

sgRNA 产品使用手册

本手册适用于科研用细胞系、原代细胞、iPSC/ESC 等。核心是：**Cas9 蛋白或 Cas9 mRNA/质粒 + sgRNA 共同进入细胞**。单独转染 sgRNA 只在 Cas9 稳定表达细胞中有效。涉及原代细胞、干细胞、动物、临床样本、生殖系编辑时，必须经过机构生物安全、伦理和动物福利审批。

1. 实验设计总览

阶段	时间	关键操作	成功标准
sgRNA 设计	Day -3~-1	设计 2-3 条，选高分低脱靶	至少 1 条效率 >10%
细胞准备	Day -1	接种对数期细胞	转染时密度 50%-70%，活力 >90%
RNP 组装	Day 0	Cas9 + sgRNA 孵育	比例 1:1.2-1:3 摩尔比，或质量比 1:0.3-0.5
递送	Day 0	电转/脂质体	转染效率用 GFP 对照 >70%
换液观察	Day 1	换完全培养基	细胞状态恢复
编辑检测	Day 2-3	gDNA、PCR、TIDE/T7E1/NGS	出现 Indel
单克隆	Day 3-7	有限稀释	96 孔每孔 0.5 细胞
克隆鉴定	Day 14-21	PCR、Sanger、NGS	纯合/杂合/双等位突变
脱靶分析	Day 21+	预测 + 深度测序	候选位点脱靶低

2. 试剂与耗材详细清单

2.1 核心试剂

- 重组 SpCas9 蛋白：无内毒素，纯度 >95%，浓度 1 µg/µL 或 20 µM，-80°C 分装。
- sgRNA：化学合成，HPLC 纯化，100 µM，-80°C 分装。
- 电转仪及专用缓冲液：Neon、Lonza 4D、Amaxa、BTX 等。
- 脂质体：CRISPRMAX、RNAiMAX、Lipofectamine 3000、Lipofectamine Stem 等。
- 无 RNase 水、Opti-MEM、DPBS、胰酶、完全培养基、无抗生素培养基。
- 基因组 DNA 提取试剂盒、PCR Mix、T7 核酸内切酶 I、琼脂糖、DNA marker。
- Sanger 测序或 NGS 服务、TIDE/ICE 分析软件。
- 流式细胞仪、荧光显微镜、电转仪、PCR 仪、凝胶成像系统。

2.2 耗材

- 无 RNase 枪头、EP 管、PCR 管。
- 电转杯或 Neon 枪头。
- 96 孔、24 孔、6 孔板、10 cm 皿。
- 细胞筛、计数板、冻存管。

3. sgRNA 设计、合成与质控

3.1 设计工具

- CRISPOR: 综合评分、脱靶预测。
- Benchling: 设计、克隆、脱靶。
- CHOPCHOP: 外显子、PAM、评分。
- Broad GPP: 人类/小鼠全基因组 sgRNA。
- Cas-OFFinder: 脱靶位点搜索。

3.2 设计原则

- SpCas9 PAM: NGG, spacer 长度 20 nt。
- 靶向外显子, 优先 5' 端功能域。
- GC 含量 40%–70%。
- 避免连续 4 个以上 T, 避免 TTTT。
- 避免 SNP 位点, 查 dbSNP。
- 避免重复序列、同源序列、二级结构。
- 每个基因设计 2–3 条, 先小规模筛选。
- 评分参考: MIT 特异性评分、CFD 评分、CRISPOR 综合评分。

3.3 合成与修饰

- 推荐化学修饰: 5' 和 3' 端各 3 个核苷酸加硫代磷酸酯, 中间加 2'-O-甲基。
- 纯化: HPLC。
- 溶解: 无 RNase 水稀释至 100 μ M。
- 分装: 5–10 μ L/管, -80°C, 避免反复冻融。
- 质控: 变性 PAGE 或毛细管电泳确认完整性; A260 测浓度。

3.4 常用阳性对照 sgRNA

- EMX1: GAGTCCGAGCAGAAGAAGAA, PAM TGG。
- HPRT、AAVS1 等也可作为阳性对照。

4. Cas9 蛋白准备

- 来源: SpCas9 重组蛋白, 无内毒素, 纯度 >95%。
- 浓度: 1 μ g/ μ L 或 20 μ M。
- 储存: -80°C, 可加 10% 甘油, 避免反复冻融。
- 活性验证: 体外切割试验或已知阳性 sgRNA。
- 使用前冰上融化, 短暂离心, 避免气泡。

5. 细胞准备

5.1 贴壁细胞

- 转染前 24 h 接种, 使转染时密度 50%–70%。
- 电转前 70%–80% 汇合, 活力 >90%。
- 转染前 2–3 次传代, 保持对数生长期。
- 电转前用 DPBS 洗一次, 胰酶消化, 完全培养基终止, 计数。

5.2 悬浮细胞

- 对数期, 密度 $2-5 \times 10^5/\text{mL}$ 。
- $100-200 \times g$ 离心 5 min, DPBS 洗一次。
- 用电转缓冲液重悬。

5.3 原代细胞/iPSC

- 使用无血清电转液和专用试剂盒。
- iPSC 常用 Lonza P3 Primary Cell 4D-Nucleofector X Kit。
- 预涂基质, 如 Matrigel、Vitronectin。
- 电转后加 Rho 激酶抑制剂, 如 Y-27632, 提高存活。
- 避免过度消化, 使用温和解离试剂。

6. RNP 组装与计算

6.1 摩尔计算

- Cas9 分子量约 158 kDa, $1 \mu\text{g} \approx 6.3 \text{ pmol}$ 。
- sgRNA 20 nt 约 6.5 kDa, $1 \mu\text{g} \approx 154 \text{ pmol}$ 。
- 推荐摩尔比 Cas9:sgRNA = 1:1.2–1:3。
- 常用质量比: Cas9 $1 \mu\text{g}$ + sgRNA 0.3–0.5 μg , 对应摩尔比约 1:5–8。

6.2 组装步骤

1. 冰上操作, 无 RNase。
2. 按比例加入 Cas9 和 sgRNA。
3. 轻弹混匀, 短暂离心。
4. 室温孵育 10–20 min。
5. 立即用于电转或脂质体, 避免长时间放置。

6.3 示例: 10 μL 电转体系

- 细胞: $1-3 \times 10^5$ 。
- Cas9: $1 \mu\text{g}$, 约 6.3 pmol。
- sgRNA: 0.3 μg , 约 46 pmol。
- 电转液补足 10 μL 。

- 室温孵育 10–15 min 后电转。

6.4 示例: 100 μ L 电转体系

- 细胞: $1-3 \times 10^6$ 。
- Cas9: 10 μ g。
- sgRNA: 3–5 μ g。
- 电转液补足 100 μ L。

7. 递送方案 A: 电转 RNP (推荐)

7.1 Neon 电转

1. 准备 10 μ L 或 100 μ L 电转体系。
2. 细胞洗涤后用电转液重悬。
3. 加入 RNP, 轻轻混匀。
4. 选择程序:
 - HEK293T 起始: 1100–1300 V, 10–30 ms, 1–2 脉冲。
 - K562 起始: 1450 V, 10 ms, 3 脉冲。
 - Jurkat 起始: 1350 V, 10 ms, 3 脉冲。
 - 其他细胞: 先用 GFP mRNA 优化。
5. 电转后立即加入 500 μ L 预温完全培养基。
6. 转移至培养板, 37°C、5% CO₂ 培养。

7.2 Lonza 4D

- 使用 SF 或 SE 溶液, 按细胞数据库推荐程序。
- 常见程序: CM-130、DS-130、EH-100 等, 需按细胞类型查询。
- 电转后加预温培养基, 避免反复吹打。

7.3 电转优化

- 电压: 从推荐值 ± 100 V 开始。
- 脉冲: 1–3 次。
- 时间: 10–30 ms。
- 细胞数: $1-3 \times 10^5/10 \mu$ L。
- RNP 量: Cas9 0.5–2 μ g/10 μ L。
- 用 GFP mRNA 评估转染效率。

8. 递送方案 B: 脂质体转染 RNP

以 24 孔板 CRISPRMAX 为例:

1. A 管: Opti-MEM 25 μ L + Cas9 0.5–1 μ g + sgRNA 0.25–0.5 μ g, 室温 10 min。

2. B 管: Opti-MEM 25 μ L + CRISPRMAX 1.5 μ L, 室温 5 min。
3. 将 A、B 混合, 室温孵育 10–15 min。
4. 细胞接种于 500 μ L 无抗生素培养基, 密度 50%–70%。
5. 将混合液逐滴加入细胞。
6. 6 h 后换完全培养基。
7. 48–72 h 检测编辑效率。

其他脂质体: RNAiMAX、Lipofectamine 3000、Lipofectamine Stem, 按说明书调整比例。

9. 递送方案 C: 质粒/病毒(简要)

9.1 质粒转染

- Cas9 质粒 + sgRNA 质粒, 或 all-in-one 质粒。
- Lipofectamine 3000 或电转。
- 24 h 后可加抗生素筛选。
- 适合稳定株构建, 但脱靶和整合风险高于 RNP。

9.2 慢病毒/逆转录病毒

- 用于 Cas9 稳定表达细胞或 sgRNA 稳定表达。
- 需 BSL-2 防护。
- 感染后 48–72 h 检测, 嘌呤霉素筛选。
- 注意病毒滴度和 MOI 优化。

10. 转染后处理

- 24 h 换液, 观察细胞状态。
- 若毒性高, 6 h 换液。
- 48–72 h 收获细胞。
- RNP 编辑快, 24–48 h 已发生; 质粒可能需 72 h。
- 记录细胞形态、密度、死亡比例。
- 若做 HDR, 可在转染时加入供体模板, 如 ssODN 或质粒。

11. 编辑效率检测

11.1 基因组 DNA 提取

- 48–72 h 收集细胞, 离心, PBS 洗。
- 柱式提取或粗提裂解液。
- 测浓度, A260/A280 1.8–2.0。

11.2 PCR 设计

- 引物位于编辑位点两侧各 100–200 bp。
- 产物 400–800 bp。
- Tm 60°C 左右, GC 40%–60%。
- 先优化 PCR, 确保单一条带。

11.3 Sanger + TIDE/ICE

1. PCR 产物纯化。
2. Sanger 测序。
3. 上传 TIDE 或 ICE 网站。
4. 输入野生型参考序列。
5. 得到 Indel 频率和类型。

11.4 T7E1 酶切

1. PCR 产物 200 ng, 加退火缓冲液。
2. 95°C 5 min, 缓慢降至 25°C。
3. 加 T7 核酸内切酶 I, 37°C 30 min。
4. 2% 琼脂糖电泳。
5. 出现切割带说明有编辑。
6. 切割效率 = 切割带强度 / (切割带 + 未切割带) × 100%。

11.5 NGS

- 扩增子测序, 引物带接头。
- 分析 Indel 频率、类型、脱靶。
- 适合精确验证和脱靶分析。

11.6 蛋白/表型验证

- Western blot: 检测蛋白敲低。
- 流式: 检测表面标记。
- 功能实验: 增殖、凋亡、迁移等。

12. 单克隆分离与鉴定

1. 编辑效率 >10% 时进行有限稀释。
2. 96 孔板每孔 0.5 个细胞。
3. 使用条件培养基, 10–14 天。
4. 显微镜下标记单克隆。
5. 胰酶消化或克隆环挑取。
6. 扩增至 24 孔、6 孔。
7. 提取 DNA, PCR, Sanger/TIDE/NGS。

8. 确认纯合、杂合、双等位突变。
9. 至少验证 2 个独立克隆。
10. 冻存至少 2 管。

13. 脱靶分析

13.1 预测

- CRISPOR、Cas-OFFinder、Benchling。
- 选择高分、低脱靶 sgRNA。
- 检查 SNP，避免个体差异。

13.2 实验验证

- 靶向深度测序候选脱靶位点。
- GUIDE-seq、CIRCLE-seq、DISCOVER-seq。
- 全基因组测序，成本高。
- 高保真 Cas9: eSpCas9、SpCas9-HF1、HiFi Cas9。
- 双切口酶: Cas9 nickase + 双 sgRNA。

14. 对照设置

对照	目的
非靶向 sgRNA	排除非特异编辑
GFP mRNA/质粒	评估转染效率
阳性 sgRNA	验证体系有效
无 Cas9	排除 sgRNA 单独作用
无 sgRNA	排除 Cas9 单独作用
未转染	基线对照

15. 优化策略

- sgRNA: 换 2-3 条，化学修饰。
- RNP 比例: 1:1.2-1:3 摩尔比。
- 电转: 电压、脉冲、时间、细胞数。
- 脂质体: 脂质体量、核酸量、孵育时间。
- 细胞: 对数期、活力 >90%、密度 50%-70%。
- 温度: 电转后 32°C 短时处理可能提高存活。
- 冷休克: 部分细胞电转后 4°C 或 32°C 处理。
- p53 抑制: 部分细胞可加 p53 抑制剂，但注意副作用。

- 高保真 Cas9: 降低脱靶。

16. 故障排除

问题	可能原因	解决
编辑效率低	sgRNA 活性低	换 sgRNA, 化学修饰
	转染效率低	GFP 对照优化电转/脂质体
	细胞状态差	对数期, 活力 >90%
	RNP 比例不佳	调整摩尔比
	检测时间不对	48-72 h 收获
细胞毒性高	电转过强	降低电压、脉冲
	核酸量过高	减少 Cas9/sgRNA
	脂质体过量	减少脂质体, 6 h 换液
无切割	PAM 错误	核对序列
	sgRNA 降解	无 RNase, 分装, -80°C
	PCR 失败	优化引物和条件
脱靶高	sgRNA 特异性差	高评分 sgRNA, 高保真 Cas9
单克隆失败	稀释不准	使用有限稀释和条件培养基
	克隆生长慢	加生长因子, 延长培养