



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107630018 B

(45)授权公告日 2018.10.12

(21)申请号 201710922540.9

(22)申请日 2017.09.30

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107630018 A

(43)申请公布日 2018.01.26

(73)专利权人 深圳三智医学科技有限公司

地址 518000 广东省深圳市南山区西丽街道茶光路1089号深圳集成电路设计应用产业园207-2

(72)发明人 张芸 姜舒 纪惜鑫 刘婕 郭明

罗朝霞 杨顺

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

(56)对比文件

WO 2016154579 A2,2016.09.29,全文.

US 2016281111 A1,2016.09.29,全文.

WO 2015148863 A2,2015.10.01,全文.

Rimantas Saprunauskas et al..The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli.《Nucleic Acids Research》.2011,9275-9282.

李焕荣,李增彦.β-地中海贫血CRISPR/Cas9基因治疗研究进展.《国际妇产科学杂志》.2017,185-188.

Yumei Luo et al..Integrative Analysis of CRISPR/Cas9 Target Sites in the Human HBB Gene.《BioMed Research International》.2015,1-9.

Fei Xie et al..Seamless gene correction of b-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac.《Genome Res.》.2014,1526-1533.

审查员 毛舒燕

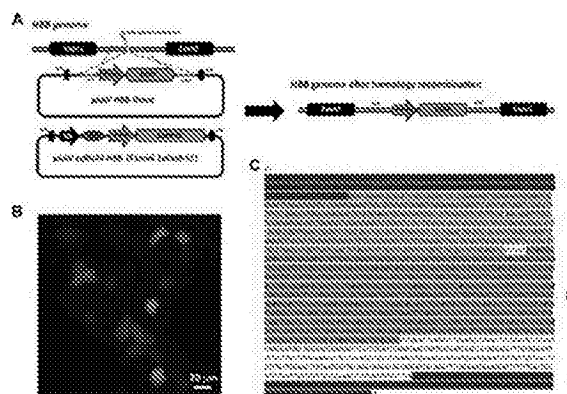
权利要求书1页 说明书8页
序列表8页 附图4页

(54)发明名称

一种用于编辑或修复HBB基因的试剂盒

(57)摘要

本发明涉及一种试剂盒,尤其是涉及一种用于编辑或修复人类血红蛋白基因(HBB基因)的试剂盒。本发明提供的试剂盒包括:特异性靶向HBB基因的sgRNA或包含该sgRNA核苷酸序列的载体;和/或改造的Cas9酶或编码该改造的Cas9酶的序列或包含编码该改造的Cas9酶序列的载体;和/或用于修复β-地中海贫血HBB基因的供体基因序列或包含所述供体基因序列的载体。本发明还提供了所述试剂盒在切割或修复HBB基因中的应用,尤其是在修复β-地中海贫血患者自体造血干细胞的HBB基因中的应用。本发明提供的试剂盒,靶向HBB基因的靶向性强,切割HBB基因效率高,脱靶效率低,且可有效修复HBB基因,在临床研究及治疗应用上前景广阔。



1. 一种改造的Cas9蛋白,该改造的Cas9蛋白为将野生型Cas9蛋白第848位赖氨酸突变成丙氨酸及第1003位赖氨酸突变成丙氨酸及第1060位精氨酸突变成丙氨酸获得;其中,所述的野生型Cas9蛋白为氨基酸序列如SEQ ID NO. 15所示的SpCas9蛋白。

2. 一种改造的Cas9蛋白,该改造的Cas9蛋白为将野生型Cas9蛋白第848位赖氨酸突变成丙氨酸及第925位精氨酸突变成脯氨酸及第1003位赖氨酸突变成丙氨酸及第1060位精氨酸突变成丙氨酸获得;其中,所述的野生型Cas9蛋白为氨基酸序列如SEQ ID NO. 15所示的SpCas9蛋白。

3. 权利要求1或2所述的改造的Cas9蛋白在制备编辑或修复HBB基因的试剂盒中的应用。

4. 一种试剂盒,其特征在于包括权利要求1或2所述的改造的Cas9蛋白或编码该改造的Cas9蛋白的核苷酸序列或包含编码该改造的Cas9蛋白的核苷酸序列的载体。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,该试剂盒还包括:用于修复HBB基因的供体基因序列或包含该供体基因序列的载体。

一种用于编辑或修复HBB基因的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种试剂盒,尤其是涉及一种用于编辑或修复HBB基因的试剂盒。

背景技术

[0002] 地中海贫血(Thalassemia,简称地贫)又称海洋性贫血。是临床常见的遗传性溶血性贫血。在东南亚、地中海等地区多见,因最早在地中海沿岸的意大利、希腊、马耳他等地区发现,故称地中海贫血。

[0003] 地中海贫血是一种遗传性血红蛋白病,是由于调控珠蛋白合成的基因缺失或突变,导致构成血红蛋白的 α 链和 β 链珠蛋白的合成比例失衡,红细胞寿命缩短的一种溶血性贫血。

[0004] 根据基因缺陷的分类,临床上主要分为 α 链珠蛋白地中海贫血及 β 链珠蛋白地中海贫血。 β -地中海贫血是由 β -珠蛋白基因突变导致的 β -珠蛋白合成障碍,是全球最常见的单基因遗传病。

[0005] 2008年WHO全球血红蛋白病流行病学报告:在229个国家中约占71%人群存在血红蛋白病这一重大健康问题。在这些国家出生的新生儿占全球新生儿的89%,其中每年超过330000例的新生儿与血红蛋白病有关(其中83%为镰状细胞症,17%为地中海贫血)。5岁以下儿童死亡者中血红蛋白病约占3.4%。每年约有56000例重型 β -地中海贫血,其中至少有30000例需规范输血才能存活,5500例重型 α -地中海贫血死于围生期。目前国内外对地中海贫血治疗主要方法:规范性长期输血和去铁治疗;根治方法:HLA相合的造血干细胞移植;姑息方法:脾切除术等。但这些治疗方法给病人家庭及社会带来了沉重的负担。

[0006] 随着分子生物学和分子遗传学理论和技术的迅速发展,人们对基因治疗进行了广泛和深入的基础研究,并在实施方法、转移效率、基因表达、动物试验、安全性评价等方面取得了很大的进展,基因治疗作为一种临床治疗方法已逐渐开始为人们所接受。基因治疗 β -地中海贫血作为新的治疗方式将患者有缺陷的基因进行替代或补偿缺陷功能成为新的研究热点。

[0007] CRISPR/Cas9系统的出现使人们认识到体内基因编辑工具的强大,因此最近许多科学家研究如何利用CRISPR/Cas9系统修复遗传疾病致病基因的突变,从而达到治疗单基因遗传病的目的。对 β -地中海贫血的研究也在此之列。

[0008] 然而,作为基因编辑技术,脱靶效应是不可避免的一个缺点,影响了其临床转化应用的进程。因此,如何在提高CRISPR/Cas技术基因编辑效率的同时提高其靶向性,是利用CRISPR/Cas技术修复 β -地中海贫血患者的HBB基因面临的一大难题。

发明内容

[0009] 为弥补现有技术的不足,本发明的目的在于提供一种试剂盒,该试剂盒利用CRISPR/Cas9系统编辑或修复人类血红蛋白基因(HBB基因),对HBB基因的靶向性强,切割HBB基因的效率,脱靶效率低。

[0010] 一方面,本发明提供了一种向导RNA (sgRNA),其作用是介导Cas9蛋白与靶基因特异性结合;所述的靶基因优选为HBB基因。

[0011] 编码所述的sgRNA的核苷酸序列(也就是所述的sgRNA对应的DNA序列)为SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的序列。

[0012] 本发明意外的发现,上述SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2、SEQ ID NO.3或SEQ ID NO.4所示的序列用于介导Cas9蛋白与HBB基因特异性结合,具有相对更强的靶向性并且结合更加紧密,显著提高了Cas9蛋白对HBB基因的切割效率,并明显减少了脱靶效应。

[0013] 另一个方面,本发明提供了一种改造的Cas9蛋白,所述的改造的Cas9蛋白为将野生型Cas9蛋白第848位赖氨酸突变成丙氨酸及第1003位赖氨酸突变成丙氨酸及第1060位精氨酸突变成丙氨酸获得;

[0014] 优选地,所述的改造的Cas9蛋白为将野生型Cas9蛋白第848位赖氨酸突变成丙氨酸及第925位精氨酸突变成脯氨酸及第1003位赖氨酸突变成丙氨酸及第1060位精氨酸突变成丙氨酸获得;

[0015] 优选地,所述的野生型Cas9蛋白为为化脓性链球菌Cas9蛋白 (SpCas9蛋白),其氨基酸序列如SEQ ID NO.15所示。

[0016] 本发明意外的发现,上述突变位点引入Cas9蛋白后得到的改造后的Cas9蛋白能够更加精准地识别HBB基因,从而提高基因编辑效率,降低脱靶效应。

[0017] 本发明还提供了上述sgRNA和/或改造的Cas9蛋白在制备编辑或修复HBB基因的试剂盒中的应用。

[0018] 再一个方面,本发明提供了一种试剂盒,该试剂盒包括:编码上述sgRNA的寡核苷酸序列或包含该寡核苷酸序列的载体。

[0019] 进一步地,编码上述sgRNA的寡核苷酸序列包括sgRNA正义链和sgRNA反义链。

[0020] 在一个优选的实施方案中,所述的sgRNA正义链包括如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列,所述的sgRNA反义链包括如SEQ ID NO.1所示的核苷酸序列的反向互补序列。

[0021] 在另一个优选的实施方案中,所述的sgRNA正义链包括如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列,所述的sgRNA反义链包括如SEQ ID NO.2所示的核苷酸序列的反向互补序列。

[0022] 在又一个优选的实施方案中,所述的sgRNA正义链包括如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列,所述的sgRNA反义链包括如SEQ ID NO.3所示的核苷酸序列的反向互补序列。

[0023] 在再一个优选的实施方案中,所述的sgRNA正义链包括如SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列,所述的sgRNA反义链包括如SEQ ID NO.4所示的核苷酸序列的反向互补序列。

[0024] 更进一步地,所述的包含编码上述sgRNA的寡核苷酸序列的载体上可以同时含有编码上述改造的Cas9蛋白的核苷酸序列。

[0025] 优选地,所述的试剂盒还包括上述改造的Cas9蛋白、编码该改造的Cas9蛋白的核苷酸序列或包含编码该改造的Cas9蛋白的核苷酸序列的载体。

[0026] 在一个优选的实施方案中,所述的包含编码改造的Cas9蛋白的核苷酸序列的载体上可以同时含有编码上述sgRNA的寡核苷酸序列。

[0027] 更优选地,所述的试剂盒还包括用于修复HBB基因的供体基因序列或包含该供体基因序列的载体。

[0028] 进一步地,所述的用于修复HBB基因的供体基因序列包括野生型HBB基因序列;

[0029] 优选地,所述的用于修复HBB基因的供体基因序列可含有野生型HBB基因的非同源序列,该非同源序列侧接两个野生型HBB基因的同源序列,以便在HBB基因处有效地进行HDR(同源介导的双链DNA修复)。

[0030] 本发明还提供了上述试剂盒在切割HBB基因或修复HBB基因中的应用。

[0031] 进一步地,所述应用为修复 β -地中海贫血患者自体造血干细胞的HBB基因。修复 β -地中海贫血患者自体造血干细胞的HBB基因可将 β -地中海贫血患者自体造血干细胞转变为具有正常合成 β -珠蛋白功能的造血干细胞。

[0032] 进一步地,所述应用的方法为:将上述sgRNA的寡核苷酸序列或包含该寡核苷酸序列的载体,和/或编码该改造的Cas9蛋白的核苷酸序列或包含编码该改造的Cas9蛋白的核苷酸序列的载体,和/或包含上述用于修复HBB基因的供体基因序列的载体导入受体细胞,以完成编辑或修复HBB基因。

[0033] 其中,所述导入受体细胞的方法可以利用本领域常用的导入方法,例如显微注射法、脂质体介导法、病毒转染法、电转染等;其中,所述病毒转染法优选利用腺相关病毒载体(Adeno-associated Virus, AAV)系统。

[0034] 本发明的有益效果在于:

[0035] 1、本发明提供的试剂盒,靶向HBB基因的靶向性强,切割HBB基因的效率,脱靶效应低,且可有效修复HBB基因,尤其是 β -地中海贫血患者自体造血干细胞的HBB基因,在临床研究及治疗应用上前景广阔。

[0036] 2、本发明提供的试剂盒中的sgRNA的靶位点设计在HBB基因的内含子区域,剪切该内含子后利用同源重组技术,将携带有正常HBB基因供体重组到细胞的基因组中,修复下游基因突变。因不用通过剪切外显子来进行基因编辑,故同以往的基因编辑相比,降低了基因编辑技术脱靶效应导致的风险。

[0037] 3、本发明提供的试剂盒中的改造的Cas9酶可提高基因编辑靶向性和靶基因切割效率,减少脱靶效应,减少脱靶导致的基因突变。

附图说明

[0038] 图1 psgRNA-HBB-SpCas9-SZ载体结构示意图。U6为驱动sgRNA的启动子, CAG为CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) 启动子,用于驱动Cas9-SZ的表达。

[0039] 图2 T7 endonuclease I 酶切法检测psgRNA-HBB-SpCas9-SZ插入/缺失效率的电泳结果。泳道1为未含sgRNA的对照组,泳道2~6分别为psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1和psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ2的酶切结果。

[0040] 图3 T7 endonuclease I 酶切法检测psgRNA-HBB-SpCas9-SZ插入/缺失效率的统计结果。1-5分别为psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1和psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ2的统计结果。Data = Mean \pm SE, n = 3。

[0041] 图4A HBB-sgRNA4-S的序列和人类基因组序列进行比对,从中挑选的3个最为接近的靶点序列。

[0042] 图4B 测序结果表明,psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1在这些位点上都无剪切。

- [0043] 图5A pAAV-sgRNA4-HBB-EF1mini-EGFP载体结构图。
- [0044] 图5B AAV病毒包装过程。
- [0045] 图5C包装好的AAV病毒感染HEK293细胞的荧光图片。
- [0046] 图6A pAAV-sgRNA4-HBB-EF1mini-SpCas9-SZ1载体和pAAV-HBB-Donor载体结构图。
- [0047] 图6B重组后的细胞表达EGFP的荧光图片。
- [0048] 图6C同源重组修复后的基因型测序结果,其中,阴影区域1和4为HBB基因同源臂序列,阴影区域2为EF1mini启动子序列,阴影区域3为EGFP基因序列。

具体实施方式

- [0049] 下述实施例中所使用的试验方法如无特殊说明,均为常规方法。
- [0050] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。以下实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。
- [0051] 实验例1
- [0052] 验证该试剂盒对HBB基因的切割效率
- [0053] 1、改造SpCas9蛋白
- [0054] 将SpCas9蛋白(GI:81533697)的第848位赖氨酸突变成丙氨酸及第1003位赖氨酸突变成丙氨酸及第1060位精氨酸突变成丙氨酸,获得的改造后的SpCas9蛋白命名为SpCas9-SZ1蛋白。
- [0055] 将SpCas9蛋白(GI:81533697)的第848位赖氨酸突变成丙氨酸及第925位精氨酸突变成脯氨酸及第1003位赖氨酸突变成丙氨酸及第1060位精氨酸突变成丙氨酸,获得的改造后的SpCas9蛋白命名为SpCas9-SZ2蛋白。
- [0056] 2、构建pSpCas9-SZ(BB)载体
- [0057] 突变pSpCas9(BB)(Addgene plasmid ID:42230)载体中SpCas9的编码序列,使其编码步骤1所述的SpCas9-SZ1酶,新载体命名为pSpCas9-SZ1载体。
- [0058] 突变pSpCas9(BB)(Addgene plasmid ID:42230)载体中SpCas9的编码序列,使其编码步骤1所述的SpCas9-SZ2酶,新载体命名为pSpCas9-SZ2载体。
- [0059] 3、合成特异性靶向HBB基因的sgRNA寡核苷酸序列
- [0060] 合成4组sgRNA序列(HBB-sgRNA1-4),这四组sgRNA序列分别包括如SEQ ID NO.1-4所示的核苷酸序列或其反向互补序列。这四组sgRNA序列(HBB-sgRNA1-4)的命名及核苷酸序列分别见表1:其中,每组sgRNA序列包括两条序列,其中一条为正义链DNA(S),另一条为反义链DNA(AS)。
- [0061] 表1

[0062]

组别	名称	合成的 DNA 序列(5' -3')	加粗斜体部分	SEQ ID NO.
1	HBB-sgRNA1-S	CACCG <i>AAGGTTACAAGACAGGTTTA</i>	SEQ ID NO. 1	5
	HBB-sgRNA1-As	AAAC <i>TAAACCTGTCTTGTAACCTTC</i>	SEQ ID NO. 1 的反向互补序列	6
2	HBB-sgRNA2-S	CACCG <i>TAAGGAGACCAATAGAAACT</i>	SEQ ID NO. 2	7
	HBB-sgRNA2-As	AAAC <i>AGTTTCTATTGGTCTCCTTAC</i>	SEQ ID NO. 2 的反向互补序列	8
3	HBB-sgRNA3-S	CACCG <i>ACCAATAGAAACTGGGCATG</i>	SEQ ID NO. 3	9
	HBB-sgRNA3-As	AAAC <i>CATGCCCAGTTTCTATTGGTC</i>	SEQ ID NO. 3 的反向互补序列	10
4	HBB-sgRNA4-S	CACCG <i>TGGTATCAAGGTTACAAGAC</i>	SEQ ID NO. 4	11
	HBB-sgRNA4-As	AAAC <i>GTCTTGTAACCTTGATACCAC</i>	SEQ ID NO. 4 的反向互补序列	12

[0063] 4、构建psgRNA-HBB-SpCas9-SZ1和psgRNA-HBB-SpCas9-SZ2载体

[0064] 将sgRNA的序列克隆到pSpCas9-SZ1中,获得sgRNA和SpCas9-SZ1蛋白共表达的重组载体:psgRNA-HBB-SpCas9-SZ1载体。

[0065] 将sgRNA的序列克隆到pSpCas9-SZ2中,获得sgRNA和SpCas9-SZ2蛋白共表达的重组载体:psgRNA-HBB-SpCas9-SZ2载体。

[0066] psgRNA-HBB-SpCas9-SZ1和psgRNA-HBB-SpCas9-SZ2重组载体的结构示意图见图1。其中,U6为驱动sgRNA的启动子,CAG为CMV early enhancer/chickenβactin (CAG) 启动子,用于驱动SpCas9-SZ1或SpCas9-SZ2蛋白的表达。

[0067] 以psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ1载体的构建方法为例描述psgRNA-HBB-SpCas9-SZ1和psgRNA-HBB-SpCas9-SZ2重组载体的构建:

[0068] (1) 配置上述步骤3所述的第1组sgRNA的正义链HBB-sgRNA1-S (SEQ ID NO.5) 和第1组sgRNA的反义链HBB-sgRNA1-As (SEQ ID NO.6) 的悬液,使其终浓度分别为100μM,按下述体系进行退火:

组分	体积 (μl)
HBB-sgRNA1-S	1
HBB-sgRNA1-AS	1
10×T4 ligation buffer	1
T4 多聚核苷酸激酶 (T4 PNK)	1
ddH ₂ O	6;

[0069] 其中,退火条件为:37℃,30min;95℃,5min;以5℃·min⁻¹的速度降至25℃。退火后的产物命名为HBB-sgRNA1。[0071] (2) 将上述步骤4-(1) 获得的HBB-sgRNA1用ddH₂O按1:200稀释至总体积为200μl。

[0072] (3) 用BbSI酶酶切步骤2获得的pSpCas9-SZ1载体,所用酶切体系如下:

组分	体积 (μl)
pSpCas9-SZ1 (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	1
10 \times NEB buffer	2
[0073] FastDigest BbsI	1
ddH ₂ O	16;

37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切反应 1 h。

[0074] (4) 将步骤4-(2) 获得的稀释后的HBB-sgRNA1连接入BbsI酶酶切后的pSpCas9-SZ1载体中:

[0075] 在步骤(3)所用酶切体系的基础上添加下述组分,

组分	体积 (μl)
步骤 4- (2) 的产物	1
[0076] 10 \times T4 ligase buffer	2.5
T4 连接酶 (T4 ligase)	1
ddH ₂ O	0.5;

[0077] 25 $^{\circ}\text{C}$ 连接 30 min。

[0078] (5) 鉴定克隆:将上述步骤4-(4)的连接产物取2 μl 热转化至Stb13感受态细胞中,涂布平板,37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。挑取单克隆,37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌过夜,抽提质粒并进行测序,鉴定HBB-sgRNA1是否插入pSpCas9-SZ1载体的U6启动子和CAG启动子之间。测序结果显示,HBB-sgRNA1正确插入。获得的新载体命名为psg RNA1-HBB-SpCas9-SZ1。

[0079] psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ2载体的构建方法同上述psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ1的构建。

[0080] 测序结果显示,psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ2载体均构建成功。

[0081] 以下所称psgRNA-HBB-SpCas9-SZ载体为psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ2、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ2载体的统称。

[0082] 5、共表达重组载体转染HEK293T细胞:

[0083] 按 1.5×10^5 个细胞/孔将HEK293T细胞接种于24孔板中,细胞悬液总体积为500 μl ;

[0084] 种板24h后进行细胞转染:(1)用无血清培养基将2 μg psgRNA-HBB-SpCas9-SZ载体和1 μg EGFP载体稀释至250 μl ,温和混匀;(2)用培养基将脂质体稀释至250 μl ,室温孵育5min;(3)将上述5-(1)步骤和5-(2)步骤获取的混合物混匀,室温孵育20min;(4)吸去HEK293T细胞中的培养液,将步骤5-(3)获得的混合物加入细胞,细胞置于细胞恒温培养箱37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育6h后换成含10%FBS的DMEM培养基,转染48h后观察转染效率。

[0085] 6、T7endonuclease I酶切法检测插入/缺失效率,以验证psgRNA-HBB-SpCas9-SZ对HBB基因切割效率:

[0086] (1)收取转染后的细胞;400g离心5min;弃去上清液,用1×PBS重悬细胞。

[0087] 利用细胞基因组DNA提取试剂盒提取其细胞基因组DNA。

[0088] (2)以基因组DNA为模板,利用针对HBB基因的特异性引物按如下程序进行PCR扩增;所述HBB基因的特异性正向引物为SEQ ID NO.13所示核苷酸序列;特异性反向引物为SEQ ID NO.14所示核苷酸序列;

[0089] 所述PCR扩增程序为:95℃,3min;95℃,30s,66℃,30s,72℃,30s,26个循环;72℃,5min。

[0090] (3)扩增产物于1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳;

[0091] 利用胶回收试剂盒回收目的DNA片段。

[0092] (4)取步骤(3)所得纯化的DNA 17μl,加入2μl T7核酸内切酶I(T7endonuclease I)缓冲液,按下述程序进行变性退火处理:

步骤	温度	变温速率	时间
变性	95 °C		5 min
[0093] 退火	95-85 °C	-2 °C/s	
	85-25 °C	-0.1 °C/s	
维持温度	4 °C		Hold;

[0094] 于上述退火产物中加入1μl T7endonuclease I,混匀后37℃孵育酶切30min。

[0095] (5)酶切产物于2%琼脂糖凝胶中电泳;比较被T7endonuclease I酶切及未被酶切的片段的比例即可检测出psgRNA-HBB-SpCas9-SZ载体对HBB基因的切割效率。电泳结果见图2,其中,泳道1为未含sgRNA的对照组,泳道2~6分别为psgRNA1-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA2-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA3-HBB-SpCas9-SZ1、psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1和psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ2的酶切结果。

[0096] psgRNA-HBB-SpCas9-SZ载体酶切效率的统计结果见图3。结果表明,本发明的试剂盒中所提供的4组sgRNA均有较好的编辑效率,其中以第4组sgRNA的编辑效率最高;在sgRNA序列相同的情况下,SpCas9-SZ2蛋白的酶切效率略优于,SpCas9-SZ1蛋白。

[0097] 实验例2

[0098] 验证该试剂盒的脱靶效率

[0099] 1、将HBB-sgRNA4-S的序列和人类基因组序列进行比对,从中挑选了与其最为接近的靶点(图4A),我们针对这些靶点区域设计特异性的引物进行PCR扩增,然后对扩增产物进行测序,测序结果表明,psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1载体在这些位点上都无剪切(图4B)。即利用本发明试剂盒提供的sgRNA序列和改造后的Cas9蛋白构建的psgRNA4-HBB-SpCas9-SZ1载体无脱靶,特异性强,安全性高。

[0100] 实验例3

[0101] 验证该试剂盒的基因重组效率

[0102] 1、验证EF1迷你(EF1mini)启动子的驱动效率

[0103] 腺相关病毒是目前基因治疗中最常用的病毒载体之一,但其装载容量有限,限制

了其包装CRISPR-Cas9系统用于将来的应用之中。为此我们对启动Cas9的启动子进行了改造,采用了新型的EF1mini启动子用于我们的系统当中。该迷你启动子大小仅为500bp,其核苷酸序列如Seq ID NO.16所示,能够很好的驱动Cas9的表达。

[0104] (1) 用化学合成方法,合成EF1mini启动子,将其连接入psgRNA-HBB-SpCas9-SZ载体。为验证该EF1mini启动子的活性,先用该启动子驱动报告基因EGFP的表达,构建pAAV-sgRNA4-HBB-EF1mini-EGFP载体,载体结构图见图5A。

[0105] (2) 利用HEK293T细胞,通过三质粒共转染方法,包装出AAV病毒,如图5B所示。

[0106] (3) 包装好的AAV病毒感染HEK293T细胞:

[0107] 按 1.5×10^5 个细胞/孔将HEK293T细胞接种于24孔板中,细胞悬液总体积为500 μ l。种板24h后加入AAV病毒悬液进行细胞感染。图5C所示为感染后96h,不同浓度的AAV病毒感染HEK293T细胞的荧光照片。

[0108] 该结果表明,该EF1迷你启动子能够很好地驱动目的基因的表达。

[0109] 2、构建pAAV-sgRNA4-HBB-EF1mini-SpCas9-SZ1腺相关病毒载体

[0110] 用PCR扩增SpCas9-SZ1基因,替代上述步骤1-(1)所述pAAV-sgRNA4-HBB-EF1mini-EGFP载体的EGFP基因后的载体即为pAAV-sgRNA1-HBB-EF1mini-SpCas9-SZ1载体,该载体的结构示意图见图6A。

[0111] 3、构建包含用于修复 β -地中海贫血HBB基因的供体基因序列的载体:pAAV-HBB-Donor载体

[0112] 用PCR扩增HBB同源臂,插入至pAAV-EF1mini-EGFP载体的EF1mini-EGFP序列的两侧后,将整个序列放入AAV载体中,得到pAAV-HBB-Donor载体,pAAV-HBB-Donor载体结构图见图6A。

[0113] 4、以上述步骤1-(2)所述AAV病毒包装方法包装的pAAV-HBB-Donor和pAAV-sgRNA4-HBB-EF1mini-SpCas9-SZ1的病毒感染HEK293T细胞。重组后的细胞表达EGFP的荧光图片见图6B。

[0114] 5、分析同源重组修复后的基因型:

[0115] 以流式细胞仪分选EGFP阳性的细胞,提取细胞基因组DNA,然后以特异性引物扩增同源臂之间的序列,将PCR产物送测序。测序结果见图6C。其中,阴影区域1和4为HBB基因同源臂序列,阴影区域2为EF1mini启动子序列,阴影区域3为EGFP基因序列。结果显示,HBB基因同源臂序列被成功重组到了受体细胞中。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 深圳三智医学科技有限公司
- [0003] <120> 一种用于编辑或修复HBB基因的试剂盒
- [0004] <130> 20170926
- [0005] <160> 16
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 20
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
- [0011] <400> 1
- [0012] aaggttaca gacaggttta 20
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 20
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
- [0017] <400> 2
- [0018] taaggagacc aatagaaact 20
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 20
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
- [0023] <400> 3
- [0024] accaatagaa actgggcatg 20
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 20
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
- [0029] <400> 4
- [0030] tggatcaag gttacaagac 20
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 25
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
- [0035] <400> 5
- [0036] caccgaaggt tacaagacag gttta 25
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 25

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0041] <400> 6
[0042] aaactaaacc tgtcttgtaa ccttc 25
[0043] <210> 7
[0044] <211> 25
[0045] <212> DNA
[0046] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0047] <400> 7
[0048] caccgtaagg agaccaatag aaact 25
[0049] <210> 8
[0050] <211> 25
[0051] <212> DNA
[0052] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0053] <400> 8
[0054] aaacagtttc tattggtctc cttac 25
[0055] <210> 9
[0056] <211> 25
[0057] <212> DNA
[0058] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0059] <400> 9
[0060] caccgaccaa tagaaactgg gcatg 25
[0061] <210> 10
[0062] <211> 25
[0063] <212> DNA
[0064] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0065] <400> 10
[0066] aaaccatgcc cagtttctat tggtc 25
[0067] <210> 11
[0068] <211> 25
[0069] <212> DNA
[0070] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0071] <400> 11
[0072] caccgtggta tcaaggttac aagac 25
[0073] <210> 12
[0074] <211> 25
[0075] <212> DNA
[0076] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0077] <400> 12

[0078] aaacgtcttg taaccttgat accac 25
 [0079] <210> 13
 [0080] <211> 23
 [0081] <212> DNA
 [0082] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
 [0083] <400> 13
 [0084] cctgaggaga agtctgccgt tac 23
 [0085] <210> 14
 [0086] <211> 21
 [0087] <212> DNA
 [0088] <213> 人工序列 (RenGongXuLie)
 [0089] <400> 14
 [0090] ttgaggttgt ccaggtgagc c 21
 [0091] <210> 15
 [0092] <211> 1368
 [0093] <212> PRT
 [0094] <213> Streptococcus
 [0095] <400> 15
 [0096] Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val
 [0097] 1 5 10 15
 [0098] Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe
 [0099] 20 25 30
 [0100] Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile
 [0101] 35 40 45
 [0102] Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu
 [0103] 50 55 60
 [0104] Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys
 [0105] 65 70 75 80
 [0106] Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser
 [0107] 85 90 95
 [0108] Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys
 [0109] 100 105 110
 [0110] His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr
 [0111] 115 120 125
 [0112] His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp
 [0113] 130 135 140
 [0114] Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His
 [0115] 145 150 155 160
 [0116] Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro

[0117]		165		170		175
[0118]	Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr					
[0119]		180		185		190
[0120]	Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala					
[0121]		195		200		205
[0122]	Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn					
[0123]		210		215		220
[0124]	Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn					
[0125]		225		230		235
[0126]	Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe					
[0127]		245		250		255
[0128]	Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp					
[0129]		260		265		270
[0130]	Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp					
[0131]		275		280		285
[0132]	Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp					
[0133]		290		295		300
[0134]	Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser					
[0135]		305		310		315
[0136]	Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys					
[0137]		325		330		335
[0138]	Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe					
[0139]		340		345		350
[0140]	Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser					
[0141]		355		360		365
[0142]	Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp					
[0143]		370		375		380
[0144]	Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg					
[0145]		385		390		395
[0146]	Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu					
[0147]		405		410		415
[0148]	Gly Glu Leu His Ala Ile Leu Arg Arg Gln Glu Asp Phe Tyr Pro Phe					
[0149]		420		425		430
[0150]	Leu Lys Asp Asn Arg Glu Lys Ile Glu Lys Ile Leu Thr Phe Arg Ile					
[0151]		435		440		445
[0152]	Pro Tyr Tyr Val Gly Pro Leu Ala Arg Gly Asn Ser Arg Phe Ala Trp					
[0153]		450		455		460
[0154]	Met Thr Arg Lys Ser Glu Glu Thr Ile Thr Pro Trp Asn Phe Glu Glu					
[0155]		465		470		475
						480

[0156]	Val Val Asp Lys Gly Ala Ser Ala Gln Ser Phe Ile Glu Arg Met Thr
[0157]	485 490 495
[0158]	Asn Phe Asp Lys Asn Leu Pro Asn Glu Lys Val Leu Pro Lys His Ser
[0159]	500 505 510
[0160]	Leu Leu Tyr Glu Tyr Phe Thr Val Tyr Asn Glu Leu Thr Lys Val Lys
[0161]	515 520 525
[0162]	Tyr Val Thr Glu Gly Met Arg Lys Pro Ala Phe Leu Ser Gly Glu Gln
[0163]	530 535 540
[0164]	Lys Lys Ala Ile Val Asp Leu Leu Phe Lys Thr Asn Arg Lys Val Thr
[0165]	545 550 555 560
[0166]	Val Lys Gln Leu Lys Glu Asp Tyr Phe Lys Lys Ile Glu Cys Phe Asp
[0167]	565 570 575
[0168]	Ser Val Glu Ile Ser Gly Val Glu Asp Arg Phe Asn Ala Ser Leu Gly
[0169]	580 585 590
[0170]	Thr Tyr His Asp Leu Leu Lys Ile Ile Lys Asp Lys Asp Phe Leu Asp
[0171]	595 600 605
[0172]	Asn Glu Glu Asn Glu Asp Ile Leu Glu Asp Ile Val Leu Thr Leu Thr
[0173]	610 615 620
[0174]	Leu Phe Glu Asp Arg Glu Met Ile Glu Glu Arg Leu Lys Thr Tyr Ala
[0175]	625 630 635 640
[0176]	His Leu Phe Asp Asp Lys Val Met Lys Gln Leu Lys Arg Arg Arg Tyr
[0177]	645 650 655
[0178]	Thr Gly Trp Gly Arg Leu Ser Arg Lys Leu Ile Asn Gly Ile Arg Asp
[0179]	660 665 670
[0180]	Lys Gln Ser Gly Lys Thr Ile Leu Asp Phe Leu Lys Ser Asp Gly Phe
[0181]	675 680 685
[0182]	Ala Asn Arg Asn Phe Met Gln Leu Ile His Asp Asp Ser Leu Thr Phe
[0183]	690 695 700
[0184]	Lys Glu Asp Ile Gln Lys Ala Gln Val Ser Gly Gln Gly Asp Ser Leu
[0185]	705 710 715 720
[0186]	His Glu His Ile Ala Asn Leu Ala Gly Ser Pro Ala Ile Lys Lys Gly
[0187]	725 730 735
[0188]	Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly
[0189]	740 745 750
[0190]	Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln
[0191]	755 760 765
[0192]	Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile
[0193]	770 775 780
[0194]	Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro

[0195]	785	790	795	800
[0196]	Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu			
[0197]		805	810	815
[0198]	Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg			
[0199]		820	825	830
[0200]	Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys			
[0201]		835	840	845
[0202]	Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg			
[0203]		850	855	860
[0204]	Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys			
[0205]		865	870	880
[0206]	Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys			
[0207]		885	890	895
[0208]	Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp			
[0209]		900	905	910
[0210]	Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr			
[0211]		915	920	925
[0212]	Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp			
[0213]		930	935	940
[0214]	Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser			
[0215]		945	950	960
[0216]	Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg			
[0217]		965	970	975
[0218]	Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val			
[0219]		980	985	990
[0220]	Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe			
[0221]		995	1000	1005
[0222]	Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys			
[0223]		1010	1015	1020
[0224]	Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser			
[0225]		1025	1030	1035
[0226]	Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu			
[0227]		1040	1045	1050
[0228]	Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile			
[0229]		1060	1065	1070
[0230]	Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser			
[0231]		1075	1080	1085
[0232]	Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly			
[0233]		1090	1095	1100

[0234]	Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile
[0235]	1105 1110 1115
[0236]	Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser
[0237]	1120 1125 1130 1135
[0238]	Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly
[0239]	1140 1145 1150
[0240]	Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile
[0241]	1155 1160 1165
[0242]	Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala
[0243]	1170 1175 1180
[0244]	Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys
[0245]	1185 1190 1195
[0246]	Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser
[0247]	1200 1205 1210 1215
[0248]	Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr
[0249]	1220 1225 1230
[0250]	Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser
[0251]	1235 1240 1245
[0252]	Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His
[0253]	1250 1255 1260
[0254]	Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val
[0255]	1265 1270 1275
[0256]	Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys
[0257]	1280 1285 1290 1295
[0258]	His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu
[0259]	1300 1305 1310
[0260]	Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp
[0261]	1315 1320 1325
[0262]	Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp
[0263]	1330 1335 1340
[0264]	Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile
[0265]	1345 1350 1355
[0266]	Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp
[0267]	1360 1365
[0268]	<210> 16
[0269]	<211> 493
[0270]	<212> DNA
[0271]	<213> 人工序列 (RenGongXuLie)
[0272]	<400> 16

[0273] gggcagagcg cacatgccc acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa 60
[0274] cgggtgccta gagaaggtgg cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc 120
[0275] gcctttttcc cgagggtggg ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc 180
[0276] tttttcgcaa cgggtttgcc gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcactctctc 240
[0277] cttcacgcgc ccgccgcct acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc 300
[0278] cgcctcccgc ctgtggtgcc tectgaactg cgtecgccgt ctaggtaagt ttaaagctca 360
[0279] ggtcgagacc gggcctttgt ccggcgctcc cttggagcct acctagactc agccggctct 420
[0280] ccacgctttg cctgaccctg cttgctcaac tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc 480
[0281] gccgttacag atc 493

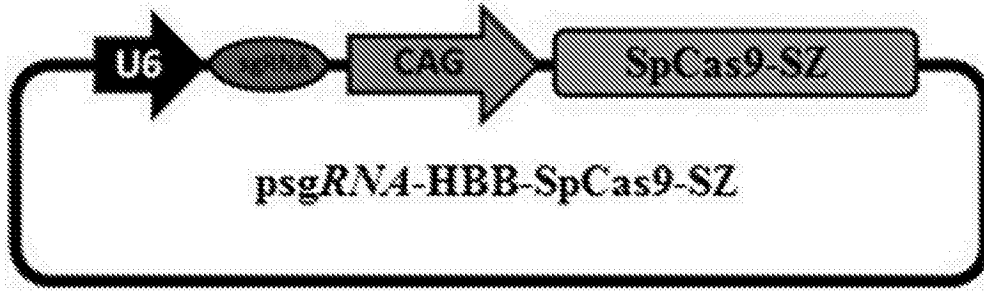


图1

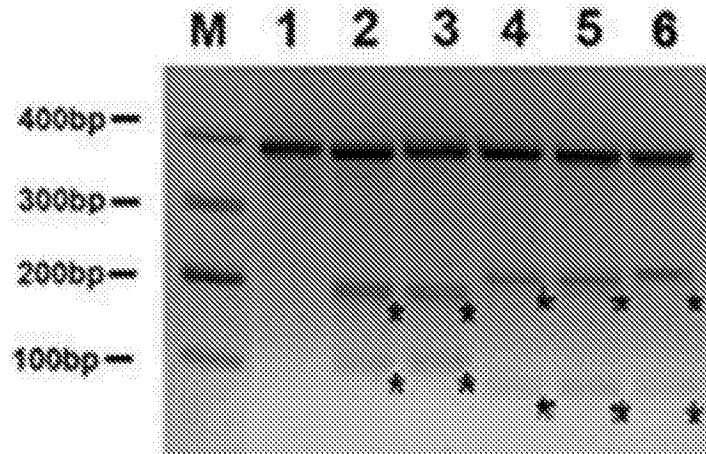


图2

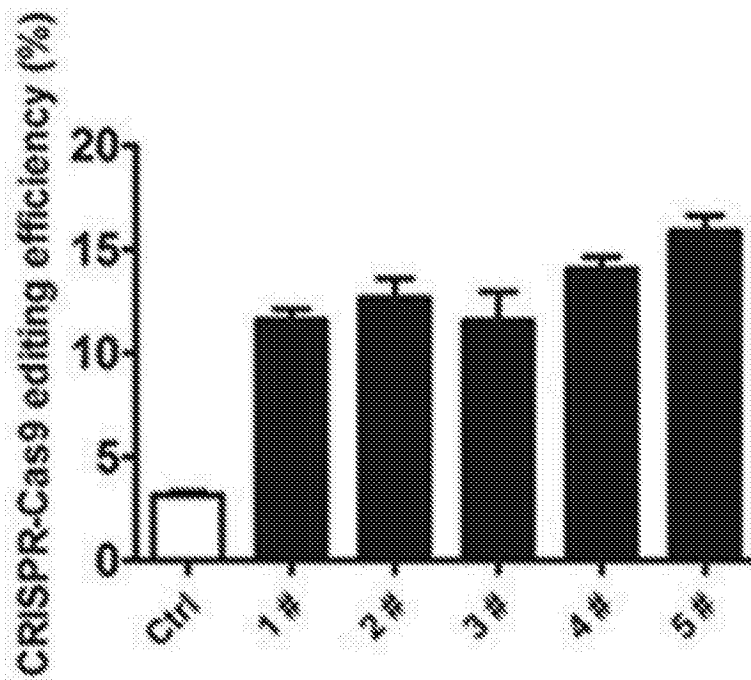


图3

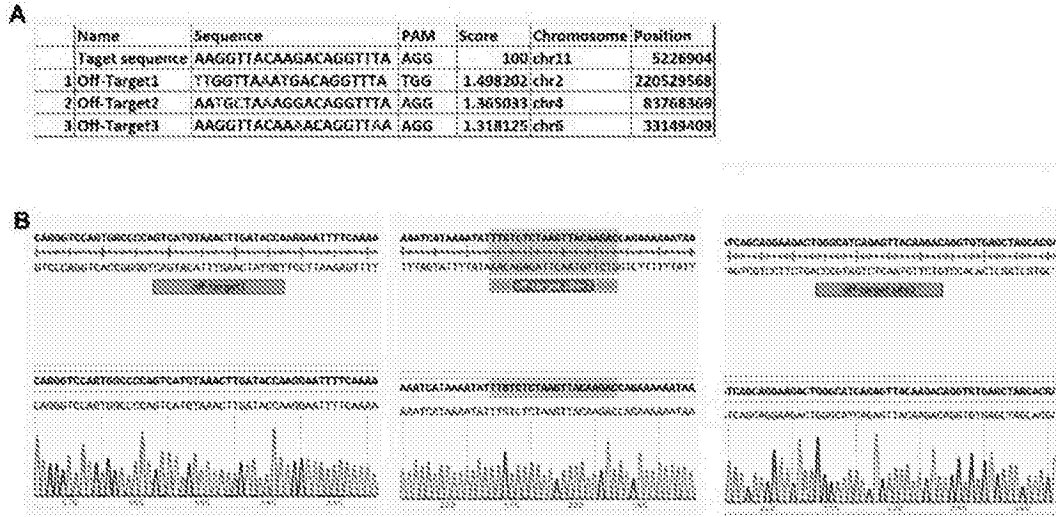


图4

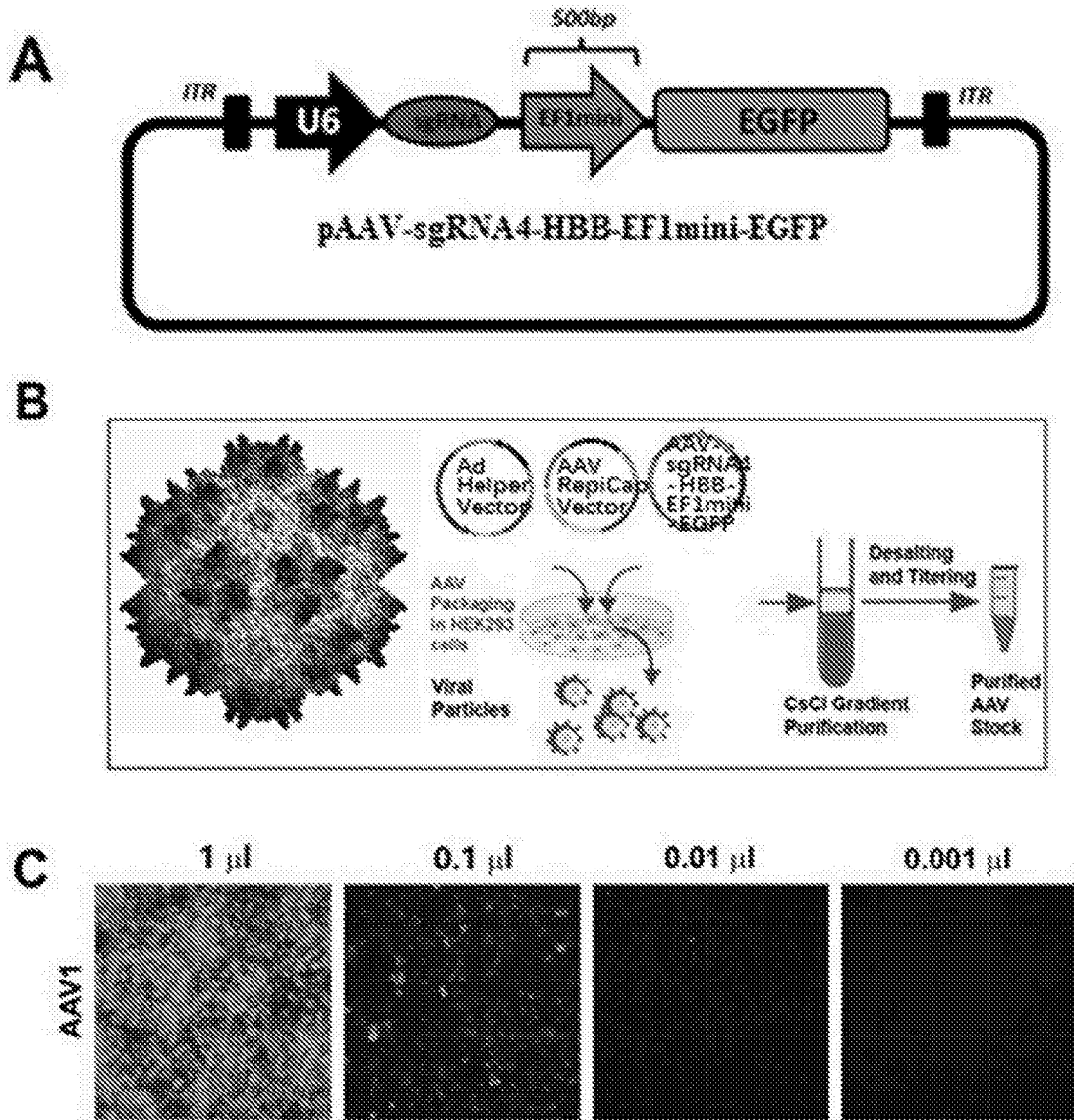


图5

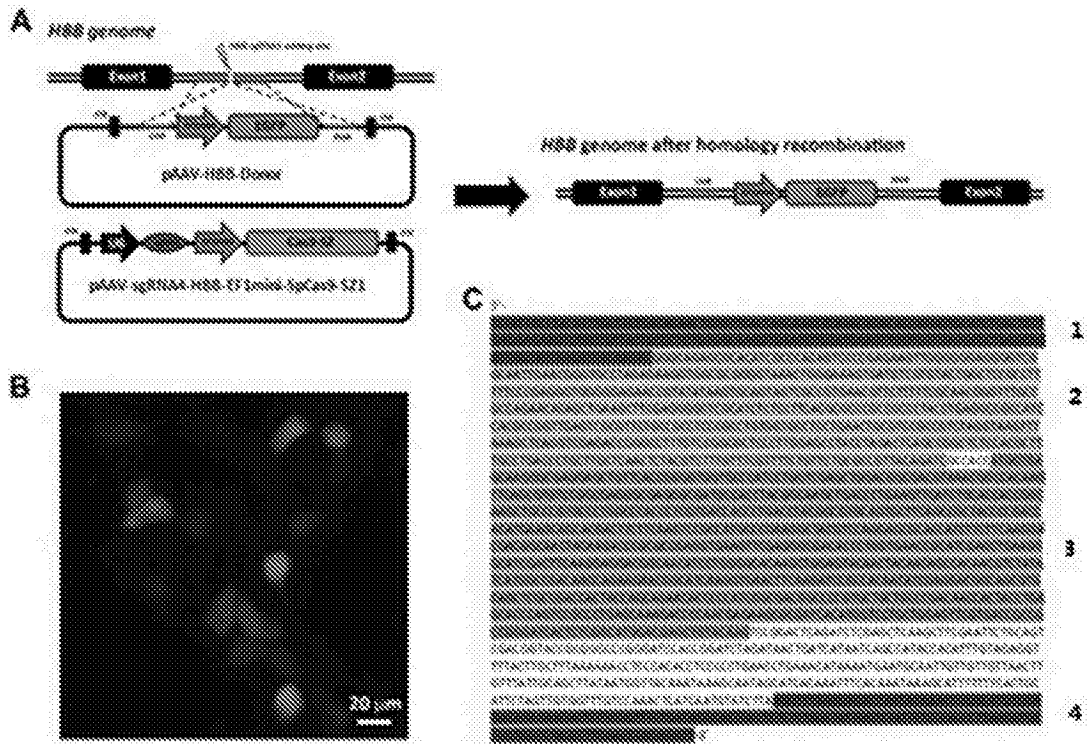


图6