(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118460529 A
(43)申请公布日 2024.08.09

(21)申请号 202410548057.9

(22)申请日 2017.12.20

(30)优先权数据
62/437,042 2016.12.20 US

(62)分案原申请数据
201780086730.X 2017.12.20

(71)申请人 百时美施贵宝公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 J·N·费德 郭齐 G·A·敏泰

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 郭杰

(51)Int.Cl.
C12N 15/10(2006.01)
C12N 15/90(2006.01)

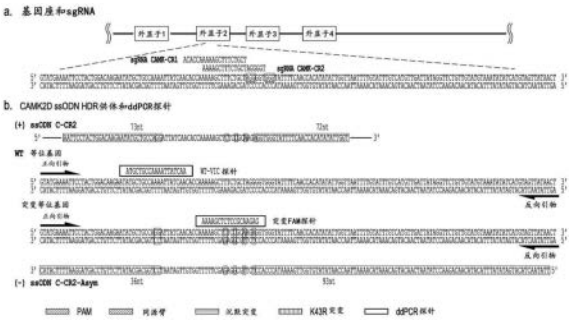
权利要求书1页 说明书39页
序列表（电子公布） 附图14页

(54)发明名称

提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法

(57)摘要

本公开涉及提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法。在某些实施方案中,本公开文本提供了用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括:(a)向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其包括有待插入基因组中的修饰序列;并且(b)使所述细胞经受从37℃到更低温度的温度转变;其中所述核酸酶在所述细胞中的切割位点切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。



CN 118460529 A

1.一种提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括:

(a)向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其包括有待插入基因组中的修饰序列;并且

(b)使所述细胞经受从37℃到更低温度的温度转变;

其中所述核酸酶在所述细胞中的切割位点处切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述更低的温度为28℃-35℃。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述更低的温度为30℃-33℃。

4.根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞在所述更低温度下生长至少24小时。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

6.根据权利要求5所述的方法,其中所述细胞选自干细胞、诱导多能干细胞(iPSC)或原代细胞。

7.根据权利要求1所述的方法,其中所述核酸酶是选自Cas核酸酶或Cpf1核酸酶的CRISPR核酸酶。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述核酸酶是Cas9核酸酶。

9.根据权利要求7所述的方法,其中将所述CRISPR核酸酶与DNA形式或RNA形式的sgRNA一起引入所述细胞中。

10.根据权利要求9所述的方法,其中所述sgRNA是合成的并且是经化学修饰的。

提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法

[0001] 本发明申请是基于申请日为2017年12月20日,申请号为201780086730.X(国际申请号为PCT/US2017/067569)、名称为“提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求于2016年12月20日提交的美国临时申请号62/437,042的权益,出于所有目的将所述申请以其全文特此结合。

技术领域

[0004] 本申请涉及生物技术领域,具体地涉及提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法。

背景技术

[0005] 本领域已经描述了用于基因组序列的DNA靶向切割的各种方法。此类靶向切割事件可用于诱导靶向诱变,诱导细胞DNA序列的靶向缺失,并促进在预定染色体基因座处的靶向重组。这些方法通常涉及使用工程化切割系统在靶DNA序列中诱导双链断裂(DSB)或切口,使得通过错误产生的过程(例如非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR))而对断裂的修复可以导致基因失活或外源目的序列的插入。通过如下方式可以发生切割:通过使用特异性核酸酶例如工程化锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN),使用CRISPR/Cas系统与工程化单一指导RNA(sgRNA)来指导特异性切割。

[0006] 通过HDR过程在特定靶位置处的基因组修饰的效率在细胞中相对较低。因此,仍然需要提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法。

发明内容

[0007] 在某些实施方案中,本发明提供了用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括:(a)向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其包括有待插入基因组中的修饰序列;并且(b)使所述细胞经受从37℃到更低温度的温度转变;其中所述核酸酶在所述细胞中的切割位点切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。例如,同源定向修复(HDR)率提高了至少1.5倍。任选地,同源定向修复(HDR)率提高了至少2倍。

[0008] 在某些方面,更低温度为28℃-35℃。任选地,更低温度为30℃-33℃。例如,细胞在更低温度下生长至少24小时或至少48小时,例如1天-5天(1天、2天、3天、4天或5天)。任选地,在温度转变后,细胞在37℃下生长。

[0009] 在某些方面,细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞。在一个具体实施方案中,细胞是干细胞,例如诱导多能干细胞(iPSC)。在另一个具体实施方案中,细胞是原代细胞。

[0010] 在某些方面,本发明中使用的核酸酶包括所有DNA序列特异性核酸内切酶或RNA指导的DNA核酸内切酶。任选地,核酸酶是选自Cas核酸酶或Cpf1核酸酶的CRISPR核酸酶。例

如,核酸酶是Cas9核酸酶。为了说明,将CRISPR核酸酶(例如Cas9)与DNA形式的sgRNA(例如编码Cas9核酸酶和sgRNA的DNA)或RNA形式的sgRNA(例如sgRNA/Cas9 RNP或sgRNA/Cas9 mRNA)一起引入细胞中。任选地,sgRNA是合成的并且是经化学修饰的。在某些方面,供体核酸含有对称同源臂。任选地,供体核酸与基因组中的DNA链互补,所述DNA链被核酸酶切割。

[0011] 在某些方面,本发明中使用的核酸酶是锌指核酸酶(ZFN)。在某些其他方面,本发明中使用的核酸酶是TALE核酸酶(TALEN)。

[0012] 在某些实施方案中,本发明提供了通过上述方法产生的分离的细胞。

[0013] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含通过上述方法产生的分离的细胞。

[0014] 在某些实施方案中,本发明提供了向有需要的受试者提供目的蛋白质的方法,所述方法包括:(a)根据上述方法将编码目的蛋白质的供体核酸引入细胞中;并且(b)将细胞引入受试者中,使得目的蛋白质在受试者中表达。

[0015] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其含有对称同源臂,与基因组中被所述核酸酶切割的DNA链互补,并包含有待以远离切割位点大于10个碱基对的距离插入基因组中的修饰序列,其中所述核酸酶在所述细胞中的所述切割位点处切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。例如,同源定向修复(HDR)率提高了至少1.5倍或至少2倍。任选地,此类方法进一步包括使细胞经受从37℃到更低温度(例如,28℃-35℃或在30℃-33℃)的温度转变。例如,细胞在更低温度下生长至少24小时或至少48小时,例如1天-5天(1天、2天、3天、4天或5天)。任选地,在温度转变后,细胞在37℃下生长。在某些方面,细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞。在一个具体实施方案中,细胞是干细胞,例如诱导多能干细胞(iPSC)。在另一个具体实施方案中,细胞是原代细胞。在某些方面,本发明中使用的核酸酶是选自Cas核酸酶或Cpf1核酸酶的CRISPR核酸酶。例如,核酸酶是Cas9核酸酶。为了说明,将CRISPR核酸酶(例如Cas9)与DNA形式的sgRNA(例如编码Cas9核酸酶和sgRNA的DNA)或RNA形式的sgRNA(例如sgRNA/Cas9 RNP或sgRNA/Cas9 mRNA)一起引入细胞中。在某些方面,本发明中使用的核酸酶是锌指核酸酶(ZFN)。在某些其他方面,本发明中使用的核酸酶是TALE核酸酶(TALEN)。

[0016] 具体地,本发明包括但不限于以下各项:

[0017] 1.一种提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括:

[0018] (a)向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其包括有待插入基因组中的修饰序列;并且

[0019] (b)使所述细胞经受从37℃到更低温度的温度转变;

[0020] 其中所述核酸酶在所述细胞中的切割位点处切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。

[0021] 2.根据项1所述的方法,其中所述更低的温度为28℃-35℃。

[0022] 3.根据项1所述的方法,其中所述更低的温度为30℃-33℃。

[0023] 4.根据项1所述的方法,其中所述细胞在所述更低温度下生长至少24小时。

[0024] 5.根据项1所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

[0025] 6.根据项5所述的方法,其中所述细胞选自干细胞、诱导多能干细胞(iPSC)或原代

细胞。

[0026] 7.根据项1所述的方法,其中所述核酸酶是选自Cas核酸酶或Cpf1核酸酶的CRISPR核酸酶。

[0027] 8.根据项7所述的方法,其中所述核酸酶是Cas9核酸酶。

[0028] 9.根据项7所述的方法,其中将所述CRISPR核酸酶与DNA形式或RNA形式的sgRNA一起引入所述细胞中。

[0029] 10.根据项9所述的方法,其中所述sgRNA是合成的并且是经化学修饰的。

[0030] 11.根据项9所述的方法,其中将编码所述Cas9核酸酶和sgRNA的DNA引入所述细胞中。

[0031] 12.根据项9所述的方法,其中将sgRNA/Cas9 RNP引入所述细胞中。

[0032] 13.根据项9所述的方法,其中将sgRNA/Cas9 mRNA引入所述细胞中。

[0033] 14.根据项1所述的方法,其中所述供体核酸含有对称同源臂,并且与基因组中被所述核酸酶切割的DNA链互补。

[0034] 15.根据项1所述的方法,其中同源定向修复(HDR)率提高了至少1.5倍。

[0035] 16.通过项1所述的方法产生的细胞。

[0036] 17.一种药物组合物,其包含项16的细胞。

[0037] 18.一种向有需要的受试者提供目的蛋白质的方法,其包括:

[0038] (a)根据项1的方法将编码目的蛋白质的供体核酸引入细胞中;并且

[0039] (b)将所述细胞引入受试者中,使得所述目的蛋白质在所述受试者中表达。

[0040] 19.一种用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其含有对称同源臂,与基因组中被所述核酸酶切割的DNA链互补,并包含有待以远离切割位点大于10个碱基对的距离插入基因组中的修饰序列,其中所述核酸酶在所述细胞中的所述切割位点处切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。

[0041] 20.根据项19所述的方法,其中所述方法进一步包括使所述细胞经受从37℃到更低温度的温度转变。

附图说明

[0042] 图1a-1b示出用于在CAMK2D基因座处的基因编辑和突变检测的单链寡核苷酸(ssODN)供体设计、微滴数字PCR探针和引物设计。(a)设计两种指导RNA(CAMK-CR1和CAMK-CR2)以特异性靶向CAMK2D外显子2,CAMK-CR1和CAMK-CR2重叠14个核苷酸并被设计用以切割DNA以通过HDR引入相同的序列改变。(b)设计两种ssODN HDR供体(C-CR2和C-CR2-Asym)以将激酶灭亡K43R突变(AAA至AGG)和四个沉默突变引入CAMK2D基因座的外显子2中。ssODN供体C-CR2是(+)链HDR供体,其与指导RNA靶向的切割链互补,在预期突变的每一侧周围具有平衡的同源臂(分别为5'-73nt和3'-72nt)。C-CR2-Asym是(-)链HDR供体,其与指导RNA非靶向链互补,同源臂长度不同(分别为5'-93nt和3'-36nt)。为了防止随后的重新切割,供体寡核苷酸C-CR2和C-CR2-Asym二者在指导物CAMK-CR1识别位点内引入三个沉默突变,并且在PAM位点内引入一个沉默突变。C-CR2和C-CR2-Asym在指导物CAMK-CR2识别位点内引入了四个沉默突变。还设计了一对引物和与Vic或Fam荧光团缀合的等位基因特异性探针,以分

开检测未改变的野生型等位基因和突变的序列转换事件。将正向引物设计为在供体序列内退火,而将反向引物设计为在供体序列外退火以确保扩增适当的基因座。

[0043] 图2a-2c示出用于共同递送单链寡核苷酸(ssODN)供体和sgRNA/Cas9mRNA以在mc-iPSC中的CAMK2D基因座处进行HDR的优化方法。使用EditPro™ RNA转染试剂将sgRNA CAMK-CR1或CAMK-CR2、Cas9 mRNA和ssODN供体C-CR2共转染到mc-iPSC中。(a)使用野生型等位基因特异性荧光探针(VIC)和突变等位基因特异性荧光探针(FAM),通过微滴数字PCR(ddPCR)检测来自转染细胞的野生型和突变等位基因百分比,将样品中每个微滴的荧光强度针对微滴数量作图。将具有高于粉红色阈值线的荧光强度的微滴计数为针对靶等位基因呈阳性。底部图(绿色)代表野生型等位基因的微滴,而顶部图(蓝色)代表经历过HDR的等位基因。所呈现的数据来自一个代表性实验,所述实验中使用ssOND最佳浓度为10pmole的两种sgRNA。(b)突变等位基因频率的定量。数据表示为来自四个独立实验的平均值±SEM。sgRNA CAMK-CR2始终以超过总等位基因的15%产生HDR。(c)使用用于ddPCR实验的相同gRNA和供体,通过下一代测序定量预期的核苷酸变化。每个条形代表供体寡核苷酸上包含的六个核苷酸变化之一。数据指示跨靶向区域且在与ddPCR结果一致的频率下发生完整的序列转换。不是通过ddPCR直接测量的两个A至G变化也被掺入,尽管与更接近CRISPR切割位点的那些变化相比,频率更低。所呈现的数据是来自四个独立实验的每个精确基因组坐标的预期碱基改变的平均百分比。

[0044] 图3a-3b示出如通过NGS测定的,'冷激'和ssODN HDR供体设计对mc-iPSC中CAMK2D基因座处的HDR效率的影响。将各种量的ssODN C-CR2或C-CR2-Asym与Cas9 mRNA和sgRNA CAMK-CR1或CAMK-CR2一起递送至mc-iPSC,以在CAMK2D基因座处实现HDR。如"材料与方法"中所述,实验在经24小时间隔的不同温度下进行:PL1:37℃-37℃-37℃,PL2:37℃-32℃-37℃,PL3:37℃-32℃-32℃。(a)如"材料与方法"中所述,通过NGS测定针对每次处理(CAMK-CR1与C-TR2或C-TR2-Asym,CAMK-CR2与C-TR2或C-TR2-Asym)使用10pmol ssODN HDR供体的HDR事件。所呈现的数据是HDR事件的平均百分比(来自三个独立实验的C-CR2:8个重复;C-CR2-Asym:来自两个独立实验的6个重复)。基于围绕预期突变的区域的所得序列,将HDR类型分类为三组。完美HDR:所有预期的碱基变化都存在,没有重新编辑性indel。经编辑HDR:存在一个或多个预期的碱基变化,其中存在重新编辑性indel。部分HDR:一些但不是所有预期的碱基变化,没有indel。数据证实增加的HDR可以通过'冷激'细胞来实现,并且大部分增加是在'完美HDR'类别中。通过单因素方差分析来分析每种gRNA和ssODN处理的三种温度条件下的总HDR效率差异的显著性(所有gRNA和ssODN处理的单因素方差分析$P<0.0001$,后续邓尼特多重比较的P值如图所示)。来自30pmol ssODN且没有寡核苷酸处理的HDR显示在表4中(b)绘制了针对每种处理(CAMK-CR1与C-TR2或C-TR2-Asym,CAMK-CR2与C-TR2或C-TR2-Asym)的完美HDR事件以在两种ssODN设计之间比较完美HDR频率。所呈现的数据是完美HDR事件的平均百分比±SEM(来自两个独立实验的6个生物学重复),通过学生t检验评价每个处理组中两种ssODN设计之间的完美HDR频率的差异,并且p值显示在图中。(+)链ssODN C-CR2在所有温度条件下比(-)链ssODN C-CR2-Asym促进更多完美的HDR。

[0045] 图4a-4c示出用于在TGFBR1基因座处进行基因编辑的指导RNA和单链寡核苷酸(ssODN)供体设计。(a)将两种指导RNA TR-CR2和TR-CR3设计为特异性靶向TGFBR1外显子4并通过HDR引入不同的序列改变。TR-CR3是TR-CR2下游的39个核苷酸。(b)将两种ssODN HDR

供体(T-CR2和T-CR2-Asym)设计为在指导RNA TR-CR2靶位点上游12bp处引入沉默突变,其中在指导RNA识别序列内具有三个沉默突变以防止对HDR转换序列的重新编辑。T-CR2是(+)链HDR供体,其与指导RNA靶向的切割链互补,在预期突变的每一侧周围具有平衡的同源臂(分别为5'-73nt和3'-74nt)。T-CR2-Asym是(-)链HDR供体,其与指导RNA非靶向链互补,同源臂长度不同(分别为5'-93nt和3'-36nt)。(c)将两种ssODN供体(T-CR3和T-CR3-Asym)设计为在指导RNA TR-CR3靶位点的上游12bp处引入已知的SNP,其中在指导RNA识别序列内具有两个沉默突变并且在TR-CR3 PAM位点内具有一个沉默突变以防止对HDR转换序列的重新编辑。T-CR3是(+)链HDR供体,其与指导RNA靶向链互补,在预期突变的每一侧周围具有平衡长度的同源臂(分别为5'-73nt和3'-72nt)。T-CR3-Asym是(-)链HDR供体,其与指导RNA非靶向链互补,在预期突变的每一侧周围具有不平衡长度的同源臂(分别为5'-86nt和3'-36nt)。

[0046] 图5a-5b示出'冷激'和ssODN HDR供体设计对mc-iPSC中TGFBR1基因座处的HDR效率的影响。将ssODN HDR供体和sgRNA与Cas9 mRNA一起共同递送到mc-iPSC细胞中以在TGFBR1基因座处实现HDR。如"材料与方法"中所述,实验在经24小时间隔的不同温度下进行:PL1:37℃-37℃-37℃,PL2:37℃-32℃-37℃,PL3:37℃-32℃-32℃,PL4:32℃-32℃-32℃。(a)如"材料与方法"中所述,通过NGS测定针对每次处理(TR-CR2与T-TR2或T-TR2-Asym,TR-CR3与T-TR3或T-TR3-Asym)使用10pmol ssODN HDR供体的HDR事件。所呈现的数据是HDR事件的平均百分比(来自三次独立实验的4个重复)。基于围绕预期突变的区域的所得序列,将HDR类型分类为三组。完美HDR:所有预期的碱基变化都存在,没有重新编辑性indel。经编辑HDR:存在一个或多个预期的碱基变化,有重新编辑性indel。部分HDR:一些但不是所有预期的碱基变化,没有indel。通过单因素方差分析来分析每种gRNA和ssODN处理的三种温度条件下的总HDR效率差异的显著性(单因素方差分析P>0.05,后续邓尼特多重比较的P值如图所示)。来自30pmol ssODN且没有寡核苷酸处理的HDR显示在表5中(b)绘制了针对每种处理(TR-CR2与T-TR2或T-TR2-Asym,TR-CR3与T-TR3或T-TR3-Asym)使用10pmol ssODN HDR供体的完美HDR事件,以在两种ssODN设计之间比较完美HDR频率。呈现的数据是完美HDR事件的平均百分比±SEM(三次独立实验,4个重复)。通过学生t检验评价每个处理组中两种ssODN设计之间的完美HDR频率的差异,并且p值显示在图中。在所有温度条件下,(+)ssODN链T-CR2和T-CR3分别比(-)ssODN链T-CR2-Asym和T-CR3-Asym促进更多完美的HDR。

[0047] 图6示出'冷激'增强了HEK293T细胞中CAMK2D基因座处的HDR效率。使用与mc-iPSC相同的转染条件将各种量的ssODN C-CR2与Cas9 mRNA和sgRNA CAMK-CR1或CAMK-CR2一起递送至HEK293T细胞以在CAMK2D基因座处实现HDR。如"材料与方法"中所述,实验在经24小时间隔的不同温度下进行:PL1:37℃-37℃-37℃,PL2:37℃-32℃-37℃,PL3:37℃-32℃-32℃。(a)如"材料与方法"中所述,通过NGS确定针对每次处理使用10pmol ssODN HDR供体的HDR事件。数据表示为来自三次重复的HDR事件的平均百分比。基于围绕预期突变的区域的所得序列,将HDR类型分类为三组。完美HDR:所有预期的碱基变化发生,并且没有indel。经编辑HDR:发生一个或多个预期的碱基变化,但有indel。部分HDR:有些但并非所有预期的碱基变化发生,并且没有indel。通过单因素方差分析来分析每种gRNA和ssODN处理的三种温度条件下的总HDR效率差异的显著性(单因素方差分析:CAMK-CR1与C-CR2,P=0.0041;CAMK-CR2与C-CR2,P=0.0469,后续邓尼特多重比较的P值如图所示)。来自30pmol ssODN且

没有寡核苷酸处理的HDR显示在表7中。

[0048] 图7a-7c示出‘冷激’后mc-iPSC中多能性标记物的表达。如“补充方法”中所述,Mc-iPSC在经24小时间隔内的不同温度下生长:PL1:37℃-37℃-37℃,PL2:37℃-32℃-37℃,PL3:37℃-32℃-32℃。然后如“补充方法”中所述用多能性特异性抗体染色细胞:(a)SSEA3(绿色),(b)Nanog(绿色)和(c)OCT4(绿色)。还用Hoechst共同染色细胞以标记细胞核(蓝色)。

[0049] 图8示出如通过NGS测定的,‘冷激’增强了mc-iPSC中CAMK2D基因座的HDR效率。将30pmol的ssODN C-CR2与Cas9 mRNA和sgRNA CAMK-CR1或CAMK-CR2一起递送至mc-iPSC以在CAMK2D基因座处实现HDR。如“材料与方法”中所述,实验在经24小时间隔的不同温度下进行:PL1:37℃-37℃-37℃,PL2:37℃-32℃-37℃,PL3:37℃-32℃-32℃,PL4:32℃-30℃-37℃,PL5:37℃-30℃-30℃,PL6:37℃-28℃-37℃,PL7:37℃-28℃-28℃。(a)每种处理的HDR事件是通过NGS确定的,如“材料与方法”中所述。呈现的数据是来自两次重复的HDR事件的平均百分比。基于围绕预期突变的区域的所得序列,将HDR类型分类为三组。完美HDR:所有预期的碱基变化都存在,没有重新编辑性indel。经编辑HDR:存在一个或多个预期的碱基变化,其中存在重新编辑性indel。部分HDR:一些但不是所有预期的碱基变化,没有indel。无寡核苷酸处理中经编辑HDR和部分HDR序列的低百分比表示与下一代测序相关的背景错误率。无寡核苷酸处理中没有检测到完美HDR。数据证实增加的HDR可以通过‘冷激’细胞来实现,并且大部分增加是在‘完美HDR’类别中。

发明详述

[0051] 在某些方面,本发明涉及用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,例如通过使用CRISPR/Cas9技术进行。如工作实施例中所述,申请人证实,通过在转染后在较低温度下‘冷激’细胞,低HDR率(1%-20%之间)可在细胞(例如,iPSC和HEK293细胞)中增强2倍至10倍。此方法还增加了跨供体序列经历完整序列转换或‘完美HDR’的基因座的比例,这与部分序列转换相反,部分序列转换中更远离CRISPR切割位点的核苷酸被不太有效地掺入(‘部分HDR’)。在工作实施例中还证实,单链DNA寡核苷酸供体的结构可以大大地影响HDR的保真度,其寡核苷酸与不对称非靶链互补寡核苷酸相比,相对于CRISPR切割位点对称并且与靶链互补从而在引导‘完美HDR’方面更有效。

[0052] 在某些实施方案中,本发明提供了用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括:(a)向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其包括有待插入基因组中的修饰序列;并且(b)使所述细胞经受从37℃到更低温度的温度转变;其中所述核酸酶在所述细胞中的切割位点切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。例如,同源定向修复(HDR)率提高了至少1.5倍。任选地,同源定向修复(HDR)率提高了至少2倍。

[0053] 在某些方面,更低温度为28℃-35℃。任选地,更低温度为30℃-33℃。例如,细胞在更低温度下生长至少24小时或至少48小时,例如1天-5天(1天、2天、3天、4天或5天)。任选地,在温度转变后,细胞在37℃下生长。

[0054] 在某些方面,细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞。在一个具体实施方案中,细胞是干细胞,例如诱导多能干细胞(iPSC)。在另一个具体实施方案中,细胞是原代细胞。在另

一个具体实施方案中,细胞是植物细胞。

[0055] 在某些方面,本发明中使用的核酸酶包括所有DNA序列特异性核酸内切酶或RNA指导的DNA核酸内切酶。任选地,核酸酶是选自Cas核酸酶或Cpf1核酸酶的CRISPR核酸酶。例如,核酸酶是Cas9核酸酶。为了说明,将CRISPR核酸酶(例如Cas9)与DNA形式的sgRNA(例如编码Cas9核酸酶和sgRNA的DNA)或RNA形式的sgRNA(例如sgRNA/Cas9 RNP或sgRNA/Cas9 mRNA)一起引入细胞中。任选地,sgRNA是合成的并且是经化学修饰的。在某些方面,供体核酸含有对称同源臂。任选地,供体核酸与基因组中的DNA链互补,所述DNA链被核酸酶切割。

[0056] 在某些方面,本发明中使用的核酸酶是锌指核酸酶(ZFN)。在某些其他方面,本发明中使用的核酸酶是TALE核酸酶(TALEN)。

[0057] 在某些实施方案中,本发明提供了通过上述方法产生的分离的细胞。

[0058] 在某些实施方案中,本发明提供了药物组合物,所述药物组合物包含通过上述方法产生的分离的细胞。

[0059] 在某些实施方案中,本发明提供了向有需要的受试者提供目的蛋白质的方法,所述方法包括:(a)根据上述方法将编码目的蛋白质的供体核酸引入细胞中;并且(b)将细胞引入受试者中,使得目的蛋白质在受试者中表达。

[0060] 在某些实施方案中,本发明提供了一种用于提高细胞基因组中同源定向修复(HDR)效率的方法,其包括向所述细胞中引入:(i)核酸酶;和(ii)供体核酸,其含有对称同源臂,与基因组中被所述核酸酶切割的DNA链互补,并包含有待以远离切割位点大于10个碱基对的距离插入基因组中的修饰序列,其中所述核酸酶在所述细胞中的所述切割位点处切割基因组,并且所述供体核酸通过提高的HDR率引导用所述修饰序列修复基因组序列。例如,同源定向修复(HDR)率提高了至少1.5倍或至少2倍。任选地,此类方法进一步包括使细胞经受从37℃到更低温度(例如,28℃-35℃或30℃-33℃)的温度转变。例如,细胞在更低温度下生长至少24小时或至少48小时,例如1天-5天(1天、2天、3天、4天或5天)。

[0061] I.定义

[0062] 为了更容易理解本公开文本,首先定义某些术语。如本申请中所使用的,除非本文另有明确规定,否则以下术语中的每一个应具有下文所述的含义。另外的定义在整个申请中阐述。

[0063] 术语“核酸”、“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,并且是指线性或环状构象的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸聚合物,并且是单链或双链形式。

[0064] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用以指代氨基酸残基的聚合物。

[0065] “锌指DNA结合蛋白”(或结合结构域)是蛋白质或者较大蛋白质内的结构域,其以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA,所述锌指是通过锌离子配位而稳定其结构的结合结构域内氨基酸序列的区域。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。

[0066] “TALE DNA结合结构域”或“TALE”是包含一个或多个TALE重复结构域/单元的多肽。重复结构域参与TALE与其同源靶DNA序列的结合。单个“重复单元”(也称为“重复”)的长度通常为33-35个氨基酸,并且表现出与天然存在的TALE蛋白中的其他TALE重复序列具有至少一些序列同源性。

[0067] 术语“CRISPR/Cas9系统”或“Cas9系统”是指能够通过许多DNA修复途径之一改变靶核酸的系统。在某些实施方案中,本文所述的Cas9系统通过HDR途径促进靶核酸的修复。

在一些实施方案中,Cas9系统包括gRNA分子和Cas9分子。在一些实施方案中,Cas9系统还包含第二gRNA分子。

[0068] 如本文所用,“Cas9分子”或“Cas9核酸酶”是指Cas9多肽或编码Cas9多肽的核酸。“Cas9多肽”是可以与gRNA分子相互作用的多肽,并且与gRNA分子一致,定位于包含靶结构域的位点,并且在某些实施方案中,定位于PAM序列。Cas9分子包括天然存在的Cas9分子,工程化的、改变的或修饰的Cas9分子,以及与参考Cas9序列(例如天然存在的Cas9分子)有例如至少一个氨基酸残基不同的Cas9多肽。如在此背景中使用的术语“改变的、工程化的或修饰的”仅指与参考或天然存在的Cas9序列的差异,并且不强加特定的过程或起源限制。Cas9分子可以是核酸酶(切割双链核酸的两条链的酶)或切口酶(切割双链核酸的一条链的酶)。

[0069] 如本文所用,术语“gRNA分子”或“gRNA”是指能够将Cas9分子靶向靶核酸的指导RNA。在一个实施方案中,术语“gRNA分子”是指指导核糖核酸。在另一个实施方案中,术语“gRNA分子”是指编码gRNA的核酸。在一个实施方案中,gRNA分子是非天然存在的。在一个实施方案中,gRNA分子是合成的gRNA分子。在另一个实施方案中,gRNA分子是经化学修饰的。

[0070] “模板核酸”、“供体核酸”或“供体多核苷酸”是指可以与核酸酶(例如Cas9分子)结合使用以改变靶位置结构的核酸序列。在一个实施方案中,通常在切割位点处或附近,模板核酸被修饰为具有模板核酸的一些或全部序列。在一个实施方案中,模板核酸是单链。在替代的实施方案中,模板核酸是双链。在一个实施方案中,模板核酸是DNA,例如双链DNA。在替代的实施方案中,模板核酸是单链DNA。在一个实施方案中,模板核酸是RNA,例如双链RNA或单链RNA。在一个实施方案中,模板核酸是外源核酸序列。在另一个实施方案中,模板核酸序列是内源核酸序列,例如内源同源区。在一个实施方案中,模板核酸是对应于核酸序列的正链的单链寡核苷酸。在另一个实施方案中,模板核酸是对应于核酸序列的负链的单链寡核苷酸。

[0071] “同源定向修复”或“HDR”是指使用同源核酸(例如,内源同源序列,例如姐妹染色单体;或外源核酸,例如模板核酸)修复细胞中DNA损伤的过程。经典的HDR通常在双链断裂处有显著切除时起作用,形成DNA的至少一个单链部分。在正常细胞中,HDR通常涉及一系列步骤,例如断裂的识别、断裂的稳定、切除、单链DNA的稳定、DNA交换中间体的形成、交换中间体的拆分、和连接。

[0072] “非同源末端连接”或“NHEJ”是指连接介导的修复和/或非模板介导的修复,包括经典NHEJ(cNHEJ)、替代性NHEJ(altNHEJ)、微同源介导的末端连接(MMEJ)、单链退火(SSA)、和合成依赖性微同源介导的末端连接(SD-MMEJ)。

[0073] “重组”是指在两个多核苷酸之间交换遗传信息的过程,包括但不限于通过非同源末端连接(NHEJ)的供体捕获和同源重组。“同源重组(HR)”是指这种交换的特化形式,其发生在例如通过同源定向修复机制修复细胞中的双链断裂期间。此过程需要核苷酸序列同源性,使用“供体”分子以对“靶”分子进行模板修复,导致遗传信息从供体转移到靶标。这种转移可涉及在破坏的靶标与供体之间形成的异源双链DNA的错配校正,和/或“合成依赖性链退火”,其中供体用于重新合成将成为靶标的一部分的遗传信息;和/或相关的过程。这种特化的HR通常导致靶分子序列的改变,使得供体多核苷酸的部分或全部序列掺入靶多核苷酸中。

[0074] 在本公开文本的方法中,如本文所述的核酸酶在预定的识别位点处在靶序列(例

如,细胞染色质)中产生双链断裂,并且可以将与该断裂区域中的核苷酸序列具有同源性的“供体”多核苷酸引入细胞中。已显示双链断裂的存在有助于供体多核苷酸修复基因组序列。供体多核苷酸可以是物理整合的,或可替代地,供体多核苷酸用作通过同源重组修复断裂的模板,导致将供体中的全部或部分核苷酸序列引入细胞染色质中。因此,可以改变细胞染色质中的第一序列,并且在某些实施方案中,可以将所述第一序列转换为供体多核苷酸中存在的序列(本文中称为“修饰序列”)。因此,术语“替代”(“replace”或“replacement”)的使用可以理解为代表一个核苷酸序列被另一个核苷酸序列替代,并且不一定需要将一个多核苷酸物理地或化学地替代为另一个多核苷酸。

[0075] II.核酸酶

[0076] 本发明的方法利用核酸酶切割细胞基因组,使得模板核酸(转基因)以靶向方式直接修复基因组序列。在某些实施方案中,核酸酶是天然存在的。在其他实施方案中,核酸酶是非天然存在的,例如天然存在的野生型核酸酶的工程化或修饰形式。

[0077] 核酸酶包括但不限于Cas蛋白、DNA序列特异性核酸内切酶、RNA指导的DNA核酸内切酶(例如Cpf1)、限制性核酸内切酶、大范围核酸酶、归巢核酸内切酶、TAL效应子核酸酶、和锌指核酸酶。示例性核酸酶包括但不限于I型、II型、III型、IV型和V型核酸内切酶。例如,核酸酶是CRISPR核酸酶(例如,Cas核酸酶或Cpf1核酸酶)。在一些具体的实施方案中,核酸酶是Cas9,例如,克隆或衍生自细菌(例如化脓链球菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌或嗜热链球菌)的Cas9。

[0078] 在某些实施方案中,核酸酶是CRISPR/Cas核酸酶系统。编码系统的RNA组分的CRISPR(规律间隔成簇短回文重复序列)基因座和编码蛋白质的cas(CRISPR相关)基因座(Jansen等人.,2002.Mol.Microbiol.43:1565-1575;Makarova等人.,2002.Nucleic Acids Res.30:482-496;Makarova等人.,2006.Biol.Direct 1:7;Haft等人.,2005.PLoS Comput.Biol.1:e60)构成CRISPR/Cas核酸酶系统的基因序列。微生物宿主中的CRISPR基因座含有CRISPR相关(Cas)基因以及能够编程CRISPR介导的核酸切割的特异性的非编码RNA元件的组合。

[0079] II型CRISPR是最充分表征的系统之一,并在四个连续步骤中进行靶向DNA双链断裂。第一步,从CRISPR基因座转录两个非编码RNA:前-crRNA阵列和tracrRNA。第二步,tracrRNA杂交到前-crRNA的重复区上,并且介导将前-crRNA加工成包含单独的间隔子序列的成熟crRNA。第三步,成熟的crRNA:tracrRNA复合物通过crRNA上的间隔子与靶DNA上的原型间隔子之间的沃森-克里克碱基配对将Cas9引导至靶DNA,靶DNA靠近原型间隔子邻近基序(PAM)为靶识别的附加要求。最后,Cas9介导靶DNA的切割,以在原型间隔子内产生双链断裂。

[0080] 在某些实施方案中,Cas蛋白可以是天然存在的Cas蛋白的“功能衍生物”。天然序列多肽的“功能衍生物”是具有与天然序列多肽共同的定性生物特性的化合物。“功能衍生物”包括但不限于天然序列的片段和天然序列多肽及其片段的衍生物,条件是它们具有与相应的天然序列多肽共同的生物活性。本文考虑的生物活性是功能衍生物将DNA底物水解成片段的能力。术语“衍生物”包括多肽的氨基酸序列变体、共价修饰和其融合物。合适的Cas多肽或其片段的衍生物包括但不限于Cas蛋白或其片段的突变体、融合物、共价修饰。Cas蛋白,包括Cas蛋白或其片段,以及Cas蛋白或其片段的衍生物,可以从细胞中获得或化

学合成或通过这两种程序的组合获得。细胞可以是天然产生Cas蛋白的细胞,或天然产生Cas蛋白并且经基因工程改造以产生更高表达水平的内源Cas蛋白或从外源引入的核酸(所述核酸编码与内源Cas相同或不同的Cas)产生Cas蛋白的细胞。在某些情况下,细胞不会天然产生Cas蛋白,而是经基因工程改造以产生Cas蛋白。

[0081] 在其他实施方案中,核酸酶可以是锌指核酸酶(ZFN)或转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)。ZFN和TALEN包含异源DNA结合和切割结构域。这些分子是众所周知的基因组编辑工具。参见例如,Gai,等人,Trends Biotechnol.2013年7月;31(7):397-405。

[0082] III.宿主细胞

[0083] 其中基因组修饰可用于本发明的任何宿主细胞。细胞类型可以是细胞系或天然(例如分离的)细胞,例如像原代细胞。

[0084] 为了说明,合适的细胞包括真核细胞(例如动物、植物、哺乳动物)细胞和/或细胞系。此类细胞或细胞系的非限制性例子包括COS、CHO(例如CHO-S、CHO-K1、CHO-DG44、CHO-DUXB11、CHO-DUKX、CHOK1SV)、VERO、MDCK、WI38、V79、B14AF28-G3、BHK、HaK、NSO、SP2/0-Ag14、HeLa、HEK293(例如HEK293-F、HEK293-H、HEK293-T)和perC6细胞。在某些实施方案中,细胞系是CHO细胞系、MDCK细胞系或HEK293细胞系。合适的细胞还包括干细胞,举例来说,例如为胚胎干细胞、诱导多能干细胞、造血干细胞、神经元干细胞和间充质干细胞。

[0085] IV.递送方法

[0086] 核酸酶、编码这些核酸酶的核酸、模板核酸和包含蛋白质和/或核酸的组合物可以通过任何合适的方式体内或离体递送到任何细胞类型中。

[0087] 还可以使用含有编码ZFN、TALEN或CRIPSR/Cas系统中的一种或多种的序列的载体递送如本文所述的核酸酶和/或供体构建体。可以使用任何载体系统,包括但不限于质粒载体、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等。还参见,美国专利号6,534,261;6,607,882;6,824,978;6,933,113;6,979,539;7,013,219和7,163,824,将它们通过引用以其全文并入本文。此外,清楚的是,这些载体中的任何一种可包含处理所需的一种或多种序列。因此,当将一种或多种核酸酶和供体构建体引入细胞中时,可以将核酸酶和/或供体多核苷酸负载于在相同载体上或不同载体上。当使用多个载体时,每个载体可包含编码一种或多种核酸酶和/或供体构建体的序列。

[0088] 可使用常规的基于病毒和非病毒的基因转移方法在细胞(例如哺乳动物细胞)和靶组织中引入编码核酸酶和供体构建体的核酸。非病毒载体递送系统包括DNA或RNA质粒、DNA MC、裸核酸和与递送运载体如脂质体或泊洛沙姆复合的核酸。病毒载体递送系统包括DNA和RNA病毒,其在递送至细胞之后具有附加型或整合的基因组。

[0089] 非病毒递送核酸的方法包括电穿孔、脂转染、显微注射、基因枪、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、人工病毒粒子、和DNA的药剂增强摄取。使用例如Sonitron 2000系统(Rich-Mar)的声孔效应(Sonoporation)也可用于递送核酸。

[0090] 另外的示例性核酸递送系统包括由Amaxa Biosystems(Cologne,Germany)、Maxcyte,Inc.(Rockville,MD)、BTX Molecular Delivery Systems(Holliston,MA)和Copernicus Therapeutics Inc提供的那些(参见例如美国专利号6,008,336)。脂转染描述于例如美国专利号5,049,386;4,946,787;和4,897,355中;脂转染试剂是市售的(例如,Transfectam.TM.和Lipofectin.TM)适合用于多核苷酸的有效受体识别脂质转染的阳离子

和中性脂质包括Feigner的WO 91/17424、WO 91/16024中的那些。

[0091] 脂质:核酸复合物(包括靶向脂质体,例如免疫脂质复合物)的制备是本领域技术人员熟知的(参见例如,Crystal,Science 270:404-410(1995);Blaese等人,Cancer Gene Ther.2:291-297(1995);Behr等人,Bioconjugate Chem.5:382-389(1994);Remy等人,Bioconjugate Chem.5:647-654(1994);Gao等人,Gene Therapy 2:710-722(1995);Ahmad等人,Cancer Res.52:4817-4820(1992);美国专利号4,186,183、4,217,344、4,235,871、4,261,975、4,485,054、4,501,728、4,774,085、4,837,028,和4,946,787)。

[0092] 使用基于RNA或DNA病毒的系统来递送编码工程化ZFP、TALE和/或CRISPR/Cas系统的核酸,利用了高度进化的过程将病毒靶向至体内的特定细胞并将病毒有效载荷运输至细胞核。可以将病毒载体直接给予患者(体内),或者可以使用它们在体外处理细胞,并且将修饰的细胞给予患者(离体)。

[0093] 也可以将含有核酸酶和/或供体构建体的载体(例如逆转录病毒、腺病毒、脂质体等)直接给予生物体以在体内转导细胞。可替代地,可以给予裸DNA。通过通常用于引入分子以与血液或组织细胞最终接触的任何途径给药,所述途径包括但不限于注射、输注、局部施用和电穿孔。给予此类核酸的合适方法是本领域技术人员可获得的并且熟知的,并且尽管可以使用多于一种途径来给予特定组合物,但是特定途径通常可以提供比另一条途径更直接且更有效的反应。

[0094] 清楚的是,可使用相同或不同的系统递送核酸酶编码序列和供体构建体。例如,核酸酶和供体可以由相同的DNA MC负载。可替代地,供体多核苷酸可由MC负载,而一种或多种核酸酶可以由标准质粒或AAV载体负载。此外,可通过相同或不同的途径给予(肌内注射、尾静脉注射、其他静脉注射、腹膜内给药和/或肌内注射)不同的载体。可同时或以任何顺序递送载体。

[0095] 使用本文公开的方法进行基因操作的效果可以通过例如从感兴趣的组织分离的RNA(例如mRNA)的RNA印迹来观察。通常,如果mRNA存在或mRNA的量增加,则可以假定相应的转基因正在表达。可以使用测量基因和/或编码的多肽活性的其他方法。取决于所用的底物和检测反应产物或副产物的增加或减少的方法,可以使用不同类型的酶测定。另外,表达的多肽水平可以经免疫化学测量,即采用ELISA、RIA、EIA和本领域技术人员熟知的其他基于抗体的测定,例如通过电泳检测测定(利用染色或蛋白质印迹)。

[0096] V.温度转变

[0097] 本发明涉及在引入一种或多种核酸酶和/或供体核酸后使宿主细胞经受一段时间的冷激。细胞可以在转染后几分钟内从37℃转变到更低温度(冷激),或者可以在转变到更低温度之前在37℃保持一段短时间(例如1天)。

[0098] 细胞受到冷激的时间段范围可以是从数小时至数天。在某些实施方案中,将细胞冷激持续1天与4天之间。清楚的是,冷激的时间段也将根据引入核酸酶的细胞类型而变化。

[0099] 同样地,细胞受到冷激的温度是减少细胞分裂、但一种或多种核酸酶表达和/或有活性的任何温度。合适的温度将根据宿主细胞类型而变化。对于哺乳动物细胞,冷激温度包括但不限于35℃、34℃、33℃、32℃、31℃、30℃、29℃、28℃、27℃、26℃、25℃以及甚至更低。此外,温度可以在冷激时间段期间变化,只要它保持足够低以使细胞不分裂或以降低的速率分裂。

[0100] 通过以下实施例进一步说明本发明,不应将所述实施例视为进一步限制。本申请中引用的所有附图和所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用明确地并入本文。

实施例

[0101] 实施例1

[0102] 冷激增加了用于对诱导多能干细胞进行基因编辑的同源定向修复的频率

[0103] 引言

[0104] 成簇规律间隔回文重复序列(CRISPR)技术最有希望的应用之一是它用于创建人类疾病的遗传模型。CRISPR技术可用于从正常个体分离的诱导多能干细胞(iPSC)以研究疾病表型,或用于源自疾病患者的IPSC以将推定的致病突变回复为野生型(1,2)。与锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应子核酸酶(TALEN)相比,CRISPR途径的相对稳健性使得对蛋白质编码突变以及由全基因组关联研究和其他非编码突变产生的经验数据进行测试成为可能(3,4)。尽管取得了许多成功,但iPSC中的基因编辑受到以下事实的挑战:同源定向修复(HDR)(外源供体DNA用于修复CRISPR诱导的双链断裂的过程)在iPSC中比在转化的癌细胞系中的效率低(5-8)。

[0105] 为了克服低HDR率,研究人员采用了几种策略,例如在CRISPR质粒和/或供体DNA上包括抗生素抗性基因(9),这样虽然有效,但会在基因组中留下外源DNA的不希望的插入。将正选择标记物与允许切除选择标记物的技术(例如Cre/lox系统或无足迹的PiggyBAC转座子)相组合表现出明显的改进,但因为克隆选择变为两步过程延长了时间线(2,10)。采用单链寡核苷酸DNA核苷酸(ssODN)供体分子的方法避免了在随机整合和不需要的“足迹”方面较大的双链DNA分子存在的问题,但再次受制于相对较低的成功修复频率和在双链断裂位点周围的序列转换(7,11)。为了应对分离稀有克隆的困难,Miyaoka及其同事设计了一种使用微滴数字PCR(droplet digital PCR)、克隆库和同胞选择(sib selection)的策略来富集极为罕见的克隆(12)。增加HDR率的另外的策略包括通过用细胞周期进程的已知化学抑制剂诱导细胞周期同步化来定时将Cas9 RNP复合物递送至核酸酶(13)。在这里,采用同步化的HEK293细胞可以实现HDR的明显增加,高达38%,同时同步化对人原代成纤维细胞或H9人胚胎干细胞的影响最小。ssODN结构和组成的特性也被证明会影响HDR率。Lin等人发现具有至少60个核苷酸的同源臂的寡核苷酸是最有效的,但这条链的互补性不是因素。Richardson等人对供体寡核苷酸的结构如何影响HEK293细胞中的HDR的更详细研究使用了从Cas9RNP-dsDNA复合物的体外结合研究中获得的见解。使用GFP-报告基因测定,他们证实了相对于PAM位点较短且与(+)链(即非靶链)互补的不对称供体寡核苷酸在促进HDR方面比对称供体寡核苷酸更有效(14)。Paquet等人在iPSC中优化HDR的研究表明,用与靶链(-)互补的寡核苷酸可以实现预期突变的有效插入,并且预期的突变整合的频率与CRISPR切割位点具有距离依赖性。还可以通过将沉默碱基变化引入寡核苷酸中从而破坏CRISPR识别序列,来增加HDR的保真度(15)。

[0106] 我们对iPSC中的基因编辑步骤进行了系统评价,以确定递送、CRISPR模式和供体寡核苷酸设计的最佳组合。然后我们测试了中度‘冷激’对细胞进行HDR的能力的影响。我们的优化方法可以通过我们的新型组合成功地将所需的基因改变引入基因组中,效率为

10％-30％,所述新型组合包含:设计用于连同编码Cas9的mRNA进行大RNA分子递送的脂质、与靶链(-)互补的对称供体寡核苷酸、和用以防止重新编辑的沉默变化。在37℃观察到低效率修复的情况下,将细胞额外暴露于32℃的短暂‘冷激’可使完美HDR的量增加2倍至10倍。

[0107] 方法与材料

[0108] 1)细胞系和细胞培养。

[0109] 人mc-iPS细胞来自System Biosciences(SC301A-1),并将其保持在mTeSR培养基(Stem Cell Technologies)和50单位/ml青霉素-链霉素(Thermo Fisher Scientific)的Matrigel(BD Bioscience)包被的平板上,每日更换培养基(Ludwig,T.E.,等人.(2006)."Feeder-independent culture of human embryonic stem cells."Nat Methods 3(8):637-646)。为了传代,将细胞用PBS洗涤,并用Accutase(Thermo Fisher Scientific)在37℃处理5min。将细胞重悬于mTeSR培养基中,以80g离心5min,并将细胞沉淀重新铺板于补充有10μM ROCK抑制剂Y-27632(Cayman Chemical)的mTeSR培养基中。

[0110] 2)CRISPR和Cas9试剂。

[0111] 采用Doench’s算法(http://portals.broadinstitute.org/gpp/public/)和Zhang实验室CRISPR设计工具(http://crispr.mit.edu)设计了CRISPR指导RNA。将指导序列亚克隆到质粒pX458(GenScript)中或合成为IVT sgRNA(Thermo Fisher Scientific)。GeneArt™ Platinum™ Cas9核酸酶获自Thermo Fisher Scientific,并且Cas9 mRNA(5meC,Ψ)获自TriLink BioTechnologies。修复模板(Ultramer,IDT)被设计为单链寡核苷酸(ssODN),在寡核苷酸中间具有靶突变,在突变的两侧具有同源基因组侧翼序列(Miyaoka,Chan等人.2014,Richardson,Ray等人.2016)。在一些ssODN设计中,还在指导RNA结合序列和PAM位点处引入了沉默突变。使用PRIMER 3设计PCR引物,并从Sigma购买引物。对于引物、探针和寡核苷酸供体的序列,参见表1。

[0112]

表1：本研究中使用的gRNA和寡核苷酸

名称	靶标	正向（5'至3'）	反向（5'至3'）
CAMK2D-F和CAMK2D-R	CAMK2D	TGGGTTTCCAGGAAGAATTG	TCCCTCTCAAAAGCAAAAGG
TGFBR1-F和TGFBR1-R	TGFBR1	GGTTTACCATTGCTTGTTCAGAG	TGCCCTAAACTAAACCAACAAA

用于微滴数字PCR的引物。

名称	靶标	正向（5'至3'）	反向（5'至3'）
CAMK2D-ddPCR引物F&R	CAMK2D	GCATTCTCAGTGGTGAGAAGATGT	CAGACCAAGAAGCATTCAGGAA

用于微滴数字PCR的探针

名称	靶标	用于野生型等位基因的探针	用于突变型等位基因的探针
CAMK2D-ddPCR探针	CAMK2D	ATGCTGCCAAAATTATCAA	AAAAGCTCTCCGCAAGAG

gRNA序列

名称	靶标	序列（5'至3'）	PAM序列
CAMK-CR1	CAMK2D	ACACCAAAAAGCTTTCTGCT	AGG
CAMK-CR2	CAMK2D	AAAAGCTTTCTGCTAGGGGT	GGG
TR-CR2	TGFBR1	GTTTGGAGAGGAAAGTGGCG	GGG
TR-CR3	TGFBR1	AGAACGTTCGTGGTTCCGTG	AGG

用于HR的单链寡核苷酸

HR ssODN	靶标	序列（5'至3'）
C-CR2	CAMK2D	TTGGTTTCCAGGGGGGCATTCTCAGTGGTGAGAAGATGTATGAAAATTCCTACTGGACAAGAATATGCTGCC AGGATTATCAACACCAAAAAGCTCTCCGCAAGAGGTGGGTATTTTCAACCACATATATTGGTTAATTTTGTATT TGTCATGTTGATTATAGGTTCTGTTGTATGT

[0113]

C-CR2-Asym	CAMK2D	TTATAACTACATGATATATTTACATACAACAGAACCTATAATCAACATGACAAATACAAAATTAACCAATATAT GTGGTTGAAAATACCCACCTCTTGCGGAGAGCTTTTTGGTGTTGATAATCCTGGCAGCATATTCTTGTCCAGT AGGAATTTTCATAC
T-CR2	TGFBR1	CTTTAGGTTTACCATTGCTTGTTCAGAGAACAATTGCGAGAACTATTGTGTTACAAGAAAGCATTGGCAAAGG cCGATTTGGAGAAGTTTGGAGgGGcAAaTGGCGGGGGAGAAGAAGTTGCTGTTAAGATATTCTCCTCTAGAGA AGAACGTTCGTGGTTCCGTGAGGCAGAGAT
T-CR2-Asym	TGFBR1	TAACATTACAGTTTGATAAATCTCTGCCTCACGGAACCACGAACGTTCTTCTCTAGAGGAGAAGAATATCTTAACA GCAACTTCTTCTCCCCGCCATTTGCCCCTCCAAACTTCTCCAAATCGGCCTTTGCCAATGCTTTCTTGTAACACA ATAGTTCTC
T-CR3	TGFBR1	GCATTGGCAAAGGTCGATTTGGAGAAGTTTGGAGAGGAAAGTGGCGGGGGAGAAGAAGTTGCTGTTAAGAT ATTTTCCTCTAGAGAAGAACGTTCGTGGTTTCGAGAAGCAGAGATTTATCAAACTGTAATGTTACGTCATGAA AACATCCTGGGATTTATAGCAGCAGACAATAAAGGT
T-CR3-Asym	TGFBR1	AGCAAATGTTACAGACCTTTATTGTCTGCTGCTATAAATCCCAGGATGTTTTCATGACGTAACATTACAGTTTG ATAAATCTCTGCTTCTCGAAACCACGAACGTTCTTCTCTAGAGGAAAATATCTTAACAGCAACTTCTTCTCCCC GCCACTTT

[0114] 3)转染

[0115] 对于mc-iPSC中Cas9 mRNA和IVT gRNA的基于脂质的转染,程序类似于IVT gRNA和

Cas9蛋白转染,具有微小修改(参见补充方法)。具体地,首先将480ng IVT gRNA和2μg Cas9mRNA在50μl OptiMEM培养基中混合,然后添加2.5μl mRNA-In Stem或Edit-Pro™(MTI-GlobalStem)。对于同源定向修复实验,在添加脂质之前将各种量的ssODN添加到复合物中。还将100ng GFP mRNA掺入每种混合物中以监测转染效率。将平板在5% CO_2培养箱中于37℃孵育48h,然后收获细胞用于基因组DNA提取。

[0116] 4)编辑区域的基因组DNA提取和PCR扩增

[0117] 对于从转染细胞中提取的基因组DNA,吸出每个孔的培养基,并用250μlActutase(Thermo Fisher Scientific)在37℃处理细胞10min。向每个孔中添加750μl mTeSR培养基,并将细胞悬浮液转移至1.5ml Eppendorf管中,并以1000g离心5min。使用DNeasy Blood&Tissue试剂盒(QIAGEN)提取基因组DNA,并使用Q5聚合酶(NEB)和靶标特异性引物(表1)将100ng基因组DNA用于PCR。具体地,使用引物Camk2D-F和Camk2D-R进行CAMK2D基因座的PCR扩增。使用引物TGFβR1-F和TGFβR1-R进行TGFBR1基因座的PCR扩增。将热循环仪条件设定为:98℃持续30s;98℃持续10s,63℃持续30s,72℃持续1min,31个循环;和72℃持续1min,1个循环。PCR反应最终保持在4℃。

[0118] 5)下一代测序和分析

[0119] 通过在两步清除中去除高分子量(HMW)基因组DNA和残留引物来清洁PCR扩增子以用于文库制备。通过添加0.6v/v比率的Ampure XP珠粒(Beckman Coulter)除去HMW DNA,将清除的上清液转移至新板。通过向转移的上清液中添加0.2v/v Ampure XP珠粒除去引物,再次置于磁体上直至澄清,然后弃去上清液。将珠粒用80% EtOH洗涤2次,经空气干燥,并重悬于20μl H_2O中以洗脱DNA。通过Tapestation HSD5000(Agilent Technologies)监测产物的大小,并用Qubit HSDNA(Invitrogen)定量。将清洁的PCR产物用于Nextera XT试剂盒(Illumina),所述试剂盒被修改为遵循制造商标准试剂体积的一半的用法。使用Illumina标准索引试剂盒对样品进行独特索引,具有多达384种独特的i5/i7组合。用加热盖进行扩增:72℃持续3min,98℃持续1min;然后98℃持续30s,55℃持续30s,72℃持续1min,12-14个循环;最后在72℃下延伸5min,并冷却至4℃。根据如上所述的相同Ampure Xp珠粒方案选择文库大小,并在15μl H_2O中洗脱。产物在Tapestation HSD1000(Agilent)上运行,并使用用于ABI(Kapa Biosystems)的KAPA文库定量试剂盒通过qPCR定量。在Illumina的KAPA文库定量数据分析模板(Kapa Biosystems)之后,将文库归一化至在TE pH 8.0中各4nM,并按体积以适当的比例合并。将文库变性并按照标准Illumina方案稀释至12pM,掺入1%v/vPhiX对照。运行参数设定为150bp配对末端,双重索引各8bp,并使用MiSeq300v2试剂盒(Illumina)。使用MiSeq Reporter v2.6或bcl2fastq v2.17对样品进行解复用。在对读段进行删除重复后,指导位点的目标覆盖率对于克隆样品而言设定为约300x,对于评价不同的非克隆种群设定为最小3000x。

[0120] NGS数据分析使用内部开发的途径进行。简而言之,使用PRINSEQ对配对末端读段进行质量过滤。然后将过滤的读段与BWA的参考基因组比对,接着使用ABRA(基于组装的重新比对器(assembly-based realigner))进行重新比对以增强indel检测。为了保证质量,我们检查了扩增子的覆盖深度,并调查了整个扩增子区域的插入和缺失频率。为了计算CRISPR位点中的indel频率,我们使用sgRNA序列(18-20个碱基)作为目标窗口来计算跨越此窗口的野生型和indel读段的数量。此外,无论点突变如何,indel读段必须在此窗口内具

有至少一个插入或缺失的碱基,而野生型读段在窗口中没有indel。除了indel的总百分比之外,还计算了框内indel的百分比以评估indel的破坏性(Mose,L.E.,等人.(2014)."ABRA:improved coding indel detection via assembly-based realignment."Bioinformatics 30(19):2813-2815)。使用R绘制indel长度直方图以及所有其他图表。我们还检查了sgRNA指导区域及其侧翼区域中的点突变频率。对于同源定向修复(HDR)项目,我们对寡核苷酸类型进行分类以评估HDR效率。

[0121] 6)用以检测CAMK2D野生型和突变序列的ddPCR测定

[0122] 按照制造商的指示使用QX200TM微滴数字PCR系统(Bio-Rad laboratories,CA)。用于检测CAMK2D野生型和突变序列的ddPCR测定是使用Primer Express设计的,并从Life Technologies(Life Technologies,CA,USA)订购。使用如下标准方案组装ddPCR反应。将用于探针的ddPCR Super mix(无dUTP)(Bio-Rad laboratories,CA,USA)与160ng样品基因组DNA、1μl 20xFAM测定和1μl 20xVIC测定(1x CAMK2D-ddPCR引物F&CAMK2D-ddPCR引物R各自900nM,1x探针,每个250nM)、5单位的限制酶BamHI-HF®(New England BioLabs,MA)、和水组合,最终反应体积为20μl。使用QX200微滴发生器将反应转换为约20,000个1纳升微滴,并转移至96孔板以便根据制造商针对此Supermix的推荐进行热循环。热循环后,在QX200微滴读取器上读取微滴,并根据荧光幅值指定为阳性或阴性。引物和探针序列列于表1中。

[0123] 7)对转染细胞的"冷激"实验

[0124] 转染前一天,如转染部分所述,将mc-IPSC接种于24孔板中,并分成四组(P1-P4),将组P1至组P3保持在37℃,并且将组P4在32℃孵育24小时。然后使用如上所述的'Edit-Pro'用IVT gRNA/Cas9 mRNA和ssODN转染细胞。转染后,将组P1保持在37℃直至收获,同时将除组P3外的其余组转移至32℃直至收获,组P3在转染后24小时移回到37℃。如上所述,在48小时后收获细胞用于基因组DNA分离,并通过ddPCR或NGS测量indel形成或HDR。

[0125] 8)另外的转染方法

[0126] 对于mc-iPSC中基于脂质的DNA转染,在转染前一天将细胞以1x10^5个/孔接种在Madrigal包被的24孔板中。在转染当天,将1μg pX458-CRISPR DNA稀释于50μl OptiMEM培养基中,然后添加2μl的DNA-In®Stem转染试剂(MTI-GlobalStem)。对于同源定向修复实验,在添加脂质之前将各种量的ssODN添加到混合物中。将样品轻轻混合并在室温下孵育15min。然后将整个混合物逐滴添加至细胞中。将板在5% CO_2培养箱中于37℃孵育48小时,然后收获细胞用于基因组DNA提取。

[0127] 对于在mc-iPSC中基于脂质的IVT gRNA和Cas9核酸酶转染,程序与DNA转染类似,具有微小修改(Liang,X.,等人.(2015)."Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection."J Biotechnol 208:44-53)。具体地,首先将480ng IVT gRNA和2μg Cas9核酸酶在50μlOptiMEM培养基中混合,并在室温下保持10min以形成稳定的RNP复合物,然后添加2.5μl mRNA-In Stem或Edit-Pro(MTI-GlobalStem)。对于同源定向修复实验,在添加脂质之前将各种量的ssODN添加到复合物中。还将100ng GFP mRNA掺入每种混合物中以监测转染效率。将板在5% CO_2培养箱中于37℃孵育48小时,然后收获细胞用于基因组DNA提取。

[0128] 对于具有或不具有ssODN的pX458 CRISPR质粒的核转染,首先在涂有Matrigel的10mm培养皿中培养mc-iPSC,直至达到60%-70%融合。用PBS洗涤细胞,并用3ml Accutase

(Thermo Fisher Scientific)在37℃处理5min-8min直至所有细胞解离。将细胞重悬于mTeSR培养基中并计数。然后将细胞转移到15ml管中并以80g离心5min。除去上清液后,将细胞以1×10^7个/ml重悬于P3或P4核转染溶液(Lonza,Basel Switzerland)中。将20μl细胞悬浮液转移到管中,并向每个管中添加1μg pX458-CRISPR。对于同源定向修复实验,还向混合物中添加各种量的ssODN。然后将悬浮液转移到8孔条带(Lonza,Basel Switzerland)的每个孔中,小心操作以避免产生气泡,并使用程序CM-113或CE-118使用Amaxa™ 4D-Nucleofector™(Lonza,Basel Switzerland)进行电穿孔。将核转染的细胞直接铺板到Matrigel包被的24孔板的单独孔中,所述孔含有500μl预加温的mTeSR培养基,且每孔中含有10μM的ROCK抑制剂Y-27632。将平板在5% CO_2培养箱中于37℃孵育48h,然后收获细胞用于基因组DNA提取。

[0129] 对于mc-iPSC中IVT gRNA和Cas9蛋白的核转染,程序类似于DNA核转染,具有微小修改。具体地,首先将480ng IVT gRNA和2μg Cas9蛋白在OptiMEM培养基中混合在一起至最终体积为5μl,并在室温下保持10min以形成稳定的RNP复合物。对于同源定向修复实验,还向复合物中添加各种量的ssODN。然后将复合物转移到P3或P4核转染溶液中的20μl细胞悬浮液中,并使用如上所述的程序CM-113或CE-118使用Amaxa™ 4D-Nucleofector™(Lonza,Basel Switzerland)进行电穿孔。

[0130] 结果

[0131] I.使用CRISPR/Cas9 RNA模式和脂质递送的iPSC中的高效HDR。

[0132] 我们评价了基因编辑方案的几个方面,以便找到在CAMK2D基因内产生HDR的最佳条件。首先,如通过PCR扩增子下一代测序(NGS)检测的,我们确定了哪种CRISPR模式(例如一体化质粒DNA,sgRNA和Cas9 mRNA,或sgRNA体外转录(IVT)/Cas9核糖核蛋白)和递送方法(例如核转染或被配制为用于增强大DNA和RNA分子递送的脂质)在CAMK2D基因内的两个特定位置(图1a)产生最大数量的双链断裂。表2列出了每种模式和递送方法的最佳的NHEJ诱导的indel率。然后重新测试用于确定最佳indel形成的完整条件矩阵,以确定促进HDR的模式和递送的最佳组合也在表2中。我们使用多重ddPCR测定来测量四种碱基变化的掺入(这些变化被设计为破坏CRISPR识别序列)以及通过代用来测量特定突变的掺入(这些特定突变被设计在相同的寡核苷酸上产生激酶灭亡形式的CAMK2D)(图1b)。使用特异性地检测非HDR野生型等位基因的不同探针测定野生型未编辑序列的量(图1b)。供体寡核苷酸设计关于同源臂的长度是对称的,并且CRISPR切割位点尽可能接近预期的激酶灭亡突变。供体序列也与非靶向CRISPR切割链(+)同源。通过寡核苷酸引入的四个沉默突变在四个位置改变了指导物CAMK-CR2的CRISPR识别序列,并且在指导物CAMK-CR1中突变了PAM序列并引入了3个序列变化。使用不同DNA序列的合成片段并且在先前在已知针对HDR供体寡核苷酸序列为杂合和纯合的HEK293细胞中制备的克隆上验证测定(数据未显示)。表2中列出了所有比较的最佳HDR率,并且图2a中呈现了最佳组合的数据。对于IVT sgRNA/Cas9 mRNA和EditProTM脂质,我们观察到对于CAMK-CR1,所有等位基因中的9%掺入了供体寡核苷酸序列,并且对于CAMK-CR2,所有等位基因中的19%掺入了供体寡核苷酸序列(图2b)。为了确认ddPCR结果,我们对来自转染的iPSC群体的PCR扩增子进行了NGS(图2c)。对于具有CAMK-CR1和CAMK-CR2二者的IVT sgRNA/Cas9m RNA,在预期碱基变化的精确基因组坐标下以及在与ddPCR确定的频率非常匹配的频率下观察到指示在基因座中的成功HDR的预期碱基变化,包括未通

过ddPCR测定直接测量的两个鸟嘌呤取代。在较低频率下观察到这两个取代,它们相比于设计用于破坏sgRNA退火的沉默变化,距离CRISPR切割位点更远。

[0133]

表2 不同递送和CRISPR模式条件下的最佳indel率和HDR率

*** 由于非常低的indel率，未进行测试

转染方法	核转染			脂质					
sgRNA形式	DNA形式	RNA形式		DNA形式		RNA形式			
Cas9/sgRNA来源	一体化	sgRNA/Cas9 RNP	sgRNA/Cas9 mRNA	一体化		sgRNA/Cas9 RNP		sgRNA/Cas9 mRNA	
转染试剂或仪器	4D-Nucleofector™			DNA-In® Stem	DNA-In® CRISPR	mRNA-In® Stem	EditPro™	mRNA-In® Stem	EditPro™
最佳indel率	29.5%[b,f]	7.7%[a]	1.0%[a]	43.5%[a]	28.3%[a]	36.3%[a]	22.4%[a]	26.0%[a]	38.8%[a]
最佳HDR率	2.6%[c,d]	1.0%[c,d]	***	2.9%[c,d]	2.7[c,d]	3.2%[e]	4.5%[e]	9.3%[e]	26.1%[e]

*** 由于非常低的indel率，未进行测试

a. sgRNA CAMK-CR1

b. sgRNA CAMK-CR2

c. sgRNA CAMK-CR1 和 ssODN C-CR2

d. 在这些实验中仅测试了sgRNA CAMK-CR1

e. sgRNA CAMK-CR2 和 ssODN C-CR2

f. sgRNA CAMK-CR1 显示出25.8% Indel率

[0134] II.‘冷激’提高了HDR率。

[0135] 基于先前的观察结果,即生长并保持在32℃的T-抗原温度敏感永生化细胞系比在37℃生长的类似细胞系更有效地进行HDR(数据未显示),我们测试了暴露mc-iPS细胞系到各种32℃间隔是否会对HDR的效率产生影响。在表3中呈现了实验的设计和得到的在每个温度下通过ddPCR测量的已经历HDR的总等位基因的百分比。使用37℃的正常培养条件作为HDR的基线(组PL1),分别观察10pmole和30pmole浓度下,指导物CAMK-CR1的HDR频率分别为7.50%和5.0%,并且指导物CAMK-CR2的HDR频率分别为16.16%和8.86%。当转染后立即将细胞转移至32℃并在此条件下保持24小时、然后移至37℃直至再持续24小时时(组PL2),我们观察到HDR在统计学上显著的1.8倍至2.3倍增加。在基线处观察到较低的HDR效率时,在30pmole浓度下效果更明显。转染后将细胞暴露于32℃持续48小时(组PL3)对HDR也具有统计学显著性影响,其将HDR从2.0倍增加至3.6倍,在基线处HDR较低的情况下效果也更明显。

[0136] 表3. CRISPR/ssODN在不同温度下在CAMK2D基因座处的HDR效率

组		PL1		PL2		PL3	
条件		37°C-37°C-37°C		37°C-32°C-37°C		37°C-32°C-32°C	
sgRNA		CAMK-CR1	CAMK-CR2	CAMK-CR1	CAMK-CR2	CAMK-CR1	CAMK-CR2
ssOND 输入	无	0.02±0	0.01±0	0.02±0	0.19±0.07	0.00±0.00	0.02±0.00
	10 pmol	7.50±0.54[a]	16.16±0.76[c]	15.85±0.51[a]	29.40±0.81[c]	19.46±0.47[a]	33.24±1.53[c]
	30 pmol	5.02±0.37[b]	8.86±1.27[d]	13.79±0.40[b]	20.70±1.44[d]	18.14±0.49[b]	27.16±1.63[d]

如"材料与方法"中所述,在不同温度下进行实验,并使用对CAMK2D基因座处的野生型和突变序列特异的探针通过ddPCR确定HDR效率。数据表示为来自三个独立实验和八个重复的含有突变等位基因的微滴的平均百分比±标准误差。通过单因素方差分析(a,b,c,d:单因素方差分析P<0.0001,后续邓尼特多重比较,PL2对PL1:P=0.0001,PL3对PL1:P=0.0001)分析针对每种gRNA和ssODN处理在三种温度条件下HDR效率差异的显著性。

[0137] III.‘冷激’和可替代的单链寡核苷酸供体设计影响HDR效率。

[0138] 最近的数据表明精确的供体寡核苷酸设计可以对供体寡核苷酸HDR的效率产生显著影响。更具体地,关于CRISPR切割位点长度不对称(在切割位点附近的一侧较短)并且与非靶向链(最初未被Cas9切割的链)具有序列互补性的寡核苷酸是比我们用于编辑CAMK2D基因座的设计(即在CRISPR切割位点周围对称并与靶向链互补)更有效的HDR启动子(14)。为了直接比较两种设计并进一步测试冷激对HDR的影响,我们设计了基因编辑实验,凭此我们将采用对称靶向链寡核苷酸供体观察到的HDR量与采用不对称非靶向链寡核苷酸供体(被设计为引入相同的序列交替)观察到的HDR量进行了比较(图1b)。我们通过基于扩增子的NGS确定HDR的量,并以几种方式分析得到的序列数据:1)基因座处的总HDR的量,所述总HDR即无论是否存在全部或部分预期变化的寡核苷酸定向修复;2)代表‘完美HDR’的HDR百分比,所述完美HDR即所有六个预期碱基变化完整的寡核苷酸定向修复;3)如下HDR的百分比,所述HDR的序列一旦通过被重新引入转换后的序列中的indel被修复就推定所述HDR的序列已经历重新编辑;和4)发生部分寡核苷酸定向修复以使得序列丢失两个更远的序列变化(预期的CAMK2激酶灭亡突变)的HDR的百分比(图3a和表4)。

[0139] 如最初通过ddPCR观察到的,在基线条件下(即转染并保持在37℃的细胞),指导物CAMK-CR2比指导物CAMK-CR1在促进总HDR方面更有效,但总体HDR较低(图2b和图3a)。对于指导物CAMK-CR1,在所有温度条件和寡核苷酸浓度下的总HDR量也是可比较的。一般而言,在温度、指导物和寡核苷酸设计的所有比较中观察到总HDR的统计学显著性增加(图3a和表4)。对于指导物CAMK-CR1,两种寡核苷酸在三种温度条件下的总HDR量基本上相同,并且对于两种寡核苷酸设计,在PL3温度条件下观察到总HDR的约2.9倍增加(图3a)。对于CAMK-CR2,对称寡核苷酸C-CR2的总HDR倍数增加约为2.4倍,但响应的大小是已经历某种类型HDR的等位基因的40%(图3a)。对于不对称设计C-CR2,在PL1与PL3之间观察到HDR的总增加为3.5倍,然而响应的大小大约是对称指导物所观察到的大小的一半(图3a)。然而,当仅考虑‘完美’HDR的量时,观察到‘冷激’的结果,使用的寡核苷酸类型具有显著效果,尤其是对于指导物CAMK-CR2,其中两种设计之间开始时的总HDR差异较大,并且对称寡核苷酸设计在引导所有六个核苷酸变化的转换方面是优越的(图3b和表4)。对于指导物CAMK-CR1,其中在所有温度条件下两种寡核苷酸类型的总HDR量相似,对称寡核苷酸的‘完美’HDR的量再次更大,但是仅在PL3条件下差异具有统计学显著性(图3b和表4)。

[0140]

表4.由NGS测定的'冷激'和ssODN HDR供体设计对mc-iPSC中CAMK2D基因座处的HDR效率的影响

	sgRNA	CAMK-CR1					
	ssODN	无					
	ssODN输入	无					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.11	0.02	0.04	0.01	99.85	0.02
PL2	37°C-32°C-37°C	0	0	0.15	0.05	0.06	0.01	99.79	0.06
PL3	37°C-32°C-32°C	0.02	0.01	0.1	0.02	0.08	0.04	99.8	0.05

	sgRNA	CAMK-CR1					
	ssODN	C-CR2					
	ssODN输入	10 pmol					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	2.47	0.58	0.82	0.13	4.48	0.53	92.23	1.2
PL2	37°C-32°C-37°C	6.32	0.98	1.65	0.18	9.75	0.65	82.29	1.75
PL3	37°C-32°C-32°C	9.09	1.12	1.96	0.16	11.15	0.51	77.8	1.29

	sgRNA	CAMK-CR1					
	ssODN	C-CR2					
	ssODN输入	30 pmol					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	1.75	0.48	0.8	0.21	2.96	0.44	94.5	1.05

[0141]

PL2	37°C-32°C-37°C	5.71	0.96	1.45	0.2	7.13	0.43	85.71	1.55
PL3	37°C-32°C-32°C	8.41	1.16	1.8	0.25	9.2	0.48	80.59	1.57

	sgRNA	CAMK-CR1							
	ssODN	C-CR2-Asym							
	ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	1.03	0.19	0.51	0.08	5.87	0.74	92.6	0.97
PL2	37°C-32°C-37°C	3.33	0.42	0.99	0.07	13.24	0.84	82.44	1.3
PL3	37°C-32°C-32°C	4.79	0.48	1.16	0.14	16.59	1.09	77.46	1.62

	sgRNA	CAMK-CR1							
	ssODN	C-CR2-Asym							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0.89	0.16	0.46	0.06	5.28	0.52	93.37	0.71
PL2	37°C-32°C-37°C	3.33	0.37	0.9	0.04	13.22	0.9	82.56	1.28
PL3	37°C-32°C-32°C	5.53	0.29	1.37	0.15	17.08	1.08	76.01	1.39

	sgRNA	CAMK-CR2			
	ssODN	无			
	ssODN输入	无			
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）	（经编辑寡核苷酸百分比）	（部分寡核苷酸百分比）	（非寡核苷酸百分比）

[0142]

		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.2	0.05	0.28	0.07	99.52	0.07
PL2	37°C-32°C-37°C	0.02	0.01	0.47	0.12	0.28	0.06	99.23	0.17
PL3	37°C-32°C-32°C	0	0	0.52	0.05	0.33	0.08	99.15	0.1

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	C-CR2							
	ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	6.54	1.02	1.35	0.39	9.8	0.79	82.32	2.05
PL2	37°C-32°C-37°C	15.73	1.1	1.95	0.43	14.27	1.27	68.05	2.18
PL3	37°C-32°C-32°C	20.05	1.74	2.16	0.45	17.96	1.83	59.83	3.24

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	C-CR2							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	4.2	1.36	1.01	0.41	4.34	0.9	90.46	2.63
PL2	37°C-32°C-37°C	10.12	1.83	1.4	0.43	9.25	1.08	79.23	3.31
PL3	37°C-32°C-32°C	14.77	2.23	1.79	0.4	12.32	0.54	71.12	2.85

	sgRNA	CAMK-CR2
	ssODN	C-CR2-Asym

[0143]

	ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	1.24	0.29	0.2	0.05	5.16	1	93.4	1.32
PL2	37°C-32°C-37°C	3.21	0.54	0.46	0.1	9.28	1.15	87.06	1.76
PL3	37°C-32°C-32°C	5.72	0.54	0.52	0.08	14.93	0.49	78.83	0.65

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	C-CR2-Asym							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	1.37	0.21	0.23	0.06	4.94	0.43	93.46	0.67
PL2	37°C-32°C-37°C	5.61	0.71	0.79	0.35	15.75	1.65	77.85	1.14
PL3	37°C-32°C-32°C	9.84	0.49	0.85	0.09	23.7	2.13	65.61	2.39

[0144] 为了将这些观察结果扩展到另一个基因座并进一步测试‘冷激’和寡核苷酸设计对HDR的影响,我们设计了基因编辑实验,以将沉默变化和SNP插入TGFRB1基因座。测试的两个指导物的位置如图4a所示,并且四个供体寡核苷酸的序列、预期序列改变的位置及其与指导物位置的关系如图4b和4c所示。指导物TR-CR2被设计为将切割引导至预期的A至C序列变化的3’约31bp处(图4b)。对称和不对称供体寡核苷酸还包含3个另外的序列变化,这些变化旨在破坏基因座处的指导识别和重新编辑。同源臂的长度也列于图4b中。指导物TR-CR3被设计为将切割引导至从预期的C到T序列变化3’约30bp处(图4c)。与TR-CR2及其ssODN一样,还包括三个另外的沉默序列改变以防止重新编辑转换的基因座。将同源臂的长度设计为尽可能接近用于引导物TR-CR2的ssODN(图4c)。

[0145] 使用IVT sgRNA/Cas9 RNA脂质形式,两种CRISPR均有效地在mc-iPSC细胞系中产生indel,其中在没有修复寡核苷酸的情况下,由NGS测定的具有indel的等位基因的百分比

为:TR-CR2为92％和TR-CR3为64％。在存在两种修复寡核苷酸的情况下,在PL1 37℃条件下,指导物TR-CR2导致对称寡核苷酸T-CR2的60％的非常高效的总HDR率,并且导致不对称设计的42％的总HDR率(图5a和表5)。对于指导物TR-CR3,对于对称和不对称设计,在37℃分别观察到41％和34％的总HDR百分比(图5a和表5)。

[0146] 如用CAMK2D观察到的,在32℃下培养细胞24小时(组PL2)或48小时(组PL3)产生HDR增加;然而,考虑到在37℃开始的相对较高HDR率,效果总体最小,并且大部分没有达到统计学显著性(图5a和表5)。然而,对于不对称寡核苷酸,'冷激'效果更为明显,在不对称寡核苷酸的情况下在37℃时'完美HDR'的数量小于对称寡核苷酸情况下的数量。在此,当将在37℃(PL1)观察到的总HDR量与将细胞在32℃下培养48小时(PL3)时观察到的总HDR量进行比较时,实现了指导物TR-CR2和不对称供体T-CR2的统计学显著性;并且在PL2和PL3两种条件下实现了指导物TR-CR3和不对称指导物T-CR3的统计学显著性(图5a和表5)。然而,当仅考虑由于'冷激'以及在基线条件下观察到的'完美'HDR的量时,所使用的寡核苷酸的类型具有显著效果(图5b和表5)。在除一者(TR-CR2/PL3)外的所有比较中,对称供体寡核苷酸在引导'完美'HDR修复方面的统计学显著性优于其不对称对应物(图5b和表5)。

[0147]

表5.由NGS测定的'冷激'和ssODN HDR供体设计对mc-iPSC中TGFBR1基因座处的HDR效率的影响

	SgRNA	TR-CR2							
	ssODN	无							
	ssODN输入	无							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.41	0.2	0.14	0.07	99.45	0.25
PL2	37°C-32°C-37°C	0	0	0.72	0.36	0.08	0.03	99.19	0.39
PL3	37°C-32°C-32°C	0.15	0.15	0.42	0.18	0.17	0.06	99.26	0.22

	sgRNA	TR-CR2							
	ssODN	T-CR2							
	ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	44.3	8.24	3.37	1.18	11.97	2.22	40.37	7.07
PL2	37°C-32°C-37°C	44.68	5.62	2.92	0.51	11.74	1.2	40.66	4.22
PL3	37°C-32°C-32°C	50.31	12.2	3.65	0.64	11.91	4.14	34.14	9.13

	sgRNA	TR-CR2							
	ssODN	T-CR2							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	

[0148]

		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	37.96	3.31	2.72	0.59	12.25	1.14	47.07	4.63
PL2	37°C-32°C-37°C	43.9	3.68	2.72	0.22	11.89	0.87	41.5	4.15
PL3	37°C-32°C-32°C	53.99	10.39	2.85	1.06	7.5	2.49	35.68	7.17

sgRNA	TR-CR2							
ssODN	T-CR2-Asym							
ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	16.83	3.42	2.05	0.48	23.38	1.53	57.74	3.89
PL2	37°C-32°C-37°C	21.74	1.19	2.1	0.7	32.93	4.24	43.23	4.65
PL3	37°C-32°C-32°C	24.8	2.5	2.74	0.37	28.96	2.53	43.5	2.98

sgRNA	TR-CR2							
ssODN	T-CR2-Asym							
ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	19.71	0.88	2.04	0.34	28	3.04	50.26	2.19
PL2	37°C-32°C-37°C	27.2	1.67	2.47	0.97	26.02	1.88	44.32	2.71
PL3	37°C-32°C-32°C	28.23	1.9	2.53	0.71	26.02	1.62	43.23	2.89

sgRNA	TR-CR3

[0149]

	ssODN	无					
	ssODN输入	无					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）	（非寡核苷酸百分比）
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	2.49	0.41	1.98	0.28	95.54	0.33
PL2	37°C-32°C-37°C	0	0	3.55	0.58	0.99	0.21	95.45	0.38
PL3	37°C-32°C-32°C	0	0	3.93	0.75	1.23	0.3	94.85	0.57

	sgRNA	TR-CR3					
	ssODN	T-CR3					
	ssODN输入	10 pmol					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）	（非寡核苷酸百分比）
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	11.63	0.55	3.45	0.96	27.21	2.27	57.72	3.32
PL2	37°C-32°C-37°C	14.58	1.55	5.03	0.47	30.1	3.07	50.29	3.58
PL3	37°C-32°C-32°C	15.26	2.04	4.72	0.38	31.61	3.5	48.41	3.58

	sgRNA	TR-CR3					
	ssODN	T-CR3					
	ssODN输入	30 pmol					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）	（非寡核苷酸百分比）
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	7.07	1.93	3.86	0.73	26.59	6.11	62.49	6.66
PL2	37°C-32°C-37°C	8.93	2.44	4.32	1.02	33.43	7.69	53.32	5.39

[0150]

PL3	37°C-32°C-32°C	10.02	2.2	3.66	0.62	35.27	6.99	51.05	5.08		

	sgRNA	TR-CR3							
	ssODN	T-CR3-Asym							
	ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	6.42	1.52	2.79	0.67	24.83	2.61	65.96	2.71
PL2	37°C-32°C-37°C	8.67	1.58	3.65	0.74	27.55	2.12	60.14	2.32
PL3	37°C-32°C-32°C	8.46	1.25	3.34	0.27	28.35	2.11	59.85	1.75

	sgRNA	TR-CR3							
	ssODN	T-CR3-Asym							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	4.9	1.54	4.15	1.14	33.81	4.98	57.14	4.63
PL2	37°C-32°C-37°C	6.49	1.88	3.32	0.74	30.4	2.34	59.78	2.78
PL3	37°C-32°C-32°C	5.5	0.34	3.88	1.17	33.42	6.47	57.21	6.15

[0151] IV.碱基HDR率较低时，‘冷激’更有效。

[0152] 为了测试‘冷激’是否在所研究的特定mc-iPSC细胞系以外的细胞类型中有效，我们重复相同的CAMK2D基因编辑实验，此实验用于得到在HEK293细胞中的表3数据，并且我们使用ddPCR确定HDR水平(表6)并通过NGS确定具体HDR类别(图6和表7)。CAMK2D sgRNA和两种供体寡核苷酸浓度的基线总HDR水平在37℃下均为约1％(表6、表7和图6)。使用基于质粒的一体化CRISPR模式(数据未显示)以及在独立实验中用于iPSC的IVT sgRNA/Cas9RNA模式获得这些结果。这与在mc-iPSC细胞系中观察到的情况形成对比，即使HEK293细胞系被转染达相同的相对效率时，在mc-iPSC细胞系中观察到在10pmole浓度下CAMK-CR1和CR2的总HDR水平分别超过10％和20％(图3a并且数据未显示)。其他人已经描述了基因座和细胞类型可以确定基因编辑水平的程度(8)。然而，尽管在37℃观察到低HDR率，但在两组条件24小时(PL2)和48小时(PL3)下的‘冷激’产生对于最佳sgRNA即CAMK-CR2而言在24小时和48小时条

件下6.9倍的总HDR统计学显著增加(如通过ddPCR测定的)(表6)。两种指导物和所有条件响应于‘冷激’产生了总HDR的统计学显著增加(图6和表7)。

[0153] 基于扩增子的NGS和分析证实,除了指导物CAMK-CR2的PL1与PL3比较之外,对于两种指导物而言‘冷激’产生了总HDR的统计学显著增加。通常,对于两种指导物和所有条件,‘完美’HDR的增加超过5倍到20倍(图6和表7)。表6.在不同温度下HEK293T细胞中CAMK2D基因座处的sgRNA/ssODN的HDR效率

[0154]

表6.在不同温度下HEK293T细胞中CAMK2D基因座处的sgRNA/ssODN的HDR效率

组		PL1		PL2		PL3	
条件		37°C-37°C-37°C		37°C-32°C-37°C		37°C-32°C-32°C	
sgRNA		CAMK-CR1	CAMK-CR2	CAMK-CR1	CAMK-CR2	CAMK-CR1	CAMK-CR2
ssODN 输入	无	0.01±0	0.02±0	0±0	0.01±0	0±0	0±0
	10 pmol	1.12±0.06[b]	1.51±0.07[b]	7.13±0.21[a]	10.45±0.21[b]	6.65±0.06[a]	10.45±0.31[b]
	30 pmol	0.57±0.02[c]	0.81±0.04[d]	3.94±0.05[c]	6.09±0.19[d]	3.40±0.06[c]	7.10±0.4[d]

在不同温度下进行实验，并使用对CAMK2D基因座处的野生型和突变序列特异的探针通过ddPCR确定HDR效率。数据表示为来自三次重复的含有微滴的突变的平均百分比±SEM。通过单因素方差分析（a，b，c，d：单因素方差分析 $P<0.0001$，后续邓尼特多重比较，PL2对PL1：$P=0.0001$，PL3对PL1：$P=0.0001$）分析针对每种gRNA和ssODN处理在三种温度条件下HDR效率差异的显著性。

[0155]

表 7.如 NGS 所确定的，'冷激'增强了 HEK293T 细胞中 CAMK2D 基因座处的 HDR 效率

	sgRNA	CAMK-CR1					
	ssODN	无					
	ssODN输入	无					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.06	0.01	0.19	0.01	99.75	0.01
PL2	37°C-32°C-37°C	0	0	0.16	0.01	0.08	0.01	99.76	0.01
PL3	37°C-32°C-32°C	0	0	0.16	0	0.11	0.01	99.73	0.01

	sgRNA	CAMK-CR1					
	ssODN	C-CR2					
	ssODN输入	10 pmol					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0.17	0.06	0.1	0.03	0.6	0.03	99.12	0.1
PL2	37°C-32°C-37°C	1.93	0.36	0.91	0.09	3.55	0.5	93.6	0.94
PL3	37°C-32°C-32°C	1.61	0.28	0.72	0.06	3.07	0.53	94.59	0.87

	sgRNA	CAMK-CR1					
	ssODN	C-CR2					
	ssODN输入	30 pmol					
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差

[0156]

PL1	37°C-37°C-37°C	0.09	0.02	0.02	0	0.41	0.06	99.49	0.08
PL2	37°C-32°C-37°C	1.75	0.4	0.75	0.31	4.04	2.27	93.47	2.97
PL3	37°C-32°C-32°C	1.46	0.48	0.52	0.32	4	2.65	94.03	3.44

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	无							
	ssODN输入	无							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.01	0	0.29	0.04	99.7	0.05
PL2	37°C-32°C-37°C	0	0	0.12	0.03	0.34	0.01	99.54	0.04
PL3	37°C-32°C-32°C	0	0	0.13	0.03	0.29	0.04	99.58	0.07

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	C-CR2							
	ssODN输入	10 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0.13	0.03	0.07	0.02	0.74	0.1	99.06	0.15
PL2	37°C-32°C-37°C	2.83	0.56	0.89	0.27	10.44	2.99	85.85	3.81
PL3	37°C-32°C-32°C	2.66	0.92	0.84	0.29	10.23	4.52	86.27	5.73

	sgRNA	CAMK-CR2
	ssODN	C-CR2
	ssODN输入	30 pmol

[0157]

组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0.19	0.03	0.02	0.02	0.44	0.02	99.36	0.04
PL2	37°C-32°C-37°C	3.37	0.8	0.85	0.23	9.2	2.91	86.59	3.87
PL3	37°C-32°C-32°C	3.21	1.12	0.57	0.26	7.24	4.1	88.98	5.33

[0158] V.‘冷激’不会影响多能性标记物的表达

[0159] 为了测试将mc-IPSC暴露于寒冷时期是否会影响细胞分化成各种细胞谱系的能力,我们进行了和曾用过的相同的‘冷激’方案,以确定此过程是否影响HDR率,并用识别蛋白质抗原(其表达指示多能性)的抗体对细胞进行染色。这些研究的结果证实,标记物SSEA3、Nanog和OCT4的表达不会因细胞暴露于24h或48h 32℃温度条件而改变(图7a-c)。

[0160] VI.‘冷激’对于在一系列温度条件下提高HDR率是有效的

[0161] 为了测试将细胞暴露于低于32℃的温度条件下对HDR效率的影响,我们重复了之前描述的细胞培养方案,但将mc-IPSC暴露于30℃、28℃以及32℃持续24h和48h。

[0162] 通过ddPCR和NGS二者分析所得的PCR扩增子(表8、表9和图8)。总体而言,总HDR的增加(表9和图8)和‘完美’HDR的增加(图8)在所测试的三个温度下是可比较的,并且这些数据证实增加的HDR不依赖于32℃温度条件。

[0163]

表8.如通过ddPCR测定的，在各种温度下在mc-iPSC中CAMK2D基因座处的HDR效率

组		PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6	PL7
条件		37°C-37°C-37°C	37°C-32°C-37°C	37°C-32°C-32°C	37°C-30°C-37°C	37°C-30°C-30°C	37°C-28°C-37°C	37°C-28°C-28°C
sgRNA		CAMK-CR1	CAMK-CR1	CAMK-CR1	CAMK-CR1	CAMK-CR1	CAMK-CR1	CAMK-CR1
ssODN 输入	无	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	30 pmol	6.52±0.51	17.35±0.38	21.6±0.23	17.9±0.12	23.25±0.61	13.7±0.06	18.6±0.12

组		PL1	PL2	PL3	PL4	PL5	PL6	PL7
条件		37°C-37°C-37°C	37°C-32°C-37°C	37°C-32°C-32°C	37°C-30°C-37°C	37°C-30°C-30°C	37°C-28°C-37°C	37°C-28°C-28°C
sgRNA		CAMK-CR2	CAMK-CR2	CAMK-CR2	CAMK-CR2	CAMK-CR2	CAMK-CR2	CAMK-CR2
ssODN 输入	无	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
	30 pmol	12.15±0.49	29.55±1.13	39.95±1.07	28.65±0.72	38.9±0.29	25.45±0.03	35.9±0.46

如"材料与方法"中所述，在不同温度下进行实验，并使用对CAMK2D基因座处的野生型和突变序列特异的探针通过ddPCR确定HDR效率。数据表示为来自两个重复的含有突变等位基因的微滴的平均百分比±标准误差

[0164]

表 9.如 NGS 所确定的，'冷激'增强了 mc-iPSC 细胞中 CAMK2D 基因座处的 HDR 效率

	sgRNA	CAMK-CR1							
	ssODN	无							
	ssODN输入	无							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.18	0.05	0.04	0.01	99.79	0.04
PL2	37°C-32°C-37°C	0.01	0.01	0.21	0.06	0.02	0.01	99.78	0.07
PL3	37°C-32°C-32°C	0.01	0.01	0.12	0.01	0.05	0.03	99.83	0.04
PL4	37°C-30°C-37°C	0	0	0.07	0.01	0.01	0	99.92	0.02
PL5	37°C-30°C-30°C	0	0	0.09	0.03	0.03	0.02	99.88	0.01
PL6	37°C-28°C-28°C	0	0	0.13	0.03	0.06	0.01	99.82	0.02
PL7	37°C-28°C-28°C	0	0	0.12	0.02	0.01	0	99.88	0.02

	sgRNA	CAMK-CR1							
	ssODN	C-CR2							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	3.6	0.42	1.41	0.02	10.83	0.81	84.17	1.25
PL2	37°C-32°C-37°C	8.32	0.58	3.85	0.63	18.38	2.02	69.46	3.22
PL3	37°C-32°C-32°C	10.65	0.2	4.45	0.19	21.38	1.38	63.54	1
PL4	37°C-30°C-37°C	8.47	0.21	3.56	0.29	16.6	1.16	71.39	0.66
PL5	37°C-30°C-30°C	9.74	0.06	4.49	0.15	23.19	3.58	62.59	3.67
PL6	37°C-28°C-28°C	7.16	0.32	3.49	0.21	14.15	0.38	75.2	0.15
PL7	37°C-28°C-28°C	8.79	0.29	4.19	0.12	15.12	0.67	71.91	1.07

[0165]

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	无							
	ssODN输入	无							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	0	0	0.21	0.03	0.24	0.02	99.56	0.04
PL2	37°C-32°C-37°C	0	0	0.23	0.04	0.16	0.01	99.61	0.02
PL3	37°C-32°C-32°C	0	0	0.65	0.07	0.32	0.11	99.03	0.04
PL4	37°C-30°C-37°C	0	0	0.66	0.01	0.22	0	99.13	0
PL5	37°C-30°C-30°C	0	0	1.07	0.37	0.47	0.17	98.47	0.21
PL6	37°C-28°C-28°C	0	0	0.69	0.02	0.4	0.05	98.92	0.07
PL7	37°C-28°C-28°C	0.01	0.01	1.37	0.03	0.35	0.11	98.28	0.14

	sgRNA	CAMK-CR2							
	ssODN	C-CR2							
	ssODN输入	30 pmol							
组	温度	（完美寡核苷酸百分比）		（经编辑寡核苷酸百分比）		（部分寡核苷酸百分比）		（非寡核苷酸百分比）	
		平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差	平均值	标准误差
PL1	37°C-37°C-37°C	6.35	0.13	1.5	0.02	13.87	0.32	78.29	0.42
PL2	37°C-32°C-37°C	15.05	0.29	2.58	0.14	24.1	1.43	58.29	1.85
PL3	37°C-32°C-32°C	20.37	3.1	3.24	0.45	25.99	1.14	50.41	2.41
PL4	37°C-30°C-37°C	13.1	0.83	2.56	0.03	24.89	0.37	59.45	1.24
PL5	37°C-30°C-30°C	17.55	0.52	3.18	0.03	28.79	0.34	50.49	0.82
PL6	37°C-28°C-28°C	11.27	0.56	2.71	0.23	23.38	0.14	62.65	0.64
PL7	37°C-28°C-28°C	14.58	0.78	2.49	0.01	26	0.63	56.94	1.41

[0166] 讨论

[0167] 基于CRISPR的基因组工程方法的快速发展需要不可知的和系统的评价过程,以便从此技术中获得最大益处。在这里,我们报告了一种优化的CRISPR模式/递送组合,其在mc-iPSC细胞系中非常有效地促进HDR。然后我们使用这种方法来评价暴露于更低温度是否可以提高HDR的效率,并发现暴露32℃或‘冷激’持续24小时或48小时能够将HDR率提高2倍或更多。鉴于正在非常努力寻找提高HDR率的方法,包括通过化学抑制DNA修复酶来‘驱动’修复过程远离非同源末端结合而朝向HDR(16),以及通过其他抑制剂阻断和同步化细胞于G2/M边界(13);我们的方法提供了更加‘生理’的途径,所述途径尤其是在治疗环境中应用基因编辑的情况下可能有更广泛的应用。

[0168] 有趣的是,当观察到较低的HDR率(等位基因中的1%-20%)时,‘冷激’效果更为显

著,并且在碱基HDR率增加超过30％或更多时‘冷激’效果减弱。这表明,至少用这种途径,理论上可以改变等位基因的数量限制。目前正在研究‘冷激’增加HDR的确切机制。类似于锌指核酸酶如何增加indel形成的机制可能是合理的(17)。我们通过CAMK2D指导物CAMK-CR1和TGFBR1指导物TR-CR2观察到,采用非常有效的CRISPR时,‘冷激’对indel形成的影响是最小的。相反,当切割效率和indel形成较低(如在HEK293细胞中的CAMK2D基因座处观察到的那样)时,切割效率和indel形成的增加更加明显。indel形成的增加可以明显地促成更高的HDR率,但不能解释‘冷激’所观察到的所有增加,或解释为什么在寒冷条件下‘完美HDR’是有利的。可能有助于提高HDR率的可能机制是使细胞在32℃下生长会影响细胞周期,其中更多细胞累积在G2/M;然而,我们迄今为止的初步观察结果并未显示支持此假设的任何细胞周期效应(数据未显示)。第三个更可能的促成因素是冷具有热力学效应,其起到稳定重组中间体的作用。目前正在努力详细了解机制。一个潜在的担忧是‘冷激’可能会对多能性产生不利影响。着眼于三种多能性标准标记物Oct4、SSEA3和Nanog的初步分析(18,19)表明这不是问题,但长时间暴露在寒冷环境中可能会导致Nanog表达的一些丢失(图7)。显然,需要做更多的工作来确保‘冷激’在细胞系和应用中是有效和可推广的。

[0169] 我们还证明,用于促进HDR的供体寡核苷酸的结构可能对发生的HDR的总体频率和类型均产生深远的影响。在测试的两个基因座中,两种寡核苷酸设计对称靶链和不对称非靶链都可以产生高水平的总HDR,然而尤其在‘冷激’的条件下,对称的靶链寡核苷酸比不对称的非靶链寡核苷酸更高效地产生‘完美HDR’。虽然这些数据与Richardson等人的数据不一致(14);但我们的数据与Paquet等人的数据一致,他们的供体寡核苷酸被设计为相同的链(15)。

[0170] 总之,我们已经开发了用于在iPSC中进行基因编辑的方案,其不需要使用核转染或选择来获得已经通过HDR过程高效地经历定向基因组序列改变的细胞群。我们还证明,通过结合向较低温度下简单、短暂和生理学的暴露,可有效地增加HDR,这种暴露将在许多基因组工程应用中具有广泛的用途。

[0171] 参考文献

[0172] 1Hockemeyer,D.&Jaenisch,R.Induced Pluripotent Stem Cells Meet Genome Editing.Cell stem cell 18,573-586,(2016).

[0173] 2Jang,Y.Y.&Ye,Z.Gene correction in patient-specific iPSCs for therapy development and disease modeling.Human genetics 135,1041-1058,(2016).

[0174] 3Bojesen,S.E.et al.Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer.Nat Genet45,371-384,(2013).

[0175] 4Chiba,K.et al.Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing.eLife 4,e07918,(2015).

[0176] 5Mali,P.et al.RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9.Science (New York,N.Y.)339,823-826,(2013).

[0177] 6Chen,F.et al.High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases.Nat Meth 8,753-755,(2011).

[0178] 7Soldner,F.et al.Generation of Isogenic Pluripotent Stem Cells

Differing Exclusively at Two Early Onset Parkinson Point Mutations.Cell 146,318-331,(2011).

[0179] 8Miyaoka,Y.et al.Systematic quantification of HDR and NHEJ reveals effects of locus,nuclease,and cell type on genome-editing.Scientific reports 6,23549,(2016).

[0180] 9Zhang,Y.et al.Generation of a human induced pluripotent stem cell line via CRISPR-Cas9 mediated integration of a site-specific homozygous mutation in CHMP2B.Stem cell research 17,151-153,(2016).

[0181] 10Yusa,K.et al.Targeted gene correction of alpha1-antitrypsin deficiency in induced pluripotent stem cells.Nature 478,391-394,(2011).

[0182] 11Yang,L.et al.Optimization of scarless human stem cell genome editing.Nucleic acids research 41,9049-9061,(2013).

[0183] 12Miyaoka,Y.et al.Isolation of single-base genome-edited human iPS cells without antibiotic selection.Nature methods 11,291-293,(2014).

[0184] 13Lin,S.,Staahl,B.T.,Alla,R.K.&Doudna,J.A.Enhanced homology-directed human genome engineering by controlled timing ofCRISPR/Cas9 delivery.Elife 3,e04766,(2014).

[0185] 14 Richardson,C.D.,Ray,G.J.,DeWitt,M.A.,Curie,G.L.&Corn,J.E.Enhancing homology-directed genome editing by catalytically active and inactiveCRISPR-Cas9 using asymmetric donor DNA.Nat Biotech advance onlinepublication,doi:10.1038/nbt.3481,(2016).

[0186] 15 Paquet,D.et al.Efficient introduction of specific homozygous andheterozygous mutations using CRISPR/Cas9.Nature 533,125-129,(2016).

[0187] 16 Maruyama,T.et al.Increasing the efficiency of precise genome editingwith CRISPR-Cas9 by inhibition of nonhomologous end joining.Naturebiotechnology 33,538-542,(2015).

[0188] 17 Doyon,Y.et al.Transient cold shock enhances zinc-fingernuclease-mediated gene disruption.Nat Meth 7,459-460,(2010).

[0189] 18 Yu,J.et al.Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from HumanSomatic Cells.Science(New York,N.Y.)318,1917-1920,(2007).

[0190] 19 Takahashi,K.et al.Induction of pluripotent stem cells from adult humanfibroblasts by defined factors.Cell 131,861-872,(2007).

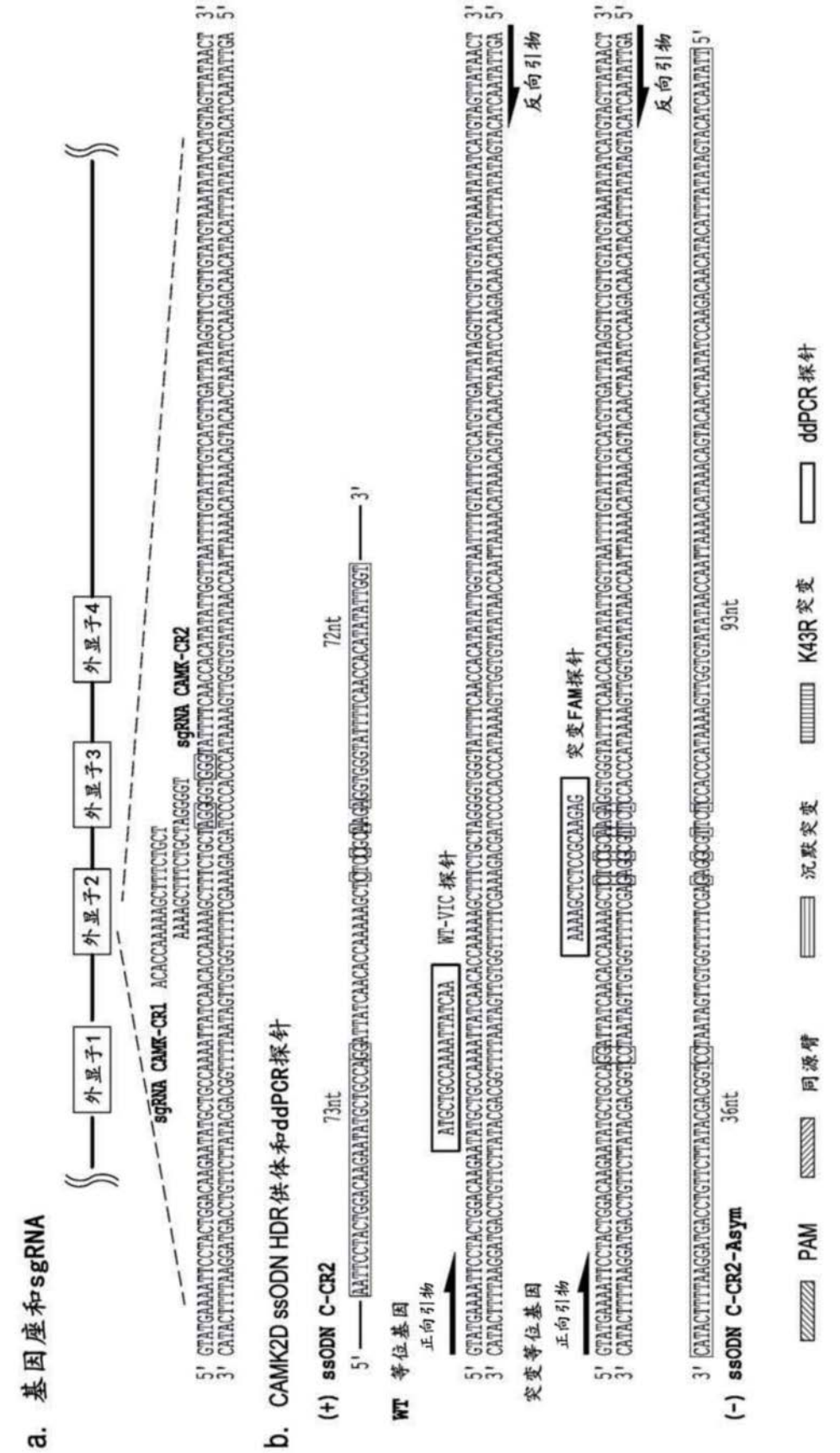

a. 基因座和sgRNA
外显子1
外显子2
外显子3
外显子4
sgRNA CAMK-CR1
sgRNA CAMK-CR2
b. CAMK2D ssODN HDR供体和ddPCR探针
(+) ssODN C-CR2
73nt
72nt
WT 等位基因
正向引物
WT-VIC 探针
突变等位基因
突变FAM探针
反向引物
(-) ssODN C-CR2-Asym
36nt
93nt
PAM
同源臂
沉默突变
K43R突变
ddPCR探针

图1

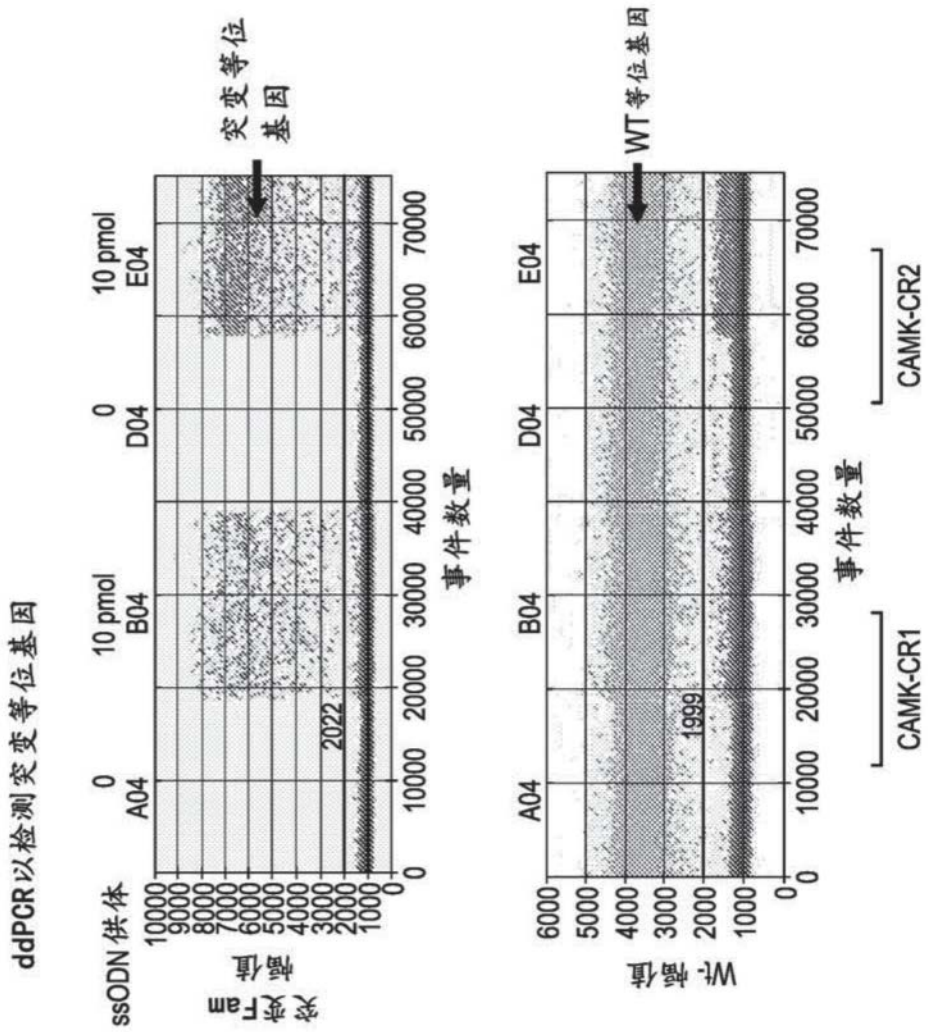

ddPCR以检测突变等位基因
ssODN 供体
10 pmol
0
10 pmol
0
A04
B04
D04
E04
突变等位基因
WT等位基因
2022
1999
事件数量
CAMK-CR1
CAMK-CR2

图2a

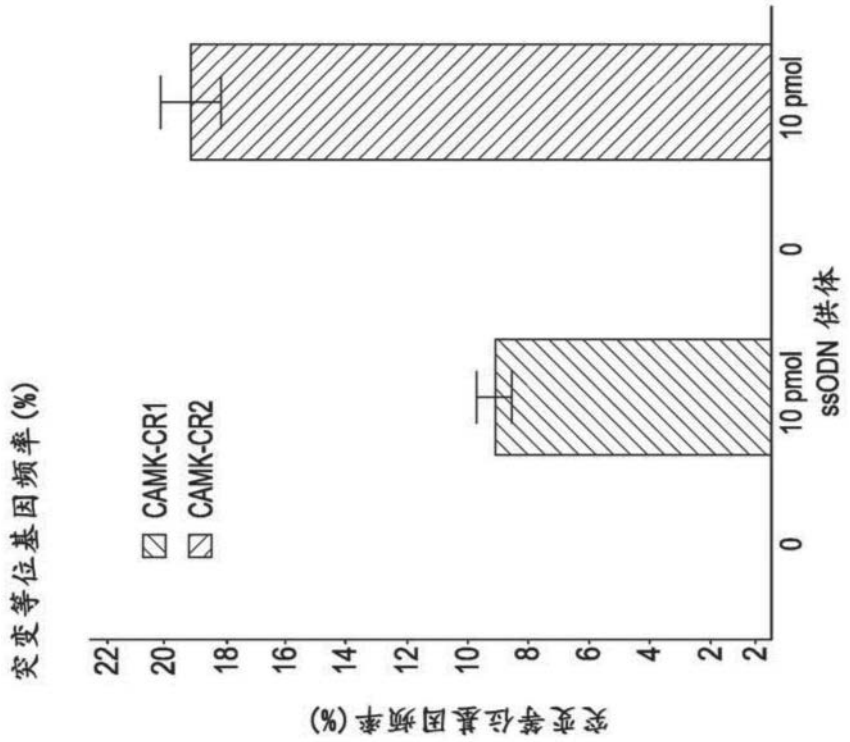

突变等位基因频率(%)
CAMK-CR1
CAMK-CR2
0
10 pmol
0
10 pmol
ssODN 供体
22
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
2
突变等位基因频率(%)

图2b

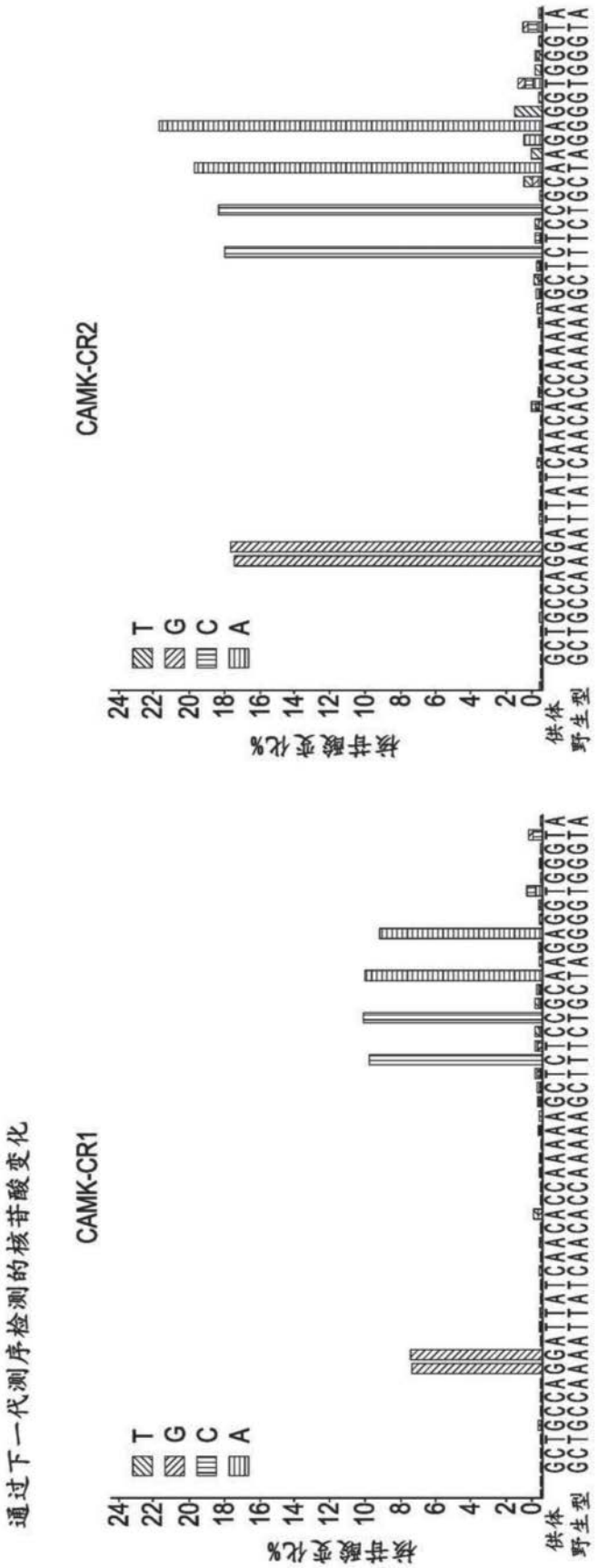

通过下一代测序检测的核苷酸变化
CAMK-CR1
CAMK-CR2
核苷酸变化%
T
G
C
A
供体
野生型
GCTGCCAGGATTATCAACACCAAAAAGCTCTCCGCAAGAGGTGGGTA
GCTGCCAAAATTATCAACACCAAAAAGCTTTCTAGGGGTGGGTA

图2c

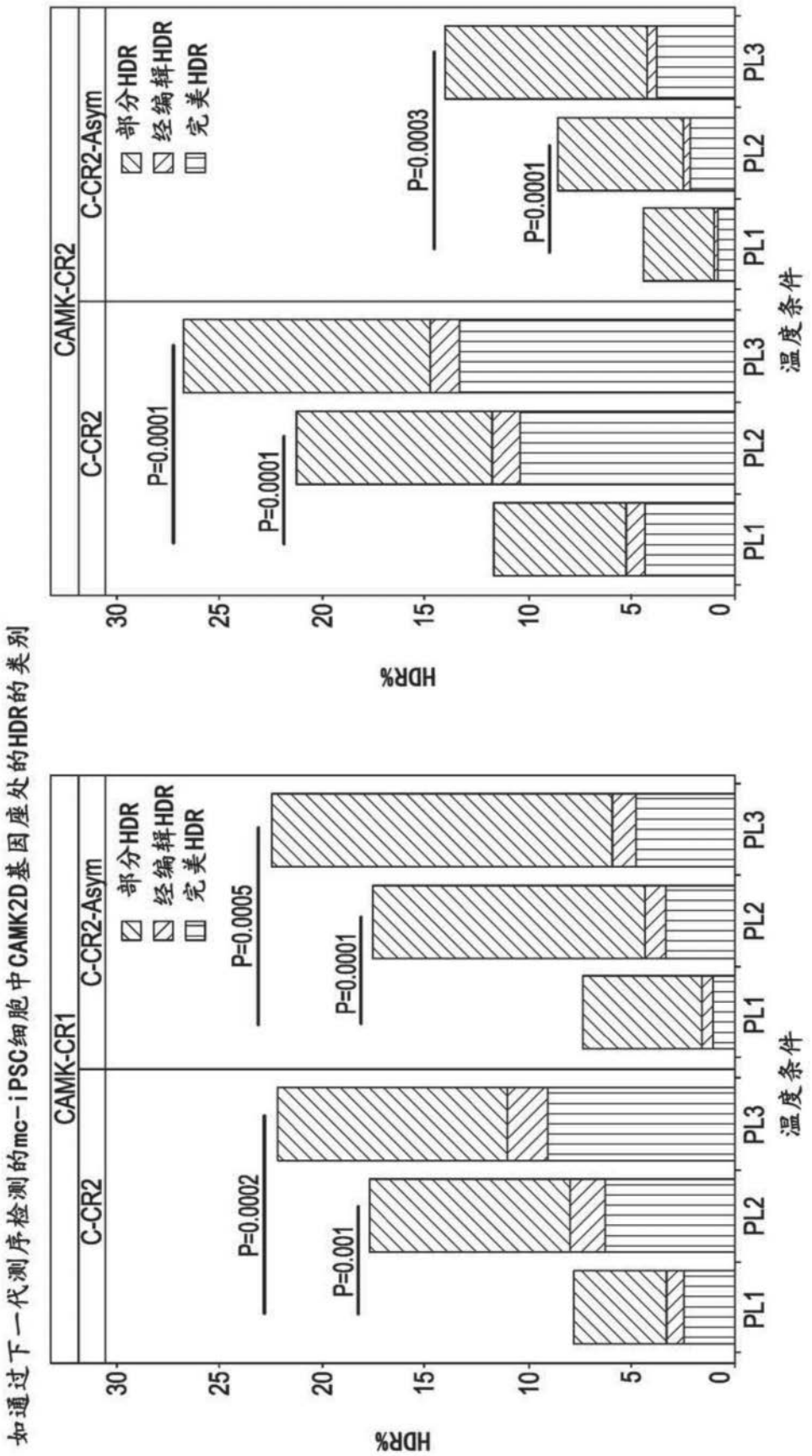

如通过下一代测序检测的mc-iPSC细胞中CAMK2D基因座处的HDR的类别
CAMK-CR1
CAMK-CR2
C-CR2
C-CR2-Asym
部分HDR
经编辑HDR
完美HDR
P=0.0002
P=0.001
P=0.0005
P=0.0001
P=0.0001
P=0.0001
P=0.0003
HDR%
温度条件
PL1
PL2
PL3
0
5
10
15
20
25
30

图3a

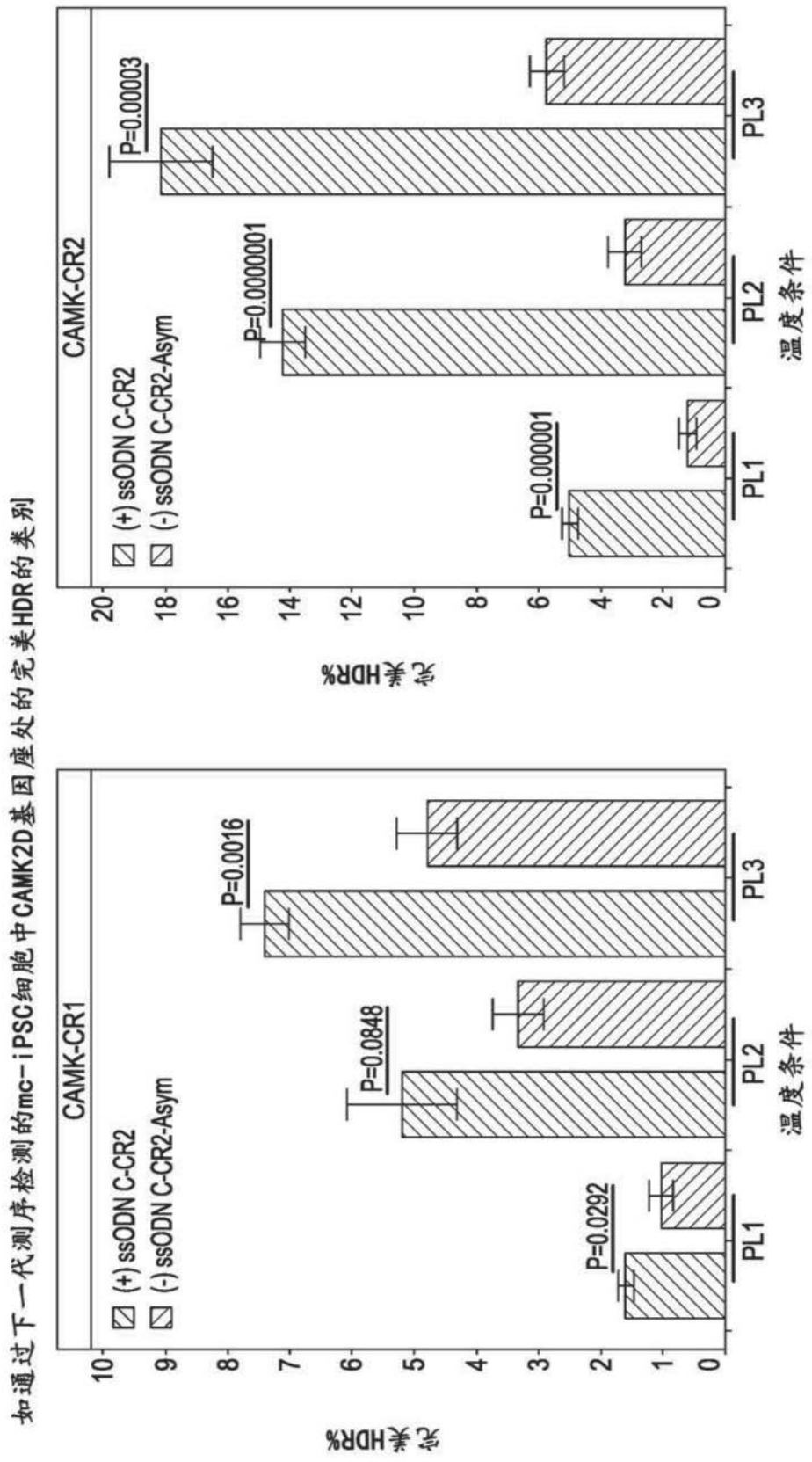

如通过下一代测序检测的mc-iPSC细胞中CAMK2D基因座处的完美HDR的类别
CAMK-CR1
CAMK-CR2
(+) ssODN C-CR2
(-) ssODN C-CR2-Asym
完美HDR%
温度条件
PL1
PL2
PL3
P=0.0292
P=0.0848
P=0.0016
P=0.000001
P=0.0000001
P=0.00003

图3b

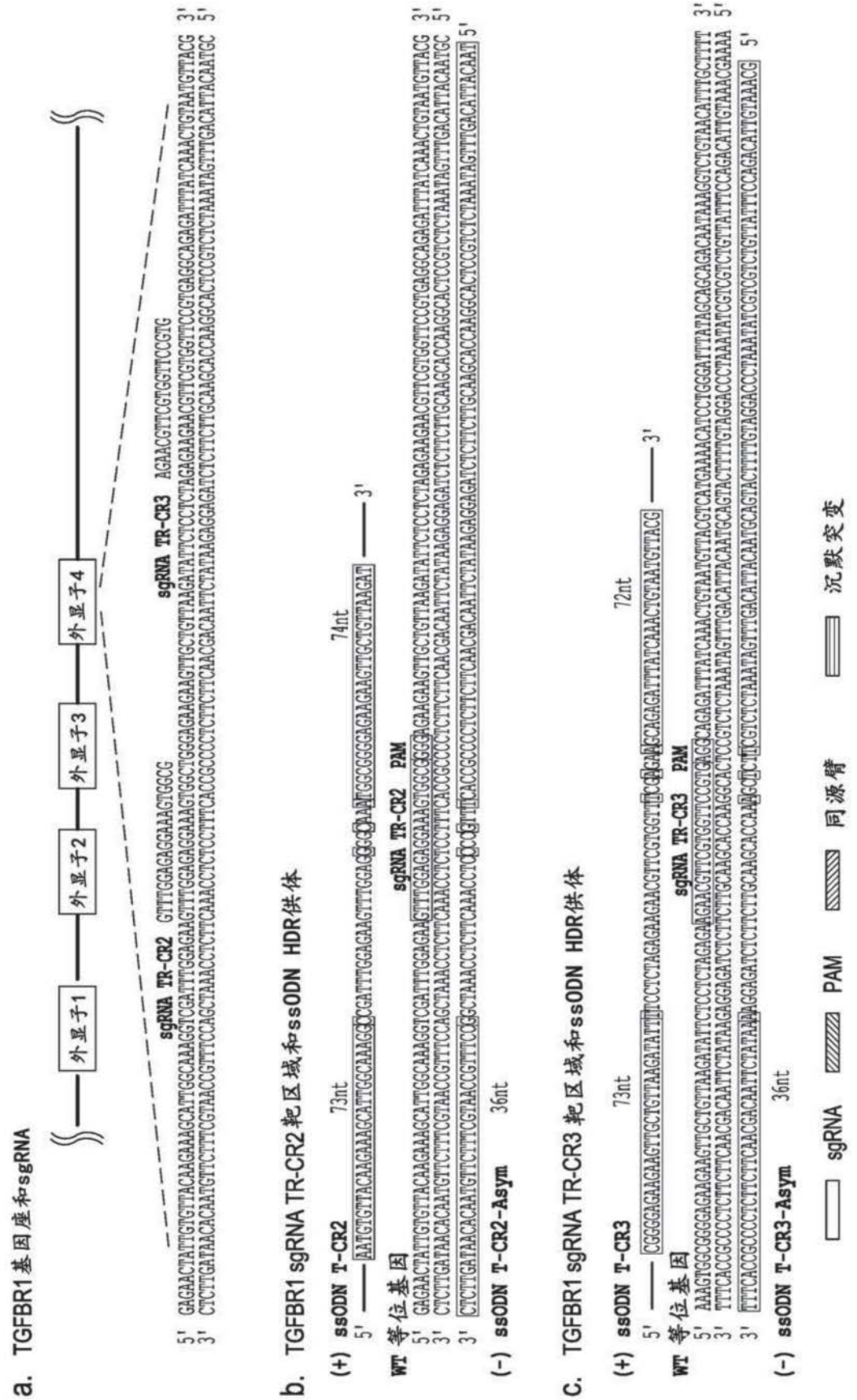

a. TGFBR1基因座和sgRNA
外显子1
外显子2
外显子3
外显子4
sgRNA TR-CR2 GTTTGGAGAGGAAAGTGGCG
sgRNA TR-CR3 AGAACGTTCGTGGTTCCGTG
b. TGFBR1 sgRNA TR-CR2靶区域和ssODN HDR供体
(+) ssODN T-CR2 73nt
74nt
WT 等位基因
sgRNA TR-CR2 PAM
(-) ssODN T-CR2-Asym 36nt
c. TGFBR1 sgRNA TR-CR3 靶区域和ssODN HDR供体
(+) ssODN T-CR3 73nt
72nt
WT 等位基因
sgRNA TR-CR3 PAM
(-) ssODN T-CR3-Asym 36nt
sgRNA
PAM
同源臂
沉默突变

图4

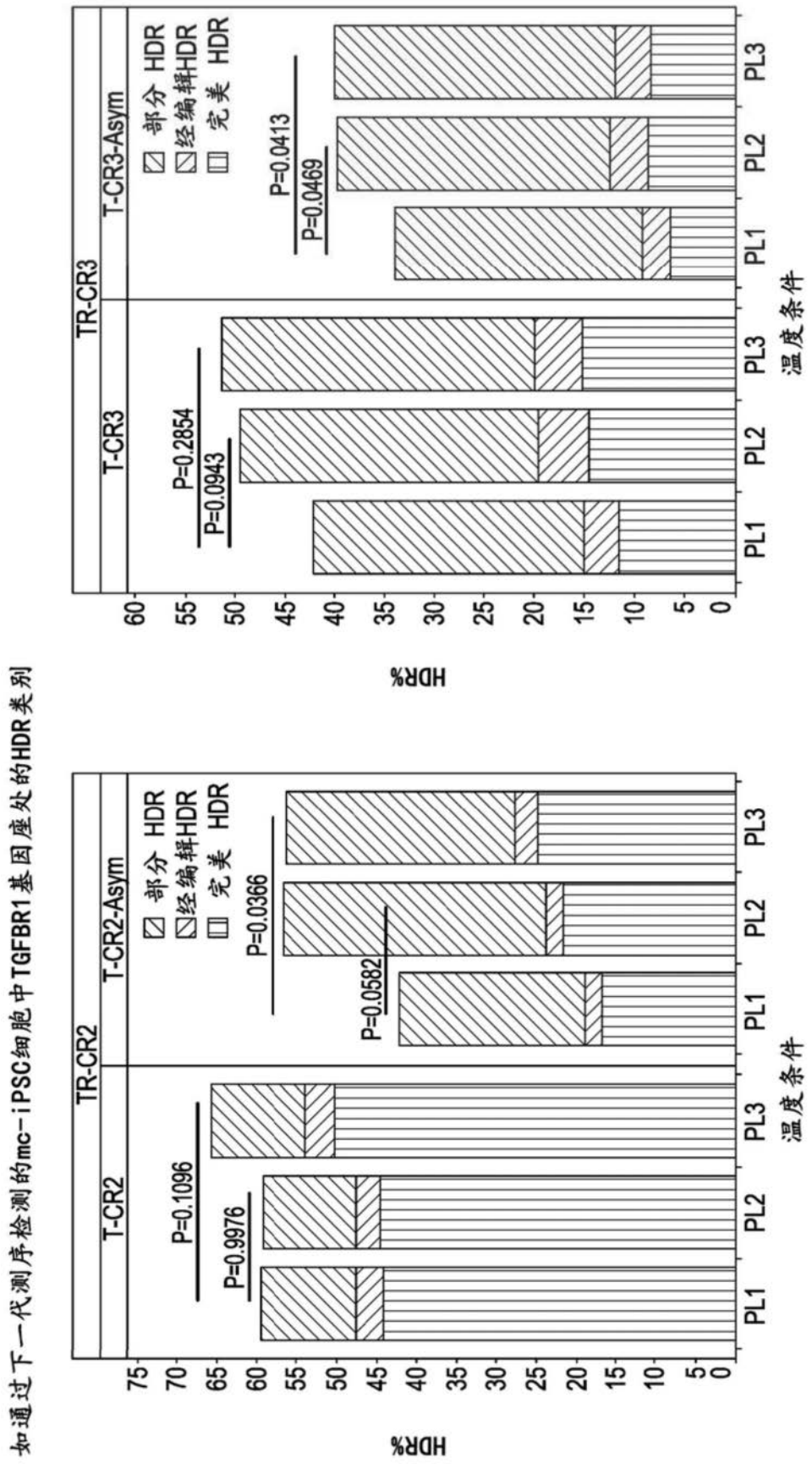

如通过下一代测序检测的mc-iPSC细胞中TGFBR1基因座处的HDR类别
TR-CR2
T-CR2
T-CR2-Asym
TR-CR3
T-CR3
T-CR3-Asym
部分 HDR
经编辑HDR
完美 HDR
P=0.1096
P=0.9976
P=0.0366
P=0.0582
P=0.2854
P=0.0943
P=0.0413
P=0.0469
HDR%
温度条件
PL1
PL2
PL3

图5a

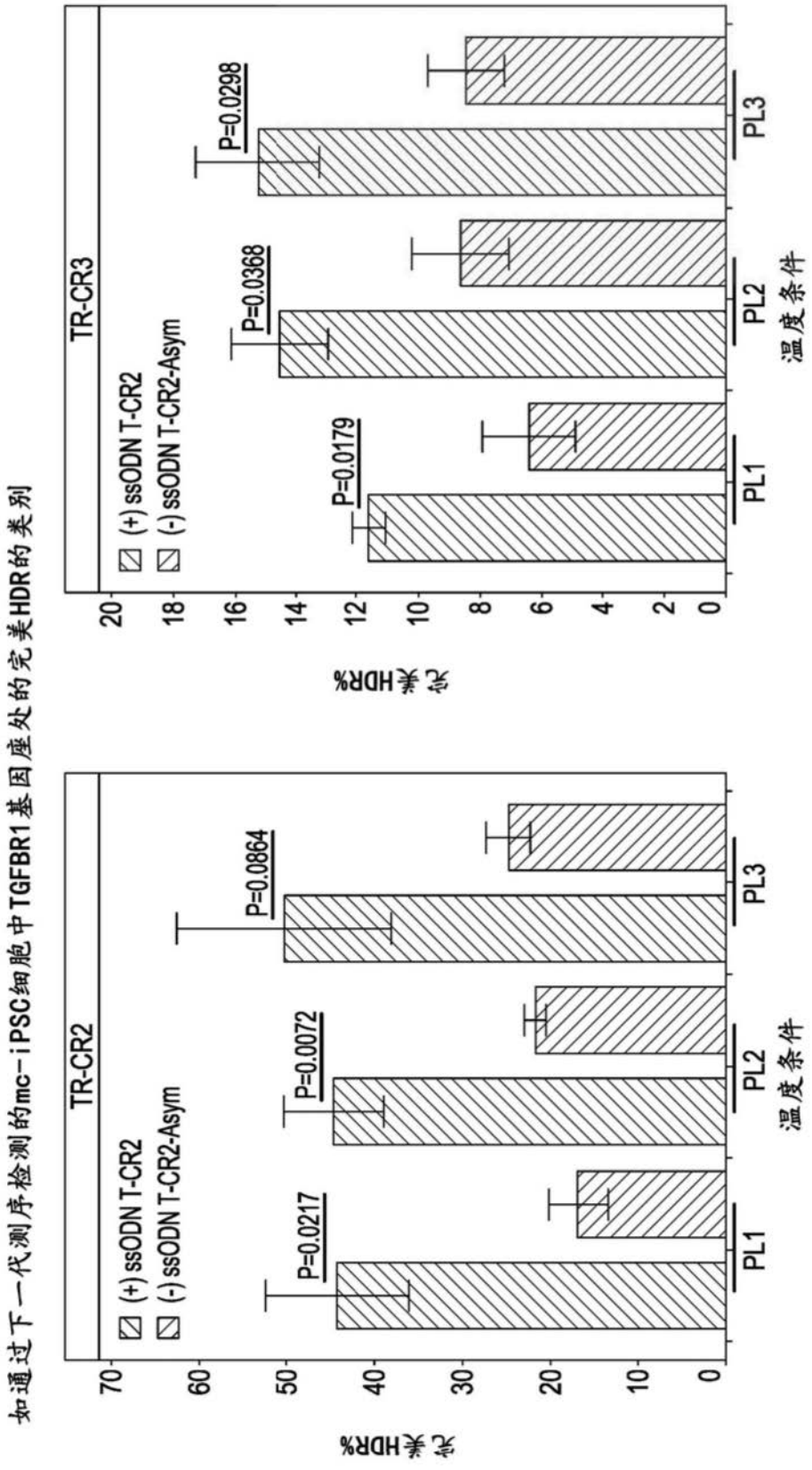

如通过下一代测序检测的mc-iPSC细胞中TGFBR1基因座处的完美HDR的类别
TR-CR2
TR-CR3
(+) ssODN T-CR2
(-) ssODN T-CR2-Asym
完美HDR%
温度条件
PL1
PL2
PL3
P=0.0217
P=0.0072
P=0.0864
P=0.0179
P=0.0368
P=0.0298

图5b

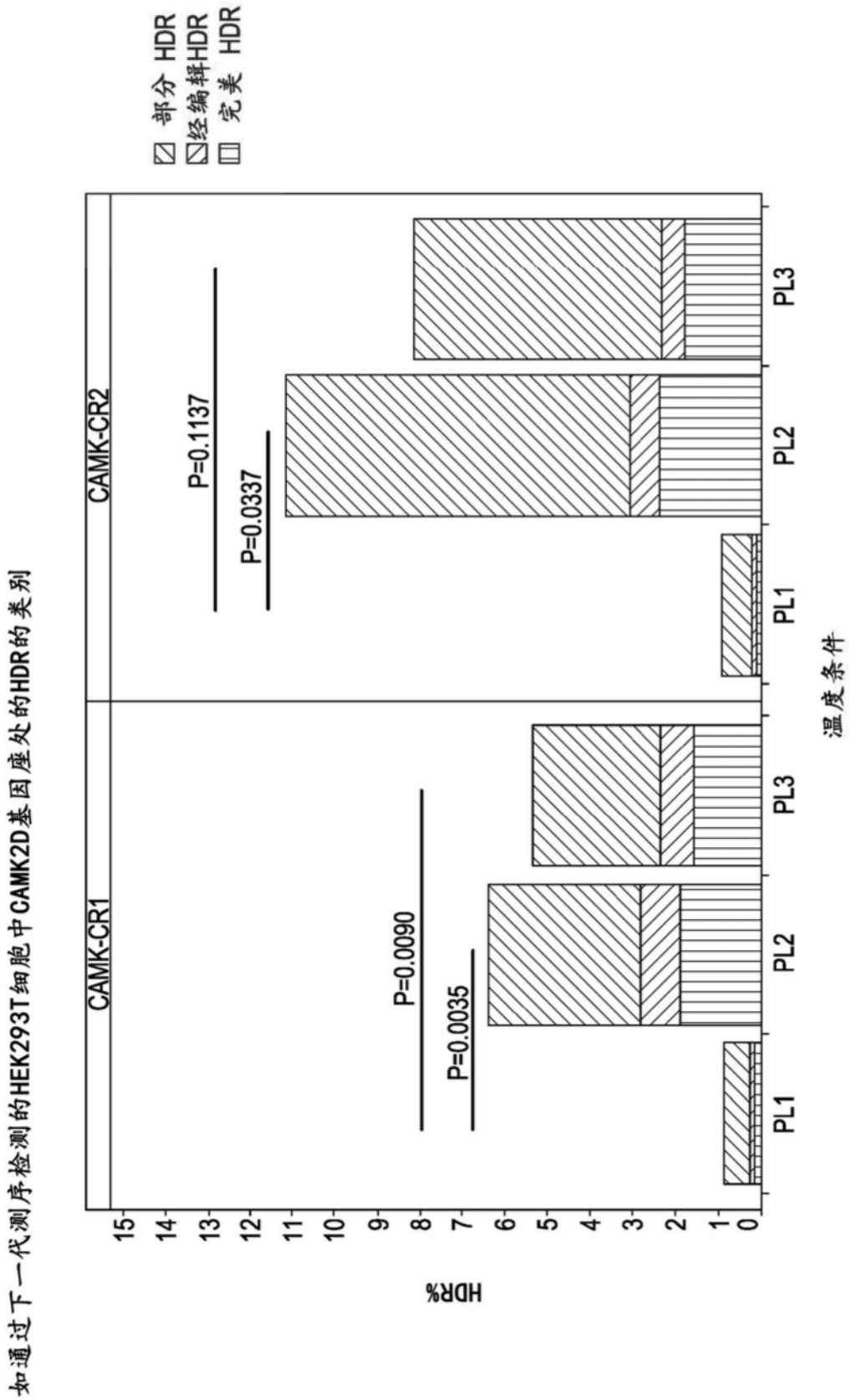

如通过下一代测序检测的HEK293T细胞中CAMK2D基因座处的HDR的类别
部分 HDR
经编辑HDR
完美 HDR
CAMK-CR1
CAMK-CR2
P=0.0090
P=0.0035
P=0.1137
P=0.0337
HDR%
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
PL1
PL2
PL3
PL1
PL2
PL3
温度条件

图6

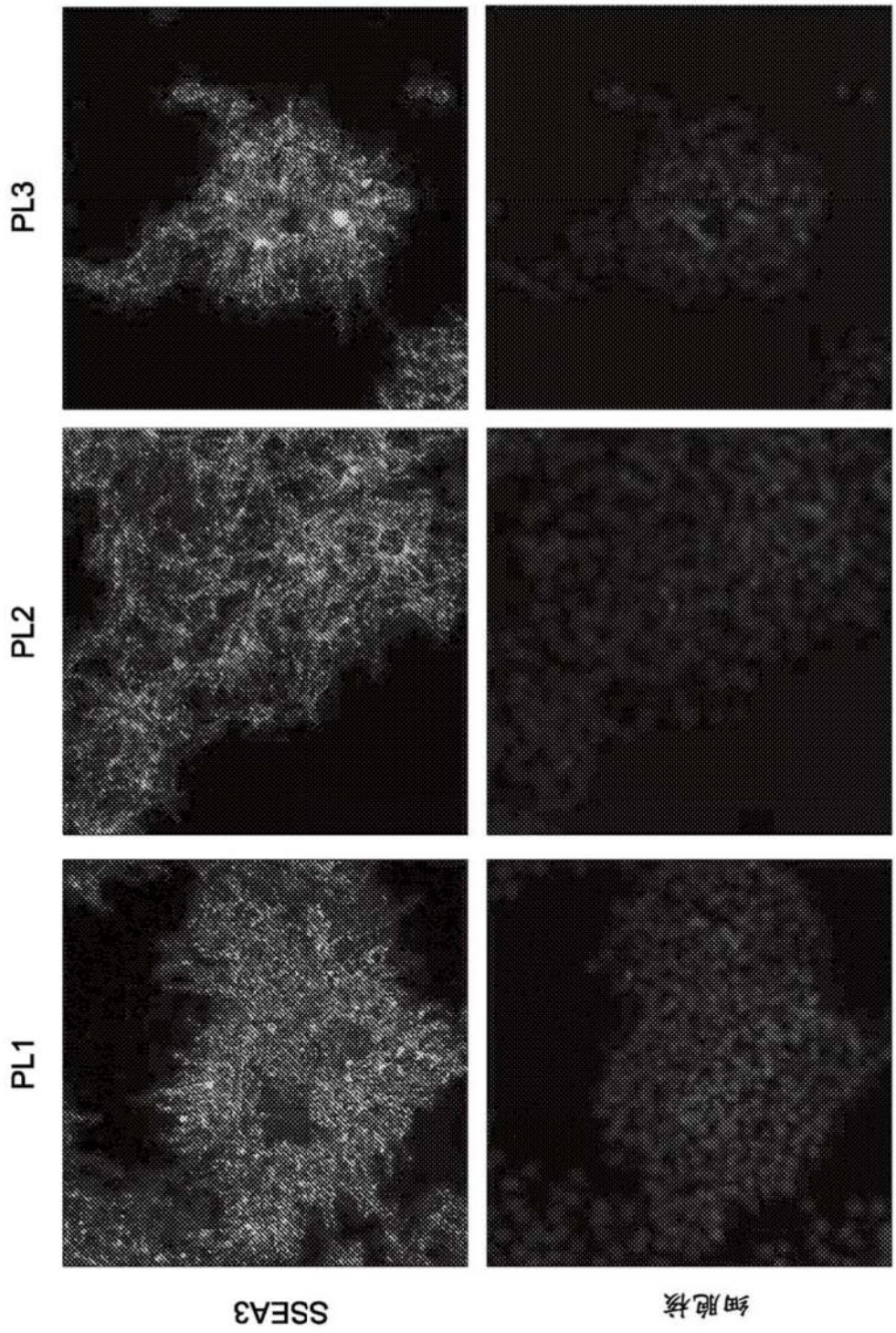


图7a

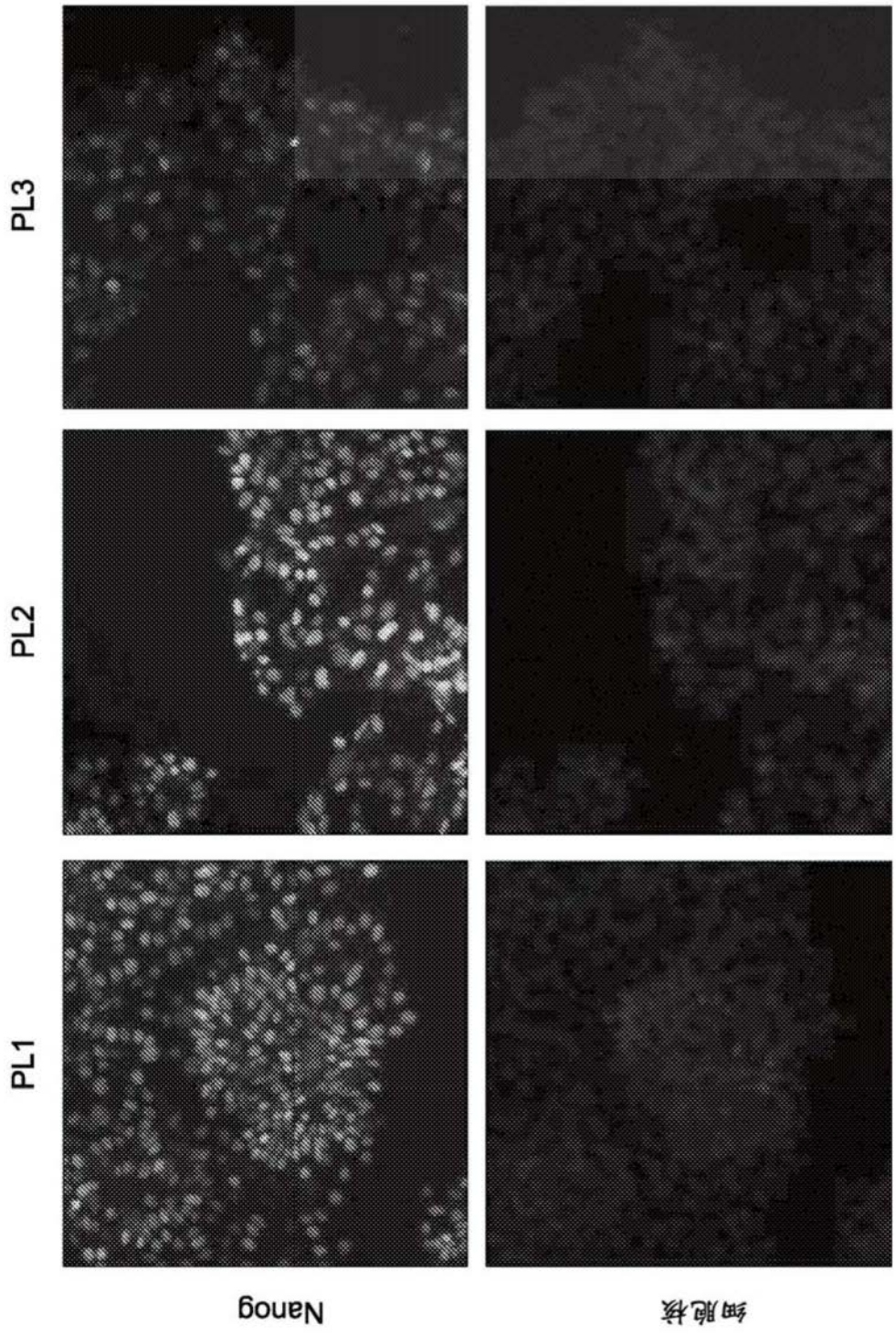


图7b

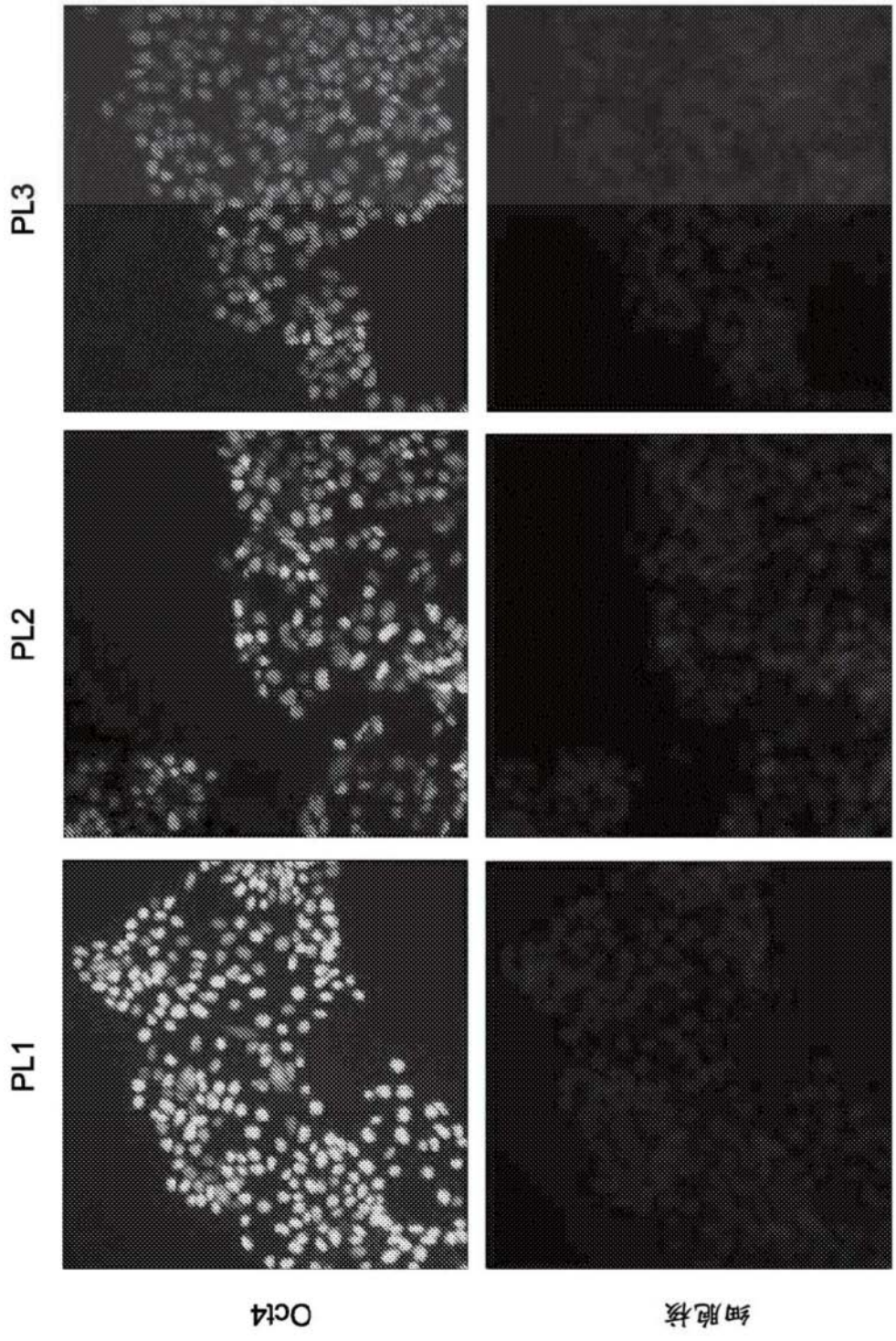


图7c

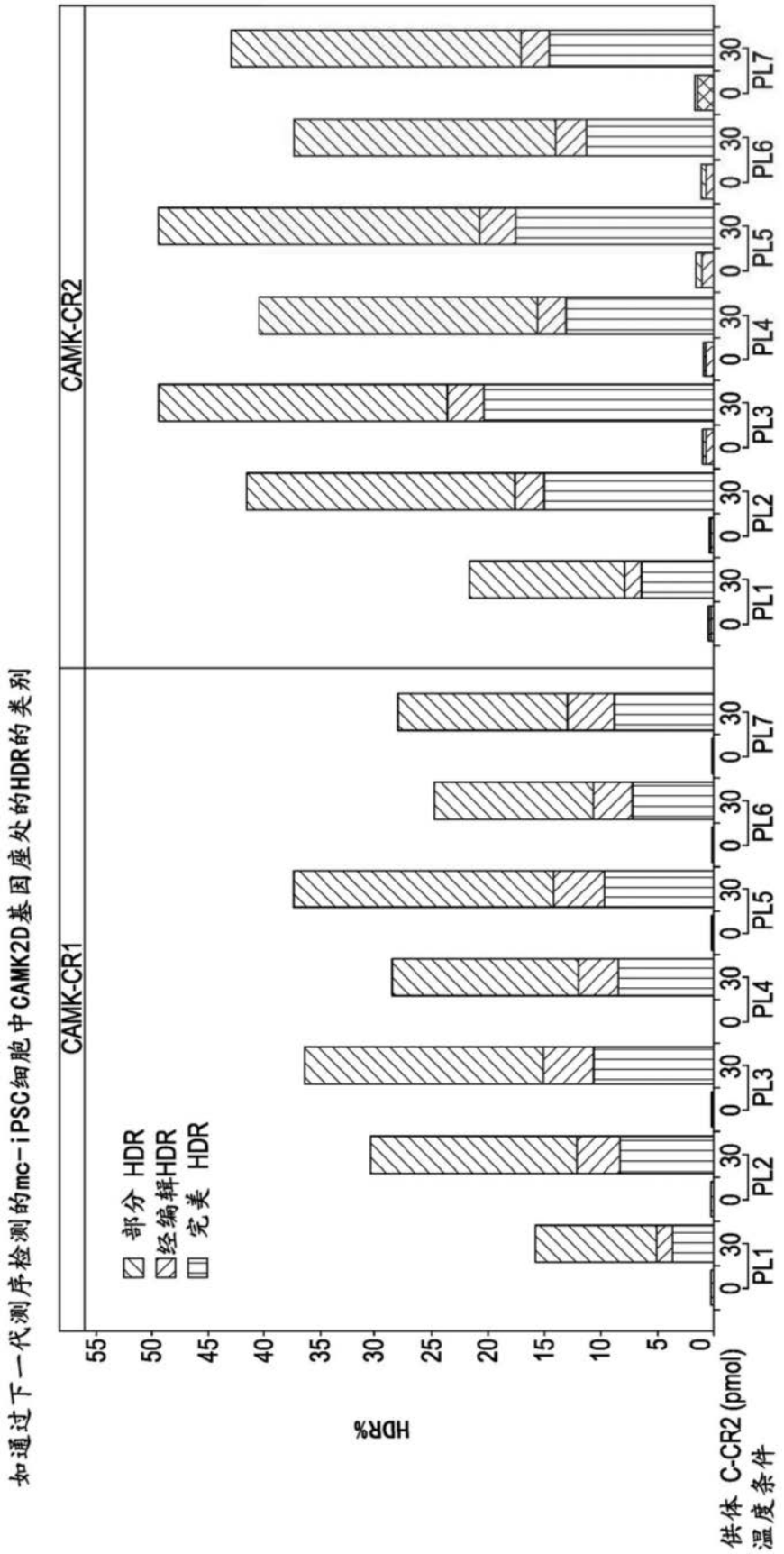

如通过下一代测序检测的mc-iPSC细胞中CAMK2D基因座处的HDR的类别
CAMK-CR1
CAMK-CR2
部分 HDR
经编辑HDR
完美 HDR
HDR%
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
供体 C-CR2 (pmol)
温度条件
0 30 0 30 0 30 0 30 0 30 0 30 0 30
PL1 PL2 PL3 PL4 PL5 PL6 PL7

图8