(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119286934 A
(43)申请公布日 2025.01.10

(21)申请号 202411288993.7

(22)申请日 2020.04.10

(30)优先权数据
62/833,523 2019.04.12 US

(62)分案原申请数据
202080038231.5 2020.04.10

(71)申请人 沃泰克斯药物股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 S·萨伊曼 S·卡哈兰 A·耶恩 S·埃斯帕诺拉 S·J·斯宾塞

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉

(51)Int.Cl.
C12N 15/864(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
A61K 31/713(2006.01)
A61K 38/46(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)

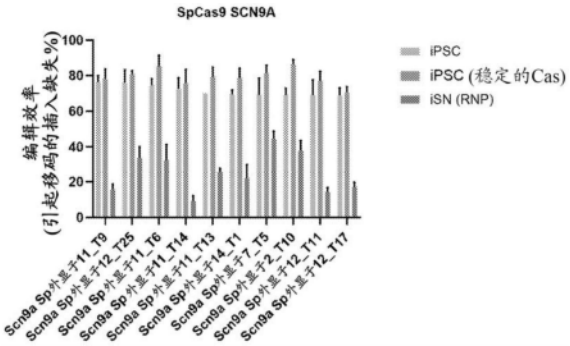
权利要求书2页 说明书106页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

用于修饰SCN9A或SCN10A基因的基因编辑系统及其使用方法

(57)摘要

本文公开了用于体外或体内编辑电压门控钠通道基因，例如钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)或钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)的高效基因编辑系统。本文所公开的基因编辑系统包含RNA引导的DNA核酸内切酶和特异性向导RNA。本文还提供了基因编辑系统修饰靶基因，从而减轻疼痛的用途。



CN 119286934 A

1.一种用于修饰钠电压门控通道α亚基10(SCNA10)基因的基因编辑系统,所述基因编辑系统包含:

(a)金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9)或包含编码SaCas9的第一核苷酸序列的第一多核苷酸部分;以及

(b)向导RNA(gRNA)或包含编码gRNA的第二核酸序列的第二多核苷酸部分,其中所述gRNA包含SEQ ID NO:31-40中任一者的核苷酸序列。

2.如权利要求1所述的基因编辑系统,其中(b)的所述gRNA还包含支架序列。

3.如权利要求2所述的基因编辑系统,其中所述支架序列包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

4.如权利要求1-3中任一项所述的基因编辑系统,其中SaCas9还包含核定位信号(NLS)。

5.如权利要求4所述的基因编辑系统,其中所述NLS是SV40NLS。

6.如权利要求1-5中任一项所述的基因编辑系统,其中(a)的所述第一多核苷酸部分和(b)的所述第二多核苷酸部分是不同多核苷酸。

7.如权利要求6所述的基因编辑系统,其中所述不同多核苷酸中的至少一者是病毒载体。

8.如权利要求7所述的基因编辑系统,其中所述一种或多种病毒载体是一种或多种腺相关病毒(AAV)载体。

9.如权利要求1-8中任一项所述的基因编辑系统,其中单个多核苷酸包含(a)的所述第一多核苷酸部分和(b)的所述第二多核苷酸部分。

10.如权利要求9所述的基因编辑系统,其中所述单个多核苷酸是病毒载体。

11.如权利要求10所述的基因编辑系统,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

12.一种核酸,所述核酸包含权利要求10所述的单个多核苷酸。

13.一种病毒颗粒或病毒颗粒组,所述病毒颗粒或病毒颗粒组集合地包含权利要求1-10中任一项所述的基因编辑系统。

14.如权利要求13所述的病毒颗粒或病毒颗粒组,所述病毒颗粒或病毒颗粒组是一种或多种腺相关病毒(AAV)颗粒。

15.下述在制备用于在有需要的受试者中编辑钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)基因的药物中的用途:

(a)权利要求1-10中任一项所述的基因编辑系统;

(b)权利要求12所述的核酸;或者

(c)权利要求13或权利要求14所述的病毒颗粒或病毒颗粒组。

16.如权利要求15所述的用途,其中所述受试者是患有疼痛的人类患者。

17.如权利要求16所述的用途,其中所述药物接触所述受试者的外周神经系统的神经元。

18.如权利要求15所述的用途,其中所述药物包含与(a)的所述基因编辑系统、(b)的所述核酸或(c)的所述病毒颗粒接触的受试者的细胞。

19.如权利要求18所述的用途,其中所述细胞是自体细胞。

20.如权利要求18所述的用途,其中所述细胞是异源细胞。

21.如权利要求19或权利要求20所述的用途,其中所述细胞是干细胞。

22.如权利要求21所述的用途,其中所述干细胞是iPSC细胞或间充质干细胞。

23.如权利要求18-22中任一项所述的用途,其中所述细胞离体与(a)的所述基因编辑系统、(b)的所述核酸或(c)的所述病毒颗粒接触,然后施用于所述受试者。

24.如权利要求23所述的用途,其中所述受试者是患有疼痛的人类患者。

用于修饰SCN9A或SCN10A基因的基因编辑系统及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请是中国发明申请(发明名称:用于修饰SCN9A或SCN10A基因的基因编辑系统及其使用方法,申请日:2020年4月10日;申请号:202080038231.5)的分案申请。

背景技术

[0003] 基因编辑(包括基因组编辑)是一种类型的基因工程,其中在DNA序列中,例如在靶向细胞的基因组中插入、缺失/或取代一个或多个核苷酸/核酸。最近利用RNA引导的核酸内切酶(例如Cas9)的基因编辑策略能够实现位点特异性DNA修饰;然而,已经发现并非所有RNA引导的核酸内切酶向导RNA对高效地进行编辑。因此,仍然迫切需要鉴定有效地修饰所关注的基因的有效RNA引导的核酸内切酶向导RNA对。

发明内容

[0004] 本公开至少部分基于用于修饰电压门控钠通道基因,例如钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)或钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)的有效基因编辑系统的开发。在一些实施方案中,基因编辑系统依赖于对用于有效修饰电压门控钠通道基因而具有低脱靶发生率的有效RNA引导的核酸内切酶和向导RNA对(例如,本文所公开的那些)的鉴定。

[0005] 因此,在一些方面,本公开涉及用于修饰电压门控钠通道基因,例如SCN9A或SCN10A的基因编辑系统。这种基因编辑系统可以包含:(a)第一多核苷酸部分,所述第一多核苷酸部分包含编码RNA引导的DNA核酸内切酶的第一核苷酸序列,或RNA引导的DNA核酸内切酶;以及(b)第二多核苷酸部分,所述第二多核苷酸部分包含编码向导RNA(gRNA)的第二核苷酸序列。

[0006] 在一些实施方案中,基因编辑系统可以修饰SCN9A基因并且包含:(a)第一多核苷酸部分,所述第一多核苷酸部分包含编码RNA引导的DNA核酸内切酶的第一核苷酸序列,或RNA引导的DNA核酸内切酶;以及(b)第二多核苷酸部分,所述第二多核苷酸部分包含编码向导RNA(gRNA)的第二核苷酸序列,其中所述gRNA包含SEQ ID NO:1-20中任一者的核苷酸序列。如本文所用的多核苷酸部分可以是独立的核酸分子。或者,多核苷酸部分可以是核酸分子的一部分,这部分可以含有一个或多个另外的多核苷酸部分。

[0007] 这种基因编辑系统的RNA引导的核酸内切酶可以是酿脓葡萄球菌(Staphylococcus pyogenes)(SpCas9),它可以与包含SEQ ID NO:1-10中任一者的核苷酸序列的gRNA配对。或者或另外,这种基因编辑系统的RNA引导的核酸内切酶可以是金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)Cas9(SaCas9),它可以与包含SEQ ID NO:11-20中任一者的核苷酸序列的gRNA配对。

[0008] 在一些实施方案中,基因编辑系统可以修饰SCN10A基因并且包含:(a)第一多核苷酸部分,所述第一多核苷酸部分包含编码RNA引导的DNA核酸内切酶的第一核苷酸序列,或RNA引导的DNA核酸内切酶;以及(b)第二多核苷酸部分,所述第二多核苷酸部分包含编码向导RNA(gRNA)的第二核苷酸序列,其中所述gRNA包含SEQ ID NO:21-40中任一者的核苷酸序

列。这种基因编辑系统的RNA引导的核酸内切酶可以是SpCas9,它可以与包含SEQ ID NO:21-30中任一者的核苷酸序列的gRNA配对。或者或另外,这种基因编辑系统的RNA引导的核酸内切酶可以是SaCas9,它可以与包含SEQ ID NO:31-40中任一者的核苷酸序列的gRNA配对。

[0009] 在一些实施方案中,(a)中编码RNA引导的DNA核酸内切酶的第一核苷酸序列还可以包含编码核定位信号(NLS)的核苷酸序列,所述核苷酸序列与RNA引导的DNA核酸内切酶框内融合。在一些实施方案中,NLS是SV40 NLS。

[0010] 在一些实施方案中,(b)中的第二核苷酸序列还可以包含支架序列。在一些实例中,支架序列可以由SaCas9识别。这种支架序列可以包含核苷酸序列GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU(SEQ ID NO:41)。在其它实例中,支架序列可以由SpCas9识别。应了解,由于编码gRNA的第二核苷酸序列可以是DNA序列或RNA序列,因此这个序列中的任何尿嘧啶(U)都可以被胸腺嘧啶(T)置换。

[0011] 在一些实施方案中,(a)的第一多核苷酸部分和(b)的第二多核苷酸部分是不同的多核苷酸,其中至少一者可以是载体。载体可以是病毒载体,例如腺相关病毒(AAV)载体。在一些实施方案中,(a)的第一多核苷酸部分和(b)的第二多核苷酸部分是不同的AAV载体。

[0012] 在一些实施方案中,单个多核苷酸包含(a)的第一多核苷酸部分和(b)的第二多核苷酸部分。单个多核苷酸可以是载体,所述载体可以是病毒载体,例如AAV载体。在一些实施方案中,AAV是AAV1。

[0013] 在本公开的范围内还有核酸和病毒颗粒或病毒颗粒组,它们集合地包含本文所公开的任何基因编辑系统。在一些实施方案中,病毒颗粒或病毒颗粒组是一种或多种AAV颗粒。

[0014] 在其它方面,本公开涉及编辑电压门控钠通道基因,例如SCN9A或SCN10A的方法,所述方法包括使细胞与以下接触:(i)本文所公开的任何基因编辑系统;(ii)包含基因编辑系统的核酸;或(iii)病毒颗粒或病毒颗粒组,它们集合地包含基因编辑系统。

[0015] 在一些实施方案中,接触步骤通过向有需要的受试者施用(a)的基因编辑系统、(b)的核酸或(c)的一个或多个病毒颗粒来进行。在一些实施方案中,受试者是患有疼痛的人类患者。

[0016] 在一些实施方案中,细胞是自体细胞。或者,细胞可以是异源细胞。在一些实施方案中,细胞是干细胞,例如iPSC细胞或间充质干细胞。在一些实例中,所述方法还可以包括向有需要的受试者(例如,患有疼痛的人类患者)施用具有编辑基因的细胞。

[0017] 在本公开的范围内还有本文所描述的任何基因编辑系统或其组分用于治疗疼痛的用途,以及其用于制造供预期医学治疗用的药剂的用途。

[0018] 下文描述中阐述了本公开的一个或多个实施方案的细节。本公开的其它特征或优点从若干实施方案的详细描述以及随附权利要求书将显而易见。

附图说明

[0019] 以下图式构成本说明书的一部分并且包括在内以进一步展示本公开的某些方面,通过参考这些图式中的一者或多者并结合本文所呈现的具体实施方案的详细描述可以更好地了解这些方面。应了解,图式中说明的数据决不限制本公开的范围。

[0020] 图1A-1D描绘了不同细胞模型中40个优先化gRNA的目标编辑效率。优先化gRNA包括(图1A)靶向SCN9A的SpCas9的十个gRNA,(图1B)靶向SCN10A的SpCas9的十个gRNA,(图1C)靶向SCN9A的SaCas9的十个gRNA,以及(图1D)靶向SCN10A的SaCas9的十个gRNA。这些gRNA在iPSC、稳定表达Cas9的iPSC和源自iPSC的感觉神经元中筛选。值代表平均值±标准偏差。

具体实施方式

[0021] 基因编辑(包括基因组编辑)是一种类型的基因工程,其中在DNA序列中,例如在靶向细胞的基因组中插入、缺失/或取代一个或多个核苷酸/核酸。靶向基因编辑能够在靶向细胞的基因组中(例如,在靶向基因或靶向DNA序列中)的预选位点处插入、缺失和/或取代。当例如通过一个或多个核苷酸/核酸的缺失、插入或取代来编辑内源基因的序列时,包含受影响序列的内源基因可能由于序列变异而被敲除或敲落。因此,靶向编辑可以用于破坏内源基因表达。或者或另外,可以将所需核酸插入DNA序列中(例如,内源基因中)的靶位点中,称为靶向整合。“靶向整合”是指涉及插入一个或多个外源序列,而在插入位点处缺失或不缺失内源序列的过程。当存在含有外源序列的供体模板时,靶向整合可以由靶向基因编辑促成。

[0022] 本公开至少部分基于用于修饰电压门控钠通道基因,例如钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)或钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)的有效基因编辑系统的开发。钠通道是形成通过细胞膜的离子通道的整合膜蛋白。电压门控钠通道是响应电压变化而“打开”(即,允许钠离子流过通道)的钠通道。钠通道的α亚基形成通道的核心并且独立发挥功能(即,在不存在任何相应的β亚基或其它辅助蛋白的情况下)。钠电压门控通道家族有九个成员。这些通道的α亚基是$Na_v1.1$、$Na_v1.2$、$Na_v1.3$、$Na_v1.4$、$Na_v1.5$、$Na_v1.6$、$Na_v1.7$、$Na_v1.8$和$Na_v1.9$,分别由SCN1A、SCN2A、SCN3A、SCN4A、SCN5A、SCN8A、SCN9A、SCN10A和SCN11A编码。

[0023] $Na_v1.7$(由SCN9A编码)例如在背根神经节、三叉神经节和交感神经节神经元中表达。$Na_v1.8$(由SCN10A编码)例如在背根神经节中、在称为C纤维的无髓鞘小直径感觉神经元中表达。$Na_v1.7$和$Na_v1.8$两者都涉及伤害感受(即,提供导致疼痛感的信号的感觉机制)。

[0024] 使用本文所描述的任何方法编辑SCN9A和/或SCN10A基因可以用于治疗、预防和/或减轻疾病和病症的症状,例如但不限于先天性疼痛不敏感、嗅觉丧失、仿佛人格、边缘型人格障碍、乳腺恶性肿瘤、非小细胞肺癌、寒冷耐受不良、热性惊厥、糖尿病(Diabetes)、糖尿病(Diabetes Mellitus)、解离性障碍、癫痫、红斑肢痛症、原发性红斑肢痛症、面部疼痛、疱疹病毒科感染、遗传性感觉自主神经病5型、增生、神经痛、遗传性感觉和自主神经病、退行性多关节炎、疼痛、肢体疼痛、术后疼痛、帕金森病(Parkinson Disease)、带状疱疹后遗神经痛、前列腺肿瘤、瘙痒、癫痫发作、躯体形式障碍、烟草使用障碍、三叉神经痛、滑膜囊肿、慢性疼痛、急性发作型疼痛、先天性副肌强直(障碍)、萎靡、感觉不适、灼痛、疼痛淡漠、炎性痛、机械痛、头皮痛、遗传性运动和感觉神经病II型、普通偏头痛、疼痛感缺失、前列腺恶性肿瘤、疼痛障碍、膝骨关节炎、神经病、复杂区域疼痛综合征、强直阵挛性癫痫发作、遗传性神经病、前列腺癌、乳腺癌、婴儿严重肌阵挛性癫痫发作、粘液样囊肿、通道病、阵发性极度疼痛障碍、疼痛性神经病、压迫性神经病、常染色体隐性先天性疼痛淡漠、全面性癫痫伴热性惊厥附加症2型、全面性癫痫伴热性惊厥附加症7、家族性热性惊厥3B和小纤维神经病(成年发作型称为小纤维神经病)。

[0025] 已知SCN9A基因的突变会导致疼痛知觉障碍,包括原发性红斑肢痛症、阵发性极度疼痛障碍、先天性疼痛不敏感和小纤维神经病。SCN9A基因的功能获得性突变导致自发性疼痛,如在原发性红斑肢痛症和阵发性极度疼痛障碍中所观察到的。因此,在患有原发性红斑肢痛症或阵发性疼痛障碍的患者中SCN9A基因的敲除或敲落可以用于治疗、预防和/或减轻相关症状。

[0026] 原发性红斑性肢痛症是一种罕见的常染色体显性病症,所述病症的特征是脚部和手部因热和运动而出现灼痛。受影响的个体通常在幼儿期发展出体征和症状,但在较轻的病例中,症状可能在生命中的较后期出现。这种疾患的管理主要是对症的。除了避免疼痛触发因素(如热、锻炼和酒精)以外,治疗选项还包括冷却和抬高肢体、使用如利多卡因(lidocaine)和美西律(mexilitine)等麻醉剂,以及在极端情况下使用阿片类药物。

[0027] 阵发性极度疼痛障碍是另一种罕见的病症,所述病症的特征是直肠、眼部和下颌区域中的严重发作性疼痛以及皮肤发红。这种疾患的症状常常在新生儿期或幼儿期开始,并且可能终生保持。用于治疗慢性神经病性疼痛障碍的剂常常用于减轻由疾病引起的疼痛发作。钠通道阻断剂卡马西平(carbamazepine)已经证明是这些治疗中最有效的。

[0028] 已知SCN10A基因的突变也会导致疼痛知觉障碍,包括家族性发作性疼痛综合征2型和小纤维神经病。因此,在患有家族性发作性疼痛综合征2型或小纤维神经病的患者中SCN10A基因的敲除或敲落可以用于治疗、预防和/或减轻相关症状。

[0029] 家族性发作性疼痛综合征2型是一种罕见的常染色体显性神经病症,所述病症的特征是足部区域中的阵发性疼痛的成年发作。发作一般由热、冷、化学物质和某些表面触发。患者还可能发展出触摸过敏反应和对疼痛刺激的反应升高。目前没有可用于这种疾病的治疗。保暖已经显示出缓解疼痛发作。

[0030] 小纤维神经病是以严重疼痛发作和疼痛不敏感为特征的疾患。疼痛发作通常描述为麻木、刺痛或灼痛,或异常的皮肤感觉,如麻刺感或发痒。目前,小纤维外周神经病无法治愈。治疗选项包括静脉内免疫球蛋白(IVIG)和血浆置换术。

[0031] 如本文所描述,确定包含RNA引导的核酸内切酶(例如,SpCas9或SaCas9)和特异性向导RNA对的基因编辑系统的插入缺失率和插入缺失模式。本文所描述的基因编辑系统依赖于促进电压门控钠通道基因,例如SCN9A或SCN10A的有效修饰而具有低脱靶发生率的有效RNA引导的核酸内切酶和向导RNA对的特定对(例如,本文所公开的那些)的鉴定。

[0032] 因此,本文提供了用于有效修饰电压门控钠通道基因的基因编辑系统及其用途。基因编辑系统的组分和应用基因编辑系统所产生的基因修饰的细胞也在本公开的范围内。

[0033] I.用于电压门控钠通道基因的基因修饰的基因编辑系统

[0034] 在一些方面,本公开涉及用于修饰电压门控钠通道基因,例如钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)或钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)的基因编辑系统。“基因编辑系统”是指用于编辑靶基因(例如,SCN9A或SCN10A)的组分的组合,或用于产生这类组分的一种或多种剂。举例来说,基因编辑系统可以包含:(a)核酸酶,或用于产生这种酶的剂(例如,编码核酸酶的核酸);和/或(b)向导RNA(gRNA),或用于产生这种gRNA的剂(例如,能够表达gRNA的载体)。

[0035] 如本文所描述的基因编辑系统在修饰电压门控钠通道基因,例如SCN9A或SCN10A中可以展现一种或多种优势。举例来说,基因编辑系统将达成高基因编辑率,例如引起移码

的插入缺失率(例如,至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%或至少75%,如通过本文所描述或本领域中已知的方法评估)或例如总插入缺失率(例如,至少20%、至少21%、至少22%、至少23%、至少24%、至少25%、至少30%、至少35%或至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或至少85%,如通过本文所描述或本领域中已知的方法评估)。此外,由本文所公开的基因编辑系统编辑的细胞相对于未编辑的对照可以具有高存活率(例如,至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%)。

[0036] 在一个示例性实施方案中,如本文所描述的基因编辑系统可以包含:(a)核酸内切酶(例如,RNA引导的DNA核酸内切酶)或产生此种酶的剂(例如,编码核酸内切酶的多核苷酸);以及(b)gRNA或产生此种gRNA的剂(例如,用于表达gRNA的载体)。此外,本文所描述的任何基因编辑系统还可以包含编码供体模板的多核苷酸序列。在一些实例中,本文所描述的基因编辑系统包含核酸内切酶、gRNA和任选的供体模板。这种基因编辑系统可以包含提供供体模板并产生gRNA的一个多核苷酸。或者,基因编辑系统可以包含供体模板和单独的核酸,所述核酸可以是gRNA本身或产生gRNA的多核苷酸。在其它实例中,基因编辑系统可以包含一个或多个多核苷酸,所述多核苷酸共同产生核酸内切酶、gRNA和任选的供体模板。在一些实例中,基因编辑系统可以包含多核苷酸,所述多核苷酸包含编码核酸内切酶的第一多核苷酸序列和编码gRNA的第二多核苷酸序列。或者,基因编辑系统可以包含两个多核苷酸:第一者包含编码核酸内切酶的第一多核苷酸序列,并且第二者包含编码gRNA的第二多核苷酸序列。

[0037] A.RNA引导的核酸内切酶

[0038] RNA引导的核酸内切酶是利用RNA:DNA碱基配对以靶向多核苷酸并使其裂解的酶。RNA引导的核酸内切酶可以使单链多核酸或双链多核苷酸的至少一条链裂解。基因编辑系统可以包含一种RNA引导的核酸内切酶。或者,基因编辑系统可以包含至少两个(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或多于十个)RNA引导的核酸内切酶。

[0039] CRISPR-Cas9系统是原核生物中天然存在的防御机制,所述机制已经重新意图作为用于基因编辑的RNA引导的DNA靶向平台。所述系统依赖于DNA核酸酶Cas9和两个非编码RNA-crisprRNA(crRNA)和反式激活RNA(tracrRNA)-以靶向DNA的裂解。crRNA经由通常与靶DNA中20个核苷酸(nt)的序列进行沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base pairing)来驱动CRISPR-Cas9复合物的序列识别和特异性。改变crRNA中5'20nt的序列允许CRISPR-Cas9复合物靶向特异性基因座。CRISPR-Cas9复合物仅结合含有与crRNA的前20nt匹配的序列的DNA序列,条件是靶序列之后是特异性短DNA基序(具有序列NGG),称为前间区序列邻近基序(PAM)。tracrRNA与crRNA的3'端杂交形成RNA双链体结构,所述结构与Cas9核酸内切酶结合形成催化活性的CRISPR-Cas9复合物,然后可以使靶DNA裂解。

[0040] 一旦CRISPR-Cas9复合物在靶位点处结合至DNA,Cas9酶内的两个独立的核酸酶结构域各自使PAM位点上游的DNA链中的一条链裂解,留下双链断裂(DSB),其中DNA的两条链都以碱基对(平端)终止。

[0041] 基因编辑系统可以包含CRISPR核酸内切酶(例如,CRISPR相关蛋白9或Cas9核酸

酶)。在一些实施方案中,核酸内切酶来自金黄色链球菌(Streptococcus aureus)(例如,saCas9)或酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)(例如,spCas9),但可以使用其它CRISPR同源物。应了解,Cas9可以被本领域中已知的另一种RNA引导的核酸内切酶,例如Cpf1取代。最后,应了解,可以使用野生型RNA引导的核酸内切酶或可以使用修饰型式(例如,Cas9、Cas9直向同源物、Cas9嵌合/融合蛋白或其它Cas9功能变体的进化型式)。举例来说,在一些实施方案中,对RNA引导的核酸内切酶进行修饰以包含核定位信号(NLS),例如SV40 NLS或核质蛋白(NucleoPlasmine)NLS。其它核定位信号的实例是本领域技术人员已知的。在一些实施方案中,NLS包括SV40 NLS和核质蛋白NLS。

[0042] B.向导RNA

[0043] 本公开提供了基因组靶向核酸或用于产生这种核酸的剂(例如,包含编码gRNA的核苷酸序列的多核苷酸),它可以将相关多肽(例如,RNA引导的核酸内切酶)的活性导向靶核酸内的特异性靶序列。基因组靶向核酸可以是RNA。基因组靶向RNA在本文中称为“向导RNA”或“gRNA”。在一些实施方案中,基因编辑系统包含一个gRNA。在其它实施方案中,基因编辑系统包含至少两个gRNA(例如,两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或多于十个gRNA)。

[0044] 基因编辑系统的gRNA可以按合成形式提供。举例来说,向导RNA可以通过化学方式合成,如下文所说明和本领域中所描述。虽然化学合成程序不断扩大,但随着多核苷酸长度显著增加超过约一百个核苷酸,通过如高效液相色谱法(避免使用凝胶,例如PAGE)等程序纯化这类RNA往往变得更具挑战性。用于产生长度更长的RNA的一种方法是产生两个或更多个接合在一起的分子。长得多的RNA更容易通过酶促产生。可以在化学合成和/或酶促产生RNA期间或之后引入各种类型的RNA修饰,例如,增强稳定性、降低先天免疫反应的可能性或程度和/或增强其它属性的修饰,如本领域中所描述。

[0045] 或者,基因编辑系统可以包含用于产生gRNA的剂。举例来说,基因编辑系统可以包含编码gRNA的核苷酸序列的核苷酸序列和促进gRNA表达/产生的另外的核苷酸序列。

[0046] gRNA可以是双分子向导RNA。双分子gRNA包含RNA的两条链。第一链可以在5’至3’方向上包含任选的间隔区延伸序列、间隔区序列和包含最小CRISPR重复序列的支架序列。第二链包含最小tracrRNA序列(与最小CRISPR重复序列互补)、3’tracrRNA序列和任选的tracrRNA延伸序列。

[0047] 或者,gRNA可以是包含间隔区序列和支架序列的单分子向导RNA(sgRNA)。支架序列可以包含如本文所描述的tracrRNA序列。sgRNA(例如,在II型系统中)可以在5’至3’方向上包含任选的间隔区延伸序列、间隔区序列、最小CRISPR重复序列、单分子向导接头、最小tracrRNA序列、3’tracrRNA序列和任选的tracrRNA延伸序列。任选的tracrRNA延伸可以包含对向导RNA贡献另外的功能性(例如,稳定性)的元件。单分子向导接头将最小CRISPR重复和最小tracrRNA序列连接形成发夹结构。任选的tracrRNA延伸包含一个或多个发夹。或者,sgRNA(例如,在V型系统中)可以在5’至3’方向上包含最小CRISPR重复序列和间隔区序列。

[0048] 单分子gRNA可以在gRNA序列的3’端不包含尿嘧啶。或者,gRNA可以在gRNA序列的3’端包含一个或多个尿嘧啶。举例来说,gRNA可以在gRNA序列的3’端包含1个尿嘧啶(U)。gRNA可以在gRNA序列的3’端包含2个尿嘧啶(UU)。gRNA可以在gRNA序列的3’端包含3个尿嘧啶(UUU)。gRNA可以在gRNA序列的3’端包含4个尿嘧啶(UUUU)。gRNA可以在gRNA序列的3’端

包含5个尿嘧啶(UUUUU)。gRNA可以在gRNA序列的3'端包含6个尿嘧啶(UUUUUU)。gRNA可以在gRNA序列的3'端包含7个尿嘧啶(UUUUUUU)。gRNA可以在gRNA序列的3'端包含8个尿嘧啶(UUUUUUUU)。

[0049] 应进一步了解,上文所描述的gRNA的核苷酸可以在任何核苷酸位置处包含修饰的核酸。因此,gRNA可以是未修饰的或修饰的。举例来说,修饰的gRNA可以包含一个或多个2'-O-甲基硫代磷酸酯核苷酸。另外的修饰的核酸的实例是本领域技术人员已知的。参见例如WO2018007976和WO2018007980,各自的相关公开内容出于本文所提及的目的和/或主题以引用的方式并入。

[0050] (i)gRNA间隔区

[0051] 如本领域普通技术人员所了解,设计每个gRNA以包括与其基因组靶序列互补的间隔区序列。参见Jinek等,Science,337,816-821(2012)和Deltcheva等,Nature,471,602-607(2011)。间隔区序列是定义所关注的靶核酸的靶序列(例如DNA靶序列,如基因组靶序列)的核苷酸序列。gRNA可以包含在gRNA序列的5'端具有17-30个核苷酸的可变长度间隔区序列。在一些实施方案中,间隔区序列是15至30个核苷酸。在一些实施方案中,间隔区序列是15、16、17、18、19、29、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个核苷酸。在一些实施方案中,间隔区序列是20个核苷酸。

[0052] "靶序列"与PAM序列相邻并且是由RNA引导的核酸酶(例如,Cas9)修饰的序列。"靶核酸"是双链分子:一条链包含靶序列并称为"PAM链",并且另一条互补链称为"非PAM链"。本领域技术人员认识到,gRNA间隔区序列与位于所关注的靶核酸的非PAM链中的靶序列的反向互补序列杂交。因此,gRNA间隔区序列是靶序列的RNA等价物。举例来说,如果靶序列是5′-AGAGCAACAGTGCTGTGGCC-3′(SEQ ID NO:498),那么gRNA间隔区序列是5′-AGAGCAACAGUGCUGUGGCC-3′(SEQ ID NO:499)。gRNA的间隔区经由杂交(即,碱基配对)以序列特异性方式与所关注的靶核酸相互作用。因此,间隔区的核苷酸序列取决于所关注的靶核酸的靶序列而变化。

[0053] 设计间隔区序列以与位于系统中使用的Cas9酶的PAM 5'的靶核酸区域杂交。间隔区可能与靶序列完美匹配或可能有错配。每个Cas9酶具有在靶DNA中所识别的特定PAM序列。举例来说,酿脓链球菌(S.pyogenes)Cas9在靶核酸中识别包含序列5'-NRG-3'的PAM,其中R包含A或G,其中N是任何核苷酸并且N紧邻间隔区序列靶向的靶核酸序列的3'。酿脓链球菌Cas9的典型PAM是5'-NGG-3',但如前一句所指示,酿脓链球菌Cas9也可以识别非典型PAM 5'-NAG-3'。类似地,对于金黄色葡萄球菌(S.aureus)Cas9,PAM包含序列5'-NNGRRT-3'。

[0054] 在一些实施方案中,靶核酸序列包含20-22个核苷酸。在一些实施方案中,靶核酸包含少于20个核苷酸。在一些实施方案中,靶核酸包含多于20个核苷酸。在一些实施方案中,靶核酸包含至少:5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,靶核酸包含至多:5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,靶核酸序列包含紧邻PAM的第一个核苷酸的5'的20-22个碱基。举例来说,在包含5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3'(SEQ ID NO:489)或5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGRRT-3'(SEQ ID NO:490)的序列中,靶核酸包含对应于没有下划线的N的序列,其中N是任何核苷酸,并且加下划线的NRG序列和NNGRRT序列分别是酿脓链球菌PAM和金黄色葡萄球菌PAM。

[0055] 在一些实施方案中,本文所用的gRNA可以包含20个核苷酸的间隔区序列。在一些实施方案中,这种gRNA与SpCas9一起使用。在其它实施方案中,本文所用的gRNA可以包含22个核苷酸的间隔区序列。在一些实施方案中,这种gRNA与SaCas9一起使用。

[0056] 在一些实施方案中,本文所用的gRNA可以包含表1-4中所列的间隔区序列。在一些实例中,本文所用的gRNA可以包含表1中所列的间隔区序列与SpCas9组合用于编辑SCN9A。在一些实例中,本文所用的gRNA可以包含表2中所列的间隔区序列与SaCas9组合用于编辑SCN9A。在一些实例中,本文所用的gRNA可以包含表3中所列的间隔区序列与SpCas9组合用于编辑SCN10A。在一些实例中,本文所用的gRNA可以包含表4中所列的间隔区序列与SaCas9组合用于编辑SCN10A。这些gRNA中的任一者可以包含表1和表3中的任一者中所列的间隔区序列(与SpCas9酶组合),具有大于40%(例如,50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%或更高)的平均总插入缺失百分比和/或大于40%(例如,50%、55%、60%、65%、70%、75%或更高)的引起移码的平均插入缺失百分比。或者,这些gRNA中的任一者可以包含表2和表4中的任一者中所列的间隔区序列(与SaCas9酶组合),具有大于15%(例如,20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%或更高)的平均总插入缺失百分比和/或大于15%(例如,20%、25%、30%、35%、40%、45%或更高)的引起移码的平均插入缺失百分比。

[0057] 示例性gRNA可以包含以下间隔区序列之一:

[0058] ●CAAUUUGGGUGGUACCUGAU(SEQ ID NO:1);

[0059] ●GCUUCGCCUUGCAGAAAACA(SEQ ID NO:2);

[0060] ●GCCUAUGCCCUUCGACACCA(SEQ ID NO:3);

[0061] ●AUAGGCGAGCACAUGAAAAG(SEQ ID NO:4);

[0062] ●CGGCUGAAUAUACAAGUAUU(SEQ ID NO:5);

[0063] ●GGAACACCACCCAAUGACUG(SEQ ID NO:6);

[0064] ●CAGGCCUGAAGACAAUUGUA(SEQ ID NO:7);

[0065] ●GGAAUGUCCCCAUAGAUGAA(SEQ ID NO:8);

[0066] ●CCACCAAUGCUGCCGGUGAA(SEQ ID NO:9);

[0067] ●CAGUCACCACUCAGCAUUCG(SEQ ID NO:10);

[0068] ●AAGCAGAAUUAUGGGCCUCUCA(SEQ ID NO:11);

[0069] ●GCCUUGCAGAAAACAAGGAGCC(SEQ ID NO:12);

[0070] ●ACGACAAAAUCCAGCCAGUUCC(SEQ ID NO:13);

[0071] ●CUGGGAAAACCUUUACCAACAG(SEQ ID NO:14);

[0072] ●UCCCAACCUCAGACAGAGAGCA(SEQ ID NO:15);

[0073] ●GAUGUUACUGCUGCGUCGCUCC(SEQ ID NO:16);

[0074] ●CAUGAUCCUGACUGUGUUCUGU(SEQ ID NO:17);

[0075] ●CUCGUGUGUAGUCAGUGUCCAG(SEQ ID NO:18);

[0076] ●AAACUGAUUGCCAUGGAUCCAU(SEQ ID NO:19);

[0077] ●AGAAAACAAGGAGCCACGAAUG(SEQ ID NO:20);

[0078] ●GCUCCCCGAUCAGUUCUGCU(SEQ ID NO:21);

[0079] ●UGUAGUCACCAUGGCGUAUG(SEQ ID NO:22);

[0080] ●GGAAGCUCCGCAGCACAGAC(SEQ ID NO:23);

[0081] ●UCCUUACAACCAGCGCAGGA(SEQ ID NO:24)；

[0082] ●ACUUCUGACCCCUUACUGUG(SEQ ID NO:25)；

[0083] ●GAGCUCCCAGCAGAACUGAU(SEQ ID NO:26)；

[0084] ●CCGAGACAUCGACAGCUCCA(SEQ ID NO:27)；

[0085] ●AUCCGUUCUACAGCACACAC(SEQ ID NO:28)；

[0086] ●UCACGUACCUGAGAGAUCCU(SEQ ID NO:29)；

[0087] ●CGCAGGUGCUAGCAGCACUA(SEQ ID NO:30)；

[0088] ●CCCUGGAGCUGUCGAUGUCUCG(SEQ ID NO:31)；

[0089] ●UAGAUCCGUUCUACAGCACACA(SEQ ID NO:32)；

[0090] ●AGUGAGAGGAAAGCCCAAGCAA(SEQ ID NO:33)；

[0091] ●ACCUUUCCGGGCCCAAAGGGCA(SEQ ID NO:34)；

[0092] ●CUUUGACUGCAUCAUCGUCACU(SEQ ID NO:35)；

[0093] ●CACUUCUUCUGGAAAUAAUAGU(SEQ ID NO:36)；

[0094] ●AUUUUAGCGUCAUUACCCUGGC(SEQ ID NO:37)；

[0095] ●AACAACUUCCGUCGCUUUACUC(SEQ ID NO:38)；

[0096] ●GCCGAGAUAUCUCACUCCCUGA(SEQ ID NO:39)；

[0097] ●UGGUGUUCAUCUUCUCCAUGCC(SEQ ID NO:40)。

[0098] (ii)gRNA支架

[0099] 在一些实施方案中,gRNA还包含支架序列。支架序列可以包含最小CRISPR重复序列、单分子向导接头、最小tracrRNA序列、3'tracrRNA序列和/或任选的tracrRNA延伸序列的序列。各种CRISPR蛋白的示例性支架序列是本领域普通技术人员已知的。

[0100] 支架序列的选择可以取决于将在如本文所用的基因编辑系统中使用的RNA引导的DNA核酸内切酶,例如,本领域技术人员已知的SaCas9或SpCas9。举例来说,如果要使用SpCas9,那么可以选择SpCas9可识别的支架序列。SpCas9支架序列的实例是本领域中已知的。参见例如Zhang等,Plant Mol Biol.2018;96(4):445-456;www.addgene.org。单分子向导RNA中的一个示例性支架序列可以包含核苷酸序列GTTTAAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTTAAATAAGGCTAGTCC GTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC(SEQ ID NO:42)。

[0101] 或者,如果要使用SaCas9核酸内切酶,那么可以选择SaCas9可识别的支架序列。SaCas9的单分子向导RNA中的支架序列可以包含核酸序列GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAAGGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU(SEQ ID NO:41)。单分子向导RNA还可以包含任选的间隔区延伸。

[0102] 应了解,由于编码gRNA的核苷酸序列可以是DNA序列或RNA序列,因此描述gRNA的序列中的任何尿嘧啶(U)都可以被胸腺嘧啶(T)置换。同样地,在指代gRNA的序列中的任何T(胸腺嘧啶)在RNA分子的情形中将指代U(或尿嘧啶)。本文中含有T(胸腺嘧啶)的序列将涵盖DNA分子和RNA分子两者(其中T是指U)。

[0103] (iii)示例性RNA引导的核酸内切酶-gRNA对

[0104] 在一些实施方案中,基因编辑系统依赖于对用于有效修饰电压门控钠通道基因的有效RNA引导的核酸内切酶向导RNA对(例如,本文所公开的那些)的鉴定。

[0105] 举例来说,用于修饰钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)基因的基因编辑系统可以包

含酿脓葡萄球菌(SpCas9)和包含SEQ ID NO:1-10中任一者的核苷酸序列的gRNA。或者或另外,用于修饰钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)基因的基因编辑系统可以包含金黄色葡萄球菌(SaCas9)和包含SEQ ID NO:11-20中任一者的核苷酸序列的gRNA。

[0106] 在另一个实例中,用于修饰钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)基因的基因编辑系统可以包含SpCas9和包含SEQ ID NO:21-30中任一者的核苷酸序列的gRNA。或者或另外,用于修饰钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)基因的基因编辑系统可以包含SaCas9和包含SEQ ID NO:31-40中任一者的核苷酸序列的gRNA。

[0107] (iv)核糖核蛋白复合物

[0108] 在一些情况下,本文所公开的基因编辑系统可以包含核糖核蛋白复合物(RNP),其中gRNA和核酸酶(例如,如上文所描述)形成复合物。如本文所用,术语“核糖核蛋白”或“RNP”是指结构上与核酸(DNA或RNA)相关联的蛋白质。举例来说,在一些实施方案中,基因编辑系统的Cas9 RNA引导的核酸内切酶和gRNA呈RNP形式。

[0109] C.供体模板

[0110] 供体模板包含将插入DNA序列中(例如,内源基因中)的靶位点处的核酸序列。基因编辑系统的供体模板可以按合成形式提供。或者,基因编辑系统可以包含用于产生供体模板的剂(例如核酸,如载体)。举例来说,基因编辑系统可以包含用于产生供体模板的核酸(例如,载体)。

[0111] 供体模板可以包含一个或多个同源臂以允许在所关注的基因组位置处进行有效的同源依赖性重组(HDR)。同源臂的长度可能有变化。举例来说,同源臂的长度可以是至少50个、至少100个、至少150个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个、至少500个、至少550个、至少600个、至少650个、至少700个、至少750个、至少800个、至少850个、至少900个、至少950个或至少1000个核苷酸。同样地,同源臂的长度可以是50至100个、50至200个、50至300个、50至400个、50至500个、50至600个、50至700个、50至800个、50至900个、50至1000个、100至200个、100至300个、100至400个、100至500个、100至600个、100至700个、100至800个、100至900个、100至1000个、200至300个、200至400个、200至500个、200至600个、200至700个、200至800个、200至900个、200至1000个、300至400个、300至500个、300至600个、300至700个、300至800个、300至900个、300至1000个、400至500个、400至600个、400至700个、400至800个、400至900个、400至1000个、500至600个、500至700个、500至800个、500至900个、500至1000个、600至700个、600至800个、600至900个、600至1000个、700至800个、700至900个、700至1000个、800至900个、800至1000个或900至1000个核苷酸。特别地,同源臂的长度可以是500个核苷酸。

[0112] 举例来说,在一些实施方案中,供体模板包含5’同源臂(即,位于第一核苷酸序列上游)和3’同源臂(即,位于第一核苷酸序列下游),其中5’同源臂包含与所关注的基因组位置上游的区域同源的核酸序列,并且其中3’同源臂包含与所关注的基因组位置下游的区域同源的核酸序列。

[0113] 在其它实施方案中,供体模板可以包含5’同源臂并且缺乏3’同源臂。在其它实施方案中,供体模板可以包含3’同源臂并且缺乏5’同源臂。

[0114] 或者,供体模板可能缺乏同源臂。举例来说,在一些情况下,供体模板可以在靶位点处裂解后通过NHEJ依赖性末端连接进行整合。

[0115] 供体模板还可以包含编码所关注基因或其部分(例如,SCN9A、SCN10A或其部分)的多核苷酸序列。或者或另外,供体模板可以包含编码调控元件(例如,SCN9A或SCN10A的调控元件)的多核苷酸序列。

[0116] 供体模板可以是单链和/或双链的DNA或RNA,并且可以按线性或环状形式引入细胞中。如果以线性形式引入,供体序列的末端可以通过本领域技术人员已知的方法加以保护(例如,免于核酸外切降解)。举例来说,将一个或多个双脱氧核苷酸残基添加至线性分子的3'端和/或将自互补寡核苷酸接合至一端或两端。参见例如Chang等,(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:4959-4963;Nehls等,(1996)Science 272:886-889。用于保护外源多核苷酸免于降解的另外的方法包括但不限于添加一个或多个末端氨基以及使用修饰的核苷酸间键,例如硫代磷酸酯、氨基磷酸酯和O-甲基核糖或脱氧核糖残基。

[0117] 可以将供体模板引入细胞中作为载体分子的一部分,所述载体分子具有另外的序列,例如复制起点、启动子和编码抗生素抗性的基因。此外,供体模板可以作为裸核酸、作为与如脂质体或泊洛沙姆(poloxamer)等剂复合的核酸引入,或者可以由病毒(例如,腺病毒、AAV、疱疹病毒、逆转录病毒、慢病毒和整合酶缺陷型慢病毒(IDLV))递送。

[0118] 在一些实施方案中,插入供体模板以使其表达由内源启动子驱动,例如驱动供体所插入的内源基因表达的启动子。

[0119] 此外,外源序列还可以包括转录或翻译调控序列,例如启动子、增强子、绝缘子、内部核糖体进入位点、编码2A肽和/或聚腺苷酸化信号的序列。

[0120] 应了解,上文所描述的供体模板的核苷酸可以在任何核苷酸位置处包含修饰的核酸。

[0121] D.基于病毒载体/病毒颗粒的基因编辑系统

[0122] 在一些实施方案中,本文所公开的基因编辑系统可以包含多核酸(例如载体,如病毒载体)或包含这类多核酸的病毒颗粒。一个或多个多核酸产生用于编辑如本文所描述的电压门控钠通道基因的组分(例如,核酸酶和gRNA)。

[0123] 在一些实例中,基因编辑系统包含能够产生基因编辑系统的所有组分(包括核酸酶和gRNA)的一个多核酸。在其它实例中,基因编辑系统包含两个多核酸,一者编码核酸酶并且另一者编码gRNA。

[0124] 核酸(或核酸组中的至少一个核酸)可以是载体,例如病毒载体,如逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体和单纯疱疹病毒(HSV)载体。

[0125] 在一些实例中,基因编辑系统可以包含一个或多个病毒颗粒,所述病毒颗粒携带用于产生如本文所公开的基因编辑系统的组分的基因材料。病毒颗粒(例如,AAV颗粒)可以包含基因编辑系统(例如,如本文所描述)的一种或多种组分(或用于产生一种或多种组分的剂)。病毒颗粒(或病毒粒子)包含编码病毒基因组的核酸和蛋白质的外壳(即,衣壳)。在一些情况下,病毒颗粒还包含包围蛋白质外壳的脂质包膜。

[0126] 在一些实例中,病毒颗粒包含能够产生基因编辑系统的所有组分(包括核酸酶和gRNA)的多核酸。在其它实例中,病毒颗粒包含能够产生基因编辑系统的一种或多种组分的多核酸。举例来说,病毒颗粒可以包含能够产生核酸酶的多核酸。或者,病毒颗粒可以包含能够产生gRNA的多核酸。

[0127] 本文所描述的病毒颗粒可以来源于本领域中已知的任何病毒颗粒,包括但不限于

逆转录病毒颗粒、腺病毒颗粒、腺相关病毒(AAV)颗粒或单纯疱疹病毒(HSV)颗粒。在一些实施方案中,病毒颗粒是AAV颗粒。在一些实施方案中,AAV颗粒是AAV1颗粒。

[0128] 在一些实施方案中,病毒颗粒组包含多于一个基因编辑系统。在一些实施方案中,病毒颗粒组中的每个病毒颗粒是AAV颗粒。在其它实施方案中,病毒颗粒组包含多于一种类型的病毒颗粒(例如,逆转录病毒颗粒、腺病毒颗粒、腺相关病毒(AAV)颗粒或单纯疱疹病毒(HSV)颗粒)。

[0129] E.另外的示例性基因编辑系统

[0130] 另外,本文所公开的基因编辑系统可以包含如本文所公开的核酸酶(例如,Cas9酶)。这种基因编辑系统还可以包含gRNA。核酸酶和gRNA可以形成用于递送的RNP。此外,基因编辑系统还可以包含gRNA和用于产生供体模板的多核酸(例如载体,如本文所描述的那些)。核酸酶和gRNA可以形成RNP复合物。或者,基因编辑系统还可以包含用于产生gRNA和供体模板的一个或多个多核酸。

[0131] 或者,本文所公开的基因编辑系统可以包含用于产生核酸酶的剂,例如表达载体,例如能够表达核酸酶的如本文所公开的病毒载体。这种基因编辑系统还可以包含gRNA或用于产生这种gRNA的剂。

[0132] 包含用于修饰电压门控钠通道基因的如本文所公开的组分或产生这类组分的剂的基因编辑系统的任何其它形式都在本公开的范围内。

[0133] II.编辑电压门控钠通道基因的方法

[0134] 在一些方面,本公开涉及使用本文所公开的任何基因编辑系统编辑电压门控钠通道基因,例如钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)或钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)的方法。编辑事件可以在钠电压门控通道(例如,SCN9A或SCN10A)中引入突变或校正突变。基因(例如,SCN9A或SCN10A)的一个或多个拷贝(即,等位基因)可以被校正和/或突变。

[0135] 编辑电压门控钠通道基因的方法可以包括使细胞与以下接触:如本文所描述的基因编辑系统;包含如本文所描述的基因编辑系统的病毒颗粒或病毒颗粒组;和/或包含如本文所描述的基因编辑系统的核酸或核酸组。举例来说,这些方法可以对存在于活受试者内(例如,体内)的一个或多个细胞进行。或者或另外,这些方法可以对存在于培养物中(例如,离体)的一个或多个细胞进行。在一些情况下,然后向受试者施用在培养物中编辑的细胞(本文中归类为“基于细胞的疗法”)。

[0136] A.递送方法

[0137] 细胞(或受试者)与基因编辑系统、病毒颗粒或病毒颗粒组和/或核酸或核酸组的接触可以经由各种递送方法进行。举例来说,核酸酶和/或gRNA可以使用载体系统递送,包括但不限于质粒载体、DNA微环、逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体;疱疹病毒载体和腺相关病毒载体,以及它们的组合。

[0138] 常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法可以用于在细胞中引入编码核酸酶和gRNA的核酸。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、DNA微环、裸核酸以及与如脂质体或泊洛沙姆等递送运载体复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,所述病毒在递送至细胞后具有游离基因组或整合基因组。

[0139] 核酸的非病毒递送方法包括但不限于电穿孔、脂质转染、显微注射、生物射弹、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、裸RNA、加帽RNA、人工病毒

粒子,以及DNA的剂增强型吸收。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声穿孔也可以用于递送核酸。

[0140] 用于递送蛋白质(例如,RNA引导的核酸内切酶)的方法包括但不限于使用细胞穿透肽和纳米运载体。

[0141] (i)腺相关病毒递送

[0142] 可以使用腺相关病毒(AAV)将基因编辑系统的一种或多种组分递送至细胞。AAV是以位点特异性方式整合至宿主基因组中并且因此可以递送转基因的小病毒。反向末端重复(ITR)存在于所关注的AAV基因组和/或转基因的侧翼,并且用作复制起点。AAV基因组中还存在rep和cap蛋白,所述蛋白在转录时形成包裹用于递送至靶细胞中的AAV基因组的衣壳。这些衣壳上的表面受体赋予AAV血清型,所述血清型决定了衣壳将主要结合哪些靶器官并且因此决定了AAV将最有效地感染哪些细胞。目前已知有十二种人类AAV血清型。在一些实施方案中,AAV是AAV血清型6(AAV6)。在一些实施方案中,AAV是AAV血清型1(AAV1)。

[0143] 出于多种原因,腺相关病毒是基因疗法中最频繁使用的病毒之一。首先,AAV在向哺乳动物(包括人类)施用后不会引起免疫反应。其次,将AAV有效递送至靶细胞,特别是在考虑选择适当的AAV血清型时。最后,AAV具有感染分裂细胞和非分裂细胞两者的能力,这是因为基因组可以在不整合的情况下持续存在于宿主细胞中。这种特性使得它们成为基因疗法的理想候选物。

[0144] (ii)同源定向修复(HDR)

[0145] 基因编辑系统的一种或多种组分可以通过同源定向修复(HDR)插入编辑细胞的靶基因组区域中。靶基因组区域的两条DNA链都被CRISPR Cas9酶切割。然后发生HDR以修复双链断裂(DSB)并插入供体DNA。为了正确发生这种情况,将供体序列设计成具有与靶基因中DSB位点周围的序列互补的侧翼残基(下文中称为“同源臂”)。这些同源臂用作DSB修复的模板并且允许HDR成为基本上无误差的机制。同源定向修复(HDR)的速率是突变与切割位点之间距离的函数,并且因此选择重叠或附近的靶位点很重要。模板可以包括位于同源区域侧翼的额外序列,或者可以含有与基因组序列不同的序列,从而允许进行序列编辑。

[0146] (iii)非同源末端连接(NHEJ)

[0147] NHEJ路径也可以在非常低的频率下产生含有外显子11-27的插入物。当插入物处于有义链方向时,这种修复应校正表达。

[0148] III.治疗应用

[0149] 本文所公开的基因编辑方法可以应用于治疗患有疼痛的患者。在一些实施方案中,本文提供了基于离体细胞的疗法。在其它实施方案中,本文提供了体内基因疗法。

[0150] (i)基于细胞的疗法

[0151] 可以使用本文所描述的任何方法产生基因编辑的细胞。在一些实施方案中,在编辑细胞的群体内的一个或多个基因编辑得到与电压门控钠通道功能变化相关的表型。

[0152] 在一些实施方案中,本公开的基因编辑的细胞相对于未编辑的对照展现降低的电压门控钠通道活性(例如,降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%)。举例来说,$Na_v1.7$和/或$Na_v1.8$活性的水平相对于未编辑的对照细胞可以降低至少5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%。在一些实施方案中,$Na_v1.7$和/或$Na_v1.8$活性的水平相对于对照T细胞可以降低5%-10%、5%-

20％、5％-30％、5％-40％、5％-50％、5％-60％、5％-70％、5％-80％、5％-90％、10％-20％、10％-30％、10％-40％、10％-50％、10％-60％、10％-70％、10％-80％、10％-90％、20％-30％、20％-40％、20％-50％、20％-60％、20％-70％、20％-80％、20％-90％、30％-40％、30％-50％、30％-60％、30％-70％、30％-80％、30％-90％、40％-50％、40％-60％、40％-70％、40％-80％、40％-90％、50％-50％、50％-70％、50％-80％或50％-90％。

[0153] 在其它实施方案中,本公开的基因编辑的细胞相对于未编辑的对照展现增加的电压门控钠通道活性(例如,增加至少30％、50％、100％、2倍、5倍或10倍)。举例来说,$Na_v1.7$和/或$Na_v1.8$活性的水平相对于未编辑的对照细胞可以增加至少30％、至少50％、至少100％、至少200％、至少500％、至少1000％。在一些实施方案中,$Na_v1.7$和/或$Na_v1.8$活性的水平相对于未编辑的对照细胞可以增加30％-50％、30％-100％、30％-200％、30％-500％、30％-1000％、50％-100％、50％-200％、50％-500％、50％-1000％、100％-200％、100％-500％、100％-1000％、200％-500％、200％-1000％或500％-1000％。

[0154] 在一些实施方案中,可以进行患者外周神经的活检。可以从患者的皮肤或腿部分离神经组织。然后,从活检材料中分离外周神经系统的细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞(Schwann cell)或神经节中的卫星神经胶质细胞)。然后,可以使用本文所描述的材料和方法编辑外周神经系统细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)的染色体DNA。最后,将外周神经系统的编辑细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)植入患者体内。任何来源或类型的细胞都可以用作祖细胞。

[0155] 在其它实施方案中,可以创造患者特异性诱导多能干细胞(iPSC)。然后,可以使用本文所描述的材料和方法编辑这些iPSC细胞的染色体DNA。接下来,基因组编辑的iPSC可以分化为外周神经系统的细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。最后,将外周神经系统的分化细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)植入患者体内。

[0156] 或者,可以从患者分离间充质干细胞,所述间充质干细胞可以从患者的骨髓或外周血中分离。接下来,可以使用本文所描述的材料和方法编辑这些间充质干细胞的染色体DNA。接下来,基因组编辑的间充质干细胞可以分化为外周神经系统的细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。最后,将外周神经系统的分化细胞(例如神经元或神经胶质细胞,如神经中的许旺细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)植入患者体内。

[0157] 可以向受试者施用任何基因编辑的细胞。施用步骤可以包括通过使引入的细胞至少部分定位于所需部位的方法或途径将基因工程细胞放置(例如,移植)于受试者体内,从而产生一种或多种所需作用并且其中至少一部分植入的细胞或细胞的组分保持存活。向受试者施用后细胞的存活期可以短至几小时,例如二十四小时,至几天,至长达数年,或甚至受试者的寿命,即,长期植入。在一些实施方案中,向受试者的呼吸道施用。

[0158] 施用模式包括注射、输注、滴注或摄入。注射包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。在一些实施方案中,途径是静脉内。

[0159] 在一些实施方案中,全身施用基因工程细胞,这是指以除了直接施用于靶部位、组

织或器官以外的方式施用细胞群体,从而替代地使其进入受试者的循环系统并且因此经受代谢和其它类似过程。

[0160] 为了用于本文所描述的各个方面,有效量的基因工程细胞包括至少10^2个细胞、至少5X 10^2个细胞、至少10^3个细胞、至少5X 10^3个细胞、至少10^4个细胞、至少5X 10^4个细胞、至少10^5个细胞、至少2X 10^5个细胞、至少3X 10^5个细胞、至少4X 10^5个细胞、至少5X 10^5个细胞、至少6X 10^5个细胞、至少7X 10^5个细胞、至少8X10^5个细胞、至少9X 10^5个细胞、至少1X 10^6个细胞、至少2X 10^6个细胞、至少3X 10^6个细胞、至少4X 10^6个细胞、至少5X 10^6个细胞、至少6X 10^6个细胞、至少7X 10^6个细胞、至少8X 10^6个细胞、至少9X 10^6个细胞,或它们的倍数。在本文所描述的一些实例中,细胞在向有需要的受试者施用前在培养物中扩增。

[0161] (ii)体内基因疗法

[0162] 或者,本文所公开的基因编辑方法和材料可以应用于在体内对靶基因(SCN9A或SCN10A)进行基因修饰。可以使用本文所描述的材料和方法编辑患者中的细胞的染色体DNA。在一些方面,基于体内的疗法中的靶细胞可以是外周神经系统的神经元。

[0163] 尽管某些细胞呈递离体治疗和疗法的有吸引力的标靶,但递送效率的增加可以允许直接体内递送至这类细胞。理想地,靶向和编辑将针对相关细胞。通过靶向递送和/或使用仅在某些细胞中和或发育阶段有活性的启动子也可以防止其它细胞中的裂解。另外的启动子是可诱导的,并且因此如果核酸酶作为质粒递送,那么所述启动子可以在时间上受到控制。也可以使用治疗或为了改变半衰期所添加的结构域来调整递送的RNA和蛋白质留在细胞中的时间量。体内治疗将消除许多治疗步骤,但较低的递送速率可能需要较高的编辑速率。体内治疗可以消除离体治疗以及神经元和神经胶质细胞适当植入和植入后整合至现有脑回路中所致的问题和损失。

[0164] 在一些方面,本公开涉及向有需要的受试者施用有效量的如本文所描述的基因编辑系统、包含如本文所描述的基因编辑系统的病毒颗粒或病毒颗粒组、包含如本文所描述的基因编辑系统的核酸或核酸组、或如本文所描述的编辑细胞的组合物的方法。

[0165] 受试者可以是需要诊断、治疗或疗法的任何受试者。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是人类。在一些实施方案中,受试者是患有疼痛的人类患者。在一些实施方案中,人类患者是儿童。

[0166] 有效量是指预防或减轻医学疾患(即,疼痛)的至少一种或多种体征或症状所需的基因编辑系统、包含基因编辑系统的病毒颗粒或病毒颗粒组、包含基因编辑系统的核酸或核酸组、或基因工程细胞群体的量,并且涉及足以提供所需作用(即,治疗患有疼痛的受试者)的组合物的量。有效量还包括足以预防或延迟疾病症状的发展、改变疾病症状的进程(例如但不限于减缓疾病症状的进展)、或逆转疾病症状的量。应了解,对于任何给定的情况,本领域普通技术人员可以使用常规实验确定适当的有效量。

[0167] 包含用于治疗医学疾患的组合物的治疗的功效可以由熟练的临床医师确定。如果体征或症状中的任一者或全部,例如功能标靶的水平以有益的方式改变(例如,增加至少10%),或疾病的其它临床上接受的症状或标志(例如,疼痛)得到改进或改善,那么治疗被视为“有效治疗”。还可以通过受试者不会经历如以住院治疗或需要医疗干预所评估的恶化(例如,中断或至少减缓疾病的进展)来测量功效。测量这些指标的方法是本领域技术人员已知的和/或在本文中描述。治疗包括对受试者疾病的任何治疗并且包括:(1)抑制疾病,例

如阻止或减缓症状的进展;或(2)缓解疾病,例如使症状消退;以及(3)预防或降低症状发展的可能性。

[0168] IV.治疗用试剂盒

[0169] 本公开还提供了使用本文所描述的组合物的试剂盒。举例来说,本公开提供了包含以下的试剂盒:如本文所描述的基因编辑系统;包含如本文所描述的基因编辑系统的病毒颗粒或病毒颗粒组;包含如本文所描述的基因编辑系统的核酸或核酸组;和/或如本文所描述的基因编辑的细胞群体。

[0170] 在一些实施方案中,试剂盒另外可以包括用于本文所描述的任何方法中的使用说明书。所包括的说明书可以包括对以下内容的描述:(i)递送如本文所描述的基因编辑系统;包含如本文所描述的基因编辑系统的病毒颗粒或病毒颗粒组;和/或包含如本文所描述的基因编辑系统的核酸或核酸组;和/或(ii)施用如本文所描述的基因编辑的细胞群体。

[0171] 试剂盒还可以包括基于鉴定受试者是否需要治疗来选择适合治疗的受试者的描述。说明书可以包括关于预期治疗的剂量、给药时程和施用途径的信息。容器可以是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。本公开的试剂盒中提供的说明书通常是标签或包装插页上的书面说明书。标签或包装插页指示,药物组合物用于治疗受试者的疾病或病症、延迟所述疾病或病症的发作和/或减轻所述疾病或病症。

[0172] 本文所提供的试剂盒处于适合的包装中。适合的包装包括但不限于小瓶、瓶子、广口瓶、软包装等。还考虑了与特定装置组合使用的包装,例如吸入器、鼻施用装置或输注装置。试剂盒可以具有无菌进入端口(例如,容器可以是具有皮下注射针可刺穿的塞子的静脉内溶液袋或小瓶)。容器也可以具有无菌进入端口。

[0173] 试剂盒任选地可以提供另外的组分,例如缓冲液和解释性信息。通常,试剂盒包括容器和在所述容器上或与所述容器相关联的标签或包装插页。在一些实施方案中,本公开提供了包含上文所描述的试剂盒的内容物的制品。

[0174] 一般技术

[0175] 除非另有指示,否则本公开的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,这些技术在本领域的技术范围内。这类技术在文献中充分解释,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版(Sambrook等,1989)Cold Spring Harbor Press;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编,1989)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编,1993-8)J.Wiley and Sons;Methods in Enzymology(Academic Press,Inc.);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编):Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等编,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:a practice

approach(D.Catty.编,IRL Press,1988-1989);Monoclonal antibodies:a practical approach(P.Shepherd和C.Dean编,Oxford University Press,2000);Using antibodies: a laboratory manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编,Harwood Academic Publishers, 1995);DNA Cloning:A practical Approach,第I卷和第II卷(D.N.Glover编,1985); Nucleic Acid Hybridization(B.D.Hames和S.J.Higgins编(1985);Transcription and Translation(B.D.Hames和S.J.Higgins编(1984);Animal Cell Culture(R.I.Freshney编(1986);Immobilized Cells and Enzymes(lRL Press,(1986);以及B.Perbal,A practical Guide To Molecular Cloning(1984);F.M.Ausubel等(编)。

[0176] 在未进一步详述的情况下,据信本领域技术人员可以基于上述描述在最大程度上利用本公开。因此,以下具体实施方案应解释为仅具有说明性,并且无论如何都不以任何方式限制本公开的其余部分。出于本文所提及的目的或主题,本文引用的所有出版物都以引用的方式并入。

[0177] 实施例

[0178] 实施例1.靶向iPSC中的SCN9A和SCN10A的SpCas9和SaCas9 gRNA的功效筛选.

[0179] 方法

[0180] 向导RNA设计和合成

[0181] 计算机向导RNA设计由CRISPR Therapeutics完成。计算机设计靶向SCN9A的外显子2-15和SCN10A的外显子1-14的SpCas9和SaCas9向导RNA,并且使用脱靶预测算法进行评价。选择具有良好脱靶型态的向导RNA用于合成和进一步中靶评价。选定的gRNA包括靶向SCN9A的99个SpCas9 gRNA(表1)和68个SaCas9 gRNA(表2)以及靶向SCN10A的166个SpCas9 gRNA(表3)和73个SaCas9gRNA(表4)。

[0182] 向导RNA由Synthego Corporation定制排序用于合成。使用标准化学修饰对向导RNA进行排序,所述修饰包括最初和最末3个核苷酸中的2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰。对于SpCas9 gRNA,表1和表3中列出了20个核苷酸的基因组靶向序列,并且添加标准的80聚体SpCas9支架序列以创造向导RNA。对于SaCas9 gRNA,表2和表4中列出了22个核苷酸的基因组靶向序列,并且用于与以下SaCas9支架序列合成以产生向导RNA:GUUUUAGUACUCUGGAAACAGAAUCUACUAAAACAA

[0183] GGCAAAAUGCCGUGUUUAUCUCGUCAACUUGUUGGCGAGAUUUU(SEQ ID NO:41)。

[0184] 使用4D-Nucleofector®系统对iPSC进行核转染

[0185] 野生型iPSC以及稳定表达Cas9的工程iPSC用于gRNA筛选的不同步骤。通过将靶向构建体插入AAVS-1基因座中从野生型iPSC产生在强力霉素(doxycycline)控制下表达SpCas9或SaCas9的iPSC。在这种构建体中,两个盒在由IS2绝缘子元件隔开的相反方向上表达。第一表达盒是在CASI启动子控制下的TetOn3G蛋白-2A-Puro,并且第二表达盒是在TRE3G启动子控制下的SpCas9或SaCas9。

[0186] 使用Lonza 4D-Nucleofector®系统和P3原代细胞96孔Nucleofector™试剂盒(Lonza,目录号:V4SP-3096)与程序CM137一起对iPSC进行电穿孔。在mTeSR1(Stemcell Technologies,目录号:85850)中培养iPSC。核转染之前,使用Accutase(Stemcell Technologies,目录号:07920)使细胞解离并且再悬浮于P3核转染溶液中。在96孔格局中,

根据制造商的说明书,使用每孔400ng Cas9 mRNA(TriLink)和400ng合成gRNA(Synthego)对每孔180,000个细胞进行电穿孔。核转染之后,在DNA提取和基于下一代测序(NGS)的插入/缺失(插入缺失)检测之前在预涂有基质胶的96孔细胞培养板中将iPSC维持于补充有10uM Y27632(Stemcell Technologies,目录号:72308)的mTeSR1中72小时。每个电穿孔实验中包括两个重复,并且进行两个独立的实验。对于稳定的SpCas9和SaCas9细胞系实验,在Amaxa核转染之前将细胞用1ug/ul强力霉素处理72小时。

[0187] 使用Lonza 4D-*Nucleofector*®Y单元对源自iPSC的感觉神经元进行核转染

[0188] 为了产生源自iPSC的感觉神经元培养物(iSN),在涂有基质胶的烧瓶中在小分子发育路径抑制剂混合液存在下使iPSC细胞分化。在分化DIV11时,使细胞解离并接种至384板中,并且维持于包含生长因子混合液的成熟培养基中,在此所述细胞成熟至DIV26-28。这些神经元表达伤害感受器的典型标志,包括TRPV1、Brn3A、外周标志Isl1、neuN和SCN9A(NaV1.7),并且可以概括生理相关神经元亚型的功能特性。

[0189] 使用Lonza 4D-Nucleofector®Y单元和AD1 4D-NucleofectorTMY试剂盒(Lonza,目录号:V4YP-1A24)与程序EH158一起对源自iPSC的感觉神经元(iSN)进行电穿孔。在24孔格局中,根据制造商的说明书,用核糖核蛋白复合物(RNP)对细胞进行电穿孔。通过将425pmol SpCas9或SaCas9蛋白(Aldevron)与531pmol合成gRNA(Synthego)在室温下孵育20分钟来产生RNP复合物。核转染之后,在DNA提取和基于下一代测序(NGS)的插入/缺失(插入缺失)检测之前将iSN维持于培养物中72小时。每个电穿孔实验中包括两个重复,并且进行两个独立的实验。

[0190] 用AAV转导源自iPSC的感觉神经元

[0191] 在384孔格局中,用在单个载体中表达SaCas9和SaCas9 gRNA的AAV-1载体转导每孔约12,000个iSN。用AAV载体以750,000的感染复数(MOI)转导iSN。转导之后,在DNA提取和基于NGS的插入/缺失(插入缺失)检测之前将iSN维持于培养物中7天。每个转导实验中包括两个重复,并且进行两个独立的实验。

[0192] 基于下一代测序(NGS)的插入/缺失(插入缺失)检测

[0193] 根据制造商的说明书,使用Lucigen Quick Extract 2X DNA提取溶液(Lucigen,目录号:QE09050)在电穿孔后72小时从iPSC中提取DNA。然后,使用KAPA2G Robust HotStart ReadyMix(Sigma Aldrich,目录号:KK5702)的两步PCR方法用于产生NGS文库。第一PCR用于创造扩增子,而第二PCR用于添加Nextera DNA Index(i7/i5)适配子序列。PCR#1的反应包括1uL提取的gDNA、1X KAPA2G Robust HotStart ReadyMix、0.5uM正向引物和0.5uM反向引物。引物序列列于表5和表6中。PCR#2的反应包括1ul PCR#1产物、1X KAPA2GRobust HotStart ReadyMix、0.5uM Index 1N7xx适配子和0.5uM Index2N5xx适配子。PCR#1和PCR#2两者的循环条件如下:(1)95℃持续3分钟,(2)95℃持续15秒,(3)60℃持续15秒,(4)72℃持续15秒,(5)重复步骤(2)-(4)20次,(6)72℃持续1分钟,(7)4℃无限保持。然后使用Zymo DNA清洁和浓缩试剂盒(Zymo,D4034)汇集并纯化样品,并且在Agilent 2100生物分析仪(Agilent,目录号:G2939BA)上进行定量。然后,在Illumina的MiSeq上运行文库以获得配对末端读数(2x150)。

[0194] 对于每个样品,然后过滤读数以获得30的最低Phred33质量评分。随后使用FLASH(短读快速长度调整)合并配对末端读数,要求至少有1bp的重叠。然后使用尼德曼-翁施算

法(Needleman-Wunsch algorithm)将所得合并的读数与相应的参考扩增子序列进行最佳对齐。对与预期切割位点3bp内的插入缺失对齐的读取进行计数,然后仅过滤移码插入缺失,其中插入缺失长度不是3的倍数。将总编辑的估计值计算为具有接近切割位点的插入缺失的读数比例,而将生产性编辑计算为每个样品的具有接近切割位点的移码插入缺失读数的读数比例。

[0195] 一旦分析了每个样品,然后通过要求每个样品具有至少90%成功合并的测序读数和70%成功对齐的测序读数来进行样品的质量控制。另外,要求样品具有至少1000个成功对齐的读数。最后,以批次感知的方式,通过丢弃最终对齐的读数计数与其相应批次样品的平均值相差超过2个标准偏差的任何样品来进行质量控制。将通过的样品取平均值并计算标准偏差。包括阳性和阴性对照,其中要求阴性对照展现低于2%的插入缺失率,指示低水平的背景噪音,而阳性对照样品必须显示高于背景的编辑水平。此外,通过在我们的两个技术重复之间比较相应样品来确认重现性;观察到强线性拟合,具有0.85的高R^2。

[0196] 靶向iPSC中的SCN9A和SCN10A的SpCas9 gRNA的脱靶评价

[0197] 对于初始脱靶评价,执行计算机提名步骤,其中基于序列相似性预测候选脱靶序列。然后,经由靶向下一代测序直接评价这些位点,以鉴定哪些位点(如果有的话)显示CRISPR-Cas诱导的脱靶编辑的证据。

[0198] a)脱靶位点的计算预测

[0199] 使用三种计算算法基于序列相似性预测脱靶位点。具体来说,CCTop和COSMID各自用于鉴定具有至多3个错配或至多2个错配的候选脱靶位点,其中1个DNA或RNA凸出来自中靶序列。用于鉴定脱靶位点的PAM序列是SpCas9向导的NRG和SaCas9向导的NNGRRT。然后将从两种算法鉴定的向导合并在一起,包括对具有相同基因组坐标的位点进行去重。表7中提供了40个向导中预测的1,471个假定脱靶位点的总列表。

[0200] b)iPSC的杂交捕获

[0201] 使用上文所描述的Lonza条件进行使用两个不同野生型供体的iPSC转染。使用两个生物重复,并且汇集基因组DNA以获得杂交捕获所必需的量。使用DNeasy 96血液和组织试剂盒(Qiagen,目录号:69581)在电穿孔后72小时从iPSC中提取DNA。使用Qubit 1x dsDNA HS测定(ThermoFisher,目录号:Q33231)和EnVision板读取器通过4PL计算对样品进行定量。使用SureSelect XT试剂盒(Aglient,目录号:G9704A)获得并处理最少200ng的每个样品用于杂交捕获。简单来说,使用Covaris LE220将样品片段化为150-200bp并且进行末端修复、dA加尾和适配子接合。然后使用Herculase II Fusion DNA聚合酶在以下循环条件下扩增文库:(1)98℃持续2分钟,(2)98℃持续30秒,(3)65℃持续30秒,(4)72℃持续1分钟,(5)重复步骤(2)-(4)10次,(6)72℃持续5分钟,(7)4℃无限保持。使用基于珠粒的净化来纯化文库,AMPure XP(Beckman Coulter,目录号:A63881)。使文库与标靶特异性捕获文库杂交,并且用链霉亲和素包被的磁性珠粒捕获靶分子。然后使用上述相同条件对捕获的文库进行扩增和纯化。在TapeStation(Agilent,目录号:5067-5584)和/或生物分析仪(Aglient,目录号:5067-1504)上使用DNA高灵敏度试剂盒对样品进行QC,并且在Illumina HiSeq平台上进行测序,达到每个候选脱靶位点2,272x的中位测序覆盖率。

[0202] c)靶向二代测序的计算分析

[0203] 对于本研究中所包括的每个假定脱靶位点,进行以下分析以确定CRISPR-Cas治疗

诱导的脱靶编辑的证据力度。首先,使用默认参数在mem模式下使用对齐工具bwa将下一代测序读数与hg38人类参考基因组对齐,继而将SAM和BAM文件进行转换和分类,并且通过samtools进行读取重复的去除。然后,通过使用Python程序包pysam堆积具有预期切割位点3bp内的插入缺失的读数并且用插入缺失读数的数目除以覆盖那个位点的读数的总数来测量插入缺失形成率。

[0204] 然后,在每个iPSC供体的经过处理的样品与那个相同iPSC供体所匹配的未处理(仅电穿孔)的阴性对照样品之间比较在每个预测脱靶位点处测量的插入缺失率。如果观察到所述位点处的插入缺失率大于阴性对照样品的程度>0.2%,那么那个候选位点的数据进入统计检验。唯一的例外是观察到具有种系插入缺失基因变体的候选位点,其中在一个或多个供体的匹配的未处理和经过处理的样品中都观察到约50%或约100%的插入缺失率。对于进入统计检验的位点,对两个供体进行配对t检验,以确定在那个位点处经过处理和未处理的插入缺失率。任何使得p值小于0.05的检验位点都被视为具有确认的脱靶编辑。大量的中靶编辑(平均插入缺失率为9.35%-52.25%)在向导中确认为本研究的阳性对照。

[0205] 表1:靶向SCN9A基因($Na_V1.7$)的SpCas9向导RNA的名称和序列

[0206]

$Na_V1.7$ SpCas9 gRNA		
SEQ ID NO:	gRNA 名称	间隔区序列(5'-3')
43	Scn9a Sp 外显子 2_T1	AuCuAuGGGGACAuuCCuCC
44	Scn9a Sp 外显子 2_T2	CAGCAAuGCGuuGuuCAAuG
45	Scn9a Sp 外显子 2_T3	AGuAGGGGuCCAAGuCCuCC
46	Scn9a Sp 外显子 2_T4	uGGGGACAuuCCuCCCGGCA
47	Scn9a Sp 外显子 2_T5	GuAGGGGuCCAAGuCCuCCA
48	Scn9a Sp 外显子 2_T6	uAGGGGuCCAAGuCCuCCAG
49	Scn9a Sp 外显子 2_T7	AuGGCAAuGuuGCCuCCCCC
50	Scn9a Sp 外显子 2_T8	GGCuCuGACACCAuGCCGGG
51	Scn9a Sp 外显子 2_T9	AACAGCuGCCCuuCAuCuAu
8	Scn9a Sp 外显子 2_T10	GGAAuGuCCCCAuAGAuGAA
52	Scn9a Sp 外显子 2_T11	CGGCAuGGuGuCAGAGCCCC
53	Scn9a Sp 外显子 2_T12	AGCAAuGCGuuGuuCAAuGA
54	Scn9a Sp 外显子 2_T13	AGGAAuGuCCCCAuAGAuGA
55	Scn9a Sp 外显子 2_T14	AAACAGCuGCCCuuCAuCuA
56	Scn9a Sp 外显子 2_T15	CCCCuACuAuGCAGACAAAA
57	Scn9a Sp 外显子 4_T1	CCAuGAAuAACCCACCGGAC
58	Scn9a Sp 外显子 4_T2	CAuuuuuGGuCCAGuCCGGu
59	Scn9a Sp 外显子 4_T3	CCAGuCCGGuGGGuuAuuCA
60	Scn9a Sp 外显子 4_T4	ACAuuuuuGGuCCAGuCCGG
61	Scn9a Sp 外显子 4_T5	uCGACAuuuuuGGuCCAGuC
62	Scn9a Sp 外显子 4_T6	ACCCACuuACuCGACAuuuu
63	Scn9a Sp 外显子 4_T7	uAuGACCAuGAAuAACCCAC
64	Scn9a Sp 外显子 5_T1	uuCuuCGuGACCCGuGGAAC
65	Scn9a Sp 外显子 5_T2	uCGuGACCCGuGGAACuGGC
66	Scn9a Sp 外显子 5_T3	uCACuuuuCuuCGuGACCCG
67	Scn9a Sp 外显子 5_T4	GuGuuuAGGuACACuuuuAC
68	Scn9a Sp 外显子 7_T1	AAGCCCCuACAAuuGuCuuC
69	Scn9a Sp 外显子 7_T2	CuGAGuGuGuuuGCACuAAu
70	Scn9a Sp 外显子 7_T3	AuuGGACuACAGCuGuuCAu

[0207]

7	Scn9a Sp 外显子 7_T5	CAGGCCuGAAGACAAuuGuA
71	Scn9a Sp 外显子 7_T6	AGGCCuGAAGACAAuuGuAG
72	Scn9a Sp 外显子 9_T1	AAGCuCGuGuAGCCAuAAuC
73	Scn9a Sp 外显子 9_T2	AGCuCGuGuAGCCAuAAuCA
74	Scn9a Sp 外显子 9_T3	GGCuAAuGACCCAAGAuuAC
75	Scn9a Sp 外显子 9_T4	uuCACACAGGuGuACCCCuC
76	Scn9a Sp 外显子 9_T5	CGuGuGuAGuCAGuGuCCAG
77	Scn9a Sp 外显子 9_T6	GCuAAuGACCCAAGAuuACu
78	Scn9a Sp 外显子 9_T7	CGAGCuuuGACACuuuCAGC
79	Scn9a Sp 外显子 9_T8	uGGuACuCACCuGuuGGuAA
80	Scn9a Sp 外显子 9_T9	GGGuACACCuGuGuGAAAAu
81	Scn9a Sp 外显子 9_T10	CuGGGAAAACCuuuACCAAC
82	Scn9a Sp 外显子 9_T11	uuGGGuCAuuAGCCuAAACA
83	Scn9a Sp 外显子 9_T12	GuGuGuAGuCAGuGuCCAGA
84	Scn9a Sp 外显子 9_T13	GGGCCuuCuuAGCCuuGuuu
85	Scn9a Sp 外显子 9_T14	GAGCuuuGACACuuuCAGCu
86	Scn9a Sp 外显子 9_T15	AuuGGCAGAAACCCuGAuuA
87	Scn9a Sp 外显子 10_T1	CCCuAGACGCuGCGuGCuGC
88	Scn9a Sp 外显子 10_T2	CCAGCAGCACGCAGCGuCuA
89	Scn9a Sp 外显子 10_T4	GCCAGCAGCACGCAGCGuCu
90	Scn9a Sp 外显子 10_T5	CuuuGuCGuAGuGAuuuuCC
91	Scn9a Sp 外显子 11_T2	GAGGuuGuCuACCCCCAAuC
92	Scn9a Sp 外显子 11_T3	uAuGCCCuuCGACACCAAGG
93	Scn9a Sp 外显子 11_T5	ACCuuGGuGuCGAAGGGCAu
3	Scn9a Sp 外显子 11_T6	GCCuAuGCCCuuCGACACCA

[0208]

94	Scn9a Sp 外显子 11_T7	AGuuuCCACCuuGGuGuCGA
1	Scn9a Sp 外显子 11_T9	CAAuuuGGGuGGuACCuGAu
95	Scn9a Sp 外显子 11_T10	GuuuCCACCuuGGuGuCGAA
96	Scn9a Sp 外显子 11_T11	CCGCuGCCGCuGCAAuuGCC
97	Scn9a Sp 外显子 11_T12	GCCCAACCAGGCAAuuGCAG
5	Scn9a Sp 外显子 11_T13	CGGCuGAAuAuACAAGuAuu
4	Scn9a Sp 外显子 11_T14	AuAGGCGAGCACAuGAAAAG
98	Scn9a Sp 外显子 11_T15	AAuuuGGGuGGuACCuGAuu
99	Scn9a Sp 外显子 12_T1	CGuuCACCGGCAGCAuuGGu
100	Scn9a Sp 外显子 12_T2	CCGuuCACCGGCAGCAuuGG
101	Scn9a Sp 外显子 12_T3	uGuuACuGCuGCGuCGCuCC
102	Scn9a Sp 外显子 12_T4	GuuACuGCuGCGuCGCuCCu
103	Scn9a Sp 外显子 12_T5	GGGCuGAGCGuCCAuCAACC
104	Scn9a Sp 外显子 12_T6	CACCAAuGCuGCCGGuGAAC
491	Scn9a Sp 外显子 12_T7	uuCCCGuuCACCGGCAGCAu
105	Scn9a Sp 外显子 12_T8	GGCuGAGCGuCCAuCAACCA
492	Scn9a Sp 外显子 12_T9	GuuCACCGGCAGCAuuGGuG
106	Scn9a Sp 外显子 12_T10	uuACuGCuGCGuCGCuCCuG
9	Scn9a Sp 外显子 12_T11	CCACCAAuGCuGCCGGuGAA
107	Scn9a Sp 外显子 12_T12	CuGCAACGGuGuGGuCuCCC

[0209]

108	Scn9a Sp 外显子 12_T13	CAGCAuuGGuGGGGACCuAC
493	Scn9a Sp 外显子 12_T14	uuGGuGGGGACCuACuGGCu
109	Scn9a Sp 外显子 12_T16	GCGuCGCuCCuGGGGuCuGu
10	Scn9a Sp 外显子 12_T17	CAGuCACCACuCAGCAuuCG
494	Scn9a Sp 外显子 12_T18	uAGGuCCCCACCAAuGCuGC
110	Scn9a Sp 外显子 12_T19	uGCuGuGGACuGCAACGGuG
111	Scn9a Sp 外显子 12_T20	CGuCGCuCCuGGGGuCuGuG
112	Scn9a Sp 外显子 12_T21	uGCGuCGCuCCuGGGGuCuG
113	Scn9a Sp 外显子 12_T22	GGuGuGGuCuCCCuGGuuGA
114	Scn9a Sp 外显子 12_T23	GuAACAuCAGCCAAGCCAGu
115	Scn9a Sp 外显子 12_T24	CuGuGCAuuuuCCCGuuCAC
2	Scn9a Sp 外显子 12_T25	GCuuCGCCuuGCAGAAAACA
116	Scn9a Sp 外显子 12_T26	GuuuGuGCCCCACAGACCCC
495	Scn9a Sp 外显子 12_T27	GCuGuCCAuuGGGGAGCAuG
496	Scn9a Sp 外显子 12_T28	uCuGGCAGAAGCuGuCCAuu
6	Scn9a Sp 外显子 14_T1	GGAACACCACCCAAuGACuG
117	Scn9a Sp 外显子 14_T2	GCAAAuCuGuACCACCAAGG
118	Scn9a Sp 外显子 14_T3	uGuGCAAAuCuGuACCACCA
119	Scn9a Sp 外显子 14_T4	CCAAGGuGGACAuuuuuGuC
120	Scn9a Sp 外显子 14_T5	uGuCuGGACuCuuCAAGuuC

[0210]

121	Scn9a Sp 外显子 14_T6	uCuGGAAuuGCuCuCCAuAu
122	Scn9a Sp 外显子 15_T1	AGuuCuGCGAuCAuuCAGAC
123	Scn9a Sp 外显子 15_T2	GGAGCuCuuuCuAGCAGAuG
124	Scn9a Sp 外显子 15_T3	CCuACuuGGAAAuACuCAuA

[0211] 表2:靶向SCN9A基因($Na_V1.7$)的SaCas9向导RNA的名称和序列

[0212]

Nav1.7 SaCas9 gRNA		
SEQ ID NO:	gRNA 名称	间隔区序列(5'-3')
125	Scn9a Sa 外显子 2_T1	GGGGCuCuGACACCAuGCCGGG
126	Scn9a Sa 外显子 2_T2	CCCCuACuAuGCAGACAAAAAG
127	Scn9a Sa 外显子 2_T3	CuCACCuuuuuGuCuGCAuAGu
128	Scn9a Sa 外显子 2_T4	AuCAuCAuCuuuCuuuuCuuCu
129	Scn9a Sa 外显子 3_T1	uuuCuCCuuuCAGuCCuCuAAG
130	Scn9a Sa 外显子 4_T1	uCGACAuuuuuGGuCCAGuCCG
131	Scn9a Sa 外显子 4_T4	CCACCGGACuGGACCAAAAAuG
132	Scn9a Sa 外显子 4_T5	GACAAACuGCAuAuuuAuGACC
133	Scn9a Sa 外显子 4_T6	AAuAGuGCACAuGAuGAGCAuG
134	Scn9a Sa 外显子 4_T7	uGGuCAuAAAuAuGCAGuuuGu
135	Scn9a Sa 外显子 5_T1	CuCCuACACAGAAGCCuCuuGC
136	Scn9a Sa 外显子 5_T2	uCuuCGuGACCCGuGGAACuGG
137	Scn9a Sa 外显子 5_T3	GuuCCACGGGuCACGAAGAAAA
138	Scn9a Sa 外显子 5_T4	CuuGCAAGAGGCuuCuGuGuAG
139	Scn9a Sa 外显子 5_T5	uuGuGuuuAGGuACACuuuuAC
13	Scn9a Sa 外显子 5_T6	ACGACAAAAuCCAGCCAGuuCC
140	Scn9a Sa 外显子 5_T7	ACuuuuACuGGAAuAuAuACuu
141	Scn9a Sa 外显子 6_T2	uACAAAuuCuGuuAAAuACCuG
142	Scn9a Sa 外显子 6_T5	AuuuAAuuCuACAGGuAuuuAA
17	Scn9a Sa 外显子 7_T1	CAuGAuCCuGACuGuGuuCuGu
143	Scn9a Sa 外显子 7_T2	uuCuAAAGuCuuCuuCACuCuC
144	Scn9a Sa 外显子 7_T4	GAGuGAAGAAGACuuuAGAAGu
145	Scn9a Sa 外显子 7_T5	AGAAAGCAuAAuGAAuACCCuA
146	Scn9a Sa 外显子 7_T6	ACACACuCAGACAGAACACAGu
147	Scn9a Sa 外显子 7_T7	uAAuGAAACAuuAGAAAGCAuA
148	Scn9a Sa 外显子 7_T8	uCuAAuGuuuCAuuAuuuuCAA
149	Scn9a Sa 外显子 8_T1	GAAACCACAAAGGAGAGCAuCu
150	Scn9a Sa 外显子 8_T2	CuuuGuGGuuuCAGCACAGAuu
151	Scn9a Sa 外显子 8_T3	ACAGAAuAuuuuuAuuACuuGG
152	Scn9a Sa 外显子 9_T1	uCAAAGCuCGuGuAGCCAuAAu
18	Scn9a Sa 外显子 9_T2	CuCGuGuGuAGuCAGuGuCCAG
14	Scn9a Sa 外显子 9_T3	CuGGGAAAACCuuuACCAACAG
153	Scn9a Sa 外显子 9_T4	GGuAAAGGuuuuCCCAGuAAuC

[0213]

154	Scn9a Sa 外显子 10_T1	AACAuuGAAGAAGCuAAACAGA
155	Scn9a Sa 外显子 10_T2	CAuAuGCCAuGGCAACCACAGC
156	Scn9a Sa 外显子 10_T3	GAAGAAGCuAAACAGAAAGAAu
157	Scn9a Sa 外显子 11_T1	GCAAuuuGGGuGGuACCuGAuu
158	Scn9a Sa 外显子 11_T2	CAGGCAAuuGCAGCGGCAGCGG
11	Scn9a Sa 外显子 11_T3	AAGCAGAAuuAuGGGCCuCuCA
159	Scn9a Sa 外显子 11_T4	uuuAGCACuuuuAGAGCuCAGu
160	Scn9a Sa 外显子 11_T5	GauGCuGAGAAAuuGuCGAAAu
161	Scn9a Sa 外显子 11_T6	AAuAuACAAGuAuuAGGAGAAG
16	Scn9a Sa 外显子 12_T1	GAuGuuACuGCuGCGuCGCuCC
12	Scn9a Sa 外显子 12_T2	GCCuuGCAGAAAACAAGGAGCC
20	Scn9a Sa 外显子 12_T3	AGAAAACAAGGAGCCACGAAuG
162	Scn9a Sa 外显子 12_T4	GGAAGAGAuAuAGGAuCuGAGA
163	Scn9a Sa 外显子 12_T5	uuCAAAGGCAGAGGAAGAGAuA
164	Scn9a Sa 外显子 13_T1	CuAuCuCCuuuCAGAGGAuAuG
165	Scn9a Sa 外显子 13_T2	CuCAuuGCuCuCuGuCuGAGGu
15	Scn9a Sa 外显子 13_T3	uCCCAACCuCAGACAGAGAGCA
166	Scn9a Sa 外显子 13_T4	uuGuAGuuCCuAuCuCCuuuCA
167	Scn9a Sa 外显子 14_T1	AuGGAACACCACCCAAuGACuG
168	Scn9a Sa 外显子 14_T2	AuAuGGAGAGCAAuuCCAGAuC
169	Scn9a Sa 外显子 14_T3	uGAuCuGGAAuuGCuCuCCAuA
170	Scn9a Sa 外显子 14_T4	AuGGuAAuuGCAAGAuCuACAA
171	Scn9a Sa 外显子 14_T5	uGCuuuuuuCuCCCAGAACuuG
172	Scn9a Sa 外显子 14_T6	AuuuCCuAuAGCAAGuACAuuu
173	Scn9a Sa 外显子 14_T7	ACAuuuuuGAAuuCCuCAGuCA
174	Scn9a Sa 外显子 14_T8	AuuuGCACACAAAuuCuuGAuC
175	Scn9a Sa 外显子 14_T9	AAAGuGuAuCuAuuuuAuuGuA
176	Scn9a Sa 外显子 14_T10	uACAAuAAAAuAGAuACACuuu
177	Scn9a Sa 外显子 15_T1	AAuGGuAuuAAAACuGAuuGCC
178	Scn9a Sa 外显子 15_T2	AuAuGAGuAuuuCCAAGuAGGC
19	Scn9a Sa 外显子 15_T3	AAACuGAuuGCCAuGGAuCCAu
179	Scn9a Sa 外显子 15_T4	ACCuuAGuuuAuGuuuACCAGu
180	Scn9a Sa 外显子 15_T5	CAGCCuACuuGGAAAuACuCAu
181	Scn9a Sa 外显子 15_T6	GAGCuCuuuCuAGCAGAuGuGG
182	Scn9a Sa 外显子 15_T7	uuuuuCuCACuuAGGuCuuuAC

[0214] 表3:靶向SCN10A基因($Na_V1.8$)的SpCas9向导RNA的名称和序列

[0215]

Nav1.8 SpCas9 gRNA		
SEQ ID NO:	gRNA 名称	间隔区序列(5'-3')
183	Scn10a Sp 外显子1_T2	GACGGAAGuuGuuAGuuuCG
184	Scn10a Sp 外显子1_T3	CAACuuCCGuCGCuuuACuC
185	Scn10a Sp 外显子1_T4	uCGCuuuACuCCGGAGuCAC
186	Scn10a Sp 外显子1_T5	GAACGGAuCuAGAuCCuCCA
187	Scn10a Sp 外显子1_T6	ACGGAAGuuGuuAGuuuCGA
188	Scn10a Sp 外显子1_T7	AACGGAuCuAGAuCCuCCAG
189	Scn10a Sp 外显子1_T8	AGAACGGAuCuAGAuCCuCC
190	Scn10a Sp 外显子1_T9	GuGACuCCGGAGuAAAGCGA
191	Scn10a Sp 外显子1_T10	uuAGuuuCGAGGGAuCCAAu
192	Scn10a Sp 外显子1_T11	GuuAGuuuCGAGGGAuCCAA
193	Scn10a Sp 外显子1_T12	GGCuCCCCGAuCAGuuCuGC
194	Scn10a Sp 外显子1_T14	uAGuuuCGAGGGAuCCAAuG
21	Scn10a Sp 外显子1_T15	GCuCCCCGAuCAGuuCuGCu
195	Scn10a Sp 外显子1_T16	GCuCCCAGCAGAACuGAuCG
28	Scn10a Sp 外显子1_T17	AuCCGuuCuACAGCACACAC
196	Scn10a Sp 外显子1_T18	ACCCGGuGuGuGCuGuAGAA
197	Scn10a Sp 外显子1_T19	AGAACuGAuCGGGGAGCCCC
198	Scn10a Sp 外显子1_T20	uCCGuuCuACAGCACACACC

[0216]

199	Scn10a Sp 外显子 1_T21	CuuuACuCCGGAGuCACuGG
200	Scn10a Sp 外显子 1_T22	CACCAuAGAACuuGGGCAGC
201	Scn10a Sp 外显子 1_T23	uGGGAGCuCACCAuAGAACu
202	Scn10a Sp 外显子 1_T24	ACuGAuCGGGGAGCCCCuGG
203	Scn10a Sp 外显子 1_T25	AACCAGCuGCCCAAGuuCuA
204	Scn10a Sp 外显子 1_T26	GAACuuGGGCAGCuGGuuGC
205	Scn10a Sp 外显子 1_T27	GAAGCAAAuuGCuGCCAAGC
206	Scn10a Sp 外显子 1_T28	uCuAuCuCCACCAGuGACuC
207	Scn10a Sp 外显子 1_T29	GGGGCCGAGGCuuCuCuuCu
26	Scn10a Sp 外显子 1_T30	GAGCuCCCAGCAGAACuGAu
208	Scn10a Sp 外显子 2_T1	GGGCCCGAGuGGCACuAAAC
209	Scn10a Sp 外显子 2_T2	uuCCCGGuuuAGuGCCACuC
210	Scn10a Sp 外显子 2_T3	GGCCCGAGuGGCACuAAACC
211	Scn10a Sp 外显子 2_T4	uuuCCCGGuuuAGuGCCACu
212	Scn10a Sp 外显子 2_T5	uuAGuGCCACuCGGGCCCuG
213	Scn10a Sp 外显子 2_T6	uGAuGGCCGuuCuuCuGAuC
214	Scn10a Sp 外显子 2_T7	GAAuAGCCACAGGGCCCGAG
215	Scn10a Sp 外显子 2_T8	GuuCuuCuGAuCAGGuuGAA
216	Scn10a Sp 外显子 2_T9	AGuGGCACuAAACCGGGAAA
217	Scn10a Sp 外显子 2_T10	ACAAAGGGAGGACCAuuuCC

[0217]

218	Scn10a Sp 外显子 4_T1	GGAuuuuAGCGuCAuuACCC
29	Scn10a Sp 外显子 4_T2	uCACGuACCuGAGAGAuCCu
219	Scn10a Sp 外显子 4_T3	CAuAGAGAuAuACuCACGCC
220	Scn10a Sp 外显子 4_T4	GCCAGuuCCAAGGAuCuCuC
221	Scn10a Sp 外显子 4_T5	ACCuGAGAGAuCCuuGGAAC
222	Scn10a Sp 外显子 5_T1	GCACAGCAAuAGAuCuCCGu
223	Scn10a Sp 外显子 5_T2	uAAGAACuCuGAAuGuCCGC
224	Scn10a Sp 外显子 5_T3	AuAGAuCuCCGuGGGAuCuC
225	Scn10a Sp 外显子 5_T4	GGCACAGCAAuAGAuCuCCG
226	Scn10a Sp 外显子 6_T2	GGGCCCCCACAAAuGACCuC
227	Scn10a Sp 外显子 6_T3	CGCAGGCCuGAAGGuCAuuG
228	Scn10a Sp 外显子 6_T4	GuGGGGCuGCAACuCuuCAA
229	Scn10a Sp 外显子 6_T7	GCAGGCCuGAAGGuCAuuGu
230	Scn10a Sp 外显子 6_T8	GGuGGGGCuGCAACuCuuCA
231	Scn10a Sp 外显子 6_T9	uCAuCuuCCCGCAGGCCuGA
232	Scn10a Sp 外显子 6_T10	GAAGAGuuGCAGCCCCACCA
233	Scn10a Sp 外显子 7_T1	GACCCCuuACuGuGuGGCAA
234	Scn10a Sp 外显子 7_T2	AGAuCCAuuGCCACACAGuA
235	Scn10a Sp 外显子 7_T3	uGuGGCAAuGGAuCuGACuC
236	Scn10a Sp 外显子 7_T4	GuGGCAAuGGAuCuGACuCA

[0218]

237	Scn10a Sp 外显子 7_T5	GAuCCAuuGCCACACAGuAA
25	Scn10a Sp 外显子 7_T6	ACuuCuGACCCCuuACuGuG
238	Scn10a Sp 外显子 7_T7	AuCCAuuGCCACACAGuAAG
239	Scn10a Sp 外显子 8_T1	ACuGuuCCGCCuCAuGACAC
240	Scn10a Sp 外显子 8_T2	CuGGGAACGCCuCuACCAGC
241	Scn10a Sp 外显子 8_T3	CCGGGuuGuCAGAAGuuuuA
242	Scn10a Sp 外显子 8_T4	GCCuCAuGACACAGGAuuCC
243	Scn10a Sp 外显子 8_T5	AGCuCAGuACCuGCuGGuAG
244	Scn10a Sp 外显子 8_T6	uuAAGGCAGAuAuAACCAuC
245	Scn10a Sp 外显子 8_T7	AAGCuGGuGuAGuuAAAAuC
246	Scn10a Sp 外显子 8_T8	uCAuGAGGCGGAACAGuGAG
247	Scn10a Sp 外显子 8_T9	CCuuAAAACuuCuGACAACC
248	Scn10a Sp 外显子 8_T10	GAAuGCAGCuCAGuACCuGC
249	Scn10a Sp 外显子 9_T1	GGCCCuCGAGAuGCuCCGGA
22	Scn10a Sp 外显子 9_T2	uGuAGuCACCAuGGCGuAuG
250	Scn10a Sp 外显子 9_T3	GuuCuGCuCCuCAuACGCCA
251	Scn10a Sp 外显子 9_T4	CuCCuuCCGGAGCAuCuCGA
252	Scn10a Sp 外显子 9_T5	CuACCuGGuCAACuuGAuCu
253	Scn10a Sp 外显子 9_T6	GCuCCuuCCGGAGCAuCuCG
254	Scn10a Sp 外显子 9_T7	CGAGAuGCuCCGGAAGGAGC

[0219]

255	Scn10a Sp 外显子 9_T8	AGGAGGCCCuCGAGAuGCuC
256	Scn10a Sp 外显子 9_T9	uuuGuGCuCGuAAuCuuCCu
257	Scn10a Sp 外显子 9_T10	GGAGCAuCuCGAGGGCCuCC
258	Scn10a Sp 外显子 9_T11	GGCGuAuGAGGAGCAGAACC
259	Scn10a Sp 外显子 9_T12	uuuuGuGCuCGuAAuCuuCC
260	Scn10a Sp 外显子 9_T13	uGACCAGGuAGAAAGAuCCC
261	Scn10a Sp 外显子 9_T14	GAuCuuGGCuGuAGuCACCA
262	Scn10a Sp 外显子 10_T1	ACCAuCCuGCGCuGGuuGuA
263	Scn10a Sp 外显子 10_T2	CuGAuCCuuACAACCAGCGC
30	Scn10a Sp 外显子 10_T3	CGCAGGuGCuAGCAGCACuA
264	Scn10a Sp 外显子 10_T4	uCGCAGGuGCuAGCAGCACu
265	Scn10a Sp 外显子 10_T5	GGuuAAAGGuGAuCCAuuGu
266	Scn10a Sp 外显子 10_T6	AGCCuCuuACCAuCCuGCGC
24	Scn10a Sp 外显子 10_T7	uCCuuACAACCAGCGCAGGA
267	Scn10a Sp 外显子 10_T9	AGGuuAAAGGuGAuCCAuuG
268	Scn10a Sp 外显子 10_T10	uGGuuGuAAGGAuCAGAGCG
269	Scn10a Sp 外显子 10_T13	GuGGAGCCCuCuGACACuCu
270	Scn10a Sp 外显子 11_T1	GCuCACuAGuGGGCGGCGGu
271	Scn10a Sp 外显子 11_T2	GGAAAACGCCGGGCuAGuCA
272	Scn10a Sp 外显子 11_T3	ACuAGCCCGGCGuuuuCCAG

[0220]

273	Scn10a Sp 外显子 11_T4	ACCGAGACAuCGACAGCuCC
274	Scn10a Sp 外显子 11_T5	CCCGGCGuuuuCCAGAGGCG
275	Scn10a Sp 外显子 11_T6	GAGAGCCCCGAuGGCuuuCG
276	Scn10a Sp 外显子 11_T7	CGAuGGCuuuCGuGGuCuCC
497	Scn10a Sp 外显子 11_T8	GCAAGCuCACuAGuGGGCGG
277	Scn10a Sp 外显子 11_T9	CCuCGCCuCuGGAAAACGCC
27	Scn10a Sp 外显子 11_T10	CCGAGACAuCGACAGCuCCA
278	Scn10a Sp 外显子 11_T11	CGAGACAuCGACAGCuCCAG
279	Scn10a Sp 外显子 11_T12	GCCuCGCCuCuGGAAAACGC
280	Scn10a Sp 外显子 11_T13	GGGAGuGAGAuAuCuCGGCC
281	Scn10a Sp 外显子 11_T14	GGAGACCACGAAAGCCAuCG
282	Scn10a Sp 外显子 11_T15	CGAGAuAuCuCACuCCCuGA
283	Scn10a Sp 外显子 11_T16	CCCACuAGuGAGCuuGCCCC
284	Scn10a Sp 外显子 11_T17	CCAGGGGCAAGCuCACuAGu
285	Scn10a Sp 外显子 11_T18	GAGuGAGAuAuCuCGGCCAG
286	Scn10a Sp 外显子 11_T19	CCGAGAuAuCuCACuCCCuG
287	Scn10a Sp 外显子 11_T20	CuCGGCCAGGGGACCGGAAA
288	Scn10a Sp 外显子 11_T21	AGAuAuCuCGGCCAGGGGAC
289	Scn10a Sp 外显子 11_T22	GuGuuCCAuuuCCGGuCCCC
290	Scn10a Sp 外显子 11_T23	uCCAGGGGCAAGCuCACuAG

[0221]

291	Scn10a Sp 外显子 11_T24	GGGGCAAGCuCACuAGuGGG
292	Scn10a Sp 外显子 11_T25	GGAGuGAGAuAuCuCGGCCA
293	Scn10a Sp 外显子 11_T26	uGGAGACCACGAAAGCCAuC
294	Scn10a Sp 外显子 11_T27	GGCGAGGCCuAGAAAAGACu
295	Scn10a Sp 外显子 11_T28	CCCuGGAGCuGuCGAuGuCu
296	Scn10a Sp 外显子 11_T29	CuGGAGACCACGAAAGCCAu
297	Scn10a Sp 外显子 11_T30	uCuuuuCuAGGCCuCGCCuC
298	Scn10a Sp 外显子 11_T31	AGGCGAGGCCuAGAAAAGAC
299	Scn10a Sp 外显子 11_T32	CCuCAGGGAGuGAGAuAuCu
300	Scn10a Sp 外显子 11_T33	GuuGAGGAAGAGGGCuuCuA
301	Scn10a Sp 外显子 11_T34	uuCuAGGGAGGGGGCCuuGC
302	Scn10a Sp 外显子 12_T1	uCuCAACAGGCAuuCGAuGC
303	Scn10a Sp 外显子 12_T2	AuGAACCuuuCCGGGCCCAA
304	Scn10a Sp 外显子 12_T3	GCACuuACCCuCAAGGACGG
305	Scn10a Sp 外显子 12_T4	uAuCAuAACCuCCGuCCuuG
306	Scn10a Sp 外显子 12_T5	uGAACCuuuCCGGGCCCAAA
307	Scn10a Sp 外显子 12_T6	AuCAuAACCuCCGuCCuuGA
308	Scn10a Sp 外显子 12_T7	AuuGCCCuuuGGGCCCGGAA
309	Scn10a Sp 外显子 12_T8	GuGAGCAGCACuuACCCuCA
310	Scn10a Sp 外显子 12_T9	GCAGCACuuACCCuCAAGGA

[0222]

311	Scn10a Sp 外显子 12_T10	CACuCAuuGCCCuuuGGGCC
312	Scn10a Sp 外显子 12_T12	GACAACACuCAuuGCCCuuu
313	Scn10a Sp 外显子 12_T13	AuACuuAGAuGAACCuuuCC
314	Scn10a Sp 外显子 12_T14	uGACAACACuCAuuGCCCuu
315	Scn10a Sp 外显子 13_T1	CACuCACGAuGuuGCCuAuC
316	Scn10a Sp 外显子 13_T4	uuCGAAGCCAuGCuCCAGAu
317	Scn10a Sp 外显子 13_T5	CACCAuCACCuuGuGCAuCG
318	Scn10a Sp 外显子 13_T6	ACACuAuAAuGCAGAACuCG
319	Scn10a Sp 外显子 13_T8	CACCACGAuGCACAAGGuGA
320	Scn10a Sp 外显子 13_T9	CGuGGuGAACACCAuCuuCA
321	Scn10a Sp 外显子 13_T10	GGAGCAuGGCuuCGAAGGuA
322	Scn10a Sp 外显子 13_T11	uAuCuGGAGCAuGGCuuCGA
323	Scn10a Sp 外显子 13_T12	uGGAGCAuGGCuuCGAAGGu
324	Scn10a Sp 外显子 13_T13	CGAAGGuAGGGCuCAuGCCA
325	Scn10a Sp 外显子 13_T14	GGuGuuCACCACGAuGCACA
326	Scn10a Sp 外显子 13_T15	ACAAGCuGGuCAAGCAGGGu
327	Scn10a Sp 外显子 13_T16	GAuGuuGCCuAuCuGGAGCA
328	Scn10a Sp 外显子 13_T17	uuCAuGGCCAuGGAGCACCA
329	Scn10a Sp 外显子 13_T18	uCuuGAGCuuCACCCACAuG
330	Scn10a Sp 外显子 13_T19	CuGGGAuuGCuGCCCCAuGu

[0223]

331	Scn10a Sp 外显子13_T20	uGuCuuGAGCuuCACCCACA
332	Scn10a Sp 外显子13_T21	GuGAuGGuGAGCuCuGCAAA
333	Scn10a Sp 外显子13_T22	GGuGAuGGuGAGCuCuGCAA
334	Scn10a Sp 外显子14_T1	uGuGCuGCGGAGCuuCCGCu
335	Scn10a Sp 外显子14_T2	GAAAuAAuAGuAuGGGuCGA
23	Scn10a Sp 外显子14_T3	GGAAGCuCCGCAGCACAGAC
336	Scn10a Sp 外显子14_T4	ACuGuGAGuCuGCuAGAGCu
337	Scn10a Sp 外显子14_T5	CACuGuGAGuCuGCuAGAGC

[0224] 表4:靶向SCN10A基因($Na_v1.8$)的SaCas9向导RNA的名称和序列

[0225]

$Na_V1.8$ SaCas9 gRNA		
SEQ ID NO:	gRNA 名称	间隔区序列(5'-3')
338	Scn10a Sa 外显子 1_T1	GCGACGGAAGuuGuuAGuuuCG
38	Scn10a Sa 外显子 1_T3	AACAACuuCCGuCGCuuuACuC
339	Scn10a Sa 外显子 1_T4	GuuAGuuuCGAGGGAuCCAAuG
340	Scn10a Sa 外显子 1_T5	CuuACCCGGuGuGuGCuGuAGA
341	Scn10a Sa 外显子 1_T6	AGAACuGAuCGGGGAGCCCCuG
32	Scn10a Sa 外显子 1_T7	uAGAuCCGuuCuACAGCACACA
342	Scn10a Sa 外显子 1_T8	uCuCuAuCuCCACCAGuGACuC
343	Scn10a Sa 外显子 1_T9	AAuGAGAAGAuGGAAuuCCCCA
344	Scn10a Sa 外显子 2_T1	AAGGACuGAAuAGCCACAGGGC
345	Scn10a Sa 外显子 2_T2	uCuuCuGAuCAGGuuGAAAGGA
346	Scn10a Sa 外显子 3_T1	CuGACCuuCCAGAGAAAAuuGA
347	Scn10a Sa 外显子 3_T2	CAAuuuuCuCuGGAAGGuCAGu
348	Scn10a Sa 外显子 3_T3	CGAACuGACCuuCCAGAGAAAA
349	Scn10a Sa 外显子 4_T2	CuGGCAAGAGGAuuuuGuCuAA
350	Scn10a Sa 外显子 4_T3	ACGCuAAAAuCCAGCCAGuuCC
351	Scn10a Sa 外显子 4_T4	CCuGAGAGAuCCuuGGAACuGG
37	Scn10a Sa 外显子 4_T5	AuuuuAGCGuCAuuACCCuGGC
352	Scn10a Sa 外显子 4_T7	GCCuuGAuAAAGAuACuGGCAA

[0226]

353	Scn10a Sa 外显子 5_T1	uuGGCACAGCAAuAGAuCuCCG
354	Scn10a Sa 外显子 5_T2	GGAuCuCAGGCCuGCGGACAuu
355	Scn10a Sa 外显子 5_T4	uGuuuuuAAuGCuCuAAGAACu
356	Scn10a Sa 外显子 6_T1	CuCCACuCACGuuuuCuGuGAG
357	Scn10a Sa 外显子 6_T3	AAACACuuAGGCAGAAGAuGGu
358	Scn10a Sa 外显子 6_T4	CAuCAGCCAGuuuCuuCACuGA
359	Scn10a Sa 外显子 6_T5	AACuACuCAuCuCACAGAAAAC
360	Scn10a Sa 外显子 6_T6	GuCACAuCAGCCAGuuuCuuCA
361	Scn10a Sa 外显子 6_T7	CAACCuCAAAAAuAAAAuGuC
362	Scn10a Sa 外显子 6_T8	uuuAuuuuuGAGGuuGCCCuuG
363	Scn10a Sa 外显子 7_T2	uCAGAuCCAuuGCCACACAGuA
364	Scn10a Sa 外显子 7_T3	CuGuGuGGCAAuGGAuCuGACu
365	Scn10a Sa 外显子 7_T4	GuGGCAAuGGAuCuGACuCAGG
366	Scn10a Sa 外显子 7_T5	uCuGACCCCuuACuGuGuGGCA
367	Scn10a Sa 外显子 8_T1	ACCuGCuGGuAGAGGCGuuCCC
368	Scn10a Sa 外显子 8_T2	CuCACuGuuCCGCCuCAuGACA
369	Scn10a Sa 外显子 8_T3	CuGCCuuAAAACuuCuGACAAC
370	Scn10a Sa 外显子 8_T4	uCAAAGCuGGuGuAGuuAAAAu
33	Scn10a Sa 外显子 8_T5	AGuGAGAGGAAAGCCCAAGCAA
371	Scn10a Sa 外显子 9_T1	uuuuuuGuGCuCGuAAuCuuCC

[0227]

372	Scn10a Sa 外显子 9_T3	uAuAGAuuuuCCCAGAAGuCCu
373	Scn10a Sa 外显子 10_T1	GCuCuGAuCCuuACAACCAGCG
374	Scn10a Sa 外显子 10_T2	CuuCGCAGGuGCuAGCAGCACu
375	Scn10a Sa 外显子 10_T3	CuuACCAuCCuGCGCuGGuuGu
376	Scn10a Sa 外显子 10_T4	GCGCuGGuuGuAAGGAuCAGAG
377	Scn10a Sa 外显子 10_T5	ACAACCuCuCuCCACuCCCACA
378	Scn10a Sa 外显子 10_T6	GAGGuuAAAGGuGAuCCAuuGu
379	Scn10a Sa 外显子 10_T7	AGAGAAGGCAuAGAAuAAAGCC
380	Scn10a Sa 外显子 10_T8	AAAAuGCCAGuGAGAGAAGGCA
31	Scn10a Sa 外显子 11_T1	CCCuGGAGCuGuCGAuGuCuCG
39	Scn10a Sa 外显子 11_T2	GCCGAGAuAuCuCACuCCCuGA
381	Scn10a Sa 外显子 11_T3	AAGCCAuCGGGGCuCuCuGCuG
382	Scn10a Sa 外显子 11_T4	uCCAuCAuCuGuGACuCCCuCA
40	Scn10a Sa 外显子 11_T5	uGGuGuuCAuCuuCuCCAuGCC
383	Scn10a Sa 外显子 11_T7	uCGGGGCuCuCuGCuGCuGGGu
384	Scn10a Sa 外显子 11_T8	uCCAuGCCuGGAGuCAGGGuuG
385	Scn10a Sa 外显子 11_T9	uCCCuGAGGGAGuCACAGAuGA
386	Scn10a Sa 外显子 11_T10	uCAuCuuCuCCAuGCCuGGAGu
387	Scn10a Sa 外显子 12_T1	CAGuAuCAuAACCuCCGuCCuu
34	Scn10a Sa 外显子 12_T2	ACCuuuCCGGGCCCAAAGGGCA

[0228]

388	Scn10a Sa 外显子 12_T4	GAAAGuCuuCuuuuGuCCuGCA
389	Scn10a Sa 外显子 12_T5	CAAAAGAAGACuuuCuuGuCAG
390	Scn10a Sa 外显子 13_T1	CCACACuAuAAuGCAGAACuCG
391	Scn10a Sa 外显子 13_T2	CAuGCuCCAGAuAGGCAACAuC
392	Scn10a Sa 外显子 13_T3	AGGGAuCCGuCACAAGCCCAAA
393	Scn10a Sa 外显子 13_T4	uGAuCuGGGAuuGCuGCCCCAu
394	Scn10a Sa 外显子 13_T5	CuuGuCuCAGAAGuAuCuGAuC
395	Scn10a Sa 外显子 13_T6	GACAAuuCuCuuuGGGCuuGuG
396	Scn10a Sa 外显子 13_T7	CuuCuGAGACAAGCuGGuCAAG
397	Scn10a Sa 外显子 13_T8	AAGGuGAuGGuGAGCuCuGCAA
398	Scn10a Sa 外显子 13_T9	uGGGCACuuCuGuuCAGACuCC
35	Scn10a Sa 外显子 14_T1	CuuuGACuGCAuCAuCGuCACu
36	Scn10a Sa 外显子 14_T2	CACuuCuuCuGGAAAuAAuAGu
399	Scn10a Sa 外显子 14_T3	GuAAAAAAuAuGGuAAAGACCu
400	Scn10a Sa 外显子 14_T4	AuACuAuuAuuuCCAGAAGAAG

[0229] 表5:用于对CRISPR介导的SCN9A基因($Na_V1.7$)编辑进行测序分析的引物的名称、序列和靶向外显子

[0230]

Nav1.7 NGS 引物			
SEQ ID NO:	引物	序列	外显子
401	Nav1-7-外显子-2-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCATCCAGGCCTCTTATGTGAGGAG	2-1
402	Nav1-7-外显子-2-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATAGATGAAGGGCAGCTGTTTGC	
403	Nav1-7-外显子-2-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGAACAACGCATTGCTGAAAGA	2-2
404	Nav1-7-外显子-2-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTTATACAGAAGGAAGCCAACAG	
405	Nav1-7-外显子-3-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAACTGCTGATATTGATGTGAAAAA	3
406	Nav1-7-外显子-3-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAAATAGCAAAAATTACACCATAAAGT	
407	Nav1-7-外显子-4-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCCTCAAATATTTCAAATTCCCACTGT	4
408	Nav1-7-外显子-4-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCCCCATCTTCATAAATGCAGTAAC	
409	Nav1-7-外显子-5-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAAGATTTACATGGTGGTTGTATTCTT	5
410	Nav1-7-外显子-5-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTGTGCTGCCTGAGATTTTCAT	
411	Nav1-7-外显子-6-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCCCAAACGTAGAAAATACCT	6
412	Nav1-7-外显子-6-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCCCAAATAGTTGGAGTTATGAGT	
413	Nav1-7-外显子-7-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTTTCGATTCAGAGGCTTTATGTC	7-1
414	Nav1-7-外显子-7-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCTCTAGGGTATTCATTATGCTTTCT	
415	Nav1-7-外显子-7-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGAAGCTTTCTGATGTCATGATCC	7-2

[0231]

416	Nav1-7-外显子-7-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAACATTTCATTATTAAAAGAGAGCA	
417	Nav1-7-外显子-8-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGACCAGGCCTGAATTTGTAG	8
418	Nav1-7-外显子-8-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTTTGCAAACTGACTGAACATTCT	
419	Nav1-7-外显子-9-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTCCTGAAGACACTCTCACCT	9
420	Nav1-7-外显子-9-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCAGGCTCTTAACATACACCAGG	
421	Nav1-7-外显子-10-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTCATGCCTGTCAAATTGAAATA	10-1
422	Nav1-7-外显子-10-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACATCTGTTGAAATTCTAATTCTTTCTGT	
423	Nav1-7-外显子-10-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTAGACGCTGCGTGCTGCT	10-2
424	Nav1-7-外显子-10-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAAGGCCAAGCATATACCGCAGA	
425	Nav1-7-外显子-11-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATGTCCTGTCCTAGGGTTTCCT	11-1
426	Nav1-7-外显子-11-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCAGCATCTCCCTTTTCCTCTC	
427	Nav1-7-外显子-11-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGCAGCGGCTGAATATACAAGT	11-2
428	Nav1-7-外显子-11-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTCGCCTATGCCCTTCGAC	
429	Nav1-7-外显子 11-3-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGAATCAAAAGAAGCTCTCCAGTG	11-3
430	Nav1-7-外显子 11-3-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCACTCACTATCCTCTCCCGA	
431	Nav1-7-外显子 12-1-NGS-F6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGTGTACTTCTATCAGTAGGTGCTT	12-1

[0232]

432	Nav1-7-外显子12-1-NGS-R6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACCTACTGGCTTGGCTGAT	
433	Nav1-7-外显子-12-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAAGCAGCAGAACAAGTCTTTTTAGTT	12-2
434	Nav1-7-外显子-12-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACCAGGGAGACCACACCGT	
435	Nav1-7-外显子12-3-NGS-F6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACAGCATTTTTGGAGACAATGAGA	12-3
436	Nav1-7-外显子12-3-NGS-R6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCCTGAGCTATGTAAAACGTC	
437	Nav1-7-外显子-13-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCAGCAATCTAGGCTCTACT	13-1
438	Nav1-7-外显子-13-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCTTCCACAGTGTTTGTTAATATGC	
439	Nav1-7-外显子-13-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCAAATACACAAGAAAAGGCGTTG	13-2
440	Nav1-7-外显子-13-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAATTCCATCAGTATCCATTGGT	
441	Nav1-7-外显子-14-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGGTTAGGAGTGAAACAGACAAATGG	14-1
442	Nav1-7-外显子-14-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGTGTTCCATAGCCATAAATAATGTG	
443	Nav1-7-外显子-14-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCTTGATCTGGAATTGCTCTCCAT	14-2
444	Nav1-7-外显子-14-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAATGATGACAACTAAAAAGAGAAACT	
445	Nav1-7-外显子-15-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATCATTGTGTTGATTTCCTGTTTTCT	15-1
446	Nav1-7-外显子-15-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCAGTCTGAATGATCGCAGAAC	
447	Nav1-7-外显子-15-2-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCAGCTGAAATGGTATTAAAACTGA	15-2

[0233]

448	Nav1-7-外显子-15-2-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCAAAACCAAAGAAATACCCCTT	

[0234] 表6:用于对CRISPR介导的SCN10A基因($Na_V1.8$)编辑进行测序分析的引物的名称、序列和靶向外显子

[0235]

Nav1.8 NGS 引物			
SEQ ID NO:	引物	序列	外显子
449	Nav1-8-外显子-1-1-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCTGTCACCTCTCTGTGGTT	1-1
450	Nav1-8-外显子-1-1-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTAGAACTTGGGCAGCTGGTT	
451	Nav1-8-外显子-1-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCAAGCAGGGAACAAAGAAA	1-2
452	Nav1-8-外显子-1-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCGAGACTTCCTCTCCAAGA	
453	Nav1-8-外显子-2-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGCCTGAGATAATGCCTCTCATGT	2
454	Nav1-8-外显子-2-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTGGACACAGTAGGCAAGG	
455	Nav1-8-外显子-3-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGTAATCATTCAGCATCAAGGTG	3
456	Nav1-8-外显子-3-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACAAAGACTGCCAAGTGAAGGA	
457	Nav1-8-外显子-4-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCATCCCTCCCTCCTGGAAGA	4
458	Nav1-8-外显子-4-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCCTCTCCTATCACACATGC	
459	Nav1-8-外显子-5-1-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGGCTAATGATACCCCAGGT	5
460	Nav1-8-外显子-5-1-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTCTTTGCCCTGGAACCTT	
461	Nav1-8-外显子-6-1-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGTGCTCCGTGTGTGCTAC	6-1
462	Nav1-8-外显子-6-1-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAACCAGACCTTGGTCCCTATG	
463	Nav1-8-外显子-6-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTCAAGGGCAACCTCAAAA	6-2

[0236]

464	Nav1-8-外显子-6-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATTTCCTTGCAAGAGGGATG	
465	Nav1-8-外显子-7-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGATTGCATTCACCACACAAGG	7
466	Nav1-8-外显子-7-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCCAAGGACAAGATGGAG	
467	Nav1-8-外显子-8-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGGGCTACCTTGTCTGCAAT	8
468	Nav1-8-外显子-8-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGCCTCCAACCAAGTCTGC	
469	Nav1-8-外显子-9-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTGGAGGAGGCTGACTTAAA	9-1
470	Nav1-8-外显子-9-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGGGCCTCCTGGAACTTCTT	
471	Nav1-8-外显子-9-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCAGACCCTGAGGACTTCT	9-2
472	Nav1-8-外显子-9-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGGACAGTCTGCAACCTTCT	
473	Nav1-8-外显子-10-1-NGS-F5	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCATGCTAAGTCCAAGCAAATACT	10
474	Nav1-8-外显子-10-1-NGS-R5	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCAGCTGCAATGGTGGGTAA	
475	Nav1-8-外显子-11-1-NGS-F6	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTCCAGCCTTCTTGCTCCTTT	11-1
476	Nav1-8-外显子-11-1-NGS-R6	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGAGTCAGGGTTGCTGGGTTGA	
477	Nav1-8-外显子-11-2-NGS-F3	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCCTGAGGGAGTCACAGATG	11-2
478	Nav1-8-外显子-11-2-NGS-R3	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTCAAGGCTTCTAGGTGGA	
479	Nav1-8-外显子-12-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTTTGCCATGAAGATGTCAGG	12

[0237]

480	Nav1-8-外显子-12-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTCACATGGGAATTCATC	
481	Nav1-8-外显子-13-1-NGS-F2	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGAGGATGACCGCAGAATTG	13-1
482	Nav1-8-外显子-13-1-NGS-R2	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATGCACAAGGTGATGGTGAG	
483	Nav1-8-外显子-13-2-NGS-F4	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTTGACCAGCTTGTCTCAGAAG	13-2
484	Nav1-8-外显子-13-2-NGS-R4	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGACTGCACCCTGCCATCAT	
485	Nav1-8-外显子-14-1-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACCCCACAGATCCCACTGT	14-1
486	Nav1-8-外显子-14-1-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCACAGACAGGCTTCCCTTCTT	
487	Nav1-8-外显子-14-2-NGS-F1	TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTGCTGAAATGGTCTTCAAAATC	14-2
488	Nav1-8-外显子-14-2-NGS-R1	GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTGAATCTGGGTGGGAGTTTC	

[0238] 表7:在40个向导中预测的1,471个假定脱靶位点的总列表

[0239]

chr	开始	结束	chr	开始	结束	chr	开始	结束
chr1	101673862	101673883	chr6	81389456	81389478	chr8	18547775	18547797
chr1	181263539	181263560	chr7	116885434	116885456	chr9	121398998	121399019
chr1	230060685	230060706	chr8	101163760	101163782	chr9	90536880	90536903
chr1	57212888	57212911	chr8	102040037	102040058	chrX	154575630	154575653
chr10	129962874	129962895	chr8	32017421	32017443	chrX	154628777	154628800
chr10	84935685	84935706	chr9	134428917	134428939	chr1	218298983	218299004
chr10	8530131	8530152	chr9	41739585	41739607	chr1	42210368	42210390
chr11	11657568	11657590	chr9	61575358	61575380	chr1	58885286	58885307
chr11	118434780	118434801	chr9	67636882	67636904	chr1	99737182	99737204
chr11	19769579	19769600	chrX	103932345	103932367	chr10	119436660	119436681
chr11	44591707	44591728	chrX	149687593	149687615	chr10	78303428	78303451
chr11	60420702	60420725	chrX	77969229	77969250	chr11	105632443	105632465
chr11	79356353	79356374	chrY	17093954	17093976	chr11	49938853	49938876
chr11	81605512	81605533	chr1	106130660	106130681	chr12	103863493	103863514
chr12	118776061	118776082	chr1	17346264	17346285	chr12	92649761	92649783
chr12	54000745	54000768	chr1	191298075	191298097	chr13	112185105	112185127
chr12	95630598	95630619	chr1	236890187	236890208	chr13	29354998	29355019
chr13	110180589	110180611	chr1	244884251	244884272	chr14	56541130	56541151
chr13	40148712	40148733	chr10	79776620	79776641	chr14	63594134	63594155
chr13	60239631	60239653	chr10	87298770	87298791	chr15	79057189	79057210
chr13	66558377	66558400	chr10	87439176	87439197	chr16	1024374	1024397
chr14	104081758	104081780	chr11	133566119	133566141	chr17	57649035	57649057
chr14	104550954	104550976	chr11	18269330	18269351	chr2	142368179	142368200
chr14	70672101	70672122	chr11	31057715	31057736	chr2	166286371	166286393

[0240]

chr14	72884578	72884599	chr11	86679889	86679910	chr20	24803468	24803489
chr14	76371571	76371593	chr13	26095101	26095122	chr20	24803468	24803490
chr15	75765848	75765871	chr13	88051002	88051025	chr20	25276655	25276676
chr16	51266796	51266817	chr15	54619157	54619179	chr20	57304528	57304551
chr16	66970656	66970677	chr16	78175674	78175695	chr20	63700780	63700801
chr17	38736344	38736365	chr16	85698295	85698317	chr3	12181396	12181417
chr17	5662660	5662682	chr18	4435202	4435223	chr3	127363721	127363742
chr17	77914635	77914656	chr18	63953514	63953535	chr3	73435663	73435686
chr19	14021634	14021656	chr18	75626393	75626414	chr4	148797789	148797810
chr2	127092215	127092238	chr19	16143760	16143782	chr4	98007120	98007141
chr2	134821956	134821977	chr19	3636896	3636918	chr5	141787884	141787905
chr2	178940831	178940853	chr2	102073639	102073660	chr5	155635156	155635177
chr20	20432289	20432311	chr2	111189580	111189601	chr6	104164934	104164956
chr20	58601338	58601359	chr2	157617978	157618200	chr7	139583922	139583943
chr21	35410460	35410482	chr2	178287459	178287480	chr7	142193746	142193769
chr22	39957473	39957496	chr2	81854796	81854819	chr7	47045289	47045310
chr3	119381654	119381676	chr2	96711649	96711670	chr7	99403691	99403712
chr3	140431388	140431409	chr20	46241748	46241769	chr9	89919212	89919233
chr3	38755787	38755809	chr20	58037844	58037865	chr9	97393314	97393335
chr4	109874522	109874543	chr20	61210620	61210641	chrX	101837971	101837993
chr4	135986289	135986310	chr21	31457963	31457984	chrX	102321859	102321881
chr4	162888411	162888432	chr3	38771311	38771333	chrX	102365234	102365256
chr4	95257196	95257217	chr3	67894307	67894329	chrX	42045623	42045644
chr5	91935098	91935119	chr5	150570292	150570313	chrX	95359671	95359693

[0241]

chr6	106430770	106430791	chr5	163518469	163518491	chr1	106905030	106905051
chr6	154267869	154267892	chr6	41702022	41702043	chr1	187369871	187369893
chr7	146640806	146641007	chr6	42338824	42338847	chr1	217283942	217283964
chr7	41078138	41078159	chr8	133739469	133739491	chr1	67514969	67514990
chr7	56759248	56759270	chr8	141160774	141160795	chr1	73958112	73958133
chr7	63816239	63816261	chr8	20158237	20158258	chr10	131976154	131976175
chr8	117647612	117647633	chr8	23430667	23430688	chr10	4150457	4150479
chr8	19663295	19663316	chr9	130371904	130371925	chr10	45658400	45658421
chr8	26849329	26849350	chr9	136746114	136746135	chr10	54308353	54308374
chr8	46389287	46389309	chr9	31741140	31741162	chr10	86859468	86859489
chr8	500777	500799	chrX	38085667	38085689	chr10	95305836	95305858
chr8	67346602	67346623	chrX	88090240	88090261	chr12	16683841	16683862
chr9	109783158	109783179	chr1	104446115	104446136	chr12	17604379	17604400
chr9	130987364	130987385	chr1	182332402	182332423	chr12	83263173	83263195
chr9	132448490	132448511	chr1	183710217	183710238	chr16	3841926	3841947
chr9	3023108	3023129	chr1	208748851	208748872	chr18	71712771	71712794
chr9	70925755	70925777	chr1	240969802	240969823	chr2	155442093	155442116
chr9	78073257	78073279	chr1	26574711	26574733	chr2	166286585	166286607
chrX	130376370	130376393	chr1	30456582	30456603	chr2	171528653	171528674
chrX	39650052	39650074	chr1	30777702	30777725	chr2	19830616	19830637
chrY	6906016	6906037	chr1	37625208	37625231	chr2	206933530	206933551
chr1	186659904	186659926	chr1	51905268	51905289	chr2	23224743	23224764
chr1	247936465	247936486	chr1	95744205	95744228	chr21	29458589	29458610
chr10	105539151	105539172	chr10	109509276	109509299	chr22	29667158	29667180

[0242]

chr10	11271522	11271544	chr10	113476180	113476201	chr3	103315028	103315050
chr10	120030919	120030940	chr10	114453754	114453775	chr3	161401860	161401882
chr10	122199548	122199569	chr10	118020250	118020271	chr3	31354038	31354059
chr10	21055795	21055816	chr10	35888611	35888633	chr4	159960343	159960364
chr10	49303209	49303230	chr10	47483140	47483161	chr5	140291535	140291557
chr11	12054766	12054789	chr10	71103889	71103910	chr5	154340017	154340038
chr11	134957078	134957099	chr10	8187525	8187546	chr6	111811118	111811140
chr11	72025745	72025766	chr10	82320936	82320957	chr6	17932393	17932416
chr12	119372784	119372807	chr10	97073249	97073270	chr7	24855398	24855419
chr12	60148276	60148297	chr10	99797253	99797275	chr7	98797096	98797118
chr13	42848194	42848215	chr11	106591429	106591451	chr8	112670565	112670588
chr13	58386752	58386775	chr11	112369728	112369751	chr8	30460352	30460373
chr13	75702660	75702682	chr11	11294441	11294463	chr9	26330106	26330127
chr14	24835976	24835997	chr11	23994069	23994092	chr9	86133463	86133485
chr14	29623510	29623531	chr11	29830201	29830222	chrX	146222562	146222583
chr14	46653453	46653475	chr11	35420641	35420662	chrX	17601216	17601237
chr14	72079604	72079627	chr11	61138088	61138110	chrX	56719178	56719201
chr15	38307571	38307592	chr11	69777241	69777264	chr1	161715957	161715978
chr16	30086751	30086772	chr11	72020177	72020198	chr1	186721495	186721516
chr16	59179342	59179363	chr11	72658233	72658256	chr1	199465695	199465717
chr17	74203946	74203967	chr11	84482547	84482568	chr1	234230046	234230069
chr18	14964141	14964162	chr11	96164837	96164860	chr1	246597563	246597584
chr18	70296440	70296462	chr12	109406803	109406825	chr1	9340847	9340868
chr19	55892885	55892908	chr13	113809849	113809870	chr10	101350793	101350816

[0243]

chr2	204557623	204557646	chr13	26875905	26875926	chr10	103066765	103066787
chr2	213875062	213875083	chr13	27416390	27416411	chr10	49429090	49429111
chr2	236094319	236094340	chr13	29693044	29693067	chr11	12731192	12731214
chr2	81092829	81092850	chr13	42970814	42970835	chr11	94300239	94300262
chr20	39790561	39790582	chr14	36801548	36801569	chr12	105242950	105242971
chr21	22714600	22714621	chr14	59632197	59632218	chr12	128011654	128011676
chr21	36945184	36945207	chr14	91903881	91903902	chr12	30430479	30430500
chr3	38756760	38756782	chr14	98960049	98960070	chr12	88935275	88935296
chr3	38909083	38909105	chr14	99595608	99595630	chr12	89530030	89530053
chr3	62160422	62160443	chr15	100390078	100390100	chr13	107193322	107193343
chr4	11569781	11569802	chr15	27968205	27968227	chr13	36103807	36103830
chr4	4596463	4596484	chr15	40289231	40289252	chr14	36905708	36905731
chr4	86891508	86891529	chr15	72631643	72631664	chr14	69696064	69696087
chr5	125913329	125913350	chr15	74105587	74105608	chr14	78054812	78054835
chr5	152687865	152687888	chr16	28011042	28011063	chr15	23634421	23634442
chr5	28941639	28941660	chr16	28181839	28181860	chr15	63926417	63926438
chr5	50928286	50928307	chr16	4699815	4699837	chr15	82103361	82103382
chr5	73347573	73347594	chr16	60430147	60430169	chr15	94230598	94230619
chr7	154662667	154662688	chr16	83976871	83976892	chr16	63947100	63947121
chr7	154663811	154663832	chr16	86429392	86429414	chr17	19807664	19807685
chr7	90972309	90972330	chr17	1162115	1162136	chr17	3505544	3505567
chr7	98854385	98854406	chr17	30090056	30090077	chr17	44071718	44071739
chr8	41214468	41214491	chr17	44854537	44854558	chr17	4995262	4995283
chr8	49406396	49406417	chr17	57642792	57642813	chr18	25386572	25386593

[0244]

chr8	50663214	50663235	chr18	23235311	23235332	chr18	44666298	44666319
chr8	51175334	51175357	chr18	57527960	57527982	chr18	56303935	56303956
chr8	62677817	62677838	chr18	60250771	60250793	chr18	58118525	58118546
chr9	27101925	27101948	chr18	79942923	79942944	chr18	7237437	7237458
chr1	116387955	116387976	chr19	15670796	15670818	chr19	28344658	28344679
chr1	14173045	14173066	chr19	30910106	30910127	chr2	11018267	11018288
chr1	155713414	155713435	chr19	45792252	45792273	chr2	142234899	142234920
chr1	170096719	170096740	chr19	7898697	7898718	chr2	157696547	157696570
chr1	175876599	175876620	chr2	111551550	111551571	chr2	15894912	15894935
chr1	202292624	202292647	chr2	120554544	120554565	chr2	166286354	166286376
chr1	210569059	210569080	chr2	126691363	126691384	chr2	169738897	169738918
chr1	50667093	50667114	chr2	126694948	126694969	chr2	174221489	174221510
chr1	66329779	66329800	chr2	180785404	180785426	chr2	198625481	198625502
chr1	9120177	9120198	chr2	191197836	191197858	chr2	213460469	213460491
chr10	118339203	118339224	chr2	240752376	240752397	chr2	216853354	216853375
chr10	29318701	29318722	chr2	40393626	40393648	chr2	30384729	30384752
chr10	30605633	30605654	chr2	87310047	87310068	chr2	50247269	50247290
chr10	78251913	78251934	chr20	24761423	24761445	chr20	17320938	17320959
chr10	90894658	90894681	chr20	48105588	48105609	chr20	19474376	19474397
chr10	9240868	9240890	chr20	63206596	63206618	chr20	57549695	57549717
chr11	119661275	119661296	chr21	34811774	34811795	chr22	45538244	45538265
chr11	122398618	122398639	chr21	37675033	37675056	chr3	10761073	10761095
chr11	128153457	128153478	chr22	25084069	25084092	chr3	122197839	122197860
chr11	35876123	35876144	chr22	29716915	29716936	chr3	124433870	124433891

[0245]

chr12	109444959	109444980	chr22	37312013	37312034	chr3	142893230	142893251
chr12	114163696	114163719	chr3	116664004	116664025	chr3	172385878	172385899
chr12	114794612	114794634	chr3	165846142	165846163	chr3	70924914	70924936
chr12	15291996	15292018	chr3	185268854	185268875	chr3	8723005	8723026
chr12	20864724	20864745	chr3	19220065	19220086	chr3	95332559	95332580
chr12	27323061	27323083	chr3	28603456	28603477	chr3	98072324	98072345
chr12	84921525	84921546	chr3	38793784	38793806	chr4	111062514	111062535
chr13	100235136	100235157	chr3	63674978	63675001	chr4	18864625	18864647
chr13	21762339	21762362	chr4	106491924	106491946	chr4	32279580	32279603
chr13	32618495	32618517	chr4	117117815	117117838	chr4	85659807	85659828
chr13	33776819	33776840	chr4	119616610	119616632	chr5	169266180	169266203
chr13	43998345	43998366	chr4	139219960	139219983	chr5	179335776	179335797
chr13	78341045	78341066	chr4	185051888	185051909	chr6	108638293	108638316
chr15	25853638	25853659	chr4	24022746	24022767	chr6	131453651	131453672
chr15	62481354	62481375	chr4	52789300	52789321	chr6	35275738	35275760
chr15	74878475	74878498	chr4	82398573	82398596	chr6	40784617	40784638
chr16	6607972	6607993	chr4	85087003	85087024	chr6	70439658	70439680
chr16	6716297	6716318	chr5	107883322	107883343	chr7	103995304	103995325
chr17	4106740	4106761	chr5	111925220	111925241	chr7	110511327	110511348
chr17	43216123	43216145	chr5	143222451	143222472	chr7	27305711	27305732
chr17	50328380	50328401	chr5	159866928	159866949	chr7	30322503	30322524
chr17	61461790	61461811	chr5	32666438	32666459	chr7	68363358	68363380
chr17	81905722	81905743	chr5	42894065	42894086	chr7	97668279	97668302
chr18	73085391	73085412	chr5	42899359	42899380	chrX	140493338	140493359

[0246]

chr19	29235109	29235131	chr5	78720216	78720237	chrX	15614904	15614926
chr19	45003779	45003802	chr5	8655482	8655503	chrX	30782422	30782443
chr19	47511671	47511692	chr5	9135657	9135678	chrX	31984015	31984036
chr19	55085146	55085169	chr6	113222662	113222683	chrX	86190344	86190365
chr2	109228516	109228539	chr6	115538457	115538478	chrY	19917588	19917609
chr2	142539467	142539488	chr6	31688661	31688684	chr1	178061425	178061447
chr2	156144910	156144931	chr6	43831465	43831486	chr1	2402386	2402407
chr2	191243299	191243320	chr6	87701119	87701140	chr1	72287683	72287705
chr2	196103556	196103579	chr7	10594397	10594418	chr1	76614806	76614827
chr2	203787061	203787083	chr7	12619084	12619105	chr1	89901148	89901169
chr2	214949817	214949839	chr7	149003021	149003042	chr10	85000194	85000215
chr2	234666709	234666730	chr7	18335788	18335809	chr11	108491260	108491281
chr2	28172483	28172506	chr7	24705842	24705863	chr11	66423974	66423995
chr2	3057588	3057611	chr7	286530	286551	chr12	71595067	71595090
chr2	36232821	36232842	chr7	36193214	36193235	chr13	69934195	69934216
chr2	50098904	50098926	chr7	38601793	38601814	chr14	66094377	66094398
chr2	73265656	73265678	chr7	47909042	47909063	chr16	14656670	14656691
chr20	13432273	13432295	chr7	748771	748792	chr16	87107991	87108013
chr20	18449036	18449057	chr8	136059616	136059639	chr17	353076	353097
chr20	29297358	29297379	chr8	38318140	38318163	chr19	13768686	13768707
chr20	32451442	32451465	chr8	3984113	3984135	chr2	166284580	166284602
chr20	38350601	38350622	chr9	113808805	113808826	chr3	10226168	10226189
chr20	49217595	49217616	chr9	116737579	116737600	chr3	115343892	115343913
chr20	64269672	64269693	chr9	12496083	12496104	chr3	134983639	134983660

[0247]

chr21	5738568	5738589	chr9	129327837	129327858	chr3	178334452	178334474
chr21	5859152	5859173	chr9	132858640	132858661	chr3	45909277	45909299
chr21	7585888	7585909	chr9	8978325	8978346	chr3	73176881	73176902
chr21	8136638	8136659	chrX	134645573	134645594	chr4	81742352	81742373
chr21	8319683	8319704	chrX	24998312	24998335	chr4	8245260	8245281
chr3	115208357	115208380	chrX	88238872	88238894	chr5	168066527	168066548
chr3	139072976	139072997	chrY	15614017	15614038	chr5	168085915	168085937
chr3	30158407	30158428	chr1	203223874	203223895	chr5	6207756	6207778
chr3	38760699	38760721	chr1	43604017	43604038	chr6	149489057	149489079
chr3	58128755	58128776	chr10	107165027	107165048	chr6	151771012	151771033
chr3	59247420	59247441	chr10	3981954	3981975	chr6	154959101	154959124
chr3	71889200	71889221	chr11	12261472	12261494	chr6	71153933	71153956
chr3	75350195	75350217	chr14_KI270725v1_随机	28652	28674	chr6	95286431	95286453
chr4	129368696	129368717	chr15	20303769	20303791	chr7	151872799	151872820
chr4	138131152	138131173	chr15	21149388	21149410	chr8	135291727	135291748
chr4	145211541	145211562	chr15	60232485	60232507	chr8	142002619	142002641
chr4	175410598	175410619	chr15	62708764	62708787	chr8	22622609	22622632
chr4	176012819	176012840	chr15	69844005	69844027	chr8	48402295	48402317
chr4	23365348	23365370	chr16	32301913	32301935	chr8	59391289	59391312
chr4	8051122	8051143	chr16	32860233	32860255	chr8	74353643	74353665
chr5	109936561	109936582	chr16	33508183	33508205	chr9	127215278	127215301
chr5	154754303	154754326	chr16	33546176	33546198	chrX	102000238	102000259
chr5	172938372	172938393	chr16	34001286	34001308	chrX	110824137	110824158

[0248]

chr5	67123377	67123398	chr16_KI270728v1_随机	1122344	1122366	chrX	9484434	9484457
chr6	115441973	115441996	chr16_KI270728v1_随机	1846473	1846495	chrX	95109255	95109277
chr6	128605720	128605741	chr16_KI270728v1_随机	215852	215874	chr1	163429927	163429948
chr6	155825911	155825933	chr18	12089271	12089293	chr1	168165741	168165762
chr6	28497324	28497345	chr18	14172226	14172248	chr1	218399183	218399204
chr6	38687945	38687967	chr19	271964	271985	chr1	225901558	225901579
chr6	55890478	55890501	chr19	29923127	29923148	chr1	239825074	239825095
chr6	62089908	62089929	chr19	39416865	39416886	chr1	246176999	246177020
chr7	118119892	118119913	chr2	75306193	75306215	chr1	66367983	66368005
chr7	137243739	137243760	chr2	821670	821691	chr10	105792310	105792331
chr7	14322295	14322316	chr20	61883165	61883187	chr10	119690965	119690986
chr7	152870674	152870695	chr21	14057110	14057132	chr10	15629626	15629649
chr7	55338095	55338117	chr21	41498789	41498811	chr10	20137117	20137140
chr7	91189289	91189310	chr21	8657234	8657256	chr10	56925205	56925227
chr8	118595807	118595830	chr22	10634363	10634385	chr10	71769157	71769178
chr8	21920926	21920947	chr22	16529314	16529336	chr10	96692195	96692217
chr8	71336124	71336145	chr22	22292514	22292536	chr11	11161353	11161374
chr8	8444382	8444403	chr3	154767190	154767211	chr11	16266249	16266271
chr8	90937374	90937396	chr3	38522285	38522306	chr11	41679797	41679819
chr8	92334917	92334939	chr3	38752218	38752240	chr11	91540261	91540283
chr9	114450778	114450799	chr3	62350580	62350602	chr12	18730599	18730622
chr9	122134671	122134694	chr4	149562539	149562561	chr12	31779884	31779905
chr9	34403481	34403502	chr4	1547652	1547673	chr12	51699567	51699588

[0249]

chr9	75992624	75992645	chr4	1735133	1735154	chr12	66038774	66038795
chrX	115546438	115546460	chr5	168627963	168627985	chr12	83661770	83661791
chrX	53085475	53085496	chr5	23795022	23795043	chr13	56206698	56206720
chrY	20804459	20804480	chr6	142507007	142507030	chr13	92515738	92515759
chr1	245125422	245125444	chr6	45418675	45418697	chr13	99930308	99930329
chr10	97153588	97153609	chr7	135558534	135558555	chr14	100709342	100709363
chr11	130405683	130405704	chr8	124041822	124041843	chr14	60948496	60948517
chr12	41542249	41542270	chr8	143306748	143306771	chr14	63458373	63458394
chr15	33405410	33405431	chr8	3193432	3193453	chr14	84372203	84372224
chr15	60494975	60494996	chr8	8236128	8236151	chr14	91094537	91094558
chr15	77987866	77987887	chr9	127698860	127698882	chr15	21654639	21654661
chr16	14924924	14924945	chr9	40589872	40589894	chr15	22097135	22097157
chr16	16323575	16323596	chr9	63047613	63047635	chr15	72236372	72236393
chr16	16363575	16363596	chr9	63390838	63390860	chr15	99388177	99388200
chr16	18345071	18345092	chr9	64717354	64717376	chr15_KI270727v1_随机	388891	388913
chr16	18388585	18388606	chr9	65201663	65201685	chr16	47873889	47873910
chr16	2112027	2112048	chr9	65820018	65820040	chr17	49809267	49809289
chr16	50712259	50712280	chr9	93336083	93336105	chr17	55088691	55088714
chr16	87750777	87750798	chr9	93515538	93515560	chr17	67339549	67339570
chr16	87750777	87750799	chr9	98612376	98612398	chr18	32630505	32630528
chr17	7139560	7139583	chrUn_KI270749v1	136081	136103	chr18	51862106	51862127
chr17	79173446	79173467	chrX	134771228	134771250	chr18	73818723	73818744
chr19	41198803	41198824	chrY	11438592	11438614	chr19	18493880	18493902

[0250]

chr2	156068013	156068034	chrY	26403323	26403345	chr19	44719395	44719417
chr2	156548581	156548602	chr1	114755705	114755728	chr2	125952758	125952779
chr2	54177434	54177455	chr1	80195820	80195841	chr2	139799913	139799936
chr20	15214248	15214269	chr10	46094875	46094896	chr2	165310320	165310342
chr20	24606031	24606052	chr10	48196282	48196304	chr2	166051970	166051991
chr20	50089991	50090013	chr10	80201966	80201989	chr2	166303283	166303305
chr22	39586599	39586620	chr10	8311347	8311368	chr2	172323440	172323461
chr3	155889542	155889563	chr10	95610284	95610306	chr2	179653735	179653756
chr3	38755941	38755963	chr10	99188037	99188058	chr2	198281873	198281895
chr3	39281879	39281900	chr11	111447509	111447530	chr2	206523132	206523155
chr3	68859694	68859715	chr11	116742303	116742326	chr2	211589335	211589356
chr4	88823295	88823316	chr11	117873838	117873861	chr2	223811794	223811815
chr5	103540423	103540444	chr11	34171625	34171647	chr2	239835025	239835048
chr5	84165474	84165495	chr11	99967904	99967925	chr2	85720060	85720081
chr5	98912731	98912753	chr12	10226257	10226278	chr2	9888602	9888624
chr7	139451004	139451025	chr12	1993974	1993996	chr20	30613675	30613696
chr7	140617217	140617238	chr12	87701468	87701489	chr21	9072499	9072522
chr8	144808058	144808079	chr13	22987248	22987269	chr22	19036400	19036421
chr8	42506480	42506501	chr13	44594630	44594651	chr22	19345323	19345344
chr9	121268473	121268495	chr13	71034293	71034316	chr3	118483785	118483807
chr9	125767930	125767952	chr14	18625660	18625681	chr3	12201058	12201079
chr9	15713241	15713262	chr14	19689363	19689384	chr3	172628542	172628563
chr9	75081273	75081294	chr14	45436755	45436777	chr3	187797026	187797047
chrX	20478318	20478339	chr14	55804739	55804761	chr3	88438945	88438966

[0251]

chr1	175444473	175444494	chr15	279482847	279483087	chr3	99743398	99743421
chr1	201448312	201448333	chr15	471930647	471930885	chr4	104263476	104263498
chr1	201529925	201529947	chr16	882825166	882825337	chr4	115502767	115502789
chr1	230112711	230112732	chr17	295959444	295959666	chr4	149515395	149515418
chr1	389212	389235	chr17	345878577	345878788	chr4	156446223	156446246
chr10	121567501	121567522	chr17	666611266	666611488	chr4	158560326	158560348
chr10	648619244	648619455	chr18	442826188	442826389	chr4	171270466	171270688
chr10	717246322	717246533	chr18	561094833	561095044	chr4	368429144	368429366
chr10	777943677	777943899	chr19	417612322	417612544	chr4	422124288	422124499
chr10	784169255	784169466	chr19	417637744	417637966	chr4	523594366	523594577
chr10	789619833	789620044	chr19	418070944	418071166	chr4	715241355	715241566
chr11	105698987	105699010	chr19	425221977	425222199	chr5	103440273	103440294
chr11	116061423	116061445	chr2	130007283	130007304	chr5	106393920	106393941
chr11	189343119	189343441	chr2	147019337	147019360	chr5	112398009	112398030
chr11	189565466	189565688	chr2	166284780	166284802	chr5	126349877	126349898
chr11	472708500	472708722	chr2	210461905	210461926	chr5	127630710	127630733
chr12	105642043	105642064	chr2	329427177	329427388	chr5	134823819	134823840
chr12	121776377	121776398	chr2	885453355	885453566	chr5	161450071	161450092
chr12	130357913	130357934	chr20	408163144	408163355	chr5	63311092	63311113
chr12	132765833	132765856	chr20	484677577	484677788	chr5	68226819	68226840
chr12	132905329	132905350	chr20	593852466	593852689	chr5	68263783	68263804
chr12	3005030	3005051	chr21	249737644	249737855	chr5	73863907	73863928
chr12	96129083	96129105	chr22	155527144	155527355	chr5	793395	793416
chr13	113429827	113429849	chr22	279972155	279972366	chr5	85758370	85758392

[0252]

chr13	24649311	24649333	chr22	47994724	47994746	chr6	117895873	117895894
chr13	49321560	49321581	chr3	13362760	13362781	chr6	155799843	155799866
chr13	74288649	74288672	chr3	154023880	154023902	chr6	169594949	169594972
chr13	95780988	95781009	chr3	165659333	165659354	chr6	42170408	42170429
chr13	99408376	99408397	chr3	194382648	194382671	chr6	55168056	55168078
chr14	48035673	48035695	chr3	3264339	3264360	chr7	128811009	128811031
chr14	95009472	95009494	chr4	147481957	147481980	chr7	93930640	93930662
chr15	31530685	31530706	chr4	154549407	154549428	chr8	114092319	114092341
chr15	31552815	31552836	chr4	162875012	162875035	chr8	125705235	125705256
chr15	66629204	66629227	chr5	101674079	101674100	chr8	127177604	127177625
chr15	69283164	69283185	chr5	139982158	139982180	chr8	43540940	43540961
chr15	78195307	78195330	chr5	143976245	143976266	chr9	115759533	115759554
chr16	1206137	1206159	chr5	21985063	21985084	chr9	116410209	116410232
chr16	1371839	1371861	chr5	69994824	69994845	chr9	37667360	37667381
chr16	27489697	27489719	chr5	70869901	70869922	chr9	83375386	83375409
chr16	86314798	86314819	chr5	82428487	82428510	chrX	113896423	113896444
chr16	87000301	87000322	chr6	132597537	132597558	chrX	18803751	18803772
chr17	19559959	19559981	chr6	163177753	163177776	chrX	19705923	19705946
chr17	50591468	50591490	chr6	23306955	23306976	chrX	29277535	29277556
chr17	62397428	62397451	chr6	25839497	25839518	chrX	46428082	46428103
chr17	65539649	65539670	chr6	35732304	35732325	chrX	86724515	86724537
chr18	47621706	47621727	chr7	136446761	136446782	chrY	11157940	11157963
chr18	49303939	49303960	chr7	29758402	29758423	chr1	110728702	110728723
chr19	1432127	1432148	chr7	34654518	34654540	chr1	111772782	111772803

[0253]

chr19	28482476	28482497	chr8	107976268	107976289	chr1	157253826	157253847
chr19	3536679	3536700	chr8	226186002	226186023	chr1	175671514	175671535
chr19	44622402	44622423	chr8	32142917	32142938	chr1	220276090	220276111
chr19	58266924	58266945	chr8	72411350	72411372	chr1	232902073	232902094
chr19	58516941	58516962	chr9	111442930	111442953	chr1	23900289	23900310
chr2	103159794	103159816	chr9	126786677	126786688	chr1	23900897	23900918
chr2	10880753	10880774	chr9	129897310	129897332	chr1	32770597	32770618
chr2	109987662	109987683	chr9	25693154	25693177	chr1	39504712	39504734
chr2	110383822	110383843	chr9	76876314	76876335	chr1	46238485	46238506
chr2	120676215	120676237	chrX	52819012	52819035	chr1	50137891	50137912
chr2	135885723	135885744	chrY	13047155	13047176	chr1	829401	829424
chr2	20595609	20595631	chr1	116045805	116045826	chr1	87979064	87979086
chr2	236107275	236107296	chr1	120524331	120524352	chr10	103640573	103640594
chr2	239351905	239351928	chr1	148997917	148997938	chr10	14556424	14556445
chr2	72391531	72391553	chr1	151862959	151862980	chr10	38653807	38653828
chr2	74675848	74675869	chr1	167440689	167440711	chr10	3970671	3970692
chr20	33197447	33197469	chr1	168115603	168115624	chr10	42269302	42269323
chr21	43796715	43796736	chr1	169785952	169786113	chr10	43355963	43355984
chr22	26472914	26472936	chr1	229636941	229636962	chr10	47378440	47378461
chr22	37940693	37940714	chr1	242646002	242646023	chr10	81680456	81680477
chr22	39658965	39658986	chr1	443485711	443485932	chr11	109342912	109342933
chr3	102092084	102092107	chr1	97897476	97897497	chr11	110768898	110768919
chr3	112104244	112104265	chr10	23165804	23165826	chr11	112180008	112180030
chr3	128744556	128744578	chr10	63315407	63315429	chr11	117348819	117348840

[0254]

chr3	129998664	129998685	chr10	66751522	66751544	chr11	18804780	18804801
chr3	138079920	138079941	chr10	6801553	6801574	chr11	62428859	62428880
chr3	179263349	179263370	chr10	98369695	98369716	chr11	64466273	64466296
chr3	38739520	38739542	chr10	99617183	99617204	chr11	6694240	6694261
chr4	11149833	11149854	chr12	103184001	103184022	chr12	110781714	110781736
chr4	124096134	124096155	chr12	112407576	112407597	chr12	110781715	110781736
chr4	146955938	146955960	chr12	117070062	117070083	chr12	115205603	115205624
chr4	170026553	170026575	chr12	51663013	51663035	chr12	127231134	127231155
chr5	181429655	181429678	chr12	59396770	59396791	chr12	129670615	129670636
chr5	21493460	21493481	chr13	111941611	111941634	chr12	15037363	15037384
chr5	34180704	34180725	chr13	20226701	20226723	chr12	52077141	52077162
chr5	67085319	67085340	chr13	31559301	31559322	chr12	6450200	6450221
chr5	82277802	82277825	chr13	54350438	54350459	chr13	112323893	112323916
chr6	149983169	149983192	chr14	100534376	100534398	chr13	67503995	67504017
chr6	150045094	150045117	chr14	103374438	103374459	chr15	100202177	100202198
chr6	170705255	170705278	chr14	63612101	63612122	chr15	44096819	44096840
chr6	40326950	40326971	chr14	94924114	94924137	chr15	94677590	94677612
chr7	156943597	156943618	chr14	97887975	97887996	chr16	20465679	20465702
chr7	157804520	157804541	chr15	66786266	66786287	chr16	20559262	20559285
chr7	41188633	41188654	chr15	82138605	82138627	chr16	32423276	32423297
chr8	102946	102969	chr15	88831872	88831894	chr16	53342629	53342650
chr8	111164312	111164334	chr16	26819249	26819271	chr16	66650888	66650909
chr9	111573096	111573118	chr16	62282993	62283016	chr16	85592850	85592871
chr9	129078778	129078799	chr16	74719101	74719122	chr16	87314891	87314913

[0255]

chr9	38871672	38871693	chr17	33572853	33572874	chr17	47655542	47655564
chr9	62096099	62096120	chr18	28806699	28806720	chr17	64039697	64039720
chr9	67492262	67492283	chr18	39821341	39821363	chr17	64818903	64818924
chr9	68460951	68460972	chr19	15031517	15031539	chr17	65106815	65106836
chr9	76787902	76787925	chr19	2884427	2884448	chr17	65447014	65447035
chrX	50395284	50395305	chr19	54704669	54704690	chr17	80882551	80882573
chrX	73763565	73763587	chr2	165176189	165176211	chr18	1469234	1469255
chrX	91536775	91536797	chr2	165296010	165296032	chr18	57837950	57837971
chrY	4778305	4778327	chr2	166073416	166073438	chr18	70384586	70384607
chr1	1047408	1047431	chr2	166311557	166311579	chr19	44473808	44473829
chr1	112272803	112272825	chr2	178928872	178928893	chr19	52740558	52740579
chr1	49353896	49353917	chr2	205437736	205437758	chr2	10064549	10064571
chr10	14093021	14093044	chr2	227782297	227782319	chr2	125400498	125400520
chr10	29199574	29199595	chr2	233662547	233662569	chr2	136156621	136156642
chr11	119381098	119381119	chr2	35864586	35864607	chr2	143967721	143967744
chr11	65057934	65057957	chr2	5417088	5417109	chr2	160404642	160404664
chr11	69777246	69777268	chr2	86491497	86491518	chr2	166284805	166284827
chr12	27945151	27945172	chr20	14319152	14319173	chr2	171274970	171274991
chr12	44794503	44794525	chr22	49344269	49344291	chr2	230313351	230313373
chr13	106331657	106331678	chr3	146246154	146246175	chr2	2695712	2695733
chr14	36719207	36719228	chr3	168393781	168393802	chr2	91895965	91895986
chr15	31179489	31179511	chr3	46155606	46155627	chr20	20797859	20797880
chr16	89566197	89566218	chr4	113280490	113280512	chr20	24493828	24493849
chr17	47055562	47055583	chr4	64749297	64749319	chr20	36236087	36236108

[0256]

chr18	78628737	78628760	chr4	85568706	85568727	chr20	45857529	45857550
chr19	43302685	43302706	chr5	107449451	107449473	chr20	48461342	48461363
chr2	238381749	238381770	chr5	121012150	121012171	chr20	57807620	57807641
chr2	49922189	49922211	chr5	1326658	1326680	chr20	59590440	59590461
chr2	66528955	66528976	chr5	1326687	1326709	chr22	16441864	16441885
chr2	7429233	7429255	chr5	79949732	79949753	chr22	33423179	33423200
chr20	10672943	10672966	chr5	81104790	81104812	chr22	37134063	37134085
chr20	35503270	35503293	chr5	91214887	91214908	chr3	123222955	123222976
chr20	38705488	38705509	chr6	152753587	152753609	chr3	95912639	95912660
chr22	29517883	29517904	chr6	50510462	50510485	chr4	102914035	102914056
chr22	32199466	32199489	chr6	7798609	7798630	chr4	137452393	137452414
chr3	194681445	194681466	chr7	145991153	145991174	chr4	163945894	163945916
chr3	25816028	25816049	chr7	77347062	77347085	chr4	1815215	1815236
chr3	38793779	38793801	chr7	77614538	77614560	chr4	20252878	20252900
chr3	43078355	43078376	chr8	58860663	58860684	chr4	25487429	25487450
chr3	5504577	5504598	chrY	9215006	9215027	chr4	41329119	41329140
chr4	154399772	154399793	chr1	153330925	153330946	chr4	41330183	41330205
chr5	18754355	18754376	chr1	179068821	179068843	chr5	126853309	126853330
chr5	1876942	1876964	chr1	193317003	193317025	chr5	135643584	135643607
chr5	23859463	23859486	chr1	201175016	201175038	chr5	144484681	144484703
chr6	131386169	131386190	chr1	229761813	229761834	chr5	149320088	149320109
chr6	157848702	157848723	chr1	236611925	236611946	chr5	34543122	34543143
chr7	144505858	144505879	chr1	44003243	44003264	chr5	38374328	38374349
chr7	28106012	28106033	chr1	60484489	60484511	chr5	51582987	51583008

[0257]

chr7	5261424	5261446	chr1	77272589	77272611	chr5	51584136	51584157
chr7	56972149	56972171	chr1	99805299	99805321	chr5	5684323	5684344
chr7	63604777	63604799	chr10	7234091	7234112	chr5	95184977	95184998
chr9	11380189	11380210	chr11	124639215	124639237	chr6	10345815	10345837
chrX	74835062	74835083	chr11	128565919	128565940	chr6	111939969	111939990
chr1	113789694	113789716	chr11	32183988	32184009	chr6	144851102	144851123
chr1	151492228	151492250	chr11	98824964	98824985	chr6	169660524	169660545
chr1	174347445	174347667	chr12	52539784	52539807	chr6	44791613	44791636
chr1	237232784	237232806	chr13	53239100	53239123	chr6	54214841	54214862
chr1	51343936	51343958	chr13	67710449	67710471	chr6	85108470	85108493
chr1	62060283	62060305	chr14	101542861	101542882	chr7	101293356	101293377
chr10	12202452	12202474	chr14	94101963	94101986	chr7	101769888	101769909
chr10	34500129	34500150	chr15	53389064	53389085	chr7	71436053	71436074
chr10	908595	908617	chr15	59609984	59610006	chr7	77258325	77258348
chr10	97430628	97430649	chr16	83718885	83718908	chr8	103188339	103188360
chr11	131800586	131800608	chr17	13619613	13619634	chr8	58208948	58208971
chr11	45059654	45059675	chr18	1302211	1302234	chr8	90410702	90410725
chr11	46293596	46293618	chr18	34382228	34382250	chr9	16091078	16091101
chr11	67532922	67532943	chr2	136683476	136683499	chr9	87763613	87763634
chr11	68473701	68473723	chr2	166280389	166280411	chr9	89771805	89771827
chr11	76869199	76869221	chr20	21609437	21609459	chrX	114583997	114584020
chr11	76891737	76891759	chr3	15056861	15056883	chrX	24592372	24592393
chr11	85780949	85780971	chr3	162472197	162472218	chrX	26644776	26644797
chr11	88640473	88640495	chr3	192144038	192144059	chrX	55695885	55695906

[0258]

chr11	92366842	92366863	chr3	193972967	193972988	chrX	6695896	6695917
chr12	104031167	104031188	chr3	313186367	313186588	chrX	97311438	97311459
chr12	131154018	131154039	chr3	339287000	339287221	chrX	9977092	9977114
chr12	131507086	131507107	chr3	663479445	663479667	chrY	11353457	11353478
chr12	22210480	22210502	chr4	172137983	172138005	chr11	9031037	9031063
chr12	2412249	2412270	chr4	378323335	378323556	chr2	135142584	135142611
chr12	37569101	37569123	chr4	537084200	537084421	chr2	166281710	166281737
chr12	50209171	50209193	chr5	133278354	133278375	chr2	166286555	166286581
chr12	79672940	79672961	chr5	155337749	155337770	chr2	166286555	166286582
chr12	93641177	93641198	chr5	397829866	397830089	chr4	139864810	139864837
chr12	95672692	95672713	chr5	677147662	677147884	chr5	163173454	163173480
chr13	21222393	21222415	chr6	357300388	357300589	chr17	63959375	63959402
chr13	24651496	24651519	chr6	448114589	448114810	chr2	166278250	166278277
chr13	29651059	29651081	chr7	149925597	149925618	chr4	46082495	46082522
chr13	84115549	84115570	chr7	152767248	152767269	chr2	166284785	166284812
chr14	34994321	34994343	chr7	156408013	156408034	chr5	120440047	120440073
chr14	75554232	75554254	chr7	28741171	28741192	chrX	148562427	148562453
chr15	36211196	36211217	chr8	29989405	29989427	chr19	13426131	13426157
chr15	62122910	62122931	chr8	34718643	34718664	chr2	166284792	166284819
chr15	76793946	76793968	chr8	43134646	43134667	chr12	123248645	123248671
chr15	98022583	98022605	chr8	752973	752994	chr2	166284621	166284647
chr16	17114450	17114472	chr9	74554912	74554934	chr2	166284621	166284648
chr16	2398065	2398087	chr9	81540528	81540550	chr14	38705215	38705242
chr16	29733409	29733431	chrX	152649787	152649810	chr2	166293356	166293383

[0259]

chr16	56488215	56488237	chr1	108020984	108021006	chr2	165313740	165313766
chr16	81033918	81033940	chr1	157607538	157607560	chr2	166293225	166293252
chr17	22325036	22325058	chr1	51964038	51964059	chr11	95324148	95324174
chr17	27938284	27938305	chr1	75514790	75514811	chr12	107418063	107418089
chr17	28384097	28384119	chr10	48281408	48281430	chr12	51699625	51699652
chr17	45270070	45270092	chr11	116241444	116241465	chr13	105592802	105592828
chr17	56133866	56133888	chr11	30474472	30474493	chr2	165162747	165162773
chr18	12282949	12282971	chr12	129136215	129136236	chr2	165310378	165310404
chr18	38388400	38388422	chr13	22491824	22491845	chr2	166051907	166051933
chr19	36769800	36769822	chr13	48042239	48042260	chr2	166303220	166303247
chr19	57588377	57588398	chr13	76397102	76397123	chr2	217662908	217662934
chr2	162152161	162152184	chr14	72859229	72859251	chr2	226368493	226368519
chr2	23872600	23872621	chr14	87684513	87684536	chr6	68609343	68609369
chr2	239298584	239298606	chr15	39766578	39766601	chr7	30750602	30750628
chr2	46148451	46148472	chr16	1615112	1615133	chr2	166305804	166305831
chr2	88190010	88190032	chr16	48745003	48745024	chr3	38771291	38771318
chr20	25843288	25843310	chr18	57051391	57051412	chr3	38752265	38752292
chr20	26012592	26012614	chr19	51986606	51986627	chr7	10755206	10755234
chr20	34453128	34453149	chr19	52276544	52276565	chrX	133006058	133006084
chr21	42555302	42555323	chr2	130730007	130730028	chr3	38752213	38752240
chr3	23131297	23131319	chr2	166286321	166286343	chr3	38752415	38752442
chr3	38793741	38793763	chr2	184148698	184148721	chr8	28147462	28147488
chr3	39209399	39209421	chr2	44473938	44473960	chr3	38793739	38793766
chr3	43298469	43298491	chr2	69785973	69785994	chr3	38793953	38793980

[0260]

chr4	110374339	110374361	chr3	100151370	100151392	chr3	38750104	38750131
chr4	137160917	137160939	chr3	172830944	172830967	chr11	133729424	133729450
chr4	138259457	138259478	chr3	26459710	26459731	chr3	38771273	38771300
chr4	150215252	150215274	chr3	38378001	38378022	chr10	112503420	112503446
chr4	175317577	175317779	chr4	69868253	69868274	chr3	38757064	38757091
chr5	141200019	141200040	chr4	99790429	99790450	chr4	175998006	175998032
chr5	141309428	141309450	chr5	101634255	101634276	chr4	80646320	80646347
chr5	169045562	169045844	chr5	135085796	135085817	chrX	137807272	137807478
chr5	281466322	281466653	chr5	173714270	173714292	chr1	105835449	105835475
chr6	104556941	104556963	chr6	149482923	149482944	chr16	59275323	59275349
chr6	106988222	106988443	chr6	169223323	169223344	chr3	38739609	38739636
chr6	157813372	157813395	chr6	73397278	73397299	chr4	96421786	96421812
chr6	30975969	30975991	chr7	139412916	139412937	chr7	14395432	14395458
chr6	4531543	4531565	chr7	5354372	5354393	chr13	45392357	45392383
chr6	5716528	5716550	chr7	7420448	7420469	chr15	80242156	80242184
chr6	73055476	73055497	chr8	10154295	10154317	chr3	38739575	38739602

[0261] 结果

[0262] 靶向iPSC中的SCN9A和SCN10A的SpCas9和SaCas9 gRNA的筛选

[0263] 在iPSC中进行两轮gRNA筛选和测序分析之后,在考察每个gRNA的预测切割位点处插入和缺失(插入缺失)的总百分比下,基于每个样品的四次重复计算平均切割效率。出于敲除SCN9A和SCN10A基因的目的,还计算了将导致移码突变的插入缺失的平均百分比。按平均总插入缺失百分比和引起移码的平均插入缺失百分比对向导RNA排等级。基于引起移码的平均插入缺失百分比按等级顺序列出向导RNA,并且包括乱序的非靶向gRNA以及未处理的细胞作为阴性对照(表8-11)。

[0264] 表8:由靶向iPSC中的SCN9A的SpCas9 gRNA产生的平均总插入缺失百分比和引起移码的平均插入缺失百分比

[0265]

gRNA 名称	靶基因	标靶外显子	Cas9	平均总插入缺失百分比	引起移码的平均插入缺失百分比	基于总插入缺失的等级	基于引起移码的插入缺失的等级
Scn9a_Sp_ 外显子_11_T9	*SCN9A*	11	SpCas9	81.86%	76.55%	3	1
Scn9a_Sp_ 外显子_12_T25	*SCN9A*	12	SpCas9	80.50%	76.05%	4	2
Scn9a_Sp_ 外显子_11_T6	*SCN9A*	11	SpCas9	78.51%	74.56%	5	3
Scn9a_Sp_ 外显子_11_T11	*SCN9A*	11	SpCas9	83.29%	73.18%	1	4
Scn9a_Sp_ 外显子_12_T20	*SCN9A*	12	SpCas9	81.94%	73.08%	2	5
Scn9a_Sp_ 外显子_11_T14	*SCN9A*	11	SpCas9	76.90%	72.51%	8	6
Scn9a_Sp_ 外显子_11_T13	*SCN9A*	11	SpCas9	78.01%	70.14%	7	7
Scn9a_Sp_ 外显子_14_T1	*SCN9A*	14	SpCas9	75.27%	69.46%	9	8
Scn9a_Sp_ 外显子_7_T5	*SCN9A*	7	SpCas9	74.45%	69.19%	11	9
Scn9a_Sp_ 外显子_2_T10	*SCN9A*	2	SpCas9	73.68%	69.08%	12	10
Scn9a_Sp_ 外显子_12_T11	*SCN9A*	12	SpCas9	71.34%	69.01%	16	11
Scn9a_Sp_ 外显子_12_T17	*SCN9A*	12	SpCas9	75.20%	68.85%	10	12
Scn9a_Sp_ 外显子_12_T12	*SCN9A*	12	SpCas9	70.60%	67.13%	17	13
Scn9a_Sp_ 外显子_9_T10	*SCN9A*	9	SpCas9	70.41%	66.70%	18	14
Scn9a_Sp_ 外显子_11_T2	*SCN9A*	11	SpCas9	72.32%	64.90%	13	15
Scn9a_Sp_ 外显子_15_T1	*SCN9A*	15	SpCas9	70.07%	64.78%	19	16
Scn9a_Sp_ 外显子_9_T14	*SCN9A*	9	SpCas9	66.06%	60.75%	27	17
Scn9a_Sp_ 外显子 12_T28	*SCN9A*	12	SpCas9	68.39%	60.72%	20	18
Scn9a_Sp_ 外显子_12_T13	*SCN9A*	12	SpCas9	64.19%	60.35%	31	19

[0266]

Scn9a_Sp_外显子_11_T5	*SCN9A*	11	SpCas9	71.86%	59.88%	15	20
Scn9a_Sp_外显子_12_T24	*SCN9A*	12	SpCas9	68.22%	58.77%	22	21
Scn9a_Sp_外显子_2_T2	*SCN9A*	2	SpCas9	62.59%	58.70%	35	22
Scn9a_Sp_外显子_12_T21	*SCN9A*	12	SpCas9	78.19%	58.69%	6	23
Scn9a_Sp_外显子 12_T27	*SCN9A*	12	SpCas9	67.28%	58.34%	25	24
Scn9a_Sp_外显子_9_T11	*SCN9A*	9	SpCas9	63.22%	57.35%	34	25
Scn9a_Sp_外显子_12_T1	*SCN9A*	12	SpCas9	61.57%	57.18%	37	26
Scn9a_Sp_外显子_12_T23	*SCN9A*	12	SpCas9	64.98%	56.37%	29	27
Scn9a_Sp_外显子_14_T3	*SCN9A*	14	SpCas9	68.34%	55.35%	21	28
Scn9a_Sp_外显子_10_T2	*SCN9A*	10	SpCas9	64.20%	54.01%	30	29
Scn9a_Sp_外显子_12_T4	*SCN9A*	12	SpCas9	61.66%	53.77%	36	30
Scn9a_Sp_外显子_12_T8	*SCN9A*	12	SpCas9	59.99%	53.24%	41	31
Scn9a_Sp_外显子_11_T10	*SCN9A*	11	SpCas9	59.73%	52.88%	42	32
Scn9a_Sp_外显子_2_T14	*SCN9A*	2	SpCas9	63.45%	52.60%	32	33
Scn9a_Sp_外显子_5_T3	*SCN9A*	5	SpCas9	56.95%	51.72%	49	34
Scn9a_Sp_外显子_12_T2	*SCN9A*	12	SpCas9	57.05%	51.39%	48	35
Scn9a_Sp_外显子_11_T15	*SCN9A*	11	SpCas9	67.51%	51.11%	24	36
Scn9a_Sp_外显子_11_T3	*SCN9A*	11	SpCas9	54.46%	50.05%	54	37
Scn9a_Sp_外显子_9_T6	*SCN9A*	9	SpCas9	63.44%	49.88%	33	38
Scn9a_Sp_外显子_9_T5	*SCN9A*	9	SpCas9	53.89%	49.71%	56	39
Scn9a_Sp_外显子_7_T2	*SCN9A*	7	SpCas9	54.86%	47.44%	52	40
Scn9a_Sp_外显子_2_T4	*SCN9A*	2	SpCas9	57.70%	46.83%	47	41

[0267]

Scn9a_Sp_外显子_2_T1	*SCN9A*	2	SpCas9	66.37%	45.78%	26	42
Scn9a_Sp_外显子_9_T2	*SCN9A*	9	SpCas9	58.26%	45.73%	46	43
Scn9a_Sp_外显子_4_T5	*SCN9A*	4	SpCas9	49.69%	45.71%	62	44
Scn9a_Sp_外显子_7_T6	*SCN9A*	7	SpCas9	60.22%	45.52%	40	45
Scn9a_Sp_外显子_12_T10	*SCN9A*	12	SpCas9	53.94%	45.27%	55	46
Scn9a_Sp_外显子_4_T3	*SCN9A*	4	SpCas9	50.92%	45.04%	58	47
Scn9a_Sp_外显子_11_T12	*SCN9A*	11	SpCas9	59.05%	43.60%	45	48
Scn9a_Sp_外显子_9_T13	*SCN9A*	9	SpCas9	60.77%	43.49%	39	49
Scn9a_Sp_外显子_11_T7	*SCN9A*	11	SpCas9	50.76%	43.49%	59	50
Scn9a_Sp_外显子_15_T2	*SCN9A*	15	SpCas9	59.54%	43.34%	44	51
Scn9a_Sp_外显子_12_T16	*SCN9A*	12	SpCas9	61.29%	42.92%	38	52
Scn9a_Sp_外显子_12_T19	*SCN9A*	12	SpCas9	59.59%	42.45%	43	53
Scn9a_Sp_外显子_2_T15	*SCN9A*	2	SpCas9	44.47%	41.45%	67	54
Scn9a_Sp_外显子_14_T2	*SCN9A*	14	SpCas9	46.19%	40.97%	64	55
Scn9a_Sp_外显子_2_T13	*SCN9A*	2	SpCas9	55.38%	40.79%	51	56
Scn9a_Sp_外显子_9_T12	*SCN9A*	9	SpCas9	44.16%	39.70%	68	57
Scn9a_Sp_外显子_9_T4	*SCN9A*	9	SpCas9	50.13%	39.54%	61	58
Scn9a_Sp_外显子_2_T11	*SCN9A*	2	SpCas9	53.70%	39.17%	57	59
Scn9a_Sp_外显子_10_T5	*SCN9A*	10	SpCas9	55.73%	38.73%	50	60
Scn9a_Sp_外显子_5_T1	*SCN9A*	5	SpCas9	66.04%	37.17%	28	61
Scn9a_Sp_外显子 12_T7	*SCN9A*	12	SpCas9	72.23%	37.12%	14	62
Scn9a_Sp_外显子_7_T1	*SCN9A*	7	SpCas9	50.50%	37.01%	60	63

[0268]

Scn9a_Sp_外显子_15_T3	*SCN9A*	15	SpCas9	54.50%	36.77%	53	64
Scn9a_Sp_外显子_12_T3	*SCN9A*	12	SpCas9	42.40%	35.16%	71	65
Scn9a_Sp_外显子_7_T3	*SCN9A*	7	SpCas9	46.33%	34.84%	63	66
Scn9a_Sp_外显子_9_T9	*SCN9A*	9	SpCas9	38.80%	34.59%	77	67
Scn9a_Sp_外显子_5_T2	*SCN9A*	5	SpCas9	39.80%	34.24%	74	68
Scn9a_Sp_外显子_2_T9	*SCN9A*	2	SpCas9	45.47%	33.41%	65	69
Scn9a_Sp_外显子 12_T9	*SCN9A*	12	SpCas9	38.68%	33.01%	79	70
Scn9a_Sp_外显子_12_T5	*SCN9A*	12	SpCas9	33.67%	31.96%	82	71
Scn9a_Sp_外显子_14_T5	*SCN9A*	14	SpCas9	44.55%	31.78%	66	72
Scn9a_Sp_外显子_2_T8	*SCN9A*	2	SpCas9	38.76%	31.73%	78	73
Scn9a_Sp_外显子_9_T15	*SCN9A*	9	SpCas9	39.98%	31.56%	73	74
Scn9a_Sp_外显子 12_T14	*SCN9A*	12	SpCas9	33.90%	31.22%	81	75
Scn9a_Sp_外显子_2_T12	*SCN9A*	2	SpCas9	39.76%	31.02%	75	76
Scn9a_Sp_外显子 12_T18	*SCN9A*	12	SpCas9	68.21%	30.76%	23	77
Scn9a_Sp_外显子 12_T15	*SCN9A*	12	SpCas9	39.07%	30.33%	76	78
Scn9a_Sp_外显子_12_T26	*SCN9A*	12	SpCas9	43.78%	30.13%	70	79
Scn9a_Sp_外显子_5_T4	*SCN9A*	5	SpCas9	38.57%	27.51%	80	80
Scn9a_Sp_外显子_12_T6	*SCN9A*	12	SpCas9	31.83%	26.92%	84	81
Scn9a_Sp_外显子_9_T1	*SCN9A*	9	SpCas9	40.20%	25.44%	72	82
Scn9a_Sp_外显子_2_T7	*SCN9A*	2	SpCas9	33.06%	25.35%	83	83
Scn9a_Sp_外显子_4_T7	*SCN9A*	4	SpCas9	26.35%	24.78%	88	84
Scn9a_Sp_外显子_4_T1	*SCN9A*	4	SpCas9	28.34%	23.77%	86	85

[0269]

Scn9a_Sp_外显子_2_T3	*SCN9A*	2	SpCas9	44.01%	23.46%	69	86
Scn9a_Sp_外显子_12_T22	*SCN9A*	12	SpCas9	24.59%	22.80%	92	87
Scn9a_Sp_外显子_14_T4	*SCN9A*	14	SpCas9	27.07%	22.67%	87	88
Scn9a_Sp_外显子_4_T2	*SCN9A*	4	SpCas9	25.94%	22.12%	89	89
Scn9a_Sp_外显子_4_T4	*SCN9A*	4	SpCas9	24.59%	19.81%	93	90
Scn9a_Sp_外显子_2_T5	*SCN9A*	2	SpCas9	21.60%	19.28%	95	91
Scn9a_Sp_外显子_9_T3	*SCN9A*	9	SpCas9	24.82%	18.98%	90	92
Scn9a_Sp_外显子_9_T8	*SCN9A*	9	SpCas9	31.39%	18.79%	85	93
Scn9a_Sp_外显子_10_T4	*SCN9A*	10	SpCas9	22.68%	16.55%	94	94
Scn9a_Sp_外显子_9_T7	*SCN9A*	9	SpCas9	24.72%	15.94%	91	95
Scn9a_Sp_外显子_14_T6	*SCN9A*	14	SpCas9	17.72%	12.91%	96	96
Scn9a_Sp_外显子_4_T6	*SCN9A*	4	SpCas9	9.53%	7.42%	97	97
Scn9a_Sp_外显子_2_T6	*SCN9A*	2	SpCas9	7.09%	5.35%	98	98
Scn9a_Sp_外显子_10_T1	*SCN9A*	10	SpCas9	1.29%	1.22%	99	99
乱序对照	N/A	N/A	SpCas9	0.27%	0.23%	N/A	N/A
未处理	N/A	N/A	N/A	0.18%	0.16%	N/A	N/A

[0270] 表9:由靶向iPSC中的SCN9A的SaCas9 gRNA产生的平均总插入缺失百分比和引起移码的平均插入缺失百分比

[0271]

gRNA 名称	靶基因	靶外显子	Cas9	平均总插入缺失百分比	引起移码的平均插入缺失百分比	基于总插入缺失的等级	基于引起移码的插入缺失的等级
Scn9a_Sa_外显子_11_T3	*SCN9A*	11	SaCas9	55.50%	49.49%	2	1
Scn9a_Sa_外显子_12_T2	*SCN9A*	12	SaCas9	61.96%	49.44%	1	2
Scn9a_Sa_外显子_5_T6	*SCN9A*	5	SaCas9	54.10%	42.37%	3	3
Scn9a_Sa_外显子_9_T3	*SCN9A*	9	SaCas9	48.41%	34.60%	4	4
Scn9a_Sa_外显子_13_T3	*SCN9A*	13	SaCas9	42.29%	33.08%	5	5
Scn9a_Sa_外显子_12_T1	*SCN9A*	12	SaCas9	33.66%	28.42%	7	6
Scn9a_Sa_外显子_7_T1	*SCN9A*	7	SaCas9	30.86%	25.39%	8	7
Scn9a_Sa_外显子_9_T2	*SCN9A*	9	SaCas9	27.99%	24.43%	11	8
Scn9a_Sa_外显子_15_T3	*SCN9A*	15	SaCas9	28.33%	23.51%	10	9
Scn9a_Sa_外显子_9_T1	*SCN9A*	9	SaCas9	41.10%	21.52%	6	10
Scn9a_Sa_外显子_12_T3	*SCN9A*	12	SaCas9	24.81%	20.49%	16	11
Scn9a_Sa_外显子_7_T5	*SCN9A*	7	SaCas9	25.26%	20.32%	15	12
Scn9a_Sa_外显子_14_T1	*SCN9A*	14	SaCas9	20.70%	19.06%	20	13
Scn9a_Sa_外显子_2_T2	*SCN9A*	2	SaCas9	23.85%	18.85%	18	14

[0272]

Scn9a_Sa_外显子_11_T1	*SCN9A*	11	SaCas9	26.58%	17.84%	14	15
Scn9a_Sa_外显子_8_T2	*SCN9A*	8	SaCas9	27.04%	16.09%	13	16
Scn9a_Sa_外显子_9_T4	*SCN9A*	9	SaCas9	21.90%	15.56%	19	17
Scn9a_Sa_外显子_15_T6	*SCN9A*	15	SaCas9	19.09%	15.54%	22	18
Scn9a_Sa_外显子_12_T4	*SCN9A*	12	SaCas9	28.51%	14.30%	9	19
Scn9a_Sa_外显子_5_T1	*SCN9A*	5	SaCas9	17.45%	14.16%	23	20
Scn9a_Sa_外显子_5_T3	*SCN9A*	5	SaCas9	16.87%	13.67%	24	21
Scn9a_Sa_外显子_11_T4	*SCN9A*	11	SaCas9	14.96%	12.34%	26	22
Scn9a_Sa_外显子_5_T2	*SCN9A*	5	SaCas9	20.59%	10.46%	21	23
Scn9a_Sa_外显子_7_T6	*SCN9A*	7	SaCas9	12.55%	9.60%	27	24
Scn9a_Sa_外显子_11_T6	*SCN9A*	11	SaCas9	27.75%	9.21%	12	25
Scn9a_Sa_外显子_12_T5	*SCN9A*	12	SaCas9	16.55%	8.77%	25	26
Scn9a_Sa_外显子_4_T4	*SCN9A*	4	SaCas9	9.89%	8.22%	30	27
Scn9a_Sa_外显子_11_T2	*SCN9A*	11	SaCas9	24.15%	6.75%	17	28
Scn9a_Sa_外显子_13_T1	*SCN9A*	13	SaCas9	9.03%	6.63%	32	29

[0273]

Scn9a_Sa_外显子_10_T2	*SCN9A*	10	SaCas9	12.12%	6.59%	29	30
Scn9a_Sa_外显子_10_T1	*SCN9A*	10	SaCas9	8.74%	6.55%	33	31
Scn9a_Sa_外显子_2_T1	*SCN9A*	2	SaCas9	9.69%	6.54%	31	32
Scn9a_Sa_外显子_5_T4	*SCN9A*	5	SaCas9	12.16%	6.43%	28	33
Scn9a_Sa_外显子_4_T7	*SCN9A*	4	SaCas9	7.54%	6.35%	36	34
Scn9a_Sa_外显子_15_T5	*SCN9A*	15	SaCas9	8.00%	5.84%	35	35
Scn9a_Sa_外显子_5_T5	*SCN9A*	5	SaCas9	7.19%	5.07%	37	36
Scn9a_Sa_外显子_14_T2	*SCN9A*	14	SaCas9	6.97%	4.96%	39	37
Scn9a_Sa_外显子_6_T5	*SCN9A*	6	SaCas9	5.78%	4.90%	42	38
Scn9a_Sa_外显子_15_T7	*SCN9A*	15	SaCas9	8.29%	4.68%	34	39
Scn9a_Sa_外显子_13_T4	*SCN9A*	13	SaCas9	5.71%	4.33%	44	40
Scn9a_Sa_外显子_5_T7	*SCN9A*	5	SaCas9	6.54%	4.33%	40	41
Scn9a_Sa_外显子_14_T6	*SCN9A*	14	SaCas9	5.88%	4.17%	41	42
Scn9a_Sa_外显子_4_T6	*SCN9A*	4	SaCas9	7.13%	4.00%	38	43
Scn9a_Sa_外显子_13_T2	*SCN9A*	13	SaCas9	4.50%	3.54%	46	44

[0274]

Scn9a_Sa_外显子_4_T5	*SCN9A*	4	SaCas9	5.75%	3.42%	43	45
Scn9a_Sa_外显子_10_T3	*SCN9A*	10	SaCas9	4.96%	3.34%	45	46
Scn9a_Sa_外显子_8_T1	*SCN9A*	8	SaCas9	3.76%	3.00	48	47
Scn9a_Sa_外显子_7_T4	*SCN9A*	7	SaCas9	4.43%	2.72%	47	48
Scn9a_Sa_外显子_15_T4	*SCN9A*	15	SaCas9	3.31%	2.53%	49	49
Scn9a_Sa_外显子_11_T5	*SCN9A*	11	SaCas9	1.53%	1.28%	51	50
Scn9a_Sa_外显子_15_T1	*SCN9A*	15	SaCas9	1.69%	1.17%	50	51
Scn9a_Sa_外显子_3_T1	*SCN9A*	3	SaCas9	1.40%	1.05%	52	52
Scn9a_Sa_外显子_15_T2	*SCN9A*	15	SaCas9	1.27%	0.83%	53	53
Scn9a_Sa_外显子_2_T3	*SCN9A*	2	SaCas9	1.18%	0.79%	54	54
Scn9a_Sa_外显子_14_T7	*SCN9A*	14	SaCas9	0.54%	0.48%	56	55
Scn9a_Sa_外显子_4_T1	*SCN9A*	4	SaCas9	0.40%	0.40%	57	56
Scn9a_Sa_外显子_6_T2	*SCN9A*	6	SaCas9	0.27%	0.24%	60	57
Scn9a_Sa_外显子_7_T7	*SCN9A*	7	SaCas9	0.26%	0.22%	61	58
Scn9a_Sa_外显子_7_T2	*SCN9A*	7	SaCas9	0.27%	0.22%	59	59

[0275]

Scn9a_Sa_外显子_7_T8	*SCN9A*	7	SaCas9	0.22%	0.21%	62	60
Scn9a_Sa_外显子_14_T4	*SCN9A*	14	SaCas9	0.96%	0.20%	55	61
Scn9a_Sa_外显子_14_T8	*SCN9A*	14	SaCas9	0.31%	0.18%	58	62
Scn9a_Sa_外显子_14_T10	*SCN9A*	14	SaCas9	0.16%	0.15%	64	63
Scn9a_Sa_外显子_14_T3	*SCN9A*	14	SaCas9	0.17%	0.14%	63	64
Scn9a_Sa_外显子_2_T4	*SCN9A*	2	SaCas9	0.15%	0.10%	65	65
Scn9a_Sa_外显子_8_T3	*SCN9A*	8	SaCas9	0.09%	0.09%	66	66
Scn9a_Sa_外显子_14_T5	*SCN9A*	14	SaCas9	0.04%	0.04%	67	67
Scn9a_Sa_外显子_14_T9	*SCN9A*	14	SaCas9	0.02%	0.02%	68	68
乱序对照	N/A	N/A	SaCas9	0.27%	0.23%	N/A	N/A
未处理	N/A	N/A	N/A	0.18%	0.16%	N/A	N/A

[0276] 表10:由靶向iPSC中的SCN10A的SpCas9 gRNA产生的平均总插入缺失百分比和引起移码的平均插入缺失百分比

[0277]

gRNA 名称	靶基因	靶外显子	Cas9	平均总插入缺失百分比	引起移码的平均插入缺失百分比	基于总插入缺失的等级	基于引起移码的插入缺失的等级
Scn10a_Sp_外显子_1_T15	*SCN10A*	1	SpCas9	75.77%	73.46%	1	1
Scn10a_Sp_外显子_9_T2	*SCN10A*	9	SpCas9	70.79%	67.64%	5	2
Scn10a_Sp_外显子_14_T3	*SCN10A*	14	SpCas9	75.21%	67.26%	2	3
Scn10a_Sp_外显子_10_T7	*SCN10A*	10	SpCas9	69.16%	66.79%	7	4
Scn10a_Sp_外显子_7_T6	*SCN10A*	7	SpCas9	69.47%	65.31%	6	5
Scn10a_Sp_外显子_1_T30	*SCN10A*	1	SpCas9	68.89%	63.21%	8	6
Scn10a_Sp_外显子_11_T10	*SCN10A*	11	SpCas9	72.63%	62.38%	3	7
Scn10a_Sp_外显子_1_T17	*SCN10A*	1	SpCas9	64.42%	61.62%	18	8
Scn10a_Sp_外显子_4_T2	*SCN10A*	4	SpCas9	66.31%	61.10%	12	9
Scn10a_Sp_外显子_10_T3	*SCN10A*	10	SpCas9	66.83%	60.57%	9	10
Scn10a_Sp_外显子_8_T3	*SCN10A*	8	SpCas9	66.35%	59.76%	11	11
Scn10a_Sp_外显子_1_T18	*SCN10A*	1	SpCas9	65.19%	59.51%	15	12
Scn10a_Sp_外显子_1_T16	*SCN10A*	1	SpCas9	66.52%	59.43%	10	13
Scn10a_Sp_外显子_11_T24	*SCN10A*	11	SpCas9	62.43%	58.84%	24	14

[0278]

Scn10a_Sp_外显子_12_T3	*SCN10A*	12	SpCas9	64.78%	58.60%	17	15
Scn10a_Sp_外显子_8_T8	*SCN10A*	8	SpCas9	65.43%	58.01%	14	16
Scn10a_Sp_外显子_4_T4	*SCN10A*	4	SpCas9	61.86%	57.86%	25	17
Scn10a_Sp_外显子_1_T14	*SCN10A*	1	SpCas9	63.17%	57.59%	22	18
Scn10a_Sp_外显子_14_T1	*SCN10A*	14	SpCas9	71.62%	56.93%	4	19
Scn10a_Sp_外显子_13_T4	*SCN10A*	13	SpCas9	61.76%	55.63%	26	20
Scn10a_Sp_外显子_8_T10	*SCN10A*	8	SpCas9	60.22%	54.64%	33	21
Scn10a_Sp_外显子_7_T2	*SCN10A*	7	SpCas9	60.19%	54.34%	34	22
Scn10a_Sp_外显子_13_T5	*SCN10A*	13	SpCas9	57.14%	53.58%	44	23
Scn10a_Sp_外显子_10_T2	*SCN10A*	10	SpCas9	58.03%	53.29%	38	24
Scn10a_Sp_外显子_7_T7	*SCN10A*	7	SpCas9	56.45%	52.36%	48	25
Scn10a_Sp_外显子_13_T17	*SCN10A*	13	SpCas9	56.62%	51.99%	47	26
Scn10a_Sp_外显子_9_T14	*SCN10A*	9	SpCas9	63.41%	51.82%	20	27
Scn10a_Sp_外显子_1_T25	*SCN10A*	1	SpCas9	60.51%	51.36%	32	28
Scn10a_Sp_外显子_12_T6	*SCN10A*	12	SpCas9	56.11%	50.72%	50	29

[0279]

Scn10a_Sp_外显子_12_T8	*SCN10A*	12	SpCas9	57.60%	50.69%	41	30
Scn10a_Sp_外显子_2_T3	*SCN10A*	2	SpCas9	63.38%	50.51%	21	31
Scn10a_Sp_外显子_13_T18	*SCN10A*	13	SpCas9	57.69%	49.95%	40	32
Scn10a_Sp_外显子_11_T14	*SCN10A*	11	SpCas9	59.24%	49.80%	36	33
Scn10a_Sp_外显子_11_T19	*SCN10A*	11	SpCas9	53.70%	49.80%	67	34
Scn10a_Sp_外显子_13_T9	*SCN10A*	13	SpCas9	65.73%	49.73%	13	35
Scn10a_Sp_外显子_8_T1	*SCN10A*	8	SpCas9	56.68%	49.55%	46	36
Scn10a_Sp_外显子_1_T10	*SCN10A*	1	SpCas9	54.89%	49.53%	60	37
Scn10a_Sp_外显子_2_T7	*SCN10A*	2	SpCas9	60.11%	49.29%	35	38
Scn10a_Sp_外显子_11_T25	*SCN10A*	11	SpCas9	62.96%	49.26%	23	39
Scn10a_Sp_外显子_1_T3	*SCN10A*	1	SpCas9	55.92%	48.35%	51	40
Scn10a_Sp_外显子_14_T2	*SCN10A*	14	SpCas9	57.55%	48.19%	42	41
Scn10a_Sp_外显子_10_T10	*SCN10A*	10	SpCas9	52.18%	48.08%	77	42
Scn10a_Sp_外显子_13_T13	*SCN10A*	13	SpCas9	54.65%	47.73%	61	43
Scn10a_Sp_外显子_11_T28	*SCN10A*	11	SpCas9	60.69%	47.45%	31	44

[0280]

Scn10a_Sp_外显子_5_T4	*SCN10A*	5	SpCas9	50.66%	47.09%	87	45
Scn10a_Sp_外显子_9_T3	*SCN10A*	9	SpCas9	51.41%	46.55%	81	46
Scn10a_Sp_外显子_2_T5	*SCN10A*	2	SpCas9	50.44%	46.45%	88	47
Scn10a_Sp_外显子_5_T1	*SCN10A*	5	SpCas9	52.12%	46.30%	78	48
Scn10a_Sp_外显子_11_T16	*SCN10A*	11	SpCas9	60.99%	45.94%	30	49
Scn10a_Sp_外显子_11_T18	*SCN10A*	11	SpCas9	61.41%	45.75%	28	50
Scn10a_Sp_外显子_4_T1	*SCN10A*	4	SpCas9	54.98%	45.45%	58	51
Scn10a_Sp_外显子_12_T5	*SCN10A*	12	SpCas9	61.45%	45.41%	27	52
Scn10a_Sp_外显子_2_T8	*SCN10A*	2	SpCas9	54.37%	45.09%	63	53
Scn10a_Sp_外显子_11_T21	*SCN10A*	11	SpCas9	55.63%	44.13%	54	54
Scn10a_Sp_外显子_11_T17	*SCN10A*	11	SpCas9	54.96%	44.09%	59	55
Scn10a_Sp_外显子_11_T15	*SCN10A*	11	SpCas9	48.65%	44.08%	95	56
Scn10a_Sp_外显子_13_T19	*SCN10A*	13	SpCas9	51.06%	43.61%	83	57
Scn10a_Sp_外显子_6_T3	*SCN10A*	6	SpCas9	54.41%	43.58%	62	58
Scn10a_Sp_外显子_10_T1	*SCN10A*	10	SpCas9	57.92%	43.50%	39	59

[0281]

Scn10a_Sp_外显子_11_T11	*SCN10A*	11	SpCas9	55.69%	43.45%	53	60
Scn10a_Sp_外显子_10_T6	*SCN10A*	10	SpCas9	49.04%	43.14%	93	61
Scn10a_Sp_外显子_12_T7	*SCN10A*	12	SpCas9	52.96%	43.13%	71	62
Scn10a_Sp_外显子_1_T5	*SCN10A*	1	SpCas9	48.50%	43.07%	97	63
Scn10a_Sp_外显子_13_T16	*SCN10A*	13	SpCas9	50.90%	42.78%	86	64
Scn10a_Sp_外显子_9_T13	*SCN10A*	9	SpCas9	64.98%	42.52%	16	65
Scn10a_Sp_外显子_6_T7	*SCN10A*	6	SpCas9	58.51%	42.38%	37	66
Scn10a_Sp_外显子_7_T4	*SCN10A*	7	SpCas9	52.52%	42.37%	75	67
Scn10a_Sp_外显子_9_T4	*SCN10A*	9	SpCas9	53.88%	42.24%	66	68
Scn10a_Sp_外显子_9_T9	*SCN10A*	9	SpCas9	52.53%	42.19%	74	69
Scn10a_Sp_外显子_10_T9	*SCN10A*	10	SpCas9	47.84%	42.05%	100	70
Scn10a_Sp_外显子_8_T2	*SCN10A*	8	SpCas9	47.46%	41.70%	102	71
Scn10a_Sp_外显子_1_T9	*SCN10A*	1	SpCas9	50.32%	41.44%	90	72
Scn10a_Sp_外显子_13_T15	*SCN10A*	13	SpCas9	55.09%	41.15%	57	73
Scn10a_Sp_外显子_1_T26	*SCN10A*	1	SpCas9	48.17%	40.83%	99	74

[0282]

Scn10a_Sp_外显子_6_T8	*SCN10A*	6	SpCas9	50.36%	40.76%	89	75
Scn10a_Sp_外显子_1_T4	*SCN10A*	1	SpCas9	51.44%	40.43%	80	76
Scn10a_Sp_外显子_11_T22	*SCN10A*	11	SpCas9	52.25%	40.22%	76	77
Scn10a_Sp_外显子_1_T8	*SCN10A*	1	SpCas9	50.94%	40.09%	85	78
Scn10a_Sp_外显子_1_T28	*SCN10A*	1	SpCas9	55.88%	40.04%	52	79
Scn10a_Sp_外显子_1_T23	*SCN10A*	1	SpCas9	48.87%	39.94%	94	80
Scn10a_Sp_外显子_12_T14	*SCN10A*	12	SpCas9	53.67%	39.85%	68	81
Scn10a_Sp_外显子_10_T5	*SCN10A*	10	SpCas9	45.47%	39.07%	104	82
Scn10a_Sp_外显子_8_T9	*SCN10A*	8	SpCas9	53.65%	38.83%	69	83
Scn10a_Sp_外显子_10_T4	*SCN10A*	10	SpCas9	53.90%	38.71%	65	84
Scn10a_Sp_外显子_2_T6	*SCN10A*	2	SpCas9	45.38%	38.38%	105	85
Scn10a_Sp_外显子_8_T6	*SCN10A*	8	SpCas9	57.30%	38.26%	43	86
Scn10a_Sp_外显子_12_T9	*SCN10A*	12	SpCas9	42.87%	38.17%	107	87
Scn10a_Sp_外显子_2_T10	*SCN10A*	2	SpCas9	47.78%	37.61%	101	88
Scn10a_Sp_外显子_12_T1	*SCN10A*	12	SpCas9	49.42%	36.83%	91	89

[0283]

Scn10a_Sp_外显子_14_T4	*SCN10A*	14	SpCas9	61.35%	35.92%	29	90
Scn10a_Sp_外显子_2_T9	*SCN10A*	2	SpCas9	53.15%	35.54%	70	91
Scn10a_Sp_外显子_1_T19	*SCN10A*	1	SpCas9	48.57%	35.36%	96	92
Scn10a_Sp_外显子_13_T19	*SCN10A*	11	SpCas9	42.69%	34.85%	108	93
Scn10a_Sp_外显子_11_T20	*SCN10A*	13	SpCas9	39.77%	34.85%	120	94
Scn10a_Sp_外显子_13_T10	*SCN10A*	13	SpCas9	40.55%	34.73%	117	95
Scn10a_Sp_外显子_12_T4	*SCN10A*	12	SpCas9	42.32%	34.32%	111	96
Scn10a_Sp_外显子_11_T29	*SCN10A*	11	SpCas9	55.45%	34.29%	55	97
Scn10a_Sp_外显子_1_T6	*SCN10A*	1	SpCas9	41.41%	33.80%	114	98
Scn10a_Sp_外显子_11_T5	*SCN10A*	11	SpCas9	36.79%	33.61%	127	99
Scn10a_Sp_外显子_8_T4	*SCN10A*	8	SpCas9	48.33%	33.60%	98	100
Scn10a_Sp_外显子_1_T20	*SCN10A*	1	SpCas9	40.84%	33.49%	116	101
Scn10a_Sp_外显子_11_T23	*SCN10A*	11	SpCas9	52.78%	33.30%	73	102
Scn10a_Sp_外显子_6_T4	*SCN10A*	6	SpCas9	38.65%	33.10%	121	103
Scn10a_Sp_外显子_1_T7	*SCN10A*	1	SpCas9	44.90%	32.82%	106	104

[0284]

Scn10a_Sp_外显子_2_T2	*SCN10A*	2	SpCas9	51.23%	32.78%	82	105
Scn10a_Sp_外显子_1_T24	*SCN10A*	1	SpCas9	42.10%	32.67%	112	106
Scn10a_Sp_外显子_4_T5	*SCN10A*	4	SpCas9	56.88%	32.61%	45	107
Scn10a_Sp_外显子_9_T11	*SCN10A*	9	SpCas9	52.09%	32.18%	79	108
Scn10a_Sp_外显子_9_T1	*SCN10A*	9	SpCas9	41.37%	32.00%	115	109
Scn10a_Sp_外显子_11_T27	*SCN10A*	11	SpCas9	55.20%	31.85%	56	110
Scn10a_Sp_外显子_11_T1	*SCN10A*	11	SpCas9	50.96%	31.76%	84	111
Scn10a_Sp_外显子_11_T30	*SCN10A*	11	SpCas9	34.52%	31.72%	133	112
Scn10a_Sp_外显子_13_T1	*SCN10A*	13	SpCas9	37.55%	31.55%	125	113
Scn10a_Sp_外显子_9_T8	*SCN10A*	9	SpCas9	52.96%	31.47%	72	114
Scn10a_Sp_外显子_4_T3	*SCN10A*	4	SpCas9	36.31%	31.31%	130	115
Scn10a_Sp_外显子_1_T21	*SCN10A*	1	SpCas9	42.58%	31.22%	109	116
Scn10a_Sp_外显子_8_T5	*SCN10A*	8	SpCas9	49.09%	30.85%	92	117
Scn10a_Sp_外显子_13_T12	*SCN10A*	13	SpCas9	42.38%	30.40%	110	118
Scn10a_Sp_外显子_12_T13	*SCN10A*	12	SpCas9	35.97%	30.38%	131	119

[0285]

Scn10a_Sp_外显子_6_T9	*SCN10A*	6	SpCas9	34.43%	30.28%	134	120
Scn10a_Sp_外显子_11_T4	*SCN10A*	11	SpCas9	54.02%	30.26%	64	121
Scn10a_Sp_外显子_11_T3	*SCN10A*	11	SpCas9	38.32%	30.19%	123	122
Scn10a_Sp_外显子_12_T10	*SCN10A*	12	SpCas9	63.89%	29.99%	19	123
Scn10a_Sp_外显子_7_T3	*SCN10A*	7	SpCas9	38.44%	29.43%	122	124
Scn10a_Sp_外显子_7_T5	*SCN10A*	7	SpCas9	35.95%	28.88%	132	125
Scn10a_Sp_外显子_8_T7	*SCN10A*	8	SpCas9	40.06%	28.67%	118	126
Scn10a_Sp_外显子_1_T11	*SCN10A*	1	SpCas9	36.94%	28.57%	126	127
Scn10a_Sp_外显子_11_T33	*SCN10A*	11	SpCas9	36.65%	27.54%	129	128
Scn10a_Sp_外显子_6_T10	*SCN10A*	6	SpCas9	32.46%	26.95%	137	129
Scn10a_Sp_外显子_11_T12	*SCN10A*	11	SpCas9	32.19%	26.77%	138	130
Scn10a_Sp_外显子_11_T7	*SCN10A*	11	SpCas9	29.15%	26.06%	143	131
Scn10a_Sp_外显子_1_T29	*SCN10A*	1	SpCas9	46.08%	25.89%	103	132
Scn10a_Sp_外显子_10_T13	*SCN10A*	10	SpCas9	33.89%	25.37%	135	133
Scn10a_Sp_外显子_13_T8	*SCN10A*	13	SpCas9	37.57%	25.01%	124	134

[0286]

Scn10a_Sp_外显子_13_T11	*SCN10A*	13	SpCas9	29.76%	24.56%	142	135
Scn10a_Sp_外显子_5_T2	*SCN10A*	5	SpCas9	31.74%	24.55%	139	136
Scn10a_Sp_外显子_11_T13	*SCN10A*	11	SpCas9	36.77%	24.35%	128	137
Scn10a_Sp_外显子_5_T3	*SCN10A*	5	SpCas9	30.72%	23.38%	140	138
Scn10a_Sp_外显子_12_T12	*SCN10A*	12	SpCas9	41.69%	22.51%	113	139
Scn10a_Sp_外显子_9_T5	*SCN10A*	9	SpCas9	56.19%	22.49%	49	140
Scn10a_Sp_外显子_2_T1	*SCN10A*	2	SpCas9	30.63%	22.14%	141	141
Scn10a_Sp_外显子_11_T26	*SCN10A*	11	SpCas9	28.87%	22.10%	144	142
Scn10a_Sp_外显子_11_T8	*SCN10A*	11	SpCas9	39.80%	21.90%	119	143
Scn10a_Sp_外显子_11_T32	*SCN10A*	11	SpCas9	26.86%	20.23%	148	144
Scn10a_Sp_外显子_13_T14	*SCN10A*	13	SpCas9	25.54%	20.20%	151	145
Scn10a_Sp_外显子_1_T27	*SCN10A*	1	SpCas9	23.64%	20.09%	155	146
Scn10a_Sp_外显子_6_T2	*SCN10A*	6	SpCas9	24.45%	19.92%	153	147
Scn10a_Sp_外显子_13_T21	*SCN10A*	13	SpCas9	26.89%	19.88%	147	148
Scn10a_Sp_外显子_11_T2	*SCN10A*	11	SpCas9	33.54%	19.60%	136	149

[0287]

Scn10a_Sp_外显子_11_T31	*SCN10A*	11	SpCas9	22.87%	18.35%	156	150
Scn10a_Sp_外显子_11_T20	*SCN10A*	11	SpCas9	28.68%	17.60%	145	151
Scn10a_Sp_外显子_1_T2	*SCN10A*	1	SpCas9	21.35%	17.50%	158	152
Scn10a_Sp_外显子_2_T4	*SCN10A*	2	SpCas9	22.73%	16.87%	157	153
Scn10a_Sp_外显子_14_T5	*SCN10A*	14	SpCas9	26.01%	16.71%	150	154
Scn10a_Sp_外显子_9_T10	*SCN10A*	9	SpCas9	24.38%	16.58%	154	155
Scn10a_Sp_外显子_11_T6	*SCN10A*	11	SpCas9	17.51%	13.60%	160	156
Scn10a_Sp_外显子_9_T6	*SCN10A*	9	SpCas9	16.03%	12.46%	161	157
Scn10a_Sp_外显子_1_T22	*SCN10A*	1	SpCas9	25.18%	12.18%	152	158
Scn10a_Sp_外显子_7_T1	*SCN10A*	7	SpCas9	27.05%	11.69%	146	159
Scn10a_Sp_外显子_12_T2	*SCN10A*	12	SpCas9	26.39%	11.56%	149	160
Scn10a_Sp_外显子_9_T12	*SCN10A*	9	SpCas9	18.60%	10.73%	159	161
Scn10a_Sp_外显子_13_T6	*SCN10A*	13	SpCas9	9.77%	7.31%	163	162
Scn10a_Sp_外显子_1_T12	*SCN10A*	1	SpCas9	8.22%	6.02%	164	163
Scn10a_Sp_外显子_9_T7	*SCN10A*	9	SpCas9	12.54%	5.44%	162	164

[0288]

Scn10a_Sp_外显子_13_T22	*SCN10A*	13	SpCas9	6.59%	4.29%	165	165
Scn10a_Sp_外显子_11_T34	*SCN10A*	11	SpCas9	3.63%	2.42%	166	166
乱序对照	N/A	N/A	SpCas9	0.27%	0.23%	N/A	N/A
未处理	N/A	N/A	N/A	0.18%	0.16%	N/A	N/A

[0289] 表11:由靶向iPSC中的SCN10A的SaCas9 gRNA产生的平均总插入缺失百分比和引起移码的平均插入缺失百分比

[0290]

gRNA 名称	靶基因	靶外显子	Cas9	平均总插入缺失百分比	引起移码的平均插入缺失百分比	基于总插入缺失的等级	基于引起移码的插入缺失的等级
Scn10a_Sa_外显子_11_T1	*SCN10A*	11	SaCas9	44.86%	42.68%	2	1
Scn10a_Sa_外显子_1_T7	*SCN10A*	1	SaCas9	42.84%	40.36%	4	2
Scn10a_Sa_外显子_8_T5	*SCN10A*	8	SaCas9	37.46%	35.32%	7	3
Scn10a_Sa_外显子_12_T2	*SCN10A*	12	SaCas9	43.31%	32.36%	3	4
Scn10a_Sa_外显子_14_T1	*SCN10A*	14	SaCas9	45.19%	31.27%	1	5
Scn10a_Sa_外显子_14_T2	*SCN10A*	14	SaCas9	39.18%	27.17%	5	6
Scn10a_Sa_外显子_4_T5	*SCN10A*	4	SaCas9	33.11%	25.46%	9	7
Scn10a_Sa_外显子_1_T3	*SCN10A*	1	SaCas9	28.02%	24.67%	13	8
Scn10a_Sa_外显子_11_T2	*SCN10A*	11	SaCas9	31.11%	23.87%	11	9
Scn10a_Sa_外显子_11_T5	*SCN10A*	11	SaCas9	29.04%	23.03%	12	10
Scn10a_Sa_外显子_13_T9	*SCN10A*	13	SaCas9	34.53%	20.42%	8	11
Scn10a_Sa_外显子_3_T1	*SCN10A*	3	SaCas9	27.38%	19.18%	14	12
Scn10a_Sa_外显子_13_T2	*SCN10A*	13	SaCas9	31.25%	18.78%	10	13
Scn10a_Sa_外显子_10_T6	*SCN10A*	10	SaCas9	20.74%	17.76%	20	14
Scn10a_Sa_外显子_11_T10	*SCN10A*	11	SaCas9	20.36%	17.65%	22	15
Scn10a_Sa_外显子_2_T1	*SCN10A*	2	SaCas9	19.59%	17.00%	27	16
Scn10a_Sa_外显子_8_T1	*SCN10A*	8	SaCas9	25.69%	16.98%	16	17
Scn10a_Sa_外显子_4_T7	*SCN10A*	4	SaCas9	20.06%	16.79%	24	18
Scn10a_Sa_外显子_13_T4	*SCN10A*	13	SaCas9	19.68%	15.79%	26	19

[0291]

Scn10a_Sa_外显子_11_T4	*SCN10A*	11	SaCas9	20.35%	15.76%	23	20
Scn10a_Sa_外显子_1_T6	*SCN10A*	1	SaCas9	26.38%	15.31%	15	21
Scn10a_Sa_外显子_7_T4	*SCN10A*	7	SaCas9	22.50%	15.28%	17	22
Scn10a_Sa_外显子_1_T8	*SCN10A*	1	SaCas9	21.83%	14.52%	18	23
Scn10a_Sa_外显子_11_T9	*SCN10A*	11	SaCas9	38.57%	13.91%	6	24
Scn10a_Sa_外显子_7_T3	*SCN10A*	7	SaCas9	20.06%	13.70%	25	25
Scn10a_Sa_外显子_11_T8	*SCN10A*	11	SaCas9	21.79%	13.40%	19	26
Scn10a_Sa_外显子_5_T2	*SCN10A*	5	SaCas9	16.95%	13.18%	29	27
Scn10a_Sa_外显子_1_T4	*SCN10A*	1	SaCas9	18.11%	13.04%	28	28
Scn10a_Sa_外显子_6_T6	*SCN10A*	6	SaCas9	20.70%	10.65%	21	29
Scn10a_Sa_外显子_1_T5	*SCN10A*	1	SaCas9	14.58%	10.63%	32	30
Scn10a_Sa_外显子_4_T2	*SCN10A*	4	SaCas9	13.82%	10.55%	33	31
Scn10a_Sa_外显子_10_T2	*SCN10A*	10	SaCas9	15.04	9.94%	31	32
Scn10a_Sa_外显子_10_T7	*SCN10A*	10	SaCas9	16.61%	8.83%	30	33
Scn10a_Sa_外显子_13_T3	*SCN10A*	13	SaCas9	12.36%	8.21%	35	34
Scn10a_Sa_外显子_10_T5	*SCN10A*	10	SaCas9	10.62%	7.87%	37	35
Scn10a_Sa_外显子_10_T3	*SCN10A*	10	SaCas9	13.45%	7.63%	34	36
Scn10a_Sa_外显子_8_T4	*SCN10A*	8	SaCas9	7.75%	6.06%	41	37
Scn10a_Sa_外显子_11_T7	*SCN10A*	11	SaCas9	6.42%	5.61%	46	38
Scn10a_Sa_外显子_7_T2	*SCN10A*	7	SaCas9	7.54%	5.53%	42	39
Scn10a_Sa_外显子_13_T5	*SCN10A*	13	SaCas9	5.84%	5.42%	48	40
Scn10a_Sa_外显子_13_T8	*SCN10A*	13	SaCas9	7.45%	5.16%	43	41

[0292]

Scn10a_Sa_外显子_3_T2	*SCN10A*	3	SaCas9	6.18%	5.14%	47	42
Scn10a_Sa_外显子_4_T4	*SCN10A*	4	SaCas9	10.64%	4.88%	36	43
Scn10a_Sa_外显子_6_T3	*SCN10A*	6	SaCas9	8.43%	4.83%	39	44
Scn10a_Sa_外显子_10_T8	*SCN10A*	10	SaCas9	6.74%	4.64%	44	45
Scn10a_Sa_外显子_1_T9	*SCN10A*	1	SaCas9	5.42%	4.53%	49	46
Scn10a_Sa_外显子_13_T1	*SCN10A*	13	SaCas9	6.56%	4.34%	45	47
Scn10a_Sa_外显子_6_T8	*SCN10A*	6	SaCas9	8.25%	3.89%	40	48
Scn10a_Sa_外显子_4_T3	*SCN10A*	4	SaCas9	4.37%	3.72%	51	49
Scn10a_Sa_外显子_5_T4	*SCN10A*	5	SaCas9	5.02%	3.69%	50	50
Scn10a_Sa_外显子_6_T5	*SCN10A*	6	SaCas9	4.27%	3.66%	52	51
Scn10a_Sa_外显子_13_T7	*SCN10A*	13	SaCas9	9.36%	2.84%	38	52
Scn10a_Sa_外显子_10_T4	*SCN10A*	10	SaCas9	2.67%	2.40%	54	53
Scn10a_Sa_外显子_5_T1	*SCN10A*	5	SaCas9	2.76%	2.36%	53	54
Scn10a_Sa_外显子_2_T2	*SCN10A*	2	SaCas9	2.29%	1.87%	55	55
Scn10a_Sa_外显子_14_T3	*SCN10A*	14	SaCas9	2.16%	1.62%	57	56
Scn10a_Sa_外显子_3_T3	*SCN10A*	3	SaCas9	2.17%	1.53%	56	57
Scn10a_Sa_外显子_12_T4	*SCN10A*	12	SaCas9	2.07%	1.52%	59	58
Scn10a_Sa_外显子_7_T5	*SCN10A*	7	SaCas9	2.12%	1.42%	58	59
Scn10a_Sa_外显子_6_T1	*SCN10A*	6	SaCas9	1.69%	1.21%	61	60
Scn10a_Sa_外显子_11_T3	*SCN10A*	11	SaCas9	1.93%	0.77%	60	61
Scn10a_Sa_外显子_6_T4	*SCN10A*	6	SaCas9	0.73%	0.53%	64	62
Scn10a_Sa_外显子_9_T1	*SCN10A*	9	SaCas9	0.79%	0.47%	63	63

[0293]

Scn10a_Sa_外显子_10_T1	*SCN10A*	10	SaCas9	0.46%	0.45%	65	64
Scn10a_Sa_外显子_14_T4	*SCN10A*	14	SaCas9	1.24%	0.33%	62	65
Scn10a_Sa_外显子_9_T3	*SCN10A*	9	SaCas9	0.28%	0.20%	67	66
Scn10a_Sa_外显子_1_T1	*SCN10A*	1	SaCas9	0.20%	0.17%	68	67
Scn10a_Sa_外显子_13_T6	*SCN10A*	13	SaCas9	0.35%	0.17%	66	68
Scn10a_Sa_外显子_12_T1	*SCN10A*	12	SaCas9	0.18%	0.16%	69	69
Scn10a_Sa_外显子_8_T2	*SCN10A*	8	SaCas9	0.11%	0.10%	70	70
Scn10a_Sa_外显子_12_T5	*SCN10A*	12	SaCas9	0.06%	0.06%	71	71
Scn10a_Sa_外显子_8_T3	*SCN10A*	8	SaCas9	0.03%	0.03%	72	72
Scn10a_Sa_外显子_6_T7	*SCN10A*	6	SaCas9	0.00%	0.00%	73	73
乱序对照	N/A	N/A	SaCas9	0.27%	0.23%	N/A	N/A
未处理	N/A	N/A	N/A	0.18%	0.14%	N/A	N/A

[0294] 在稳定表达SpCas9或SaCas9的iPSC中以及源自iPSC的感觉神经元中筛选靶向SCN9A和SCN10A的顶级gRNA

[0295] 基于在iPSC中初始gRNA筛选的中靶功效,将40个向导优先化用于在另外的细胞模型,例如稳定表达Cas9的iPSC和源自iPSC的感觉神经元(iSN)中进行进一步中靶编辑研究(图1A-1D)。具体来说,从四个类别中的每一者中选择十个向导:1)靶向SCN9A的SpCas9的十个gRNA,2)靶向SCN10a的SpCas9的十个gRNA,3)靶向SCN9A的SaCas9的十个gRNA,以及4)靶向SCN10a的SaCas9的十个gRNA(表12和表13)。

[0296] 在稳定表达SpCas9或SaCas9的工程iPSC中筛选这40个优先化gRNA。将合成的gRNA电穿孔至相应的细胞系中。已经针对iSN中的中靶编辑效率来筛选这40个gRNA。在iSN中,将RNP复合物电穿孔至所有40个gRNA的粘附神经元培养物中。另外,由表达SaCas9和gRNA的一体化AAV载体也将20个SaCas9 gRNA递送至iSN。如方法中所描述,从经过处理的细胞中纯化基因组DNA用于测序分析。

[0297] 在每个模型中,进行两个独立的实验。在考察每个gRNA的预测切割位点处插入和缺失(插入缺失)的总百分比下,基于每个样品的四次重复计算平均切割效率。出于敲除SCN9A和SCN10A基因的目的,还计算了将导致移码突变的插入缺失的平均百分比。按引起移码的平均插入缺失百分比对向导RNA排等级。不同细胞模型中这40个优先化gRNA的中靶编辑效率的汇总可以在图1A-1D中以及表12和表13中找到。

[0298] 表12:不同细胞模型中优先化SpCas9 gRNA的中靶编辑效率的汇总

[0299]

gRNA名称	SEQ ID NO:	序列	移码插入缺失%			iPSC等级	iPSC稳定等级	iSN等级
			iPSC	稳定的Cas9 iPSC	iSN (RNP电穿孔)			
	SCN9A SpCas9							
Scn9a Sp外显子11_T9	1	CAAuuuGGGuGGuACCuGAu	76.55%	78.18%	15.83%	1	7	8
Scn9a Sp外显子12_T25	2	GCuuCGCCuuGCAGAAAACA	76.05%	80.74%	33.90%	2	4	3
Scn9a Sp外显子11_T6	3	GCCuAuGCCCuuCGACACCA	74.56%	85.16%	32.52%	3	2	4
Scn9a Sp外显子11_T14	4	AuAGGCGAGCACAuGAAAAG	72.51%	75.68%	9.20%	4	9	10
Scn9a Sp外显子11_T13	5	CGGCuGAAuAuACAAGuAuu	70.14%	79.25%	26.04%	5	5	5
Scn9a Sp外显子14_T1	6	GGAACACCACCCAAuGACuG	69.46%	78.77%	22.14%	6	6	6
Scn9a Sp外显子7_T5	7	CAGGCCuGAAGACAAuuGuA	69.19%	81.38%	44.42%	7	3	1
Scn9a Sp外显子2_T10	8	GGAAuGuCCCCAuAGAuGAA	69.08%	86.34%	37.78%	8	1	2

[0300]

Scn9a Sp 外显子 12_T11	9	CCACCAAuGCuGCCGGuGAA	69.01%	77.06%	14.40%	9	8	9
Scn9a Sp 外显子 12_T17	10	CAGuCACCACuCAGCAuuCG	68.85%	70.36%	17.25%	10	10	7
	SCN10A SpCas9							
Scn10a Sp 外显子 1_T15	21	GCuCCCCGAuCAGuuCuGCu	73.46%	79.12%	21.33%	1	6	2
Scn10a Sp 外显子 9_T2	22	uGuAGuCACCAuGGCGuAuG	67.64%	80.40%	22.50%	2	4	1
Scn10a Sp 外显子 14_T3	23	GGAAGCuCCGCAGCACAGAC	67.26%	82.00	20.91%	3	3	3
Scn10a Sp 外显子 10_T7	24	uCCuuACAACCAGCGCAGGA	66.79%	85.44%	20.77%	4	1	4
Scn10a Sp 外显子 7_T6	25	ACuuCuGACCCCuuACuGuG	65.31%	78.28%	19.31%	5	7	6
Scn10a Sp 外显子 1_T30	26	GAGCuCCCAGCAGAACuGAu	63.21%	71.66%	17.33%	6	9	7
Scn10a Sp 外显子 11_T10	27	CCGAGACAuCGACAGCuCCA	62.38%	76.53%	16.60%	7	8	9

[0301]

Scn10a Sp外显子1_T17	28	AuCCGuuCuACAGCACACAC	61.62%	83.60%	20.25%	8	2	5
Scn10a Sp外显子4_T2	29	uCACGuACCuGAGAGAuCCu	61.10%	65.50%	8.80%	9	10	10
Scn10a Sp外显子10_T3	30	CGCAGGuGCuAGCAGCACuA	60.57%	79.22%	17.04%	10	5	8

[0302] 表13:不同细胞模型中优先化SaCas9 gRNA的中靶编辑效率的汇总

[0303]

gRNA名称	SEQ ID NO：	序列	移码插入缺失%				iPSC等级	iPSC稳定等级	iSN (RNP)等级	iSN (AAV)等级
			iPSC	稳定的Cas9 iPSC	iSN (RNP电穿孔)	iSNs (AAV转导)				
SCN9A SaCas9										
Scn9a Sa外显子11_T3	11	AAGCAGAAuuAuGGGCCuCuCA	49.49%	66.77%	7.87%	14.87%	1	1	4	3
Scn9a Sa外显子12_T2	12	GCCuuGCAGAAAACAAGGAGCC	49.44%	57.62%	14.87%	23.22%	2	2	1	1
Scn9a Sa外显子5_T6	13	ACGACAAAAuCCAGCCAGuuCC	42.37%	54.16%	11.97%	3.79	3	3	3	10
Scn9a Sa外显子9_T3	14	CuGGGAAAACCuuuACCAACAG	34.60%	48.90%	13.50%	6.20%	4	7	2	8
Scn9a Sa外显子13_T3	15	uCCCAACCuCAGACAGAGAGCA	33.08%	51.37%	4.33%	13.04%	5	5	7	4
Scn9a Sa外显子12_T1	16	GAuGuuACuGCuGCGuCGCuCC	28.42%	52.96%	7.57%	9.96%	6	4	5	6
Scn9a Sa外显子7_T1	17	CAuGAuCCuGACuGuGuuCuGu	25.39%	40.83%	4.22%	5.70%	7	10	8	9

[0304]

Scn9a Sa外显子9_T2	18	CuCGuGuGuAGuCAGuGuCCAG	24.43%	51.04%	3.84%	12.52%	8	6	9	5
Scn9a Sa外显子15_T3	19	AAACuGAuuGCCAuGGAuCCAu	23.51%	48.59%	5.07%	8.54%	9	8	6	7
Scn9a Sa外显子12_T3	20	AGAAAACAAGGAGCCACGAAuG	20.49%	46.80%	3.51%	17.10%	10	9	10	2
SCN10A SaCas9										
Scn10a Sa外显子11_T1	31	CCCuGGAGCuGuCGAuGuCuCG	42.68%	0.00%	0.00%	0.39%	1	10	10	10
Scn10a Sa外显子1_T7	32	uAGAuCCGuuCuACAGCACACA	40.36%	71.64%	6.10%	7.31%	2	2	3	5
Scn10a Sa外显子8_T5	33	AGuGAGAGGAAAGCCCAAGCAA	35.32%	73.07%	7.37%	25.44%	3	1	2	2
Scn10a Sa外显子12_T2	34	ACCuuuCCGGGCCCAAAGGGCA	32.36%	63.10%	11.88%	36.91%	4	3	1	1
Scn10a Sa外显子14_T1	35	CuuuGACuGCAuCAuCGuCACu	31.27%	48.68%	3.67%	0.72%	5	8	5	9

[0305]

Scn10a Sa外显子14_T2	36	CACuuCuuCuGGAAAuAAuAGu	27.17%	39.07%	3.16%	3.03%	6	9	7	6
Scn10a Sa外显子4_T5	37	AuuuuAGCGuCAuuACCCuGGC	25.46%	49.54%	1.86%	2.52%	7	7	9	8
Scn10a Sa外显子1_T3	38	AACAACuuCCGuCGCuuuACuC	24.67%	57.17%	2.36%	2.87%	8	4	8	7
Scn10a Sa外显子11_T2	39	GCCGAGAuAuCuCACuCCCuGA	23.87%	56.97%	4.61%	12.23%	9	5	4	4
Scn10a Sa外显子11_T5	40	uGGuGuuCAuCuuCuCCAuGCC	23.03%	54.02%	3.32%	13.89%	10	6	6	3

[0306] 靶向iPSC中的SCN9A和SCN10A的SpCas9和SaCas9 gRNA的脱靶评价

[0307] 基于iPSC中初始gRNA筛选的中靶功效,也将40个向导优先化用于脱靶评价。具体来说,从四个类别中的每一者中选择十个向导:1)靶向SCN9A的SpCas9的十个gRNA,2)靶向SCN10a的SpCas9的十个gRNA,3)靶向SCN9A的SaCas9的十个gRNA,以及4)靶向SCN10a的SaCas9的十个gRNA。

[0308] 在研究中所包括的40个gRNA当中,将29个gRNA归类为“1级”(表14),其中研究中所包括的脱靶位点不进入统计检验;这29个gRNA包括4个在序列相似性准则下未预测到脱靶位点的gRNA。基于本研究,这29个gRNA视为没有脱靶编辑的证据。另外,将七个gRNA归类为“2级”(表15),其中至少一个与所述gRNA相关的脱靶位点可能已进入统计检验,但未发现统计上显著的。这些gRNA的这些脱靶型态视为本研究中非确定性的。另外,将四个gRNA归类为“3级”(表16),其中发现至少一个脱靶位点具有统计上显著的脱靶编辑。基于这些脱靶编辑结果,这些gRNA优先级大大降低。发现靶基因(SCN9A或SCN10A)和酶(SpCas9或SaCas9)的所有组合具有至少5个1级向导。

[0309] 表14:29个归类为1级且没有脱靶编辑证据的gRNA

[0310]

gRNA 名称	SEQ ID NO:	测试位点数	具有任何编辑证据的位点数
Scn9a Sp 外显子 11_T9	1	44	0
Scn9a Sp 外显子 11_T6	3	42	0
Scn9a Sp 外显子 11_T14	4	83	0
Scn9a Sp 外显子 11_T13	5	40	0
Scn9a Sp 外显子 12_T11	9	42	0
Scn10a Sp 外显子 10_T3	30	42	0
Scn10a Sp 外显子 9_T2	22	54	0
Scn10a Sp 外显子 14_T3	23	104	0
Scn10a Sp 外显子 7_T6	25	117	0
Scn9a Sa 外显子 12_T3	20	1	0
Scn9a Sa 外显子 12_T1	16	1	0
Scn9a Sa 外显子 12_T2	12	2	0
Scn9a Sa 外显子 5_T6	13	1	0
Scn9a Sa 外显子 9_T3	14	1	0
Scn9a Sa 外显子 13_T3	15	2	0
Scn9a Sa 外显子 11_T3	11	2	0
Scn9a Sa 外显子 9_T2	18	1	0
Scn9a Sa 外显子 15_T3	19	2	0
Scn10a Sa 外显子 11_T5	40	2	0
Scn10a Sa 外显子 8_T5	33	4	0
Scn10a Sa 外显子 14_T1	35	2	0
Scn10a Sa 外显子 14_T2	36	4	0

[0311]

Scn10a Sa 外显子 4_T5	37	1	0
Scn10a Sa 外显子 11_T2	39	1	0
Scn10a Sp 外显子 10_T7	24	68	1*
Scn10a Sa 外显子 11_T1	31	0	0
Scn10a Sa 外显子 1_T7	32	0	0
Scn10a Sa 外显子 12_T2	34	0	0
Scn10a Sa 外显子 1_T3	38	0	0

[0312] *Scn10a Sp外显子10_T7由于0.2%的阈值要求具有一个测试位点,但由于种系突变最终排除那个位点。

[0313] 表15:具有非确定性脱靶编辑型态的七个归类为2级的gRNA

[0314]

gRNA 名称	SEQ ID NO:	位点 ID	T 检验 p 值	卡方 p 值	经过处理(插入缺失%)	未处理(插入缺失%)	错配数	空位数
Scn10a Sp 外显子 11_T10	27	chr8:31934 32-3193453	0.09 81	0	0.89 %	0.00%	2	1
Scn9a Sa 外显子 7_T1	17	chr2:16516 2747-165162773	0.07 15	0	0.67 %	0.00%	1	1
Scn9a Sp 外显子 7_T5	7	chr12:5169 9567-51699588	0.22 93	0	0.62 %	0.00%	0	1
Scn9a Sp 外显子 7_T5	7	chr17:4980 9267-49809289	0.17 07	0.0006	0.35 %	0.00%	2	0
Scn9a Sp 外显子 12_T25	2	chr5:13998 2158-139982180	0.07 69	0	0.53 %	0.00%	3	0
Scn9a Sp 外显子 14_T1	6	chr18:3438 2228-34382250	0.09 29	0.0140	0.17 %	0.00%	3	0
Scn9a Sp 外显子 12_T17	10	chr4:41330 183-41330205	0.08 41	0.0114	0.16 %	0.00%	2	0
Scn10a Sp 外显子 4_T2	29	chr1:19129 8075-191298097	0.19 89	0.0107	0.15 %	0.00%	3	0

[0315] 表16:在一个或多个位点处确认脱靶编辑(p<0.05)的四个归类为3级的gRNA

[0316]

gRNA 名称	SEQ ID NO:	位点 ID	T 检验 p 值	卡方 p 值	经过处理(插入缺失%)	未处理(插入缺失%)	错配数	空位数
Scn9a Sp 外显子 2_T10	8	chr12:51663013-51663035	0.020	3.52E-18	1.80%	0.00%	2	0
Scn9a Sp 外显子 2_T10	8	chr4:64749297-64749319	0.030	6.26E-116	8.50%	0.00%	3	0
Scn10a Sp 外显子 1_T15	21	chr15:31179489-31179511	0.050	1.74E-13	3.90%	0.00%	3	0
Scn10a Sp 外显子 1_T15	21	chr16:89566197-89566218	0.080	3.48E-07	0.70%	0.00%	2	1
Scn10a Sp 外显子 1_T30	26	chr2:180785404-180785426	0.010	9.20E-07	3.20%	0.00%	3	0
Scn10a Sp 外显子 1_T30	26	chr5:111925220-111925241	0.090	7.59E-09	0.60%	0.00%	2	1
Scn10a Sp 外显子 1_T17	28	chr1:17434745-17434767	0.000	7.48E-75	6.10%	0.00%	2	0
Scn10a Sp 外显子 1_T17	28	chr9:134428917-134428939	0.030	0.000920453	0.40%	0.00%	3	0

[0317] 其它实施方案

[0318] 本说明书中公开的所有特征可以按任何组合形式进行组合。本说明书中公开的每个特征可以被用于相同、等效或类似目的的替代特征替换。因此,除非另有明确规定,否则所公开的每个特征仅仅是等效或类似特征的通用系列的实例。

[0319] 从前面的描述,本领域技术人员可以容易地确定本公开的基本特征,并且在不背离本发明精神和范围的情况下可以对本公开作出各种变化和修改以使其适于各种用途和条件。因此,其它实施方案也在权利要求内。

[0320] 本公开还涉及以下示例实施方案:

[0321] 实施方案1.一种用于修饰钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)基因的基因编辑系统,所述基因编辑系统包含:

[0322] (a)金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9)或包含编码SaCas9的第一核苷酸序列的第一多核苷酸部分;以及

[0323] (b)向导RNA(gRNA)或包含编码gRNA的第二核酸序列的第二多核苷酸部分,其中所

述gRNA包含SEQ ID NO:11-20中任一者的核苷酸序列。

[0324] 实施方案2.如实施方案1所述的基因编辑系统,其中(b)的所述gRNA包含SEQ ID NO:11-16和18-20中任一者的核苷酸序列。

[0325] 实施方案3.如实施方案1或2所述的基因编辑系统,其中(b)的所述gRNA还包含支架序列。

[0326] 实施方案4.如实施方案3所述的基因编辑系统,其中所述支架序列包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

[0327] 实施方案5.如实施方案1-4中任一项所述的基因编辑系统,其中SaCas9进一步包括核定位信号(NLS)。

[0328] 实施方案6.如实施方案5所述的基因编辑系统,其中所述NLS是SV40 NLS。

[0329] 实施方案7.如实施方案1-6中任一项所述的基因编辑系统,其中(a)的所述第一多核苷酸部分和(b)的所述第二多核苷酸部分是不同多核苷酸。

[0330] 实施方案8.如实施方案7所述的基因编辑系统,其中所述不同多核苷酸中的至少一者是病毒载体。

[0331] 实施方案9.如实施方案8所述的基因编辑系统,其中所述一种或多种病毒载体是一种或多种腺相关病毒(AAV)载体。

[0332] 实施方案10.如实施方案1-6中任一项所述的基因编辑系统,其中单个多核苷酸包含(a)的所述第一多核苷酸部分和(b)的所述第二多核苷酸部分。

[0333] 实施方案11.如实施方案10所述的基因编辑系统,其中所述单个多核苷酸是病毒载体。

[0334] 实施方案12.如实施方案11所述的基因编辑系统,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0335] 实施方案13.一种核酸,所述核酸包含实施方案11所述的单个多核苷酸。

[0336] 实施方案14.一种病毒颗粒或病毒颗粒组,所述病毒颗粒或病毒颗粒组集合地包含实施方案1-12中任一项所述的基因编辑系统。

[0337] 实施方案15.如实施方案14所述的病毒颗粒或病毒颗粒组,所述病毒颗粒或病毒颗粒组是一种或多种腺相关病毒(AAV)颗粒。

[0338] 实施方案16.下述在制备用于有需要的受试者中编辑钠电压门控通道α亚基9(SCN9A)基因的药物中的用途:

[0339] (a)实施方案1-12中任一项所述的基因编辑系统;

[0340] (b)实施方案13所述的核酸;或者

[0341] (c)实施方案14或实施方案15所述的病毒颗粒或病毒颗粒组。

[0342] 实施方案17.如实施方案16所述的用途,其中所述受试者是患有疼痛的人类患者。

[0343] 实施方案18.如实施方案17所述的用途,其中所述药物接触所述受试者的外周神经系统的神经元。

[0344] 实施方案19.如实施方案16所述的用途,其中所述药物包含与(a)的所述基因编辑系统、(b)的所述核酸或(c)的所述病毒颗粒接触的受试者的细胞。

[0345] 实施方案20.如实施方案19所述的用途,其中所述细胞是自体细胞。

[0346] 实施方案21.如实施方案19所述的用途,其中所述细胞是异源细胞。

[0347] 实施方案22.如实施方案20或实施方案21所述的用途,其中所述细胞是干细胞。

[0348] 实施方案23.如实施方案22所述的用途,其中所述干细胞是iPSC细胞或间充质干细胞。

[0349] 实施方案24.如实施方案19-23中任一项所述的用途,其中所述细胞离体与(a)的所述基因编辑系统、(b)的所述核酸或(c)的所述病毒颗粒接触,然后施用于所述受试者。

[0350] 实施方案25.如实施方案19-23中任一项所述的用途,其中所述受试者是患有疼痛的人类患者。

[0351] 实施方案26.一种用于修饰钠电压门控通道α亚基10(SCNA10)基因的基因编辑系统,所述基因编辑系统包含:

[0352] (a)金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9)或包含编码SaCas9的第一核苷酸序列的第一多核苷酸部分;以及

[0353] (b)向导RNA(gRNA)或包含编码gRNA的第二核酸序列的第二多核苷酸部分,其中所述gRNA包含SEQ ID NO:31-40中任一者的核苷酸序列。

[0354] 实施方案27.如实施方案26所述的基因编辑系统,其中(b)的所述gRNA还包含支架序列。

[0355] 实施方案28.如实施方案27所述的基因编辑系统,其中所述支架序列包含SEQ ID NO:41的核苷酸序列。

[0356] 实施方案29.如实施方案26-28中任一项所述的基因编辑系统,其中SaCas9还包含核定位信号(NLS)。

[0357] 实施方案30.如实施方案29所述的基因编辑系统,其中所述NLS是SV40 NLS。

[0358] 实施方案31.如实施方案26-30中任一项所述的基因编辑系统,其中(a)的所述第一多核苷酸部分和(b)的所述第二多核苷酸部分是不同多核苷酸。

[0359] 实施方案32.如实施方案31所述的基因编辑系统,其中所述不同多核苷酸中的至少一者是病毒载体。

[0360] 实施方案33.如实施方案32所述的基因编辑系统,其中所述一种或多种病毒载体是一种或多种腺相关病毒(AAV)载体。

[0361] 实施方案34.如实施方案26-33中任一项所述的基因编辑系统,其中单个多核苷酸包含(a)的所述第一多核苷酸部分和(b)的所述第二多核苷酸部分。

[0362] 实施方案35.如实施方案34所述的基因编辑系统,其中所述单个多核苷酸是病毒载体。

[0363] 实施方案36.如实施方案35所述的基因编辑系统,其中所述病毒载体是腺相关病毒(AAV)载体。

[0364] 实施方案37.一种核酸,所述核酸包含实施方案35所述的单个多核苷酸。

[0365] 实施方案38.一种病毒颗粒或病毒颗粒组,所述病毒颗粒或病毒颗粒组集合地包含实施方案26-35中任一项所述的基因编辑系统。

[0366] 实施方案39.如实施方案38所述的病毒颗粒或病毒颗粒组,所述病毒颗粒或病毒颗粒组是一种或多种腺相关病毒(AAV)颗粒。

[0367] 实施方案40.下述在制备用于在有需要的受试者中编辑钠电压门控通道α亚基10(SCN10A)基因的药物中的用途:

[0368] (a)实施方案26-35中任一项所述的基因编辑系统;

[0369] (b)实施方案37所述的核酸;或者

[0370] (c)实施方案38或实施方案39所述的病毒颗粒或病毒颗粒组。

[0371] 实施方案41.如实施方案40所述的用途,其中所述受试者是患有疼痛的人类患者。

[0372] 实施方案42.如实施方案41所述的用途,其中所述药物接触所述受试者的外周神经系统的神经元。

[0373] 实施方案43.如实施方案40所述的用途,其中所述药物包含与(a)的所述基因编辑系统、(b)的所述核酸或(c)的所述病毒颗粒接触的受试者的细胞。

[0374] 实施方案44.如实施方案43所述的用途,其中所述细胞是自体细胞。

[0375] 实施方案45.如实施方案43所述的用途,其中所述细胞是异源细胞。

[0376] 实施方案46.如实施方案44或实施方案45所述的用途,其中所述细胞是干细胞。

[0377] 实施方案47.如实施方案46所述的用途,其中所述干细胞是iPSC细胞或间充质干细胞。

[0378] 实施方案48.如实施方案43-47中任一项所述的用途,其中所述细胞离体与(a)的所述基因编辑系统、(b)的所述核酸或(c)的所述病毒颗粒接触,然后施用于所述受试者。

[0379] 实施方案49.如实施方案48所述的用途,其中所述受试者是患有疼痛的人类患者。

[0380] 等效方案

[0381] 虽然本文中已经描述和图解了若干本发明实施方案,但本领域普通技术人员将容易地设想用于执行功能和/或获得结果和/或本文所描述的一个或多个优点的多种其它方式和/或结构,并且这类变更和/或修改中的每一者都视为处于本文所描述的本发明实施方案的范围内。更一般来说,本领域技术人员将容易了解,本文所描述的所有参数、尺寸、材料和配置意在作为示例并且实际参数、尺寸、材料和/或配置将取决于本发明教义所用于的一种或多种具体应用。本领域技术人员仅仅使用常规实验将认识到或能够确定本文所描述的具体的本发明实施方案的许多等效方案。因此,应了解,前述实施方案仅作为实例呈现,并且在所附权利要求及其等效物的范围内,可以按不同于具体描述和要求的方式来实践本发明实施方案。本公开的发明性实施方案涉及本文所描述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。另外,两个或更多个这类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合,如果这类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不相互矛盾,那么就包括于本公开的发明范围内。

[0382] 如本文所定义和使用的所有定义应理解为控制字典定义、以引用的方式并入的文献中的定义和/或所定义的术语的普通含义。

[0383] 本文所公开的所有参考文献、专利和专利申请关于每一者所引用的主题以引用的方式并入,在一些情况下可以涵盖整个文献。

[0384] 除非相反地明确指示,否则在本文中如说明书和权利要求书中使用的不定冠词“一个”和“一种”应理解为意指“至少一个/种”。

[0385] 在本文中如说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应理解为意指如此联合的要素中的“任一者或两者”,即,在一些情况下联合存在且在其它情况下不联合存在的要素。以“和/或”列出的多个要素应以相同方式解释,即,如此联合的要素中的“一者或多者”。除了由“和/或”子句具体标识的要素以外,可以任选地存在其它要素,无论与那些具体标识的

要素相关或不相关。因此,作为非限制性实例,当与如“包含”等开放式语言结合使用时,提及“A和/或B”可以在一个实施方案中仅指A(任选地包括除B以外的要素);在另一个实施方案中仅指B(任选地包括除A以外的要素);在又一个实施方案中指A和B两者(任选地包括其它要素);等等。

[0386] 在本文中如说明书和权利要求书中使用,“或”应理解为与如上文所定义的“和/或”具有相同的含义。举例来说,当分隔清单中的项目时,“或”或“和/或”应解释为包括性的,即,包括许多或一列要素和任选地另外未列出的项目中的至少一者,但也包括多于一者。只有相反地明确指示的术语,例如“仅一者”或“确切一者”或当在权利要求书中使用时“由……组成”将指包括许多或一列要素中的确切一个要素。一般来说,当前面有排他性术语,例如“任一个”,“其中一个”、“仅其中一个”或“确切一个”时,如本文使用的术语“或”应仅仅解释为指示排他性替代方案(即,“一个或另一个但不是两个”)。“基本上由……组成”在权利要求书中使用时,应具有专利法领域中使用的普通含义。

[0387] 在本文中如说明书和权利要求书中使用,关于一个或多个要素的清单的短语“至少一个”应理解为意指选自要素清单中的任一个或多个要素的至少一个要素,但不一定包括要素清单内具体列出的每个要素中的至少一者并且不排除要素清单中的要素的任何组合。这个定义还允许可以任选地存在除了在短语“至少一个”所指的要素清单内具体标识的要素以外的要素,无论与那些具体标识的要素相关或不相关。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一者”(或等效地“A或B中的至少一者”,或等效地“A和/或B中的至少一者”)在一个实施方案中可以指至少一个,任选地包括多于一个A,而不存在B(并且任选地包括除B以外的要素);在另一个实施方案中指至少一个,任选地包括多于一个B,而不存在A(并且任选地包括除A以外的要素);在又一个实施方案中指至少一个,任选地包括多于一个A,和至少一个,任选地包括多于一个B(并且任选地包括其它要素);等等。

[0388] 还应了解,除非相反地明确指示,否则在本文要求的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,方法的步骤或动作的顺序不一定限于所叙述的方法的步骤或动作的顺序。

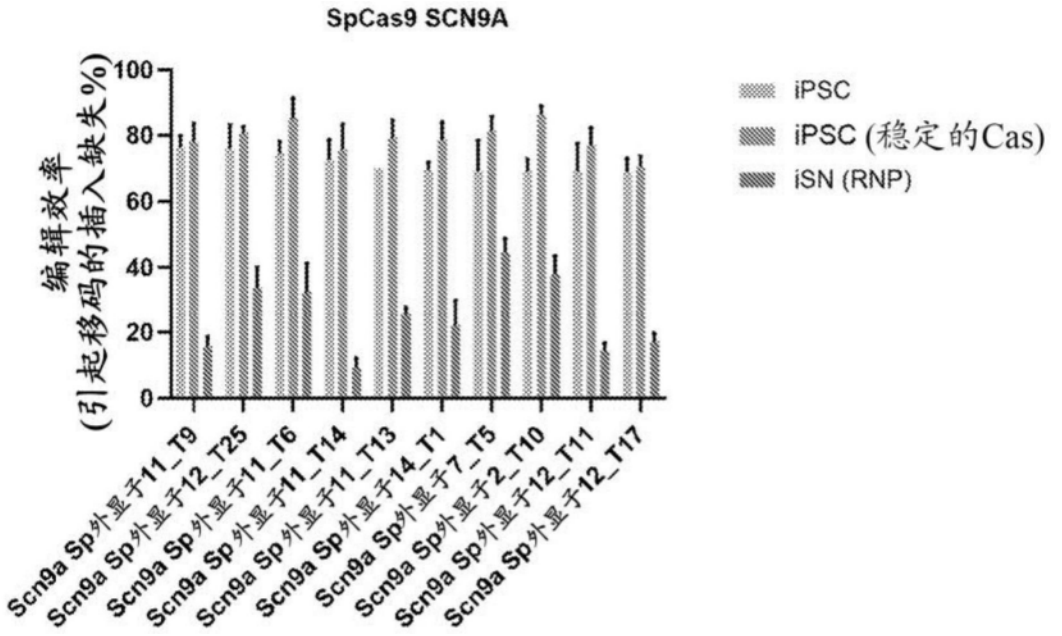

SpCas9 SCN9A
编辑效率
(引起移码的插入缺失%)
100
80
60
40
20
0
iPSC
iPSC (稳定的Cas)
iSN (RNP)
Scn9a Sp外显子11_T9
Scn9a Sp外显子12_T25
Scn9a Sp外显子11_T6
Scn9a Sp外显子11_T14
Scn9a Sp外显子11_T13
Scn9a Sp外显子14_T1
Scn9a Sp外显子7_T5
Scn9a Sp外显子2_T10
Scn9a Sp外显子12_T11
Scn9a Sp外显子12_T17

图1A

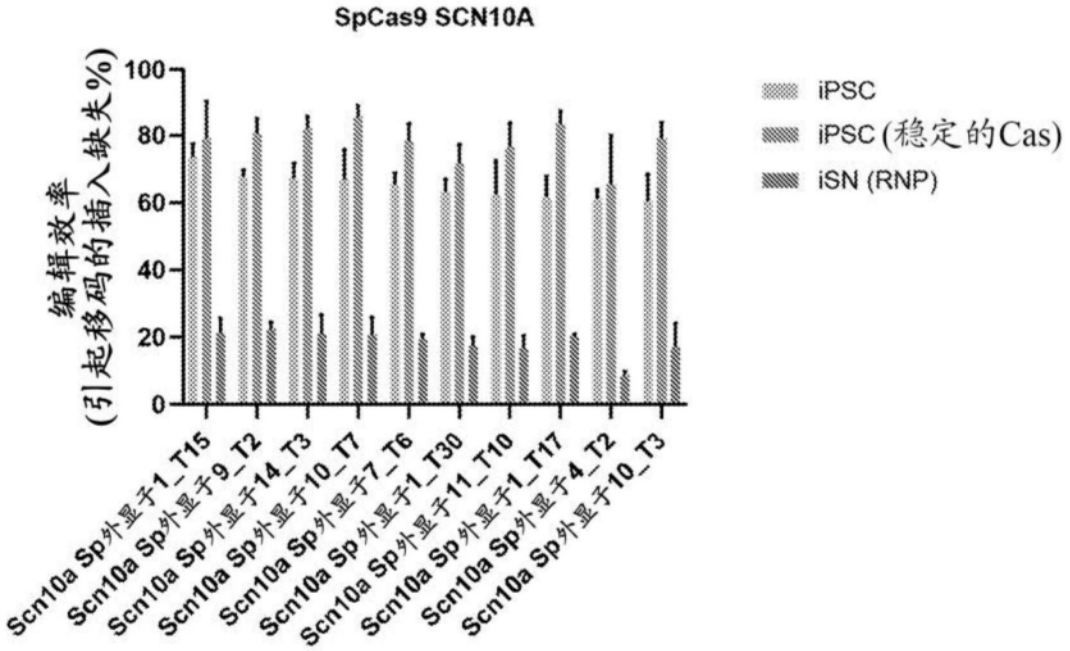

SpCas9 SCN10A
编辑效率
(引起移码的插入缺失%)
100
80
60
40
20
0
iPSC
iPSC (稳定的Cas)
iSN (RNP)
Scn10a Sp外显子1_T15
Scn10a Sp外显子9_T2
Scn10a Sp外显子14_T3
Scn10a Sp外显子10_T7
Scn10a Sp外显子7_T6
Scn10a Sp外显子1_T30
Scn10a Sp外显子11_T10
Scn10a Sp外显子1_T17
Scn10a Sp外显子4_T2
Scn10a Sp外显子10_T3

图1B

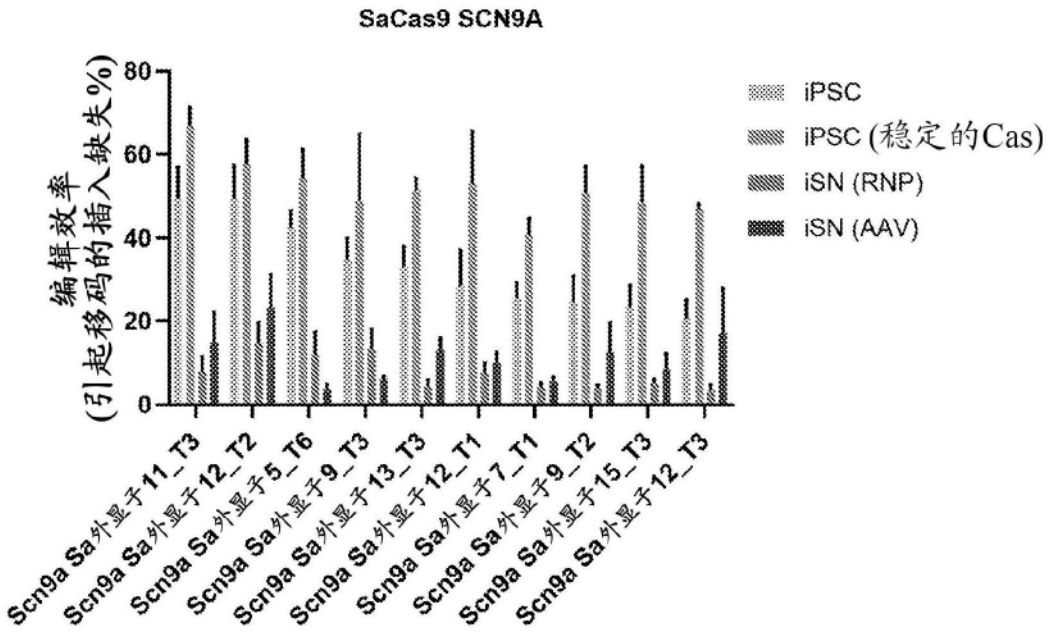

SaCas9 SCN9A
编辑效率
(引起移码的插入缺失%)
80
60
40
20
0
iPSC
iPSC (稳定的Cas)
iSN (RNP)
iSN (AAV)
Scn9a Sa外显子11_T3
Scn9a Sa外显子12_T2
Scn9a Sa外显子5_T6
Scn9a Sa外显子9_T3
Scn9a Sa外显子13_T3
Scn9a Sa外显子12_T1
Scn9a Sa外显子7_T1
Scn9a Sa外显子9_T2
Scn9a Sa外显子15_T3
Scn9a Sa外显子12_T3

图1C

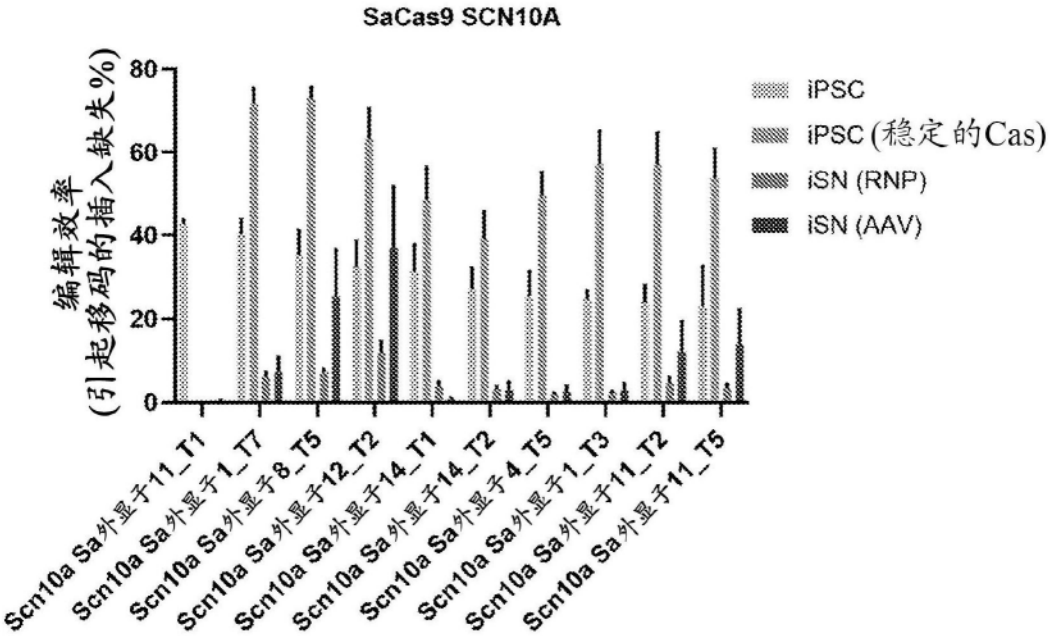

SaCas9 SCN10A
编辑效率
(引起移码的插入缺失%)
80
60
40
20
0
iPSC
iPSC (稳定的Cas)
iSN (RNP)
iSN (AAV)
Scn10a Sa外显子11_T1
Scn10a Sa外显子1_T7
Scn10a Sa外显子8_T5
Scn10a Sa外显子12_T2
Scn10a Sa外显子14_T1
Scn10a Sa外显子14_T2
Scn10a Sa外显子4_T5
Scn10a Sa外显子1_T3
Scn10a Sa外显子11_T2
Scn10a Sa外显子11_T5

图1D