

CRISPR

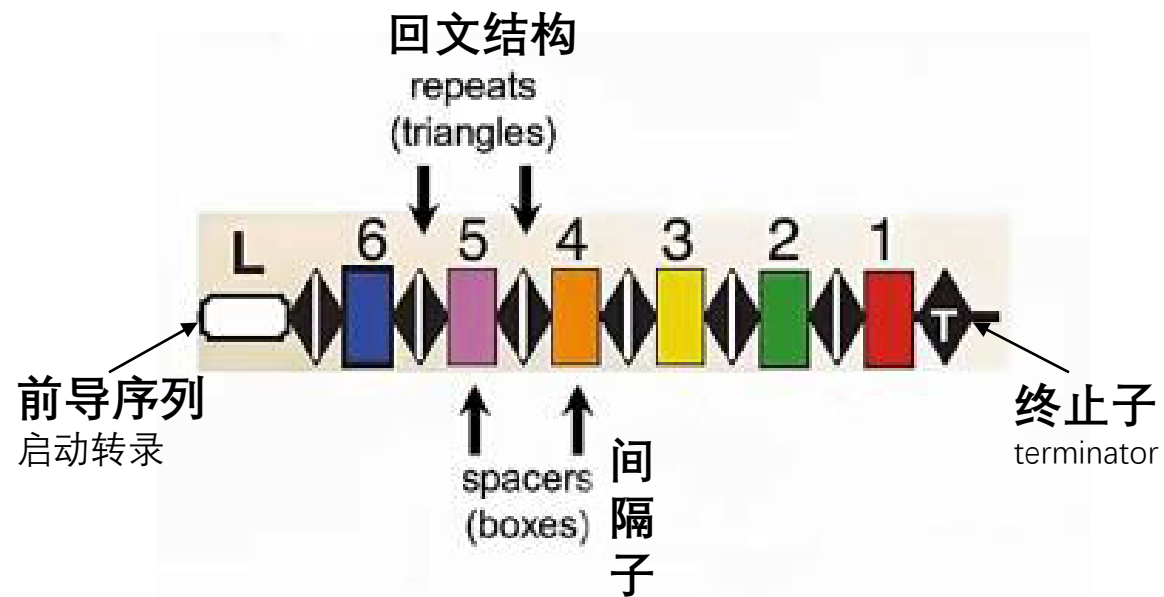
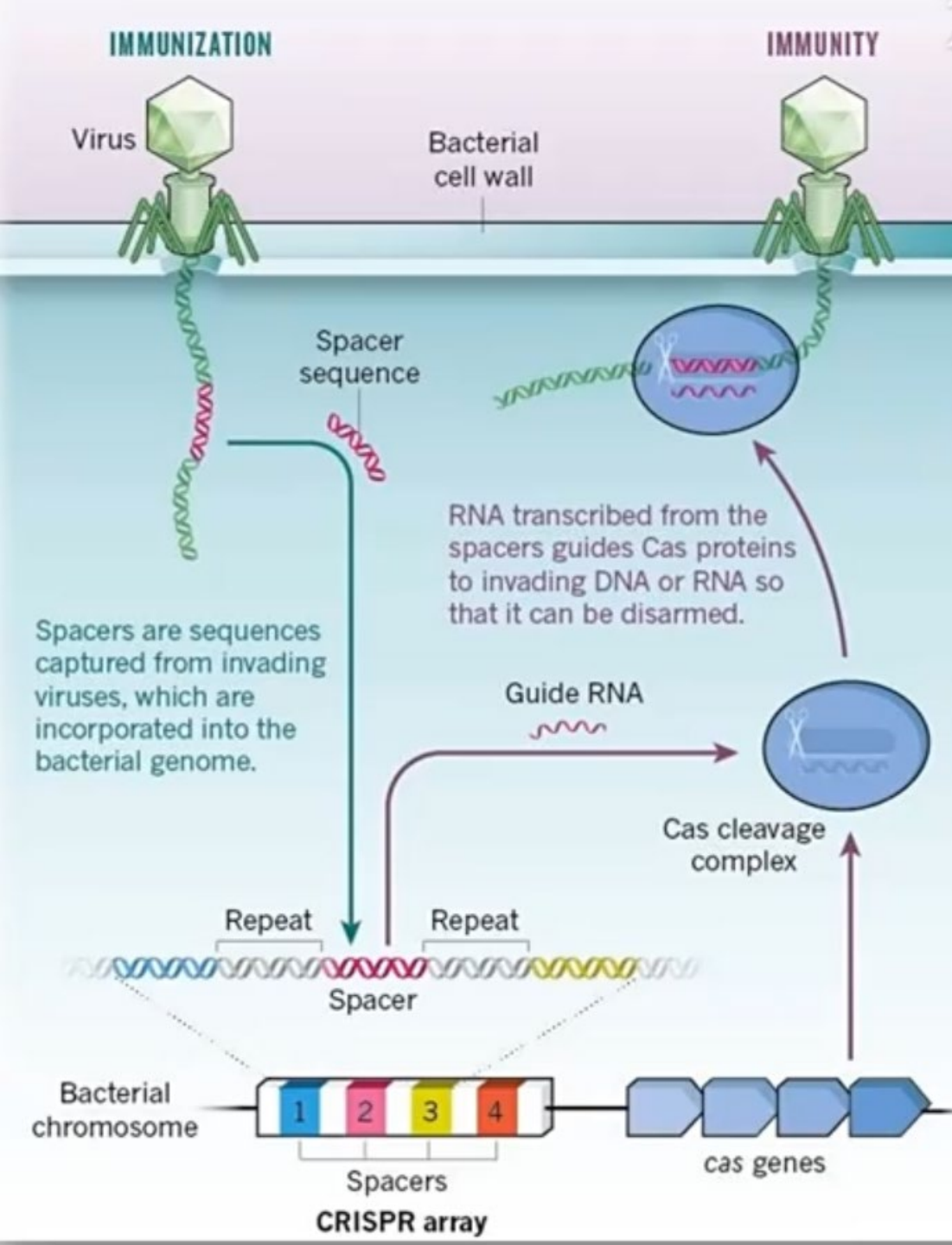
*C*lustered *R*egularly *I*nterspaced *S*hort *P*alindromic *R*epeats



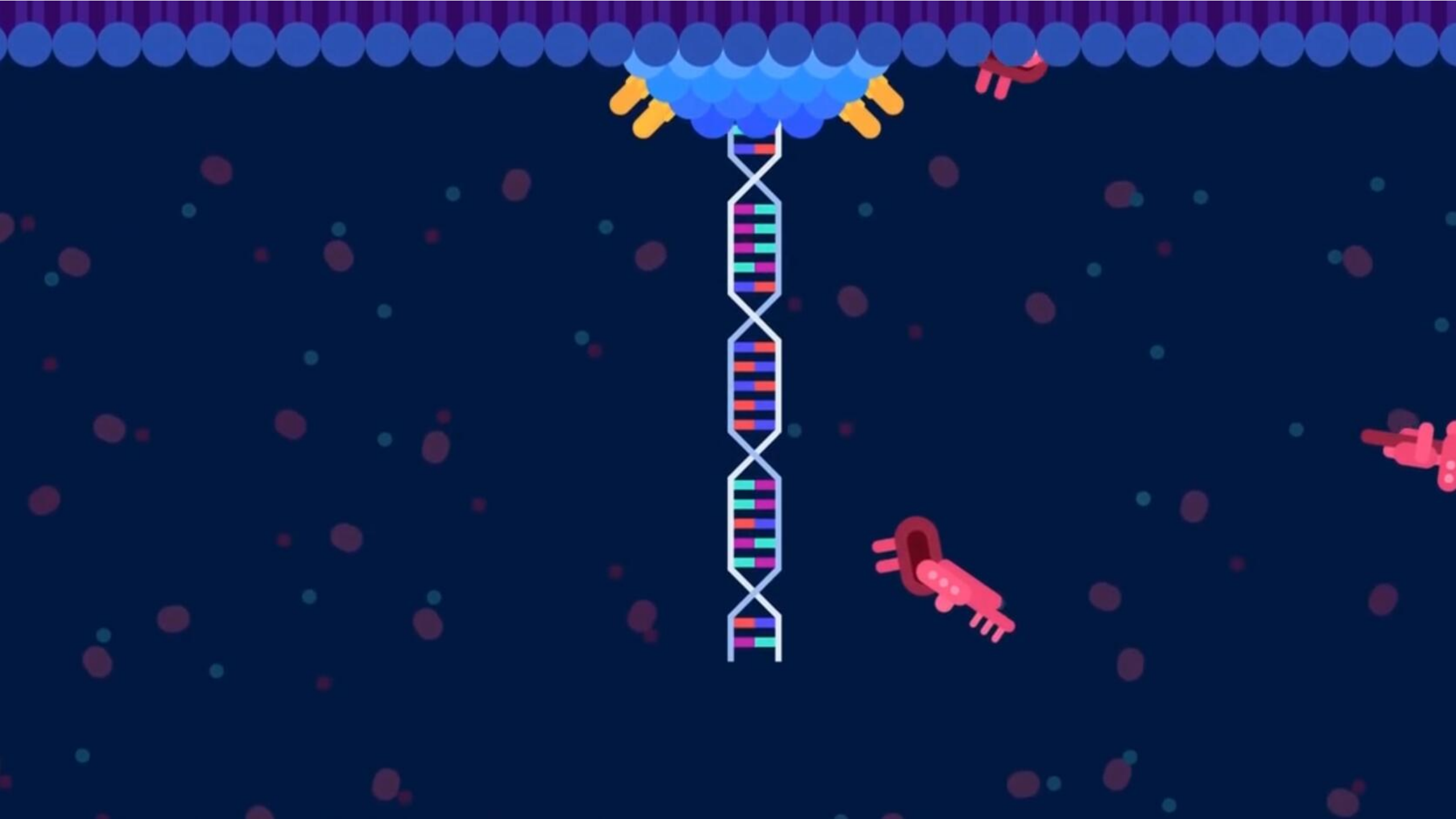
BACTERIUM



VIRUS







CRISPR



VIRUS DNA





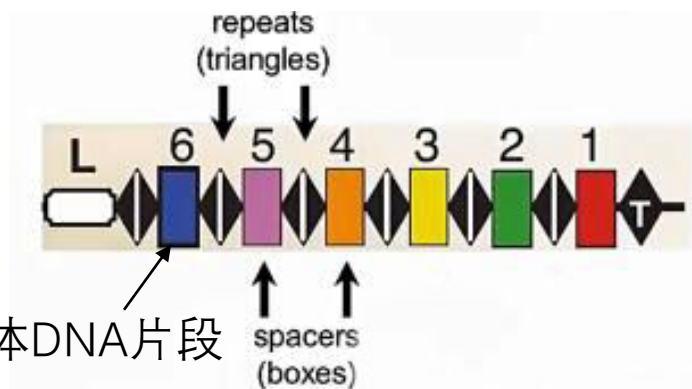
cas

CRISPR associated protein

cas系统表达cas蛋白

当噬菌体再次入侵时，cas系统会捕捉噬菌体注入的DNA并分解

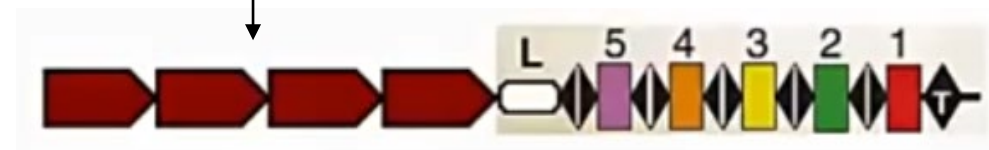
cas蛋白是单链多肽



噬菌体DNA片段

编码一种多亚基蛋白质 (cas)

cas gene



cas

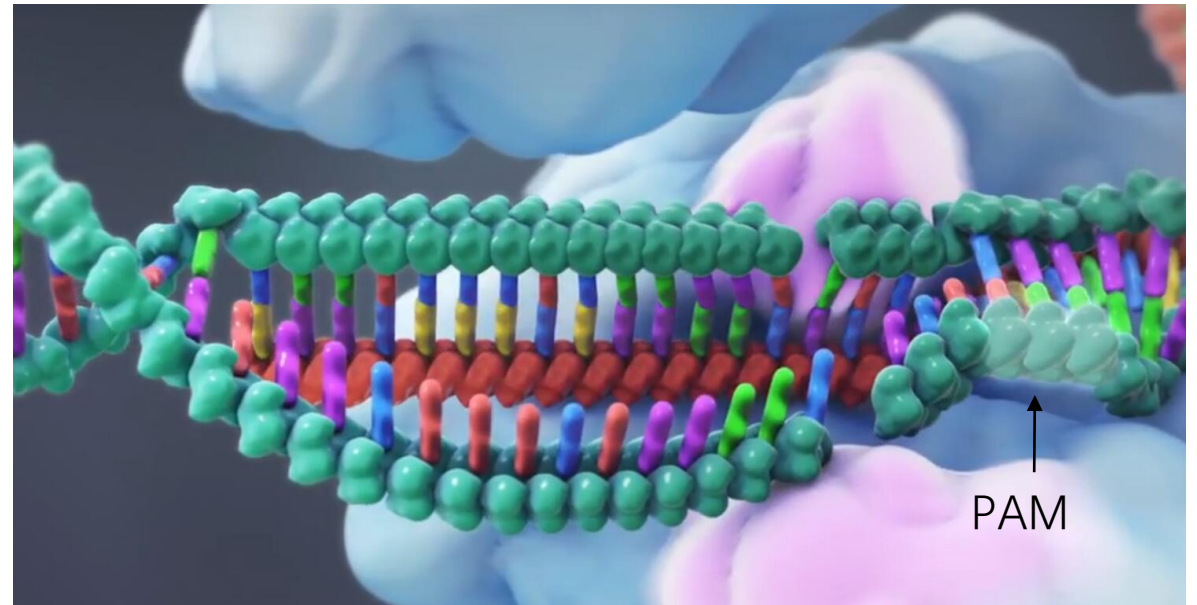
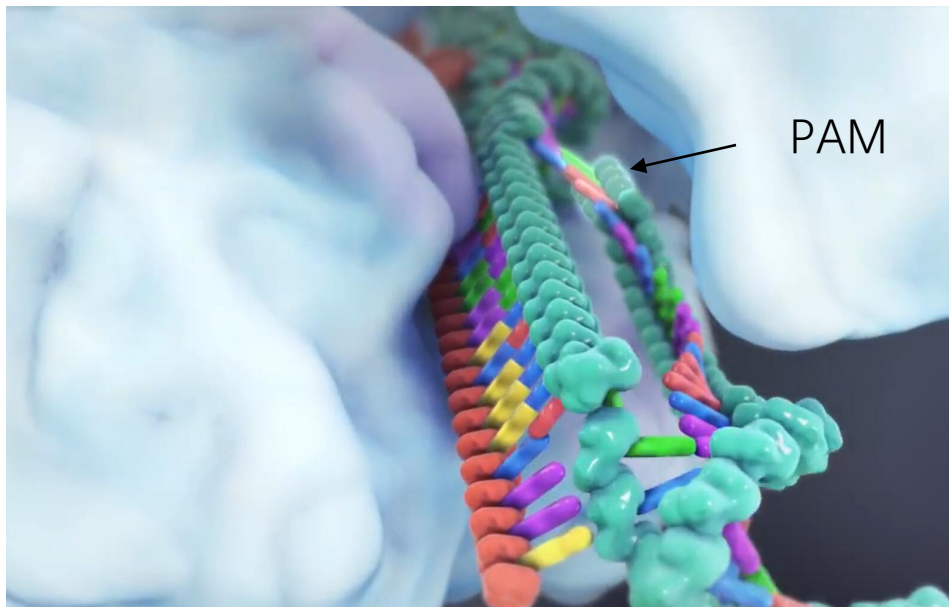
CRISPR associated protein

CAS9



PAM(5'-NGG-3')

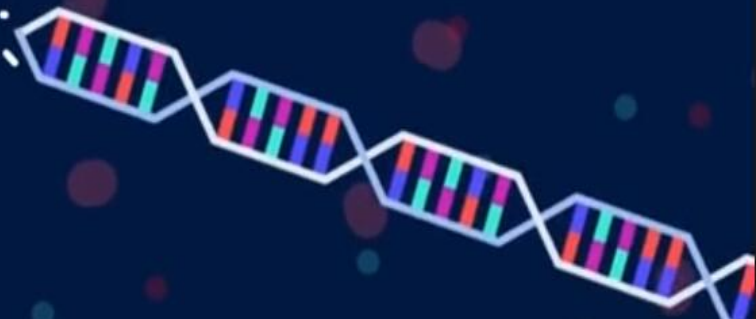
- cas9通过PAM序列结合并侵入DNA，形成RNA-DNA复合结构，进而对目的DNA双链进行切割，使DNA双链断裂

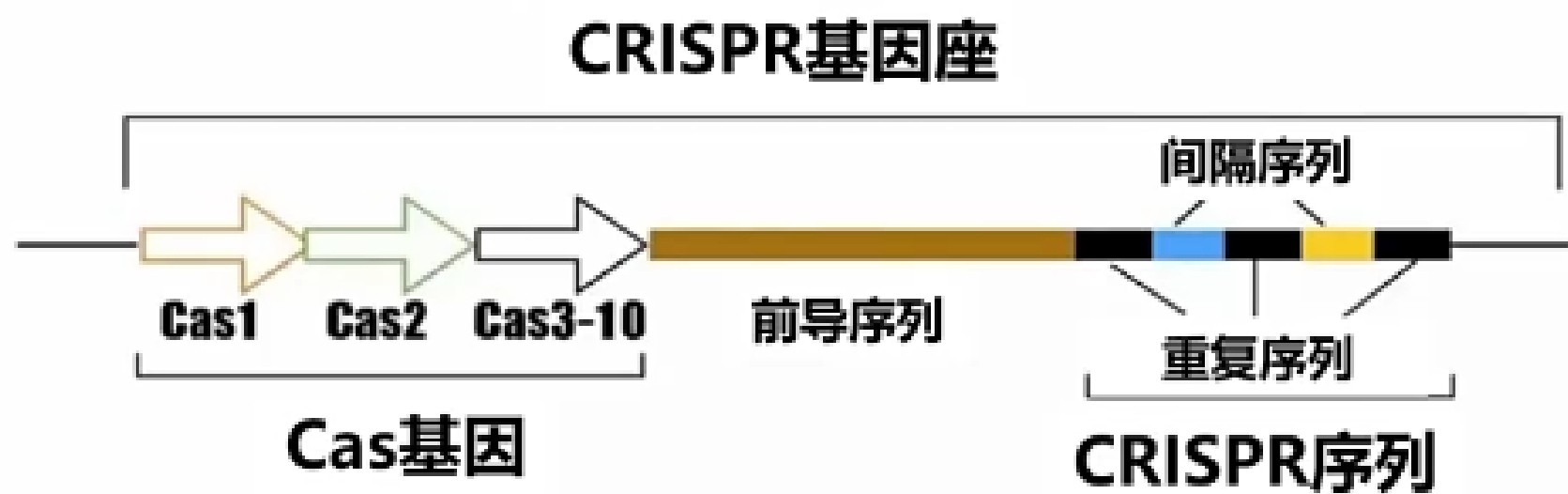


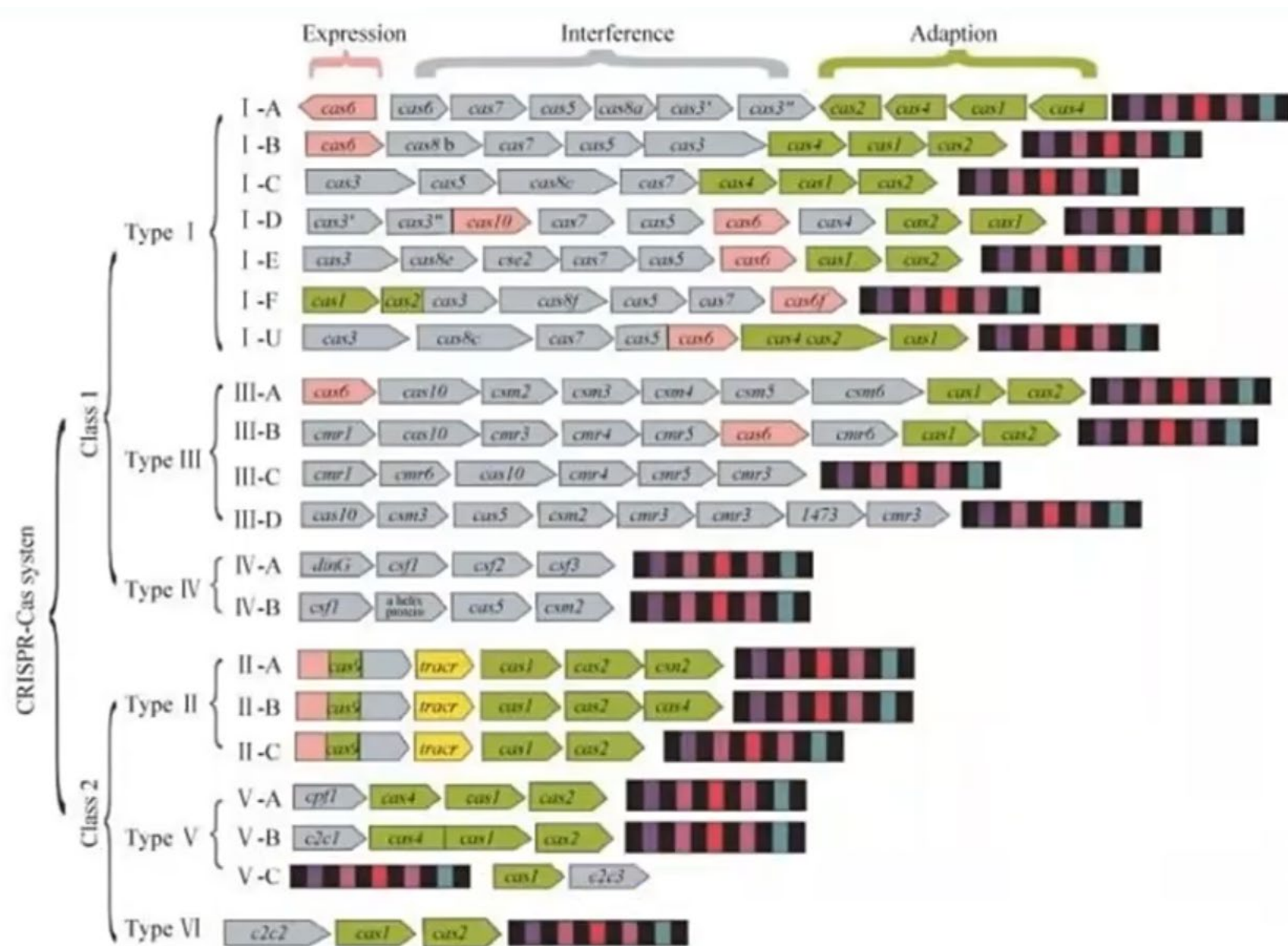
- PAM序列在病毒DNA上，所以cas9不会剪切细菌自身DNA

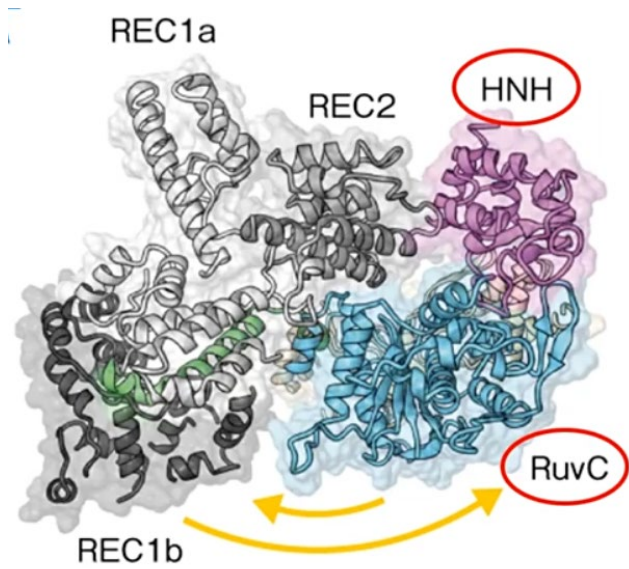
CAS9

MATCH!!





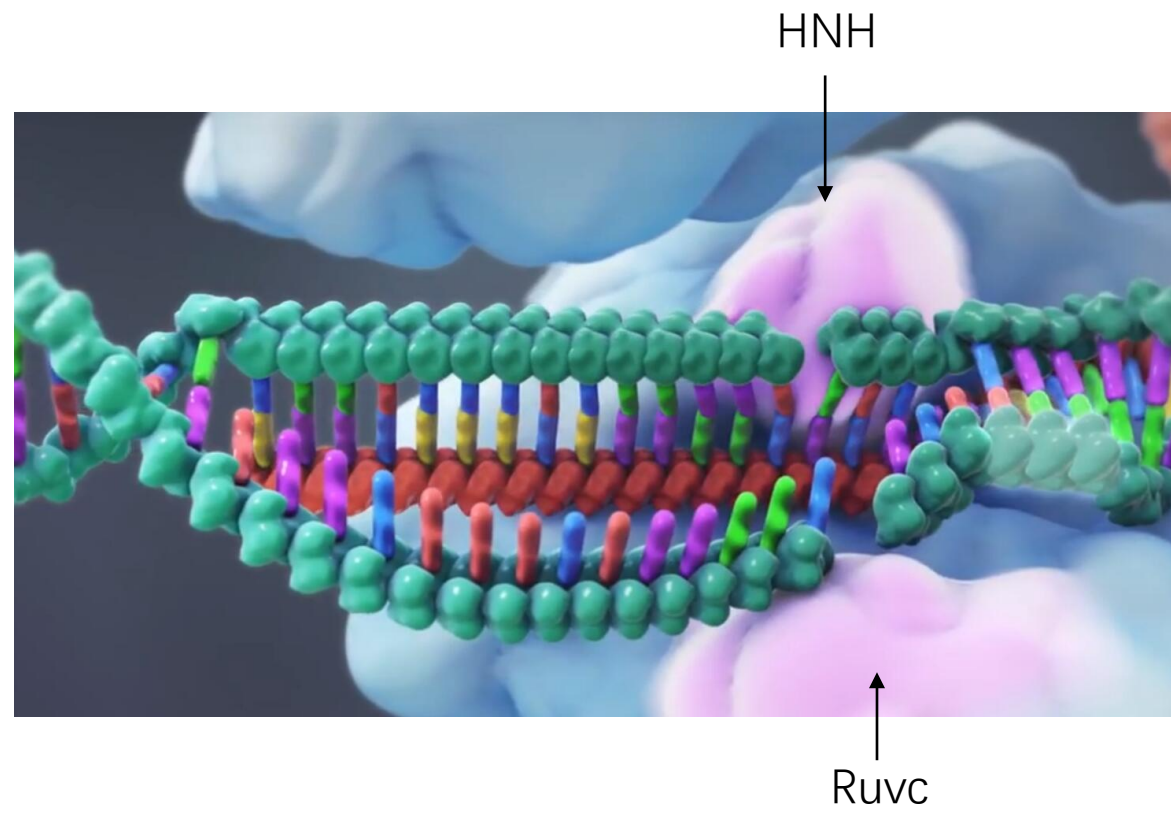
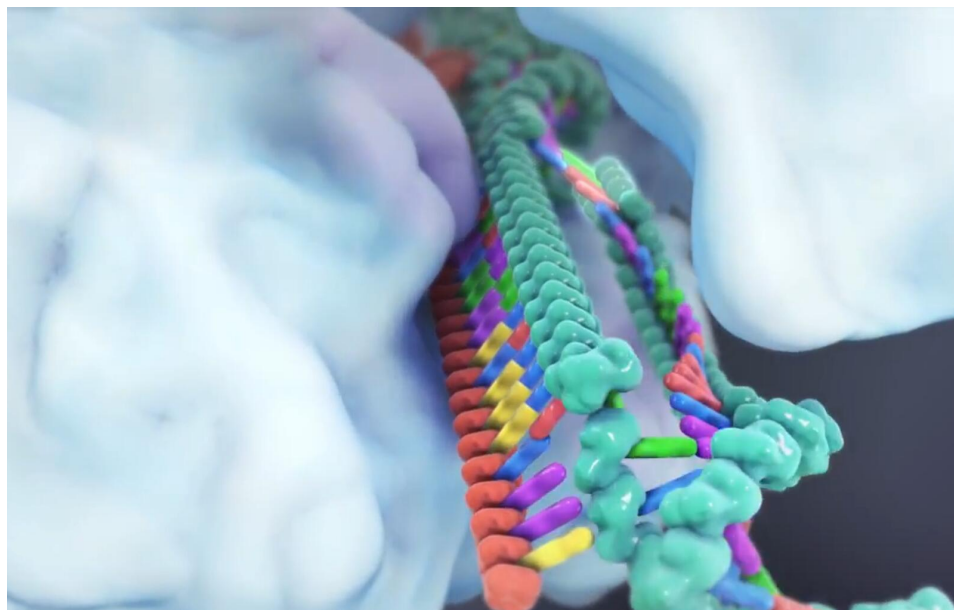




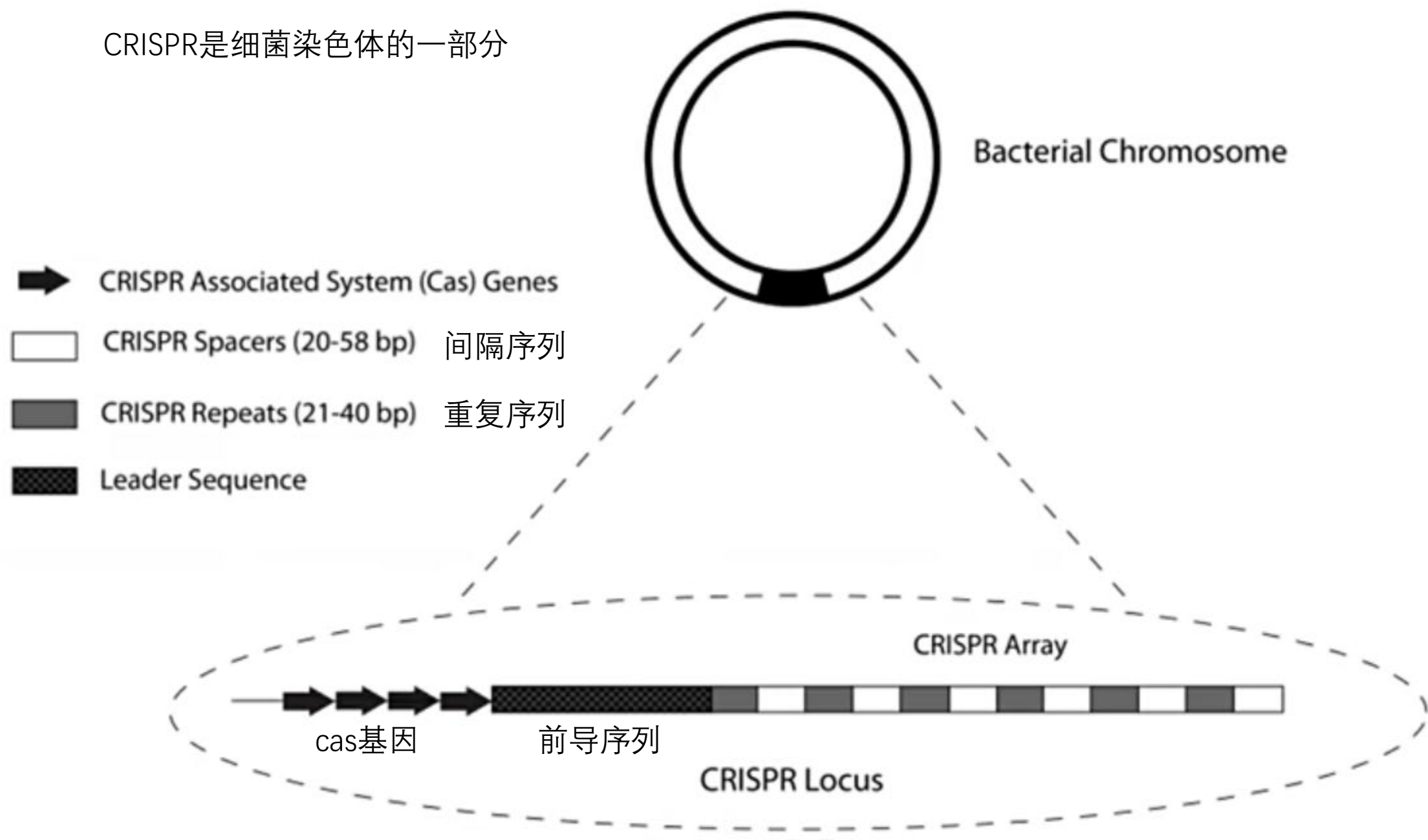
CRISPR cas9 组成

HNH: 切外源DNA与间隔序列互补链

RuvC: 切外源DNA另一条链



CRISPR是细菌染色体的一部分



外源基因的捕获



Protospacer
原间隔序列

原间隔序列会被cas1/2蛋白剪切下来

CRISPR



cas1/2识别的不是原间隔序列本身，而是处在原间隔序列下游的前间隔序列邻近基序（PAM）

前间隔序列邻近基序由2-6个碱基组成，对于CRISPR-cas9系统的PAM序列是5'-NGG-3'



Protospacer



Cas Gene cassette

CRISPR

New spacer acquisition

Cas Genes

Leader /promoter

Repeat

Spacer

Repeat

Spacer

Repeat

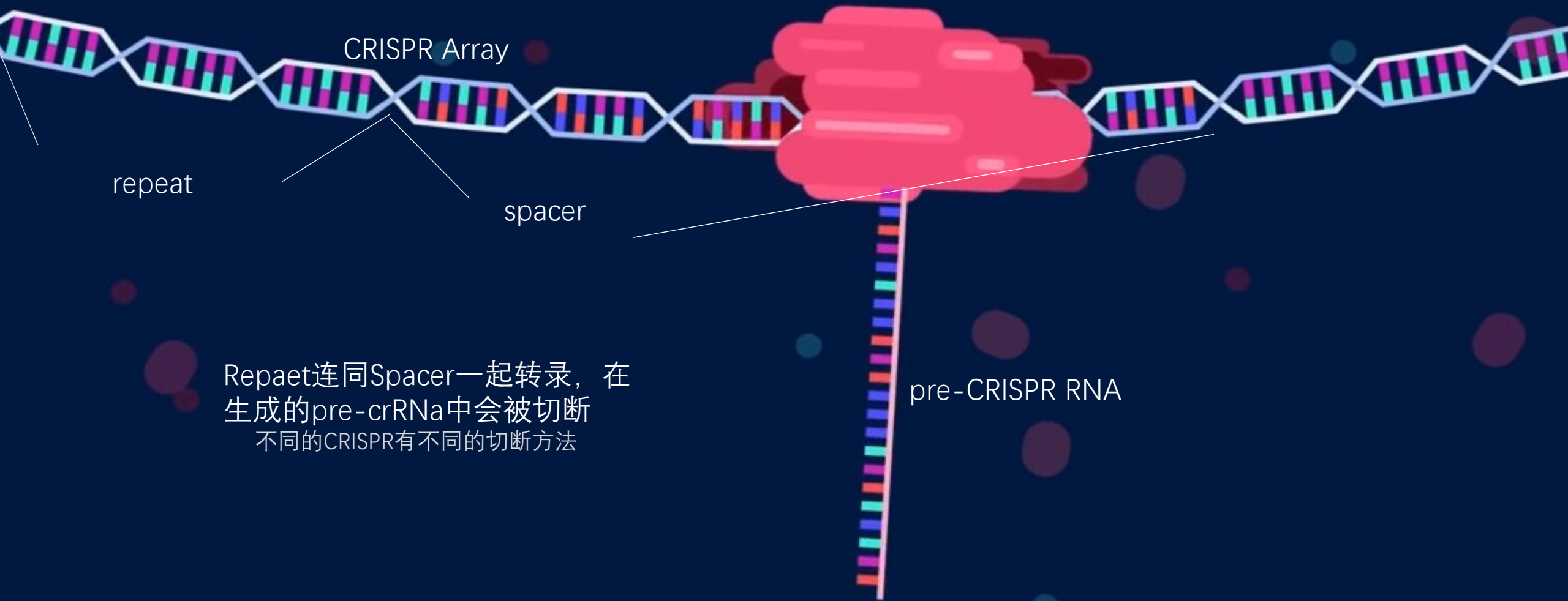
Spacer

Repeat

Repeat



crRNA的形成



repeat

CRISPR Array

spacer

Repeat连同Spacer一起转录，在
生成的pre-crRNA中会被切断
不同的CRISPR有不同的切断方法

pre-CRISPR RNA

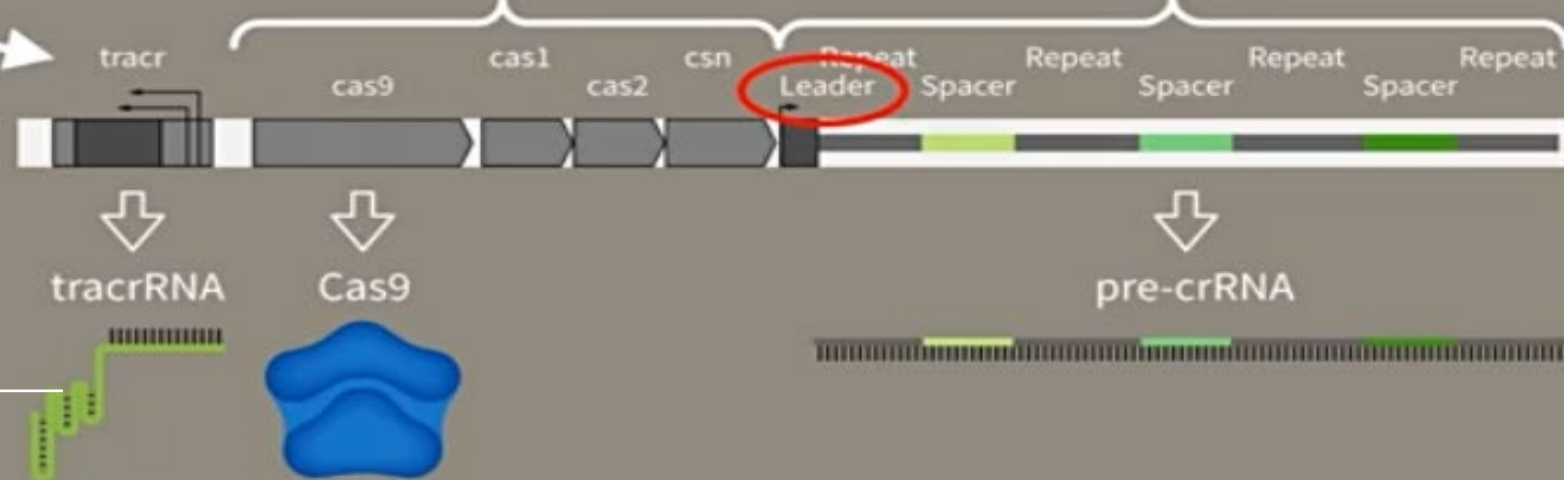
反式激活CRISPR RNA基因

(tracr RNA gene)

操纵子

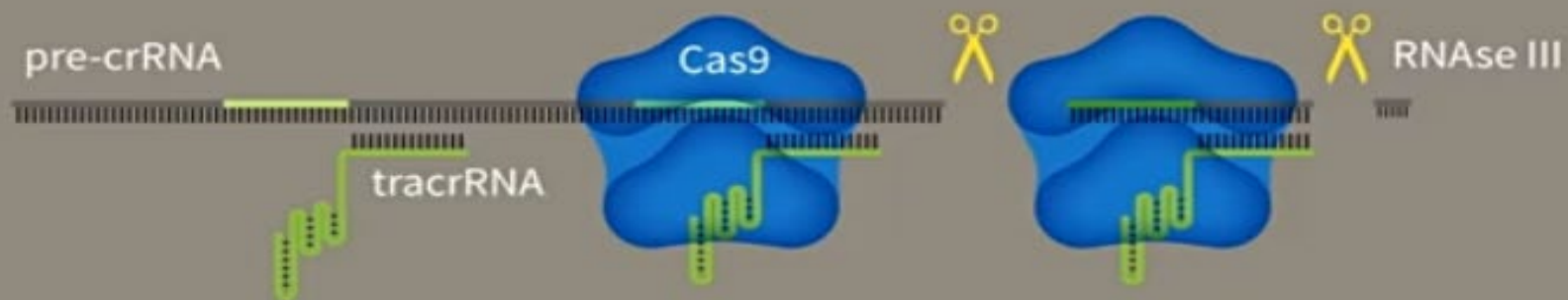
CRISPR Array

1.

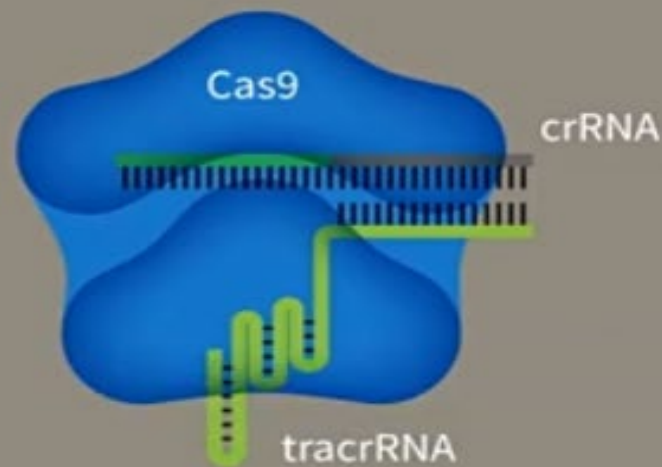


trans-activating crRNA

2.

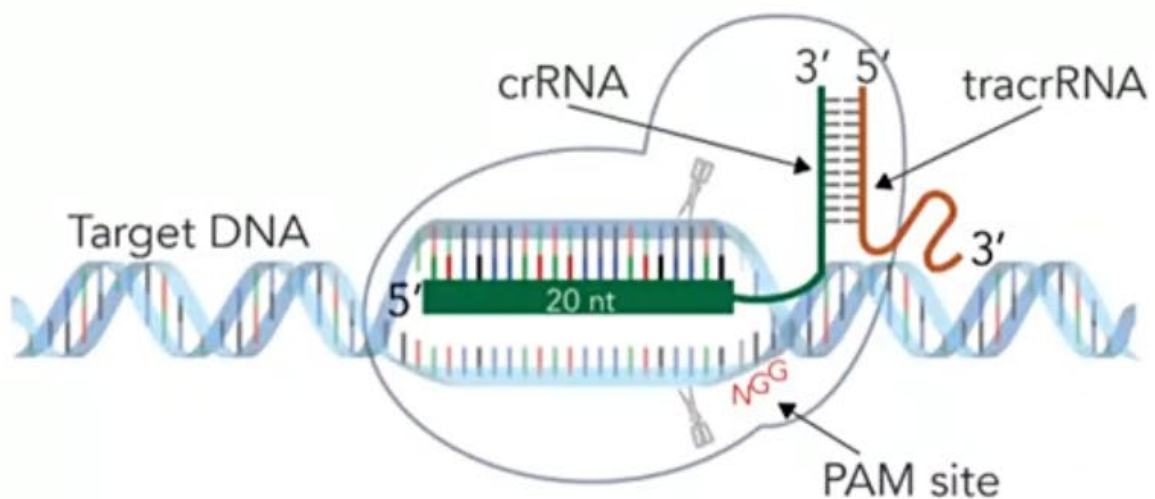


3.

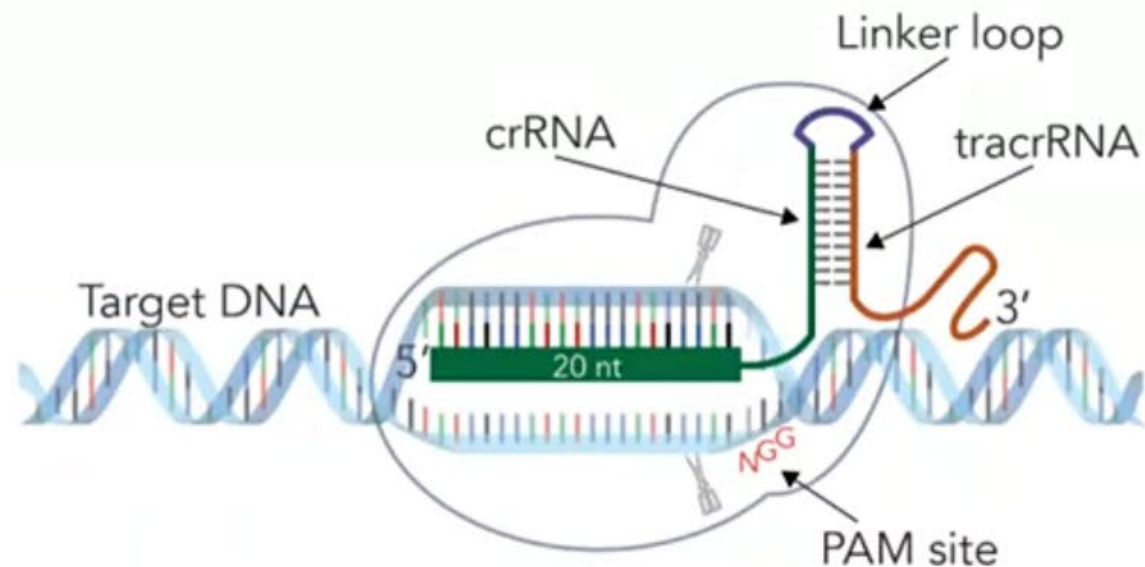


切割之后trans-activating crRNA能够与pre-crRNA没有分离，结合成了一条sgRNA

(small guide RNA)



A. 2-part crRNA:tracrRNA complex



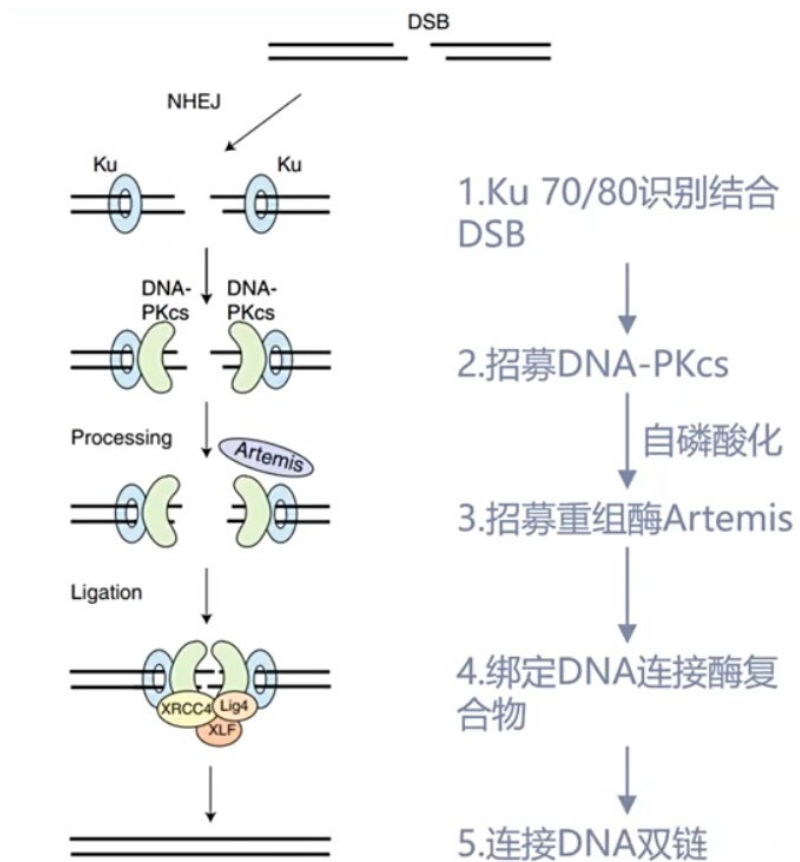
B. Single fusion sgRNA trigger

DSB

染色体（双链）断裂

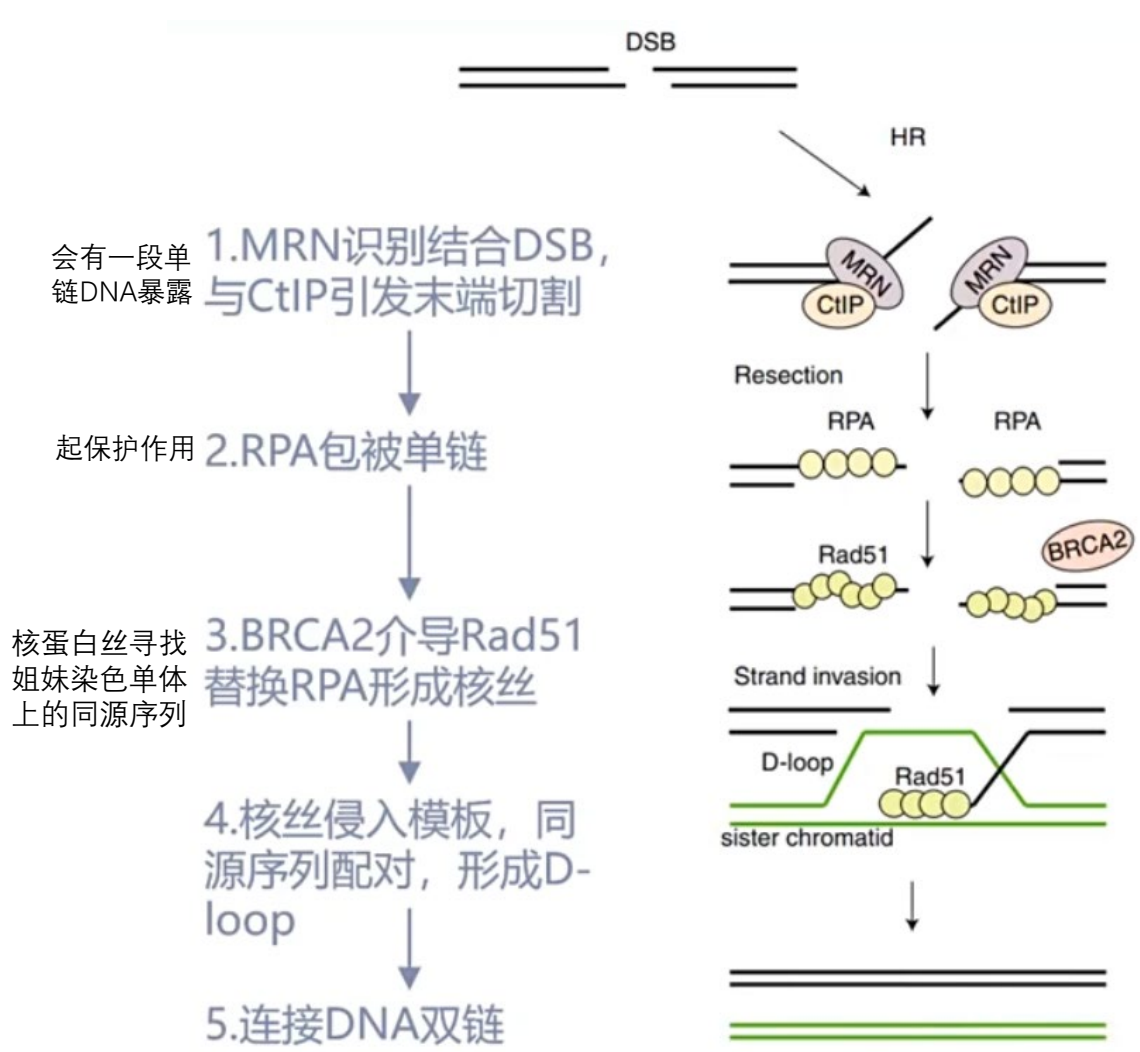
- 双链断裂之后一般有两种方式修复DSB
 - NHEJ 非同源末端连接
 - HR 同源重组

NHEJ 非同源末端连接



此过程不需要同源序列当模板，容易造成碱基的随机插入和缺失，导致基因功能性缺失，利用这个特点可以实现基因的敲除

HR 同源重组



这种方式需要同源序列当模板，能够实现真正意义上的修复

这个过程只发生在细胞周期的S或G2期

应用

- 基因敲除 (Knock-out)
- 基因敲入 (Knock-in)
- 基因抑制、基因激活 (Repression or Activation)
- 多重编辑 (Multiplex Editing)
-