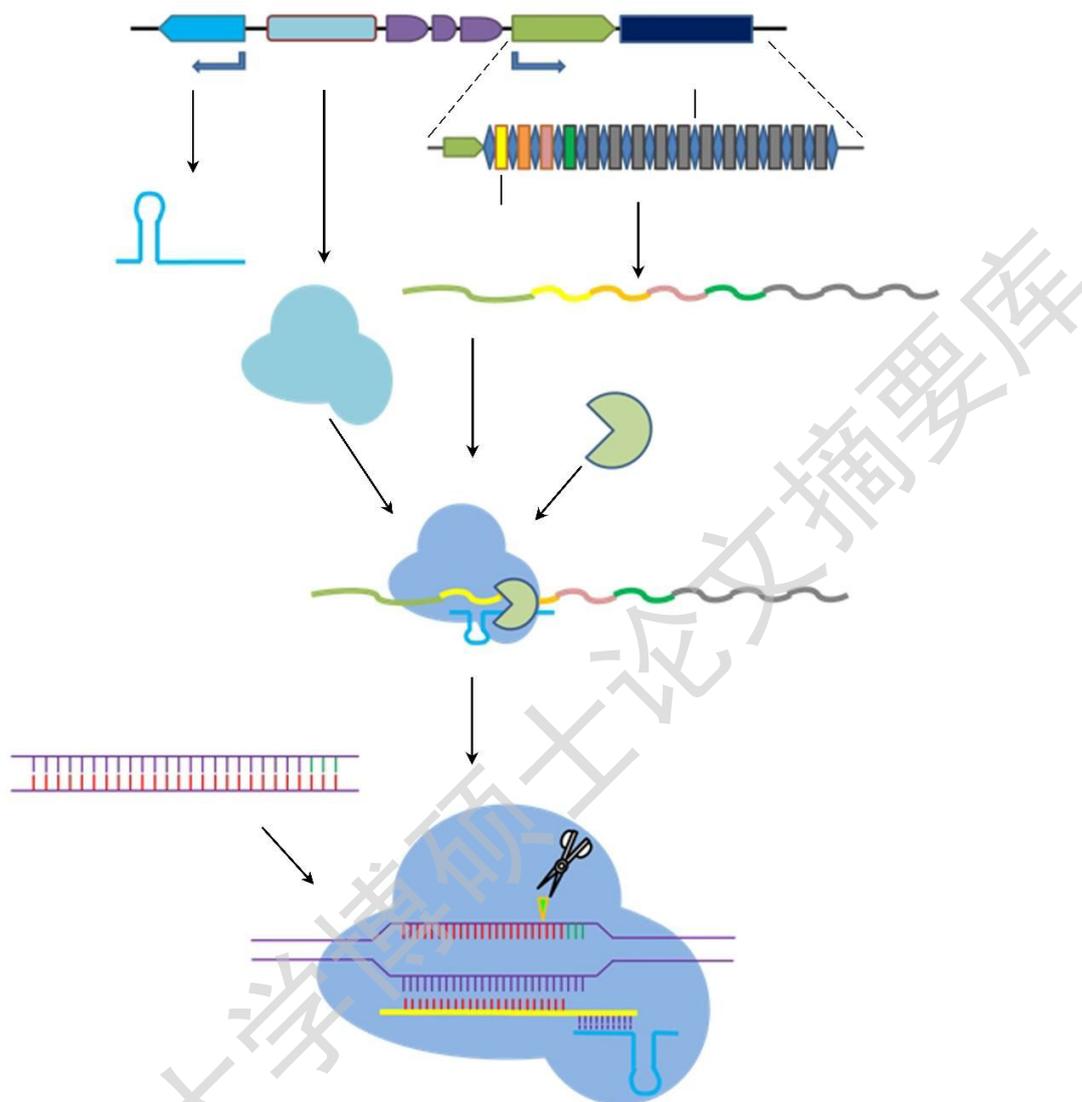


图 1 产脓链球菌 CRISPR/Cas9 干扰噬菌体或外源质粒入侵示意图^[9]

Figure 1 Schematic of CRISPR/Cas9 mediated DNA double-strand break^[9]

CRISPR/Cas 的发现在当时并没有引起大家的重视，直到 2005 年，三个研究小组均发现 CRISPR 的间隔序列(spacer)与宿主菌的染色体外的遗传物质高度同源，推测其功能可能与细菌抵抗外源遗传物质入侵的免疫系统有关。2007 年，Barrangou 等^[10]首次发现并证明细菌可能利用 CRISPR 系统抵抗噬菌体入侵。2008 年，Marraffini 等^[11]又发现细菌 CRISPR 系统能阻止外源质粒的转移，首次利用实验验证了 CRISPR 系统的功能，由此科学家们揭开了研究 CRISPR 系

统作用机制的序幕。2013年初，经过研究人员改造过的一种全新的人工核酸内切酶 CRISPR/Cas9 就成为各个领域研究及应用的热点，目前该技术成功应用于人类细胞、斑马鱼和小鼠以及细菌的基因组精确修饰，修饰类型包括基因定点 *InDel* 突变、基因定点敲入、两位点同时突变和小片段的缺失^[4]。

1.2 CRISPR/Cas9 的基因结构及其介导基因编辑的机制

经过改造的 CRISPR/Cas9 基因座主要由三部分构成：第一部分是 5' 端的 *tracrRNA* 基因，在 *crRNA* 成熟过程，5' 端的 *tracrRNA* 基因与 RNaseIII 共同作用，帮助 Pre-*crRNA* 剪切为成熟的 *crRNA*，并与 *crRNA* 形成二聚体结构，识别靶位点 (target site)。第二部分 3' 端为 CRISPR 基因座，由启动子区域和众多的间隔序列 (*spacers*) 和重复序列 (*direct repeats*) 顺序排列组成，转录出 *crRNA*，主要负责识别靶位点 (target site)。第三部分是 Cas 蛋白编码基因，包括 Cas9、Cas1、Cas2 和 Csn2。Cas 存在于 CRISPR 位点附近，编码一种双链 DNA 核酸酶，能在 guide RNA 引导下对靶位点进行切割。它与 *folk* 酶功能类似，但是它并不需要形成二聚体就能发挥作用，而且不具特异性^[12, 13]。

CRISPR/Cas9 介导基因编辑的过程如图 2 所示，主要分为三步，第一是 Cas9 蛋白和 CRISPR 基因座中起识别作用的间隔序列的表达 (包括转录和转录后的成熟加工成为 guide RNA)，第二 guide RNA 对靶位点 PAM (protospacer adjacent motifs) 的识别并将 Cas9 蛋白介导到靶位点。第三是 Cas9 蛋白对靶基因进行切割，导致双链 DNA 断裂，在 DNA 损伤修复过程中，会产生碱基插入和缺失，就能导致读码框的改变^[12]。

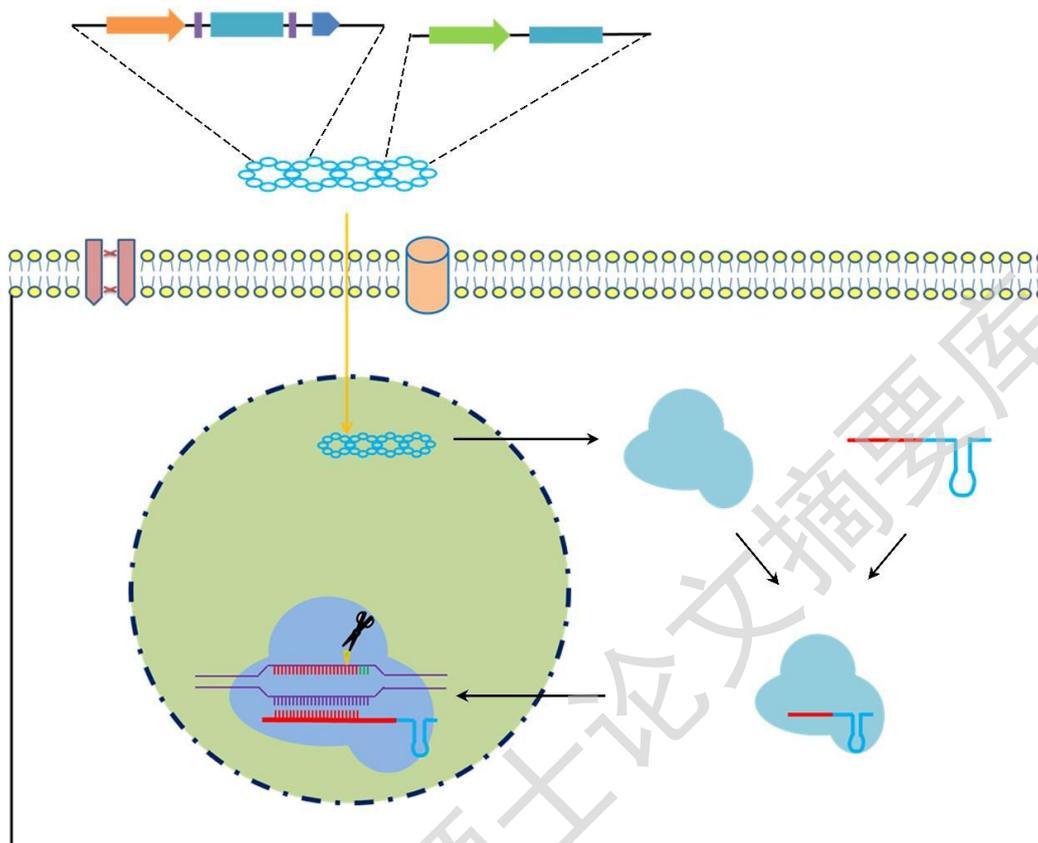


图 2 哺乳动物细胞中 gRNA (chimeric RNA) 介导 Cas9 基因定点编辑^[9]

Figure 2 Schematic of gRNA (chimeric RNA) guide Cas9 site-specific cleavage in animal genome^[9]

在改造过的 CRISPR/Cas9 系统中，sgRNA 是有基因特异性的，Cas9 表达质粒不具有特异性，可以与任何基因的特异的 sgRNA 组合进行基因编辑。

为了形成功能性的 DNA 靶向复合物，Cas9 需要两种不同的 RNA 转录物即 crRNA (CRISPR RNA) 和 tracrRNA (transactivating crRNA)。然而，近期的研究表明，这样的双 RNA 可以重新装配成一种单导向 RNA (single-guide RNA, sgRNA)，人们根据其特点对其进行化学合成，形成单导向 RNA (single-guide RNA) 即 sgRNA，其包含的序列足以编程 RNA 复合物介导 Cas9 切割靶基因导致 DNA 双链断裂。人工合成的 sgRNA 使 CRISPR/Cas 系统介导的基因编辑技术更加简单高效，并且已经得到了广泛的应用^[14]。

1.3 CRISPR/Cas9 的优势和应用价值

基因编辑技术是研究基因功能的重要手段之一，人工核酸内切酶(engineered endonuclease, EEN)的出现，是基因编辑技术的重大突破。锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)被称为第一代人工核酸内切酶。锌指是指一类能够结合DNA的蛋白质，人类细胞的转录因子中大约有一半含有锌指结构，ZFN 由将锌指蛋白与核酸内切酶Fok I 融合而形成的核酸内切酶^[15]，它可以在各种复杂基因组的特定位置进行基因编辑。但是，由于ZFN的制备比较复杂，成本很高，并且其技术专利被少数几家商业公司控制，所以转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)一出现就在很大程度上替代了ZFN。2009年，科学家将一种水稻的致病菌(Xanthomonas)编码的类转录激活因子效应物(transcription activator-like effector, TALE)与DNA 碱基对应关系解密^[16-18]出来，称为第二代人工核酸内切酶。TALEN和ZFN一样可以对复杂的基因组进行精细的基因修饰，同时其构建相对简单，特异性更强，因此，在2012年被《科学》(Science)杂志评为十大科学突破之一^[12]。

然而无论是ZFN还是TALEN，都是由DNA结合蛋白与核酸内切酶Fok I 融合而成。最近经过研究人员改造过的一种全新的人工核酸内切酶CRISPR/Cas9，与锌指核酸内切酶(zinc finger endonuclease, ZFN)和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)一样可用于各种复杂基因组的编辑，被称为第三代人工核酸内切酶。CRISPR/Cas9与ZFN和TALEN这两种人工核酸酶相比，更有优势，相对于ZFN和TALEN而言，CRISPR/Cas9构建简单方便快捷，适用于任何分子生物实验室并且编辑效率优于ZFN或TALEN。CRISPR/Cas9还可以改造成为切口酶，在DNA的特定位置制造单链切口，这样基本不会引起非同源末端插入(NHEJ)，但可以激活细胞的同源重组(HR)机制。实验证明，同一种细胞的同一靶位点处由CRISPR/Cas9切割产生的单链切口和双链切口诱发的同源重组效率基本相同^[19]，但是发生非同源末端插入的概率却不同。因此，利用Cas9 作为切口酶可以高效地介导基因组的点突变，大大降低了非同源末端插入的风险和脱靶现象。Ding等^[20]在Cell Stem Cell上报道，在人的iPS 细胞中，在细胞相同、载体结构相似以及靶位点相同的情况下，CRISPR/Cas9 的定点突变效率至少是TALEN的2倍以上，并且诱发双等位基因的效率更高。人的iPS 细胞在治疗某些人类遗传疾病的方面有着很大的前景^[21-24]。

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.