臺大醫學院第一共研電子報

2014年6月第15期

基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室

Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core

本期編輯：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室 黃呈彥

編輯委員：鄧述諄 詹迺立 吳明賢 林淑華 林泰元

本期目錄：基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介

基因剔除(剔入)之原理與應用

基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室簡介

為協助醫學校區學術研究，醫學院研究發展分處第一共同研究室在2014年4月於人類疾病模式生物中心(Human disease modeling center)底下增設基因剔除(剔入)細胞株核心實驗室(Gene Knockout/in Cell Line Modeling Core)，由黃呈彥博士負責相關業務。服務與收費方式詳見醫學院研發分處第一共研網頁:

http://rd.mc.ntu.edu.tw/bomrd/ntu2/firstcore6.asp

設置地點：醫學院基礎醫學大樓R1448, R1442 & R1439

開放時間：週一至週五 9:00~17:00

使用資格：本校各科系所實驗室或計畫及附設醫院各科部負責人為主

服務項目：基因剔除(剔入)靶位設計

載體構築

基因剔除(剔入)活性測試

基因剔除(剔入)細胞株篩選

聯絡方式：電子郵件 cyh0729@ntu.edu.tw

分機 88930或88507

(請多利用電子郵件聯絡，謝謝。)

申請方式與服務流程

於第一共研網頁下載委託調查表，傳送電子郵件予黃呈彥博士

↓

靶位設計後預約面談並填寫申請表

↓

載體構築與細胞轉殖測試

↓

基因剔除(剔入)活性測試

↓

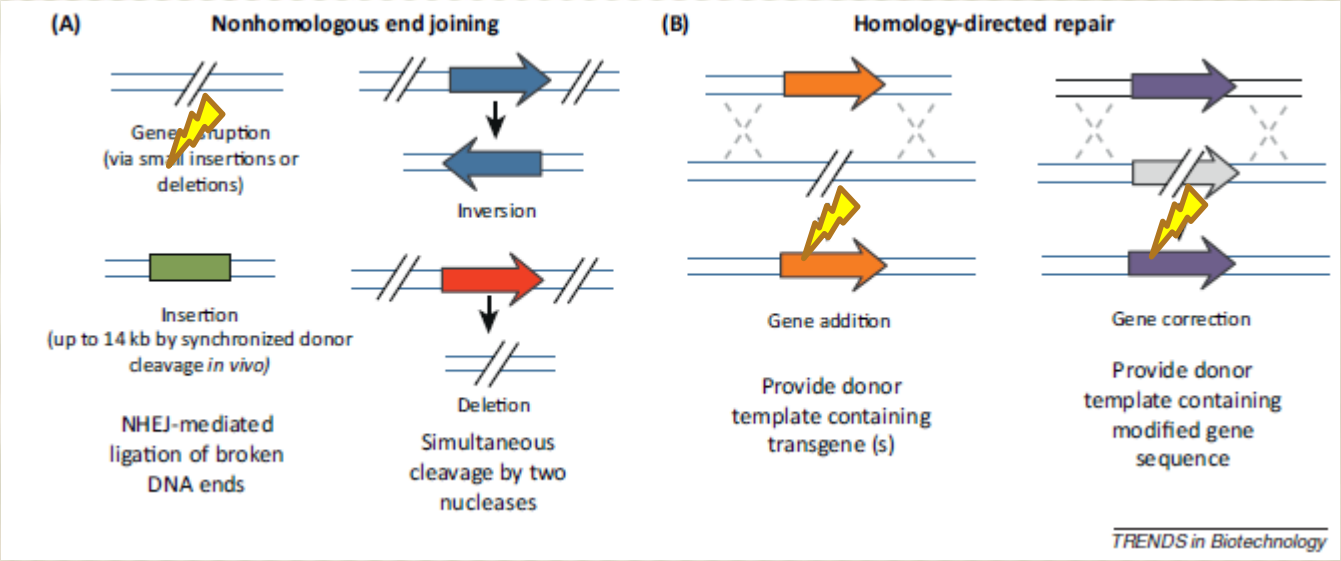
基因剔除(剔入)細胞株篩選

基因剔除(剔入)之原理與應用

Genome engineering /Genome editing technologies

基因功能研究的主要手段是對基因進行修飾以影響其功能，包括基因剔除、點突變或過表達。傳統上，利用化學誘變或轉位子導致的突變來研究基因功能，但是這些篩選不能進行特定位置的修飾。同源重组所造成的基因剔除或剔入，雖然可以準確地對特定基因進行修飾，但其操作步驟多，且效率偏低，通常低於1×10^6 [1] ，而基因干擾技術也存在著無法將基因表現完全終止的缺點。因此，科學家們一直期待一種效率高的基因组编輯方法。

基因组编輯(genome editing)技術[2]主要依賴一些識別特定序列的核酸酶在DNA上切割，造成雙股DNA斷裂，進而利用非同源末端接合機制(non-homologous end joining, NHEJ)或同源重组機制(HR, homologous recombination)來修復DNA斷點，HR可針對斷點附近的基因序列進行序列置換(HDR, homology direct repair)。

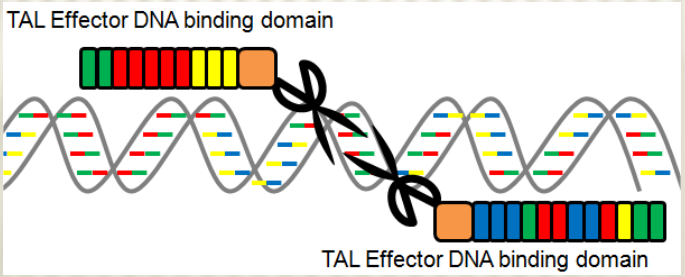


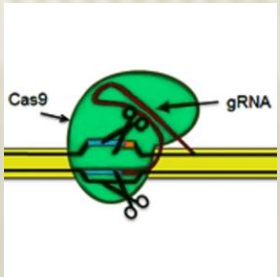
基因剔除(剔入)之原理與應用

DNA Scissors—TALEN and CRISPR/Cas

非同源末端連接修復機制並不精確，極易發生錯誤(缺失/插入)進而造成移碼突變，因此可以達到基因剔除的目的。如果刪除或插入的DNA片段的鹼基數正好是3的倍數，也可能因氨基酸的缺失或增加，對蛋白的功能有影響。雙股DNA斷點產生後，若同時存在模板DNA序列，通過同源重组的作用，可以根據所設計的模版，插入特定的一段序列(knock in)、刪除特定的序列(knock out)來突變特定的鹼基或序列。引入的模版序列可以是單股DNA，也可以是帶有長的同源臂的雙股DNA。因雙股DNA斷點的存在，可提高在DNA斷點處同源重组的機率，而增進了基因组编辑的效率[3]。同源重组修復機制發生的機率要比非同源末端接合機制低，但由於該機制在修復的過程中有同源性模板，因此可以實現準確的突變。

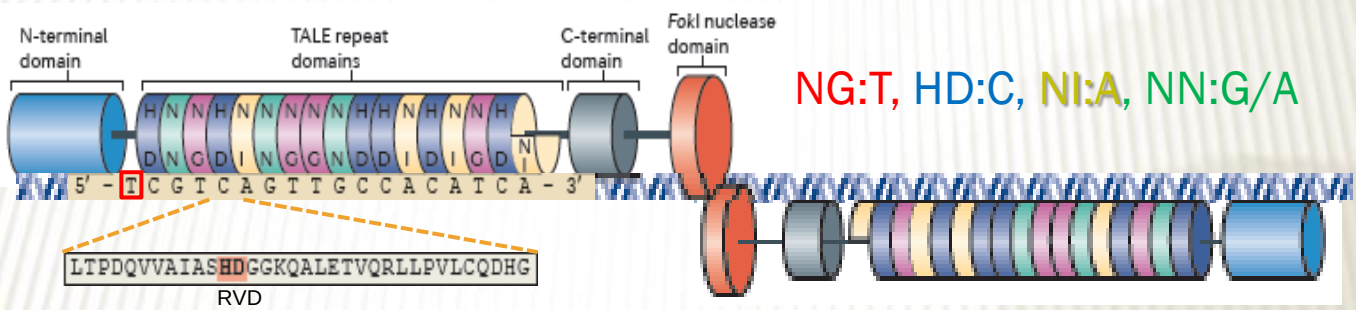
近幾年來，基因组编辑的實驗技術有了快速的進展，開發出許多新的技術，如：Cer/LoxP、ZFN、TALEN以及CRISPR系統，其中TALEN以及CRISPER技術因其載體易構築，以及突破物種限制的優點，迅速被科學家們接受並應用於基因功能的研究。底下將針對TALEN以及CRISPER技術原理進行介紹：





基因剔除(剔入)之原理與應用

TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)

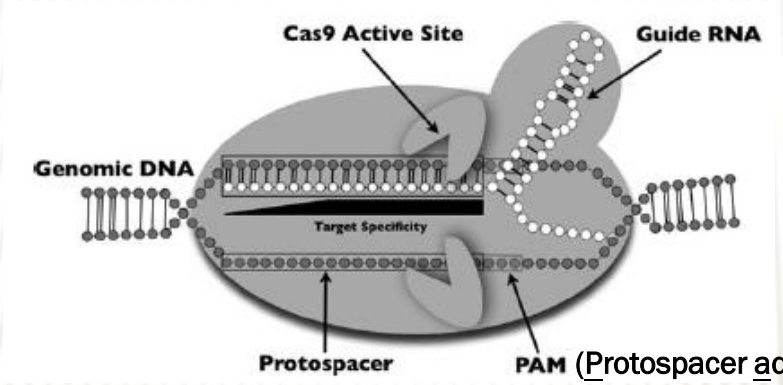


TALE (Transcription Activator-Like Effector)是由植物致病細菌*Xanthomonas*所分泌具有轉錄激活功能的蛋白，經由其DNA結合區與植物宿主基因啟動子區的相對應核苷酸序列發生專一性結合，並活化基因表現[4,5]。TALE的DNA結合區由一些高保留的重複氨基酸序列組成，包含33~35個氨基酸，而第12、13位置氨基酸種類可變且決定了TALE與DNA結合的專一性，稱為Repeat Variable Diresidue (RVD) [6,7]。理論上，將重複氨基酸序列進行排列組合即可專一性辨識任意DNA序列。

TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)是一種人工改造的限制性內切酶，將TALE的DNA結合區與限制性內切酶(Fok I) 的DNA切割區融合而得到[8-15]。TALEN在細胞中與基因靶位點結合，形成二聚體發揮內切酶活性，導致spacer區域發生雙股DNA斷裂(DSB，Double-Strand Breaks)而誘發非同源性末端接合機制或同源重組機制修復DNA，達到基因剔除(剔入)的目的。

基因剔除(剔入)之原理與應用

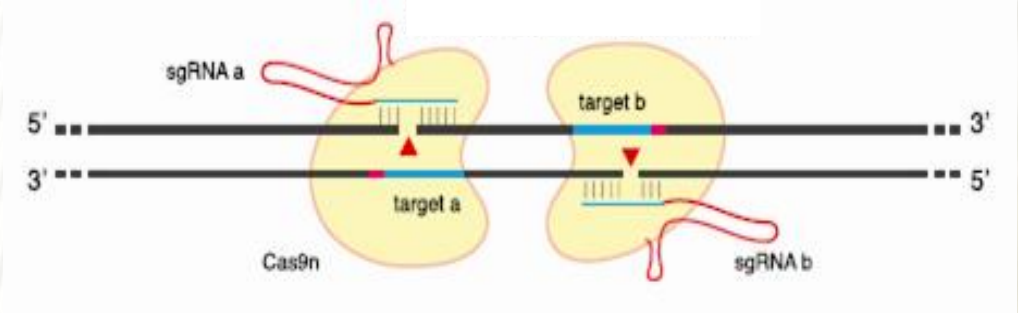
CRISPR/Cas:Clustered regularly interspaced short palindromic repeats and CRISPR-associated systems



CRISPR系統是細菌在噬菌体長期選擇壓力下演化出來的一種有效抵禦外源 DNA 入侵的免疫機制，分為三種類型，其中第二型CRISPER/Cas9系統是透過Cas9/tracrRNA/crRNA複合體去辨識與切割互補DNA，由於此複合體構造較為簡單，在2013年被開發出來並經過改良[16,17]，將來自於化膿性鏈球菌(*Streptococcus pyogenes*)的Cas9蛋白與guide RNA (gRNA, crRNA與tracrRNA的結合體)形成一個複合體，透過gRNA上的Protospacer序列(18~20nt)辨識DNA，緊接在Protospacer序列之後的三個核苷酸(NGG)稱為Protospacer adjacent motif (PAM)，Cas9即辨識PAM並切割緊鄰的雙股DNA。在細胞中，一樣因NHEJ或HDR修復機制達到基因剔除(剔入)的目的。

基因剔除(剔入)之原理與應用

CRISPR/Cas 9 D10A (Nickase)



由於CRISPR系統是透過gRNA上的Protospacer序列(約20nt)辨識DNA，容易造成脫靶效應(off target effect)，為了解決此問題，研究者進一步改造Cas9成為突變型Cas9n (D10A突變，又稱為nickase)。由於只能在單股DNA造成缺口(nick)的特性，因此可以在靶點DNA的正反股設計兩段guide RNA引導Cas9n水解DNA產生相鄰的nick而使DNA斷裂，此種方式由於需要兩個guide RNA同時辨認才能剪切，可有效降低脫靶的問題，約降低50-1500倍[18,19]。此外也有學者將Protospacer序列縮減為18或19nt，發現也可以降低脫靶效應至5000倍[20]。

在實驗設計上，為了證明無脫靶效應的存在，後續實驗可將預測會發生脫靶效應的位置分別設計引子PCR後定序，或是進行基因功能互補(trans-complementation)實驗來證明，此外，也有次世代定序(NGS, next generation sequencing)的方式對篩選出的細胞進行基因體定序的方法。

基因剔除(剔入)之原理與應用

相 關 技 術 之 應 用

一、進行基因剔除工作。

二、進行大片段基因缺失突變。

三、多基因同時剔除。

四、基因點突變。

五、基因剔入大片段啟動子或報導基因。

六、在轉錄層次干擾基因表現：有學者利用TALE-SRDX抑制阿拉伯芥基因表現[21]；而在CRISPR方面，學者研究發現Cas9 D10A以及H840A雙重突變會造成Cas9蛋白失去切割DNA的能力，但仍保留與sgRNA結合與辨識DNA的功能。若是將Cas9 D10A-H840A蛋白與活化子或是抑制子結合，即可在特定基因啟動子區域進行活化或是抑制基因表現，稱為CRISPR干擾技術(CRISPR interference, CRISPRi) [22-24]。 。

基因剔除(剔入)之原理與應用

參 考 文 獻

1. Iiizumi S *et. al*., (2008). *Nucleic Acids Res,* 36:6333-6342.
2. Wyman, C. and Kanaar, R. (2006). *Annu. Rev. Gene*t. 40, 363–383.
3. Rouet P *et. al*., (1994). *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(13): 6064–6068.
4. Hopkins CM *et. al*., (1992). *Mol Plant Microbe Interact 1992; 5(6): 451-9.*
5. Boch J. and Bonas U. (2010*). Annu Rev Phytopathol*, 48: 419–436.
6. Boch J. *et. al*., (2009). *Science*,326(5959):1509-12.
7. Moscou MJ and Bogdanove AJ (2009). *Science*,326(5959):1501.
8. Cermak, T. *et. al*., (2011*). Nucleic Acids Res.* 39: e82.
9. Cristian, M. (2010). *Genetics* 186: 757-761.
10. Li, T. *et. al*., (2011). *Nucleic Acids Res.* 39: 359-372.
11. Hockemeyer, D . *et. al*., (2011). *Nat. Biotechnol.* 29: 731-734.
12. Li, T. *et. al*., (2011). *Nucleic Acids Res.* 39: 6315-6325.
13. Mahfousz, M.M. (2011). *Proc Natl Acad Sci USA*, 108: 2623-2628.
14. Miller, J. C. *et. al*., (2011). *Nat. Biotechnol.* 29: 143-148.
15. Wood, A.J. *et. al*., (2011). *Science*, 333: 307
16. Jinek M. *et. al*., (2012). *Science*, 337: 816-821.
17. Hwang W. Y. *et. al*., (2013). *Nat. Biotechnol.* 31: 227-229.
18. Ran F. A . *et. al*., (2013). *Cell,* 154: 1380-1389.
19. Burgess D.J. (2014). *Nat. Rev. Genet.* 15:5.
20. Fu Y. *et. al*., (2014). *Nat. Biotechnol.* 32: 279–284.
21. Mahfouz M. M. *et. al*. (2012). *Plant Mol Biol,* 78(3): 311–321.
22. Perez-Pinera P. *et. al*., (2013). *Nat. Methods* 10: 973–976.
23. Larson M. H. *et. al*., (2013). *Nat. Protoc.* 8: 2180-2196.
24. Qi L. S. *et. al*., (2013). *Cell 152*: 1173-1178.

基因剔除(剔入)之原理與應用

相 關 網 站 連 結

基因相關資訊

http://www.ensembl.org/index.html

靶位設計網站

http://www.e-talen.org/E-TALEN/

http://www.e-crisp.org/E-CRISP/

相關載體取得網站

http://www.addgene.org/TALEN/

http://www.addgene.org/CRISPR/

預測脫靶位點網站

http://ccg.vital-it.ch/tagger/tagscan.html

http://gggenome.dbcls.jp/en/