



先导编辑

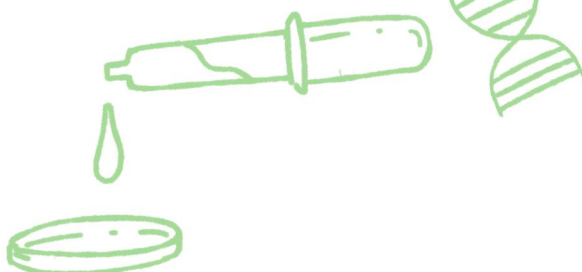
Prime Editing

点突变单克隆细胞株构建入门指南



目录

前言	2
PE 点突变细胞构建实验流程	4
1 实验材料	4
1.1 细胞	4
1.2 试剂	4
2 实验方法	4
2.1 细胞 Puromycin 和 Blasticidin 抗性敏感浓度摸索	4
2.1.1 实验目的	4
2.1.2 实验操作	4
2.2 单克隆形成验证实验	5
2.3 靶标位点测序	5
2.3.1 实验方法	5
2.4 载体构建	6
2.5 细胞点突变阳性细胞多克隆筛选	7
2.6 阳性单克隆细胞株筛选	8
3 阳性单克隆细胞株验证	8



前言

关于 Prime Editing

Prime editing 是 David R. Liu 团队在 2019 年提出的全新基因编辑技术，在没有 DSB 和供体 DNA 模板的情况下可介导靶向插入、缺失以及十二种碱基替换，实现精准基因编辑。这四年间 Prime editing 发展迅速，在各个领域都展现出了巨大潜力。

在 Prime Editing 中，设计一段含有目标基因的信息和编辑指令的 Prime Editing Guide RNA (pegRNA)。这个 pegRNA 与经过改造的 Cas9 蛋白一起引导到目标基因上。Cas9 通过其剪切功能切断 DNA 链，但不像传统 CRISPR-Cas9 那样形成双链断裂。反转录酶将新的 DNA 序列插入到目标基因中，实现基因组的精准修复。这一过程发生在细胞内，并且可以在不引起双链断裂的情况下实现单碱基的精确更改，从而最小化副作用和误差。

Prime Editing 作为一种革命性的基因编辑技术，具有广阔的发展前景。其精准、高效的基因修复特性使其在治疗遗传性疾病和癌症等领域具有潜在的临床应用。Prime Editing 相对于传统技术更少引起副作用，为定制化基因疗法提供了可行性。随着技术的不断改进和完善，Prime Editing 有望成为未来基因治疗和精准医学的重要工具，为人类健康带来新的希望。

本册将详细介绍 PE 点突变细胞构建流程，一册搞定基因点突变细胞构建实验。





PE 点突变细胞构建实验流程

1 实验材料

1.1 细胞

细胞需要确保可以进行电转或化学转染

1.2 试剂

细胞完全培养基; 细胞冻存培养基; 0.25% Trypsin-EDTA; NEAA (100x); Opti-MEM; Puromycin Dihydrochloride; Blasticidin; T4 DNA Ligase; T4 PNK; BsmB I; BsaI-HF v2; DL10000 Ladder

细胞 / 组织基因组 DNA 提取试剂盒; 质粒提取试剂盒; 无内毒素质粒提取试剂盒; 核酸浓度测定试剂盒; PCR 产物回收试剂盒等。

2 实验方法

2.1 细胞 Puromycin 和 Blasticidin 抗性敏感浓度摸索

2.1.1 实验目的

摸索确定细胞的 Puromycin 和 Blasticidin 抗性浓度范围, 为后续阳性细胞筛选等实验提供参考。

2.1.2 实验操作

- 1) 取生长状态良好的细胞, 胰酶消化, 使细胞分离成单个, 终止消化。
- 2) 离心, 弃上清, 加入适量完全培养基重悬细胞, 计数;
- 3) 将细胞悬液稀释成 4×10^4 cells/mL, 共 1 mL;
- 4) 96 孔板铺板 (二倍稀释法): 96 孔板每孔预先加入 100 μ L 完全培养基; 在第一列加入 100 μ L 浓度 4×10^4 cells/mL 的细胞悬液, 用移液器混匀后取 100 μ L 加到第二列, 后面每列重复这个过程;
- 5) 种板后培养 24 h - 48 h, 观察细胞贴壁生长情况, 如果生长正常, 每孔加入 100 μ L 含不同浓度 Puromycin (或 Blasticidin) 的完全培养基;
- 6) 在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养细胞, 根据细胞生长情况, 每 24~48 h 更换一次含抗生素的培养基, 每日观察并记录细胞在不同浓度下、不同密度下的变化。





7) 给药 3~4 天后, 弃培养液, 用台盼蓝染色 2~5 min, 显微镜下观察细胞存活情况。

2.2 单克隆形成验证实验

- 1) 细胞计数, 将细胞悬液稀释成 5 cells/mL;
- 2) 向 96 孔板每孔加 100 μ L 细胞悬液, 用封口胶将孔板封好, 放于培养箱中培养;
- 3) 静置培养 48 h 后每日观察并记录单克隆形成情况;
- 4) 实验结果: 种板后观察发现, 大部分单细胞增殖很慢或不增殖, 形成单克隆团效率较低。

2.3 靶标位点测序

2.3.1 实验方法

- 1) 提取细胞基因组。
 - a) 提前将水浴锅调至 55°C 和 95°C;
 - b) 取适量细胞 400g 室温离心 5min;
 - c) 小心取出离心管, 吸除上清;
 - d) 吸取 100 μ L PBS 洗涤一次沉淀;
 - e) 然后 400g 室温离心 3min 以彻底吸除上清;
 - f) 按下表配制新鲜的裂解液, 充分混匀后使用;

Component	Amount
1x Lysis Buffer	200 μ L
Proteinase K	4 μ L

- g) 每份样品加入 200 μ L 配制的新鲜的裂解液, 涡旋振荡混匀后, 55°C 水浴 10min。
- h) 孵育完成后, 95°C 水浴 5min;
- i) 将裂解产物涡旋振荡后, 12000rpm 离心 5min, 取上清进行 PCR;

2) 靶标区域扩增

3) 反应体系冰上配制

使用 2 \times Taq Plus Master Mix(Dye Plus)配制反应体系:

组分	加样体积 / μ L
2 \times Taq Plus Master Mix	10





10 μ M For	0.5
10 μ M Rev	0.5
模板 DNA	2
ddH ₂ O	To 20

4) 反应程序

	温度	时间
预变性	95°C	3 min
35 个循环	95°C	15 sec
	59°C	15 sec
	72°C	16 sec
终延伸	72°C	5 min
保持	4°C	

5) PCR 产物的检测：配制 1.2% 的琼脂糖凝胶，PCR 产物点样，120V 电泳 30min 后切胶回收；

6) 送样测序 P。

2.4 载体构建

- 1) 根据基因突变信息设计 sgRNA；
- 2) 设计 pegRNA 序列；
- 3) 合成 pegRNA 和 sgRNA；
- 4) pegRNA 克隆到 EDV480 载体：

组成	体积
EDV480	1 μ L
pegRNA	1 μ L
10 \times T4 Ligation Buffer	1.5 μ L
BSA	1.5 μ L
BsaI-HF v2	1 μ L
NEB T4 ligase	1 μ L
ddH ₂ O	8 μ L
In total	15 μ L





5) sgRNA 克隆到 EDV466 载体:

组成	体积
45 ng EDV466	1 μ L
Annealed sgRNA (1:50 diluted)/H ₂ O	1 μ L
10 \times T4 Ligation Buffer	1.5 μ L
1 mg/mL BSA	1.5 μ L
BsmBI	1 μ L
NEB T4 ligase	1 μ L
ddH ₂ O	8 μ L
In total	15 μ L

6) 将 5 μ L 反应产物加入 DH5 α 感受态细胞进行转化

7) 质粒提取:

- 每个实验组各挑取 2 个单克隆菌落, 于 LB/ Amp 培养基中扩增菌体;
- 使用质粒提取试剂盒提取质粒;

8) 将 pegRNA 和 sgRNA 质粒样品送样测序。

EDV480: pU6-pegRNA-EF-1 α -Puro, 来自广州艾迪基因科技有限责任公司

EDV466: pU6-gRNA, 来自广州艾迪基因科技有限责任公司

2.5 细胞点突变阳性细胞多克隆筛选

- 1) 将 3×10^5 个靶细胞接种 24 孔板中。
- 2) 培养 18-24 小时后进行转染, 此时细胞的融合率应为 80-90%
- 3) 根据 lipo3000 转染试剂说明或电转仪说明进行转染, 将 PE 辅助载体、pegRNA 载体、sgRNA 载体共转染至细胞。
- 4) 细胞于培养箱中静置培养 24 h;
- 5) 细胞传代至 6 孔板, 6-8 h 细胞贴壁后, 加入含 blasticidin 的完全培养基进行筛选;
- 6) 转染 48 h 后, 加入含 puromycin 和 blasticidin 的完全培养基, 此后每 48 h 更换一次;
- 7) 筛选 4 d 后, 对照组细胞全部死亡, 将实验组阳性细胞扩大培养。





2.6 阳性单克隆细胞株筛选

- 1) 将阳性多克隆细胞培养至融合度约 75-85%，使其处于生长；
- 2) 细胞计数，将细胞悬液稀释成 5×10^5 cells/mL；
- 3) 使用有限稀释法铺板 96 孔板分离单克隆，培养箱中培养；
- 4) 静置培养 24h 后，更换含 puromycin 和 blasticidin 的完全培养基，观察并记录单克隆生长情况；
- 5) 挑选阳性单克隆进行扩增，测序验证。

3 阳性单克隆细胞株验证

- 1) 提取抗性筛选阳性的单克隆细胞基因组；
- 2) PCR 扩增基因靶标序列；
- 3) 送测序，验证单克隆细胞株的靶标序列；
- 4) 扩增纯合突变单克隆细胞并冻存。

