

使用LentiArray CRISPR gRNA进行强大的功能缺失型筛选: 在保持特异性的同时, 最大限度地提高敲除效率

简介

通过全基因组敲除筛选新的成药靶点仍然是制药和生物技术行业的首要任务。Invitrogen™ LentiArray™ CRISPR文库将CRISPR-Cas9技术应用到功能基因组学的高通量筛选中, 可帮助理解复杂的生物学通路和发现新的药物靶点。Thermo Fisher Scientific的LentiArray CRISPR文库是一个极为灵活的系统, 使您能够以每孔一个基因的形式实现对全板基因完全和永久的敲除, 提高您筛选实验的质量和效率。向导RNA (gRNA) 的设计对CRISPR文库的功能效率至关重要。我们的文库建于最新的基因组序列信息和gRNA设计原则, 减少脱靶效应的同时最大限度地实现基因敲除效率。在此应用指南中, 我们用新一代测序(NGS)来验证基因组DNA (gDNA) 的有效切割效率, 证明了我们预设计的LentiArray CRISPR文库gRNA的稳健性。我们还使用免疫荧光和蛋白质免疫印迹分析检测了蛋白质的敲除效率。总之, 这些工具共同组成了一个强大的靶标发现和验证筛选平台^[1,2]。

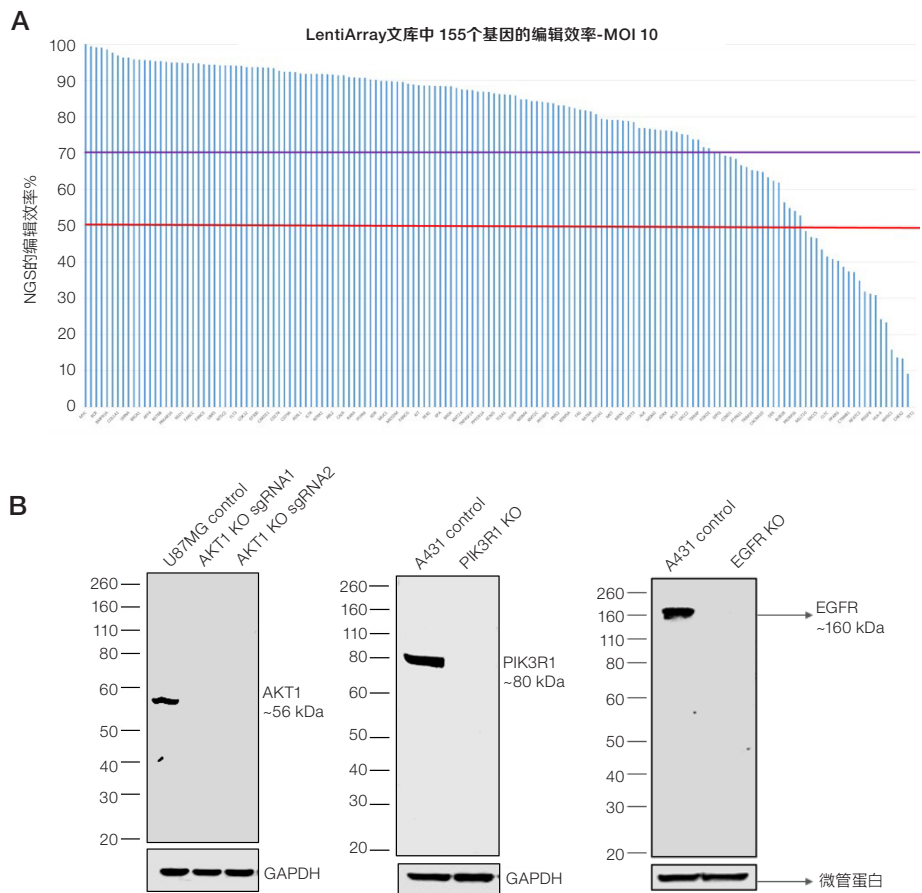


图1. 使用预设计的LentiArray gRNAs 靶向编辑大量基因, 均展示了高编辑效率。(A) NGS 编辑效率分析。选取 Invitrogen™ LentiArray™ 人癌症生物学 CRISPR 文库中的部分基因, 将对应的 LentiArray gRNA 慢病毒颗粒转染稳定表达 Cas9 的 HT1080 细胞中, 感染复数 (MOI) 为 10。在嘌呤霉素筛选 5 天后收集细胞并裂解, 对基因组目标片段进行 PCR 扩增后打上条形码; 随后进行 NGS 分析, 结果显示 87% 的靶标基因编辑效率大于 50%, 77% 的靶标基因编辑效率大于 70%。**(B)** 将单个慢病毒 gRNAs 转导至稳定表达 Cas9 的 U87MG 和 A431 细胞中, 收获细胞后, 使用针对相应靶向基因的特异性抗体进行蛋白质免疫印迹分析。结果显示未检测到 AKT、PIK3R1 和 EGFR 蛋白, 表明该方法能有效敲除目的蛋白。

结果

LentiArray gRNAs 的高编辑效率

LentiArray CRISPR 文库中针对每个基因靶点的优质 gRNAs 设计由我们专有的 CRISPR 设计算法完成, 该算法考虑了最新的设计原则和我们广泛的内部验证实验, 确保在不牺牲特异性的情况下获得最大的敲除效率。每个靶标基因最多有四个不同的 gRNAs, 靶向编辑 5' 蛋白编码区, 且重叠序列最少, 确保在多种细胞类型中对靶标基因进行高效敲除。为确认编辑效率, 我们利用高通量方法, 将 LentiArray 人类癌症生物学 CRISPR 文库的一个子文库的 gRNAs 包装成慢病毒形式, 以阵列形式置于 96 微孔板中, 每孔对应一个靶标基因。随后用慢病毒感染稳定表达 Cas9 的 HT1080 细胞系, 感染复数 (MOI) 为 10。嘌呤霉素筛选 5 天后, 收获细胞, 用 Ion Proton™ 系统通过 NGS 检测编辑效率。如图 1A 所示, 87% 的检测基因显示超过 50% 的敲除效率, 77% 的检测基因敲除效率超过 70%。

为了进一步验证功能性敲除效率, 我们用蛋白质免疫印迹分析或免疫组织化学染色法测试了几个靶标基因在病毒感染后的蛋白表达水平。如图 1B 所示, gRNA 转导后, 未在蛋白质免疫印迹分析中检测到 AKT1、PIK3R1 和 EGFR 的蛋白表达, 从而表明高效的基因和蛋白敲除。

使用免疫荧光染色和蛋白质免疫印迹分析验证基因功能性敲除

我们进一步测试了 LentiArray gRNAs 进行单个基因敲除 (KO) 对细胞信号通路的影响。转录因子 NF- κ B 在免疫和炎症反应中起着关键的作用。在 NF- κ B 通路活跃的细胞系中, TNF- α 可激活 NF- κ B 迅速从细胞质转移到细胞核, 进而激活特定的基因。我们首先建立了一个稳定表达 Cas9 蛋白 (采用 Invitrogen™ LentiArray™ Cas9 慢病毒进行感染) 的 Invitrogen™ CellSensor™ NF- κ B ME-180 单克隆细胞系 (货号 K1667)。然后用靶向激酶通路相关基因的慢病毒 gRNA 感染细胞, 包括 IKK α 和 TRADD 和阴性对照组。所有细胞 (包括对照组和 KO 组) 随后用 TNF- α 进行处理或不作处理。正如预期, TNF- α 会激活该通路导致 NF- κ B p65 亚基从细胞质转移到细胞核。相反, 敲除 IKK α 或 TRADD 抑制了 NF- κ B p65 亚基的易位, 表明这两个基因在 NF- κ B 信号通路中发挥着重要作用 (图 2A)。蛋白质免疫印迹分析的结果证实了 IKK α 和 TRADD 蛋白的有效敲除 (图 2B)。

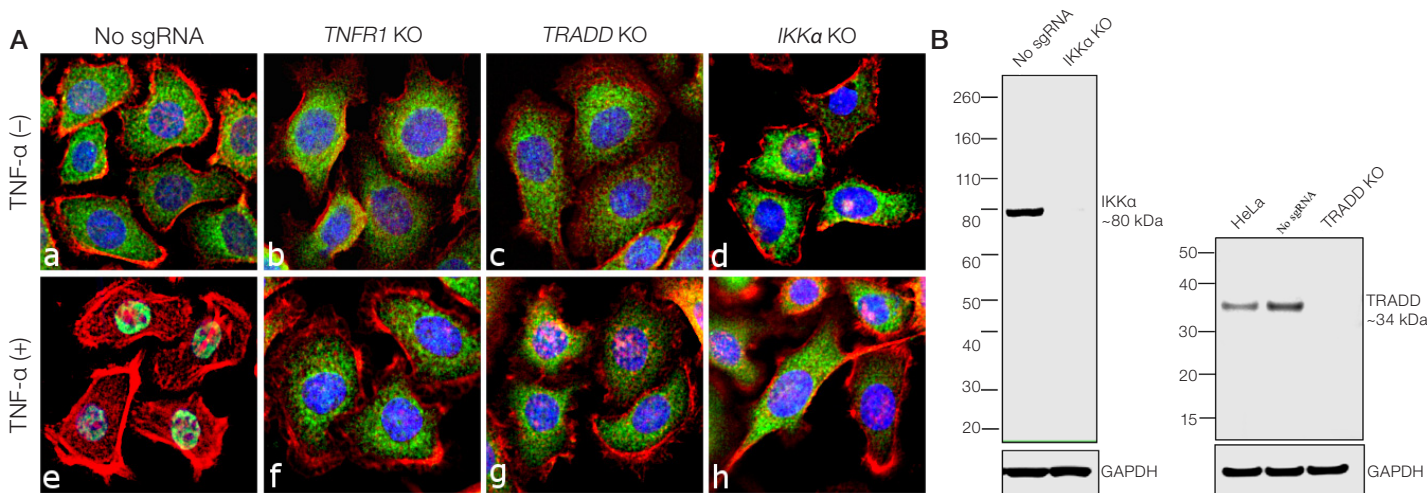


图 2. 使用 LentiArray CRISPR gRNAs 验证基因功能性敲除。(A) 图中细胞被靶向 TNFR1、TRADD 和 IKK α 的 LentiArray gRNAs 慢病毒, 及阴性对照单导向 RNA (sgRNA) 慢病毒进行感染。绿色: NF- κ B p65, 使用 Invitrogen™ NF- κ B p65 多克隆抗体 (货号 710048) 进行染色; 蓝色: 细胞核, 用 Invitrogen™ DAPI 染色; 红色: 肌动蛋白, 用罗丹明鬼笔环肽染色。(B) 通过使用 IKK α 和 TRADD 特异性抗体进行蛋白质免疫印迹分析, 确认 IKK α 和 TRADD 蛋白的敲除 (货号 PA517803 和 PA517465)。

利用表皮生长因子受体 (EGFR) KO 细胞系对信号通路进行功能性验证

表皮生长因子是一种跨膜蛋白, 通过结合特定配体 (包括表皮生长因子 (EGF)) 而激活 (图3A)。激活后, EGFR 二聚体化、自我磷酸化, 并触发一个或多个下游蛋白的级联磷酸化。该级联反应可以介导各种细胞活动, 包括增殖、凋亡、生长和分化。我们首先使用 LentiArray gRNA 构建单克隆 EGFR KO A431 细胞系。使用蛋白质免疫印迹分析确认了 EGFR 的敲除。然后, 使用相应的抗体研究了 EGFR KO 对关键下游效应因子 (包括 SHC、MEK 和 ERK) 磷酸化

状态的影响。用 200 ng/mL 的 EGF 处理细胞 10 min后, 在 A431 对照细胞和 A431-Cas9 细胞中检测到SHC、MEK 和 ERK 的磷酸化 (图3B)。相比之下, EGFR-KO A431 细胞系未能对 EGF 作出反应, 这证明了 LentiArray CRISPR gRNAs 在基因功能分析中的有效应用。

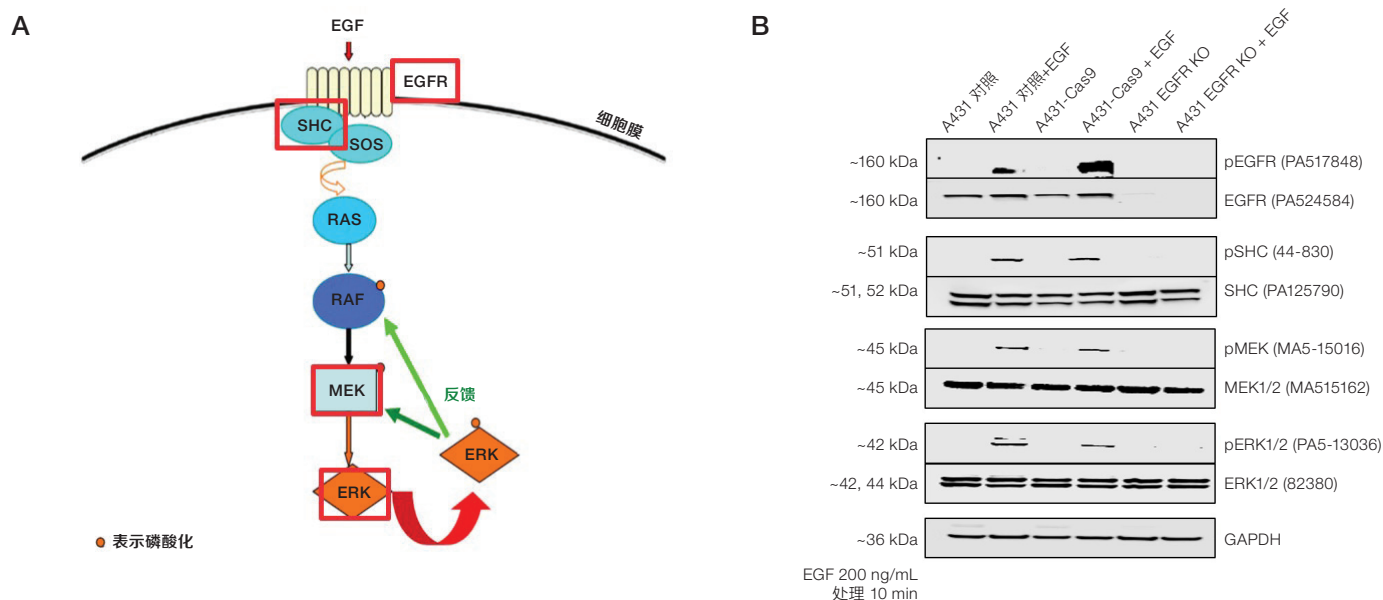


图 3. EGFR及其下游蛋白磷酸化的蛋白质免疫印迹分析: (A) EGFR信号通路示意图, 其中包括信号级联的下游蛋白, 这些蛋白在 EGF 与 EGFR 结合后被磷酸化。本研究中靶标用红框表示。**(B)** 使用 30 μ g 细胞提取物进行 SHC、MEK 和 ERK 的蛋白质免疫印迹分析: A431对照组、EGF 处理的 A431对照组 (200 ng/mL, 10 min)、A431-Cas9 组、EGF 处理的 A431-Cas9 组 (200 ng/mL, 10 min)、EGF 处理的 A431 EGFR KO 组、EGF 处理的 A431 EGFR KO 组 (200 ng/mL, 10 min)。采用 EGFR、磷酸化EGFR (pEGFR) 和EGFR下游通路磷酸化蛋白的对应抗体进行蛋白质免疫印迹分析, 证明了敲除 EGFR 导致了 EGFR 通路失活。在感染了靶向 EGFR 的 gRNA 慢病毒的细胞中未检测到 EGFR 表达 (右侧最后两个泳道, 均为A431 EGFR KO)。此外, 下游通路蛋白磷酸化缺失也表明 EGFR 受体的完全敲除。使用 pSHC、pMEK 和 pERK 的抗体, 亲代 A431 细胞系和稳定表达 Cas9 的 A431 细胞系在加入EGF后在信号级联中显示出强烈的磷酸化。相反, 在感染靶向 EGFR 的 gRNA 慢病毒的细胞中, 信号级联的下游蛋白在加入 EGF 后未发生磷酸化。因此, 在抑制整个信号通路的实验中, 利用 CRISPR 文库为蛋白敲除和筛选提供了强有力的保障。

结论

CRISPR-Cas9 技术彻底颠覆了从药物靶点确认到疾病模型建立的整个药物发现过程。

本文介绍的实验证明了我们预设计的gRNAs 的高编辑效率和使用 LentiArray CRISPR 文库在功能性敲除研究中成功编辑目标基因。

LentiArray CRISPR 文库形式包括含有序列验证过的慢病毒载体的甘油菌储液形式, 或抗生素筛选测定过的滴度 $>1 \times 10^8$ TU/mL 的即用型慢病毒。此外, 在进行高通量筛选实验时, LentiArray CRISPR gRNAs 可用于支持实验开发和下游的靶标验证。与慢病毒混合文库相比, 使用 LentiArray 文库可进行包括细胞活力、特异性标志物和报告基因等等的高通量筛选。该类文库使研究人员能够在一次筛选中进行复杂的表型分析, 如形态变化、高内涵成像和多基因敲除。凭借强大的gRNA设计和高滴度病毒颗粒, LentiArray CRISPR 文库致力于提升您靶标发现和筛选的能力, 助您走向成功。

访问thermofisher.cn/lentiarray获取更多信息

方法和材料

gRNA 设计、克隆和慢病毒包装

CRISPR gRNA 序列用我们专有的设计算法生成。该算法融入了最前沿的 gRNA 结合的特异性和效率信息, 并且我们内部进行了大量验证。

从 LentiArray 人癌症生物学 CRISPR 库中选择一个 CRISPR gRNAs 子文库(T1 和 T2)进行实验。所有的 LentiArray gRNA 载体都经过序列验证, 并以每孔一个 gRNA 的形式排列在 96 孔板中。使用 Invitrogen™ PureLink™ Pro Quick 96 质粒纯化试剂盒(货号 K211024A), 以及 Invitrogen™ Quant-iT™ dsDNA 检测试剂盒, Broad Range(货号 33130)检测 DNA 的浓度。慢病毒的包装采用了专有的自动化流程。使用嘌呤霉素抗生素筛选来确定病毒的滴度。

慢病毒转导

在 96 孔板中使用以下方案进行慢病毒转导。

第 0 天 在 96 孔板的 100 μ L 完全生长培养基中, 以 3000 个细胞/孔的数量接种稳定表达 Cas9 的 HT1080 细胞。

第 1 天 含有 8 μ g/mL Polybrene™ 试剂(Sigma Aldrich, 货号 H9268)的新鲜完全培养基进行换液。在每个孔中加入 6 μ L 慢病毒, 轻轻旋转孔板, 使慢病毒均匀地分布在每个孔中; 在室温下以 800 \times g 离心 30 min。

第 2 天 移除含有慢病毒的培养基, 替换为 100 μ L/孔的新鲜完全培养基。

第 3 天 用含有 1 μ g/mL 嘌呤霉素的新鲜培养基替换培养基, 用于选择转染细胞。

第 8 天 通过去除培养基以收获细胞, 然后在每个孔中加入 50 μ L 含细胞裂解物的缓冲液。

NGS

使用 Thermo Scientific™ Phusion™ Green Hot Start II 高保真 PCR 预混液(货号 F566L)从细胞提取物中扩增基因组靶标区域。在 2% Invitrogen™ E-Gel™ 48 琼脂糖凝胶(货号 G800802)上验证 PCR 产物, 然后用 Ion Torrent™ IonCode™ 标签接头 1-384 试剂盒(货号 A31173)加标签。使用 Ion Chef™ 仪器(货号 4484177)对每个孔板的样品进行混合和制备。然后用 Ion Proton™ 系统(货号 4476610)对扩增的文库进行测序。将读数对应至相应的参考序列, 随后使用专有的 NGS 分析软件进行表征和计数。

蛋白质免疫印迹分析

使用全细胞蛋白提取物 (IKK α 、TRADD、AKT1、EGFR、SHC、MEK 和 ERK) 和膜蛋白提取物 (针对 PIK3R1) 进行蛋白质免疫印迹分析。简言之, Invitrogen™ NuPAGE™ 4-12% Bis-Tris凝胶 (货号NP0321BOX) 置于XCell SureLock Mini-Cell中, 进行样本和 Invitrogen™ Novex™ Sharp 预染色蛋白质标准品的跑胶。然后用 iBlot 2 凝胶转移装置将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上, 用 5% 的脱脂牛奶在室温下封闭 1 h。靶蛋白的特异性抗体均来自 Thermo Fisher Scientific。抗体处理如下:

Invitrogen™ PI3K p85 alpha 单克隆抗体 (货号MA1-74183) 在 5% 脱脂牛奶中以 1:500 的比例稀释。与 HRP 结合的 Invitrogen™山羊抗小鼠IgG (H+L) Superclonal™ 重组二抗 (货号 A28177) 以 1:4,000 的比例稀释使用。

Invitrogen™ IKK α 的兔多克隆抗体 (货号 PA5-17803), TRADD (货号PA5-17465) 和EGFR (货号 PA5-24584) 以 1:1,000 的比例稀释。Invitrogen™ AKT1 重组多克隆抗体 (货号 710005) 以 2 μ g/mL 的浓度稀释于 5% 的脱脂牛奶中。HRP 标记的 Invitrogen™ 山羊抗兔IgG (H+L) Superclonal™ 二抗 (货号 A27036) 以 1:4,000 的比例稀释。

使用 Invitrogen™ Novex™ ECL 化学发光底物试剂盒 (货号 WP20005) 进行化学发光检测。

免疫荧光染色

用表达靶向 IKK α 和 TRADD gRNAs的慢病毒或无gRNA的慢病毒作为阴性对照转染稳定表达 Cas9 的 Invitrogen™ CellSensor™ NF- κ B ME-180 细胞系。

感染的细胞使用 TNF- α (50 ng/mL, 20 min) 处理或不作处理。然后用 4%的多聚甲醛固定 15 min, 用 0.1% 的 Triton™ X-100 表面活性剂透化10 min, 并在室温下用 1%的BSA 封闭1 h。随后用 Invitrogen™ NF- κ B p65 兔多克隆抗体 (货号 510500) 在 0.1% BSA 中以 1:300 的比例在室温下孵育 3 h。洗涤步骤后, 用Alexa Fluor™ 488 标记的Invitrogen™ 山羊抗兔IgG (H+L) Superclonal™ 重组二抗 (货号A27034) 在室温下以 1:2,000 的稀释度孵育 45 min。

使用含有DAPI (货号S36938) 的Invitrogen™ SlowFade™ Gold 抗淬灭防褪色封固剂对细胞核 (蓝色) 进行染色。F-肌动蛋白使用Invitrogen™ Rhodamine Phalloidin 进行染色 (货号 R415)。图像以40X放大率拍摄。

References

1. Sredni ST, Suzuki M, Yang JP et al. (2017) A functional screening of the kinome identifies the Polo-like kinase 4 as a potential therapeutic target for malignant rhabdoid tumors, and possibly, other embryonal tumors of the brain. *Pediatr Blood Cancer* 64(11). doi: 10.1002/pbc.26551.
2. Sredni ST, Bailey AW, Suri A et al. (2017) Inhibition of polo-like kinase 4 (PLK4): a new therapeutic option for rhabdoid tumors and pediatric medulloblastoma. *Oncotarget* 8:111190-111212.

订购信息

产品	慢病毒形式货号	甘油形式货号
LentiArray人激酶CRISPR文库	A31931	A32167
LentiArray人磷酸酶CRISPR文库	A31932	A32168
LentiArray人癌症生物学CRISPR文库	A31933	A32169
LentiArray人表观遗传学CRISPR文库	A31934	A32170
LentiArray人泛素CRISPR文库	A31935	A32171
LentiArray人细胞周期 CRISPR文库	A31936	A32172
LentiArray人膜运输CRISPR文库	A31937	A32173
LentiArray人转录因子CRISPR文库	A31938	A32174
LentiArray人细胞核激素受体CRISPR文库	A31939	A32175
LentiArray人细胞凋亡CRISPR文库	A31940	A32176
LentiArray人药物转运体CRISPR文库	A31941	A32177
LentiArray人离子通道CRISPR文库	A31942	A32178
LentiArray人细胞表面CRISPR文库	A31943	A32179
LentiArray人蛋白酶CRISPR文库	A31944	A32180
LentiArray人肿瘤抑制基因CRISPR文库	A31945	A32181
LentiArray人DNA损伤响应CRISPR文库	A31946	A32182
LentiArray人GPCRCRISPR文库	A31947	A32183
LentiArray人成药酶CRISPR文库	A31948	A32184
LentiArray人全基因组CRISPR 文库	A31949	A32185
LentiArray自定义CRISPR板孔板	A32045	
LentiArrayCas9慢病毒, 100 µL	A32064	
LentiArrayCas9慢病毒, 1 mL	A32069	
LentiArrayCRISPR阳性对照慢病毒, 人HPRT, 100 µL	A32056	
LentiArray CRISPR阳性对照慢病毒, 人HPRT, 1 mL	A32829	
LentiArray CRISPR阳性对照慢病毒, 人 HPRT, 含GFP, 100 µL	A32060	
LentiArray CRISPR阳性对照慢病毒, 人 HPRT, 含GFP, 1 mL	A32830	
LentiArray CRISPR阴性对照慢病毒, 非靶向 (人), 100 µL	A32062	
LentiArray CRISPR阴性对照慢病毒, 非靶向 (人), 1 mL	A32327	
LentiArray CRISPR阴性对照慢病毒, 非靶向 (人), 100 µL	A32063	
LentiArray CRISPR阴性对照慢病毒, 非靶向 (人), 含GFP, 1 mL	A32831	
GeneArt基因组剪切检测试剂盒	A24372	
嘌呤霉素二盐酸盐 (10 mg/mL)	A1113803	

详情请访问 thermofisher.com/lentiarray



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

www.thermofisher.cn

ThermoFisher
SCIENTIFIC