

利用MGIEasy PCR Free建库技术和DNBSEQ™高通量测序技术评估CRISPR/Cas9基因编辑及基因组CRISPR/Cas9文库的编辑效率

亮点



操作步骤简单，可实现全自动化建库流程

操作步骤简单，仅需3.9小时即可完成文库制备流程。适配自动化样本处理系统，提供自动化的文库制备方法



兼容多种常见样本类型

适用于常见的人、动植物、细菌、真菌等物种的样本，例如人的血液、唾液、新鲜组织，小鼠，水稻，大肠杆菌，宏基因组（metagenomics）等



无扩增错误累积

结合MGI DNBSEQ™技术，WGS PCR-free建库和测序全流程无PCR错误累积，最大程度保证了基因组序列的真实性



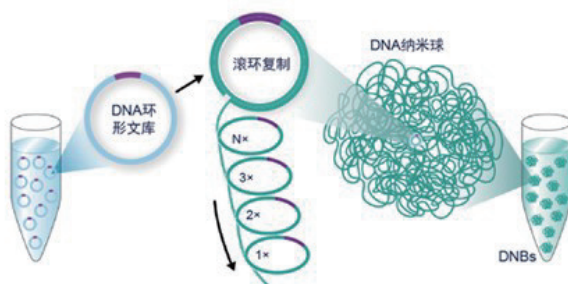
优秀的变异检测性能

同传统的WGS（PCR扩增）相比较，具有更优秀的变异检测灵敏度和准确性，特别是Indel的检测灵敏度和准确性表现优异

引言

近年来CRISPR-Cas9基因编辑系统及其衍生的单碱基基因编辑系统在科学研究和临床治疗方法开发领域得到了广泛的应用;然而CRISPR系统在不同基因编辑位点处效率的巨大差异阻碍了该系统的应用，因此实验之前，对不同guide RNA（gRNA）在基因编辑靶点处编辑效率的验证显得尤为重要。影响gRNA编辑效率的因素有很多，包括gRNA本身的二级结构、递送系统的递送效率、gRNA与编辑靶位点结合的松散程度、编辑靶点表观遗传修饰水平、二级结构、靶细胞的突变修复模式及脱靶几率的高低等。常规的Sanger测序可低通量“低深度”的对候选gRNA的编辑效率进行检测，但如果想准确细致的研究编辑位点处基因型的类型及比例，得到更多的数据，则需借助于NGS高通量测序技术。另外基因组范围的CRISPR/Cas9文库筛选技术已经得到了广泛的应用，该技术可覆盖几乎所有的已知基因，通过特定的筛选标记进行正向或反向富集，随后通过PCR扩增gRNA区，拿到富集的候选gRNA数据集，从而筛选到功能目的基因，如癌症的耐药基因等。基因组CRISPR/Cas9高通量筛选技术更离不开高通量测序技术的帮助。

华大生命科学研究院的Lars再生医学研究所向熙等依托华大智造MGIEasy的PCR free建库及MGI2000高通量测序平台，建立了一套可高通量检测CRISPR/Cas9基因编辑效率的TRAP-seq平台，实现了大规模gRNA在细胞内基因编辑图谱及效率的快速产出和研究，构建了人类细胞中CRISPR/Cas9，单碱基编辑（ABE7.10，CBE4）系统的效率数据库，并通过大数据的深度机器学习，建立了三种编辑器的效率及基因型产物预测模型，使得CRISPR基因编辑系统的开发应用更快速、更精准。通过MGIEasy的PCR Free建库及高通量测序策略对CRISPR编辑靶位点进行编辑后基因型的深入细致的研究，已成为CRISPR研究领域不可或缺的技术平台。华大智造提供MGIEasy PCR-Free系列文库构建试剂、DNBSEQ™高通量测序平台等产品组合，为用户提供全方位产品和支持。



应用案例：基于DNBSEQ技术构建TRAP-seq方法对gRNA在体内Crispr-Cas9/ABE/CBE基因编辑系统中的效率和结果进行大规模量化研究

慢病毒载体基因编辑报告系统及TRAP-seq系统结构

该系统有四大特征 (图1)：(1) 人类U6启动子；(2) 基于Golden-Gate Assembly方法组装, 包含 *lacZ* 标记的基因表达序列用于筛选阳性克隆；(3) 绿色荧光蛋白标记 (GFP) 用于病毒滴度定量；(4) 嘌呤霉素选择基因用于稳定转染细胞的富集。

人工合成的待克隆序列由gRNA、gRNA scaffold和TRAP序列组成, 共139bp; 上下游由31bp CGA克隆位点及PCR引物序列组成。总的人工合成序列长度170bp (图2)。

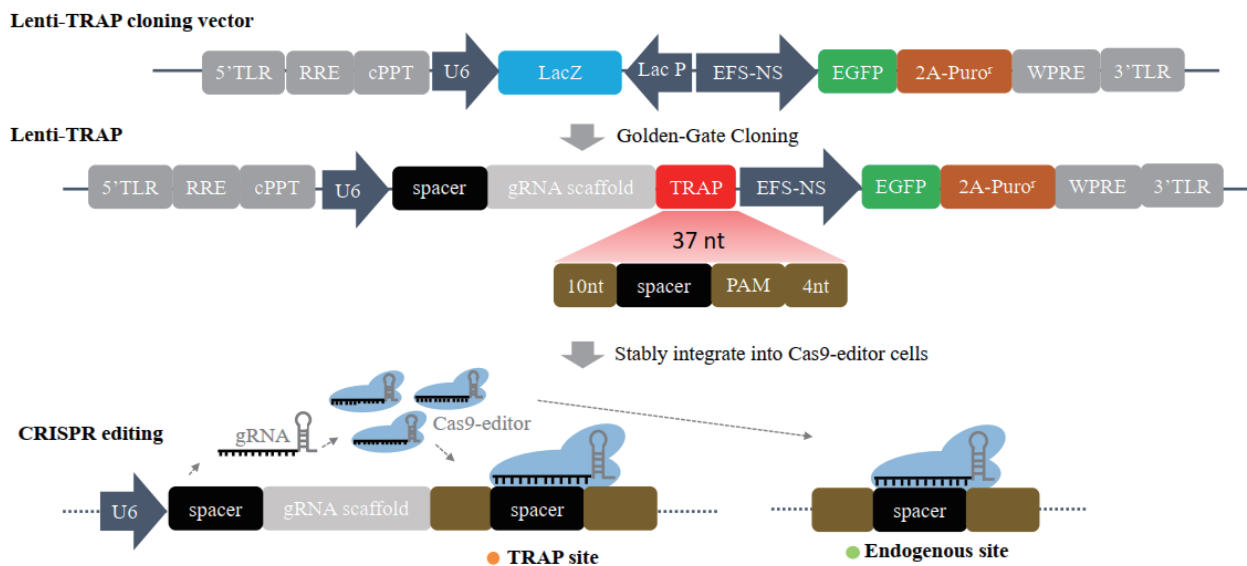


图1. 慢病毒载体结构

Illustration of the TRAP-seq vector and cloning

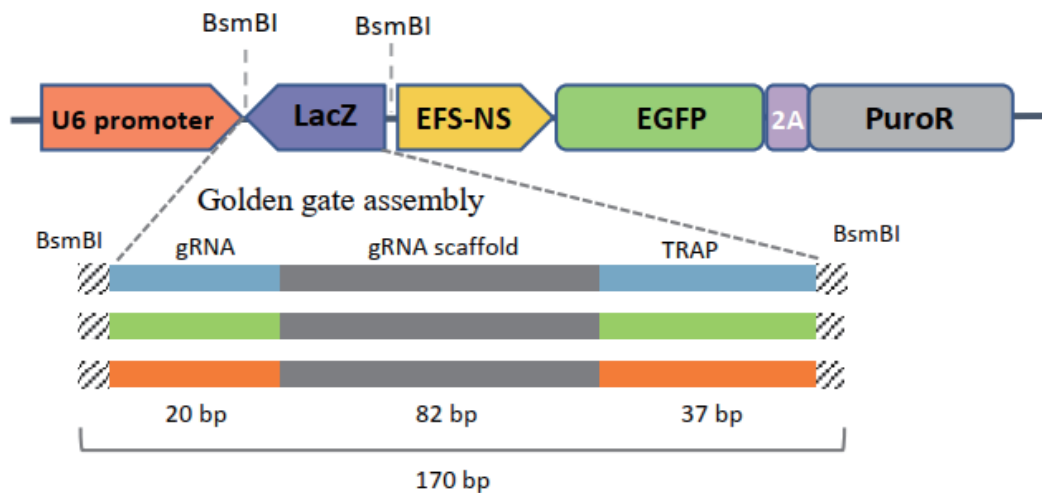


图2. TRAP-seq载体克隆结构

慢病毒载体文库构建

基于芯片合成技术合成包含12,000条（可高至92K芯片）序列的寡核苷酸序列池，使用序列两侧的通用引物序列对寡核苷酸序列池进行扩增并将序列克隆到慢病毒载体中。通过转化DH5a大肠杆菌实现载体的扩增和回收。使用野生型HEK293T细胞系进行病毒的包装和富集，同时通过流式细胞技术对病毒滴度进行定量。

慢病毒转染、细胞回收和DNBSEQ高通量深度测序

使用构建好的慢病毒文库对培养的野生型HEK293T细胞系和四环素介导Cas9基因表达的HEK293T细胞系（spCas9/ABE7.10/CBE）进行转染，在不同的培养天数后进行细胞回收和DNA提取，具体操作流程见图3。

使用TRAP载体两端的PCR引物序列对DNA进行扩增。扩增产物使用MGIEasy 酶切PCR-Free文库制备试剂套装构建高通量测序文库，在DNBSEQ测序平台上进行测序，测序模式PE150。

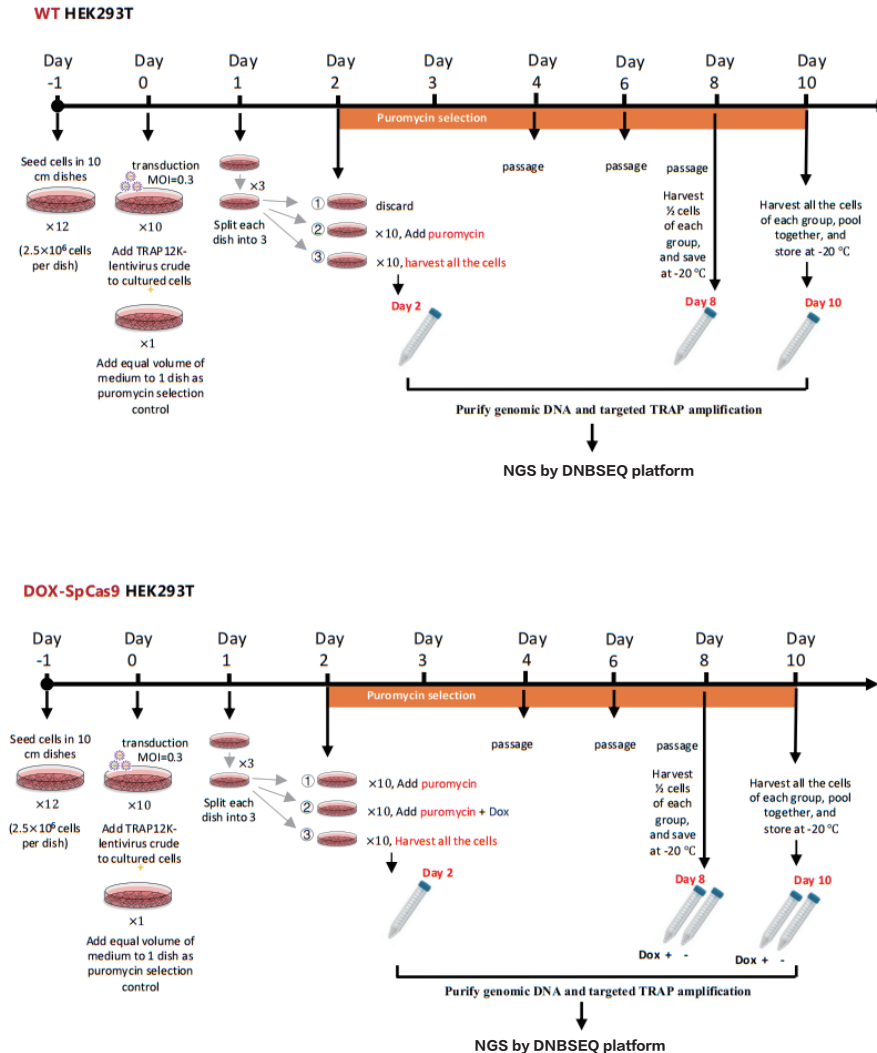


图3. 慢病毒文库转染细胞系及细胞处理和回收流程

基因编辑效率、结果及特征分析

数据分析结果显示，基因编辑的效率与Cas9蛋白表达水平（四环素诱导表达）、细胞培养时间有关。随着Cas9蛋白表达升高和培养时间延长，基因编辑效率升高（图4a、图4b、图4c）。

通过对靶点序列进行分析，发现基因编辑效率最优时gRNA的GC含量在50%–70%，deltaG自由能在[-5, 1] kJ/mol。同时还发现基因编辑靶点核心区域上下游的序列特征与基因编辑的效率有关。

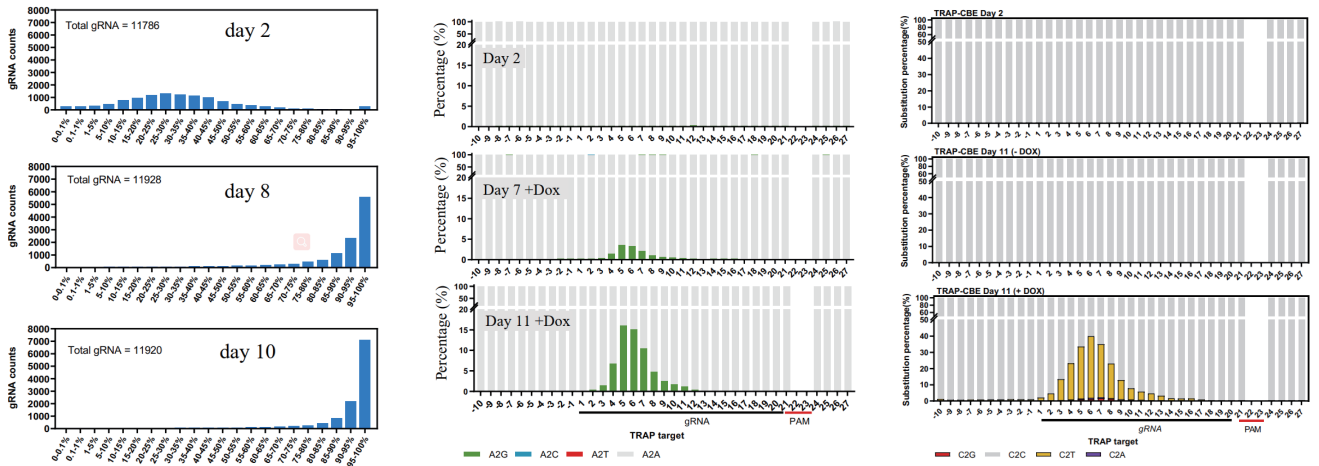


图4a. DOX-SpCas9 HEK293T细胞系转染不同时间后基因编辑的效率

图4b. DOX HEK293T ABE细胞系转染不同时间后基因编辑的效率

图4c. DOX HEK293T CBE细胞系转染不同时间后基因编辑的效率

基于机器学习的基因编辑预测模型开发和验证

使用DNBSEQ高通量深度测序得到的基因编辑效率和结果数据对GNL-Scorer算法进行训练，80%数据用于模型构建，20%数据用于模型验证。分析结果显示基于TRAP-seq数据库训练的算法对Indel预测的准确性约为70%，其表现优于其他数据和算法（图5）。

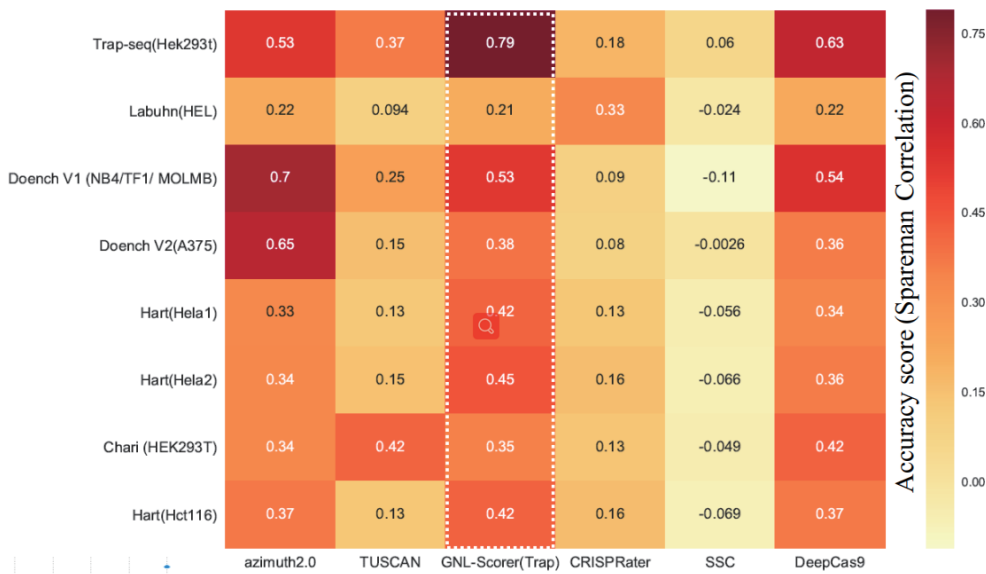


图5. TRAP-seq数据GNL-Scorer评分模型比较

■ 总结

在本应用指南中，我们介绍了MGIEasy PCR Free建库技术和MGI DNBSEQ™高通量测序技术在基因编辑数据库构建中的应用案例。基于PCR free的建库方法，有更好的SNP和InDel准确性；配合MGI DNBSEQ™高通量测序技术，可以实现Crispr-Cas9基因编辑效应的准确检测。通过高通量测序技术和慢病毒基因编辑报告系统可以快速地大规模研究gRNA在体内基因编辑的效率和结果，从而建立完善的gRNA基因编辑数据库，为Crispr-Cas9基因编辑系统的开发和应用提供指导。

■ 订购信息

产品名称	规格型号	货号
基因测序仪 MGISEQ-200RS	/	900-000350-00
基因测序仪 MGISEQ-2000RS	/	900-000035-00
基因测序仪 DNBSEQ-T7	/	900-000236-00
MGIEasy PCR-Free文库制备试剂套装	16 RXN	1000013452
MGIEasy PCR-Free文库制备试剂套装	96 RXN	1000013453
MGIEasy 酶切PCR-Free文库制备试剂套装	16 RXN	1000013454
MGIEasy 酶切PCR-Free文库制备试剂套装	96 RXN	1000013455

参考文献

1. Xi Xiang, Kunli Qu, Xue Liang, Xiaoguang Pan, etc. Massively parallel quantification of CRISPR editing in cells by TRAP-seq enables better design of Cas9, ABE, CBE gRNAs of high efficiency and accuracy. bioRxiv 2020.05.20.103614; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.20.103614>

深圳华大智造科技股份有限公司

MGI-service@mgi-tech.com | www.mgi-tech.com | 4000-688-114 | 深圳市盐田区北山工业区综合楼及11栋2楼

仅供研究使用

版权声明：本手册版权属于深圳华大智造科技股份有限公司。未经本公司书面许可，任何其他个人或组织不得以任何形式将本手册中的各项内容进行复制、拷贝、编辑或翻译为其他语言。本手册中所有商标或标识均属于深圳华大智造科技股份有限公司及其提供者所有。