

CRISPR/Cas9 基因编辑 HeLa 细胞以 mNeonGreen

标记蛋白质

摘要

信号转导过程中蛋白质的亚细胞定位动态对确定信号输出至关重要。然而，关于活细胞中内源性信号蛋白定位的信息非常有限。例如，表皮生长因子(EGF)受体(EGFR)到 RAS-RAF 和 ERK1/2/MAPK 信号通路的生化机制已被充分理解，但该通路在细胞中的运行区域仍未充分表征。用荧光蛋白标记信号通路的内源性组分可以在其天然表达水平下更准确地表征其细胞内动态，避免过表达和错误定位的潜在干扰。本研究描述了使用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术标记 EGFR-RAS-MAPK 通路组分（如 Grb2、KRAS 和 NRAS）的方法，以及生成标记目标蛋白的纯合单细胞克隆的生成过程。

背景

表皮生长因子(EGF)受体(EGFR)在细胞表面被 EGF 或其他配体激活，触发参与细胞增殖、分化、存活和运动的 RAS-RAF-MAPK/ERK1/2 信号通路。激活的 EGFR 被内吞并积累在早期内体中，在那里它要么被回收到细胞膜，要么被靶向溶酶体降解。激活的 EGFR 是否继续通过 RAS-ERK1/2 轴从内体信号传导以维持 ERK1/2 激活仍有争议。内体到 ERK1/2 的信号传导证据基于在 EGF 刺激的细胞中检测到 ERK1/2 通路组分。然而，这些观察是通过过表达重组蛋白、化学固定细胞或亚细胞分馏进行的，这些方法可能无法正确报告内源性蛋白的亚细胞定位。

我们使用 CRISPR-Cas9 系统对 KRAS、NRAS 和 Grb2 进行标记。CRISPR-Cas9 技术有两个主要组成部分：

1. Cas9 - RNA 引导的核酸内切酶
2. 短非编码引导 RNA，包括靶向互补 CRISPR RNA(crRNA) 和 转 激 活 crRNA(tracrRNA)

这些组件通过质粒或纯化的 Cas9 和纯化的 sgRNA 的体外生成复合物的直接递送进入细胞。递送后，gRNA 通过 Watson-Crick 碱基配对与其靶 DNA 序列结合，Cas9 在 gRNA 的 PAM 位点附近产生双链断裂(DSB)。DSB 要么通过易错的非同源末端连接(NHEJ)机制修复，要么通过精确的同源依赖修复(HDR)机制修复。对于基因标记，还提供了额外的修复模板，即含有荧光蛋白或诸如 His、HA 或 MYC 等小标签序列的供体 DNA，通过 HDR 允许感兴趣标签的插入。HDR 修复机制本质上效率低下，导致具有框内插入标签的细胞克隆的产量较低，而敲除克隆的生成（通常涉及 NHEJ）通常效率更高。

材料与试剂

1. CellTrics 50 μ m 无菌一次性过滤器 (Sysmex, 04-004-2327)
2. 96 孔板(Ibidi, 15 μ -Plate 96 孔黑色)

3. 12 孔细胞培养板 (Corning, 3513)
4. 25 或 75 cm² 细胞培养瓶 (Corning, 430639 或 430641U)
5. 15 mL 锥形管 (Sarstedt, 62.554.205)
6. DNA 寡核苷酸引物 (IDT)
7. GeneArt Precision gRNA 合成试剂盒 (Invitrogen, A29377)
8. Tracr 片段+ T7 引物混合物（包含通用 PCR 扩增引物和 crRNA/tracrRNA 的 80-nt 恒定区域）(Invitrogen, A29377)
9. PhusionTM高保真 PCR 主混合物(2 \times) (Invitrogen, A29377)
10. 无核酸酶水
11. dNTP 混合物(10 mM 每种 dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (NEB, N0447)
12. 5 \times TranscriptAidTM 反应缓冲液 (Invitrogen, A29377)
13. TranscriptAidTM酶混合物 (Invitrogen, A29377)
14. DNase I (Invitrogen, A29377)
15. 单链 DNA(ssDNA)寡核苷酸（来自 IDT）
16. NEBuilder[®] HiFi DNA 组装主混合物 (NEB, E2621)
17. pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) 质粒 (Addgene #62988)
18. BbsI (NEB, R0539)
19. NEB 缓冲液 2 (NEB, B7002S)
20. NEB[®] 5- α 感受态大肠杆菌（高效率）(NEB, C2987)
21. 氨苄青霉素琼脂平板和卡那霉素琼脂平板
22. NEB 缓冲液 2.1 (NEB, B7202)
23. QIAquick PCR 纯化试剂盒 (Qiagen, 28104)
24. 合成双链供体 DNA（来自 IDT）
25. Phusion 高保真 DNA 聚合酶 (NEB, M0530)
26. Phusion GC 缓冲液 5 \times (NEB, B0519)
27. Zero BluntTM TOPOTM PCR 克隆试剂盒 (Invitrogen, 45-1245)
28. EcoRI-HF (NEB, R3101)
29. CutSmart 缓冲液 10 \times (NEB, B6004)
30. QIAquick 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, 28704)
31. XbaI (NEB, R0145)
32. Easy-Fusion Halo 质粒 (Addgene #112850)
33. EcoRI-HF (NEB, R3101)
34. Aval (NEB, R0152)
35. HincII (NEB, R0103)
36. DMEM (Gibco, 11965-092) 与 10% FBS (Invitrogen, 16140071)
37. DPBS（无 Ca²⁺或 Mg²⁺）(Gibco, 14190-144)
38. 胰蛋白酶 (Gibco, 25200-056)

39. Neon 转染系统 (Invitrogen, MPK5000)
40. Neon 转染系统 10 μ L 试剂盒 (Invitrogen, MPK1025)
41. 缓冲液 R
42. 嘌呤霉素 (Sigma-Aldrich, P8833)
43. Platinum Cas 9 (Invitrogen, A36498)
44. BD FACSAria III 分选仪 (配有 488 100 mW Trigon 激光器和 100 μ m 喷嘴) (BD Biosciences)
45. 诺考达唑 (Sigma-Aldrich, M1404)
46. Lipofectamine 3000 (Invitrogen, L3000001)
47. OptiMEM (Invitrogen, 31985062)
48. 重组 KRAS 兔单克隆抗体 (Thermo Fisher Scientific, 703345)
49. 细胞分选缓冲液 (见配方)
50. TGH 缓冲液 (见配方)

软件

1. <https://www.benchling.com>
2. <https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/>
3. <http://chopchop.cbu.uib.no/>
4. <https://nebuilder.neb.com>

程序

实验设计

图 1. 在 KRAS、NRAS 和 Grb2 中插入 mNG 的示意图。mNG 序列被插入 KRAS 和 NRAS 基因的氨基末端(A) 和 Grb2 基因的羧基末端(B)。为所有三种基因生成了带有 500 至 1,000 bp 同源臂的供体 DNA。ATG: 起始密码子; STOP: 终止密码子; HA: 同源臂; mNG: mNeongreen; gRNA: 引导 RNA; 空盒表示 KRAS, NRAS 和 Grb2 的外显子。

表 1. 用于标记基因的组件来源

	KRAS	NRAS	Grb2
Cas9	商业纯化酶	商业纯化酶	质粒-PX459
gRNA	体外转录	体外转录	克隆在质粒 PX459 中
供体	合成基因片段	合成基因片段	同源臂和 mNG 片段克隆在质粒中
递送方法	电穿孔	电穿孔	Lipofectamine 转染

A. 为 KRAS、NRAS 和 Grb2 生成 gRNA

1. KRAS 和 NRAS 的体外合成 gRNA

a. 确定靶向 gRNA 我们使用 KRAS 和 NRAS 基因的氨基末端进行 mNeonGreen 荧光蛋白序列标记, 因为所有 RAS 蛋白在其羧基末端都经过处理 (图 1)。在线提供了几种引导 RNA 设计工具。我们通常使用 Benchling、Broad 研究所 GPP (现为 CRISPick) 和 CHOPCHOP 等工具设计靶向 gRNA。使用这些工具, 为 KRAS 和 NRAS

确定了两个靶点, 它们非常接近两个基因的起始密码子。为每个靶点订购两个互补引物 (表 2)。

表 2. 体外翻译 gRNA 的引物

引物	序列 5'--- 3'	
Kras_1F	TAATACGACTCACTATAGGAAT ATAAACTTGTGGTAGT	靶点 1
Kras_1R	TTCTAGCTCTAAAACACTACCA CAAGTTTATATTC	靶点 1
Kras_2F	TAATACGACTCACTATAGAATG ACTGAATATAAACTTG	靶点 2
Kras_2R	TTCTAGCTCTAAAACCAAGTTT ATATTCAGTCATT	靶点 2
Nras_1F	TAATACGACTCACTATAGGACT GAGTACAAACTGGTGG	靶点 1
Nras_1R	TTCTAGCTCTAAAACCCACCAG TTTGTACTCAGTC	靶点 1
Nras_2F	TAATACGACTCACTATAGAATG ACTGAGTACAACTGG	靶点 2
Nras_2R	TTCTAGCTCTAAAACCCAGTTT GTACTCAGTCATT	靶点 2

i. 将靶点引物稀释到 1 \times TE 缓冲液中 100 μ M 的储备溶液。 ii. 通过将每个 100 μ M 正向和反向靶点引物各 10 μ L 加入到 80 μ L 无核酸酶水中, 制备 10 μ M 靶点引物混合物储备溶液。 iii. 通过将 10 μ M 靶点引物混合物储备溶液的 3 μ L 稀释在 97 μ L 无核酸酶水中, 制备 0.3 μ M 靶点引物混合物工作溶液。

b. 组装 gRNA DNA 模板 此步骤生成 gRNA 体外转录所需的 DNA 模板。在冰上解冻 GeneArt Precision gRNA 合成试剂盒中的试剂。混合并离心所有小瓶的内容物。按照给定的顺序在 25- μ L 体积中设置以下 PCR 组装反应 (表 3)。

表 3. 制作 gRNA DNA 模板的组件

Phusion™高保真 PCR 主混合物(2 \times)	12.5 μ L
Tracr 片段+ T7 引物混合物	1 μ L
0.3 μ M 靶点 F/R 寡核苷酸混合物	1 μ L
无核酸酶水	10.5 μ L

由于 PCR 产物预期很短 (120 bp), 使用以下参数执行两步组装 PCR (表 4)。

表 4. 生成 gRNA DNA 模板的 PCR 参数

循环步骤	温度	时间	循环
初始变性	98°C	10 s	1×
变性	98°C	5 s	32×
退火	55°C	15 s	32×
最终延伸	72°C	1 min	1×
保持	4°C	保持	1×

c. gRNA 的体外转录(IVT) 使用在步骤 A.1.b 中生成的 gRNA DNA 模板进行 gRNA 的体外转录。按照给定的顺序设置反应（表 5）。

表 5. IVT 反应组件

NTP 混合物（每种 NTP 100 mM）	8 μL
gRNA DNA 模板（来自 PCR 组装）	6 μL
5× TranscriptAid™反应缓冲液	4 μL
TranscriptAid™酶混合物	2 μL

彻底混合内容物并离心。在 37°C 进行 IVT 反应 3 小时。
d. 用 DNase I 消化去除 DNA 模板 从 IVT 反应中去除 DNA 是有帮助的，这样它就不会干扰 RNA 转录本的后续应用。
i. 在 IVT 反应后立即用 1 μL DNase I (1 U/μL) 孵育 IVT 反应混合物，并在 37°C 孵育 15 分钟。
e. 使用试剂盒提供的柱子和缓冲液纯化 gRNA
i. 用无核酸酶水将 IVT 反应稀释到 200 μL，并加入 100 μL 结合缓冲液。通过吹打混合。
ii. 加入 300 μL 乙醇(>96%) 并通过吹打混合。
iii. 将混合物转移到 GeneJET™ RNA 纯化微柱（预组装有收集管）并以 14,000 × g 离心 30-60 秒。弃去流出物。
iv. 用 700 μL 洗涤缓冲液 1 和洗涤缓冲液 2 洗涤结合的 RNA。
v. 将空纯化柱再以 14,000 × g 离心额外 60 秒，以完全去除任何残留的洗涤缓冲液。
vi. 将纯化柱转移到干净的 1.5-mL 收集管中。
vii. 向纯化柱过滤器中心加入 10 μL 无核酸酶水，并以 14,000 × g 离心 60 秒以洗脱 RNA。
viii. 将洗脱的 gRNA 储存在 -20°C 直到使用。长期储存，将 gRNA 储存在 -80°C。

注意：在处理 RNA 时遵循所有必要的预防措施，以避免其降解或污染，并参考制造商的说明以获取生成 gRNA 的详细指南。

2. 克隆用于标记 Grb2 的 gRNA

a. 确定靶向 gRNA Grb2 在其羧基末端用 mNG 标记。使用 NEBuilder HiFi DNA 组装混合物进行 Grb2 gRNA 的克隆，该混合物允许线性质粒和单链 DNA 片段的组装，就像多个 DNA 片段组装一样。与 RAS 蛋白类似，使用 Benchling 和 Broad 研究所 GPP（现为 CRISPick）确定了 Grb2 的两个靶向 gRNA。以 ssDNA 形式从 IDT 订购了以下靶向 gRNA 序列寡核苷酸（表 6）。下划线序列表示实际靶向 gRNA 序列，由来自 PX459 的 BbsI 限制酶切割位点周围的重叠序列包围。

表 6. 用于 Grb2 gRNA 的 ssDNA 寡核苷酸

grb2-RNA_T1	ATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGGGTTA GACGTTCCGGTTCACGGGTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTT
grb2-gRNA_T2	ATCTTGTGGAAGGACGAAACACCGGGCTT AGACGTTCCGGTTCACGGTTTTTAGAGCTAG AAATAGCAAGTT

b. 用 BbsI 消化 PX459 通过在 37°C 用 BbsI 消化 4 小时线性化 PX459 质粒（表 7）。使用 QIAquick PCR 纯化试剂盒纯化消化的质粒。

表 7. PX459 消化设置

PX459 质粒（500 ng/μL）	10 μL
10× 缓冲液 2.1	2 μL
BbsI（10 U/μL）	1 μL
ddH ₂ O	7 μL

c. 将 ssDNA 连接到消化的 PX459 离心 ssDNA 寡核苷酸沉淀并将其在 1× TE 中重悬至最终浓度为 100 μM，然后进一步稀释至 NEB 缓冲液 2 中 0.4 μM 的工作储备液。按下面给定的顺序设置线性化 PX459 和 ssDNA 寡核苷酸的连接反应（表 8）。

表 8. HiFi DNA 组装设置

线性 PX459 质粒（50 ng）	1 μL
0.4 μM ssDNA 储备液	5 μL
ddH ₂ O	4 μL
NEBuilder® HiFi DNA 组装主混合物	10 μL

在 50°C 孵育组装反应 1 小时，并将 2 μL 的反应混合物转化到 NEB 5-α感受态大肠杆菌细胞中。通过将转化的大肠杆菌细胞铺板到氨苄青霉素琼脂平板上选择氨苄青霉素抗性菌落。

d. 筛选和确认阳性克隆 从氨苄青霉素平板中选择几个菌落进行质粒分离。通过 Sanger 测序确认含有 gRNA 序列的阳性克隆。

B. 生成用于标记 KRAS、NRAS 和 Grb2 的供体 DNA

1. 克隆用于标记 KRAS 和 NRAS 的供体 DNA

带有约 500 b 每个的 5'和 3'同源臂包围的 mNG 序列的供体 DNA 作为基因片段从 IDT 获得。使用 TOPO PCR 克隆试剂盒，将这些片段采用引物扩增并克隆到 pCRBluntII-TOPO 质粒中。

a. 扩增供体 DNA 在含有基因片段的小瓶中离心以收集沉淀物在 50 µL 1× TE 中。使用 Phusion 聚合酶（表 10 和 11）和下面提到的引物（表 9）扩增合成 DNA。

表 9. 用于扩增 KRAS 和 NRAS 合成供体 DNA 的引物

引物	5'-----3'
KRas_5HAF	AGGTGGGGGTCCACTAGGAA
KRas_3HAR	CATATGATGTCACAATACCAAGAAAC
NRas_5HAF	CAGAGGCAGTGGAGCTTG
NRas_3HAR	ACAATCAGACAGTCTCGCTACTAT

表 10. 用于扩增 KRAS 和 NRAS 合成供体 DNA 的 PCR 设置

	KRAS 供体 DNA	NRAS 供体 DNA
供体基因片段	5 µL	5 µL
Phusion GC 缓冲液 5×	10 µL	10 µL
10mM dNTP	1 µL	1 µL
5HAF	2.5 µL	2.5 µL
3HAR	2.5 µL	2.5 µL
Phusion 聚合酶	1 µL	1 µL
无核酸酶水	28 µL	28 µL

表 11. 用于扩增 KRAS 和 NRAS 合成供体 DNA 的 PCR 参数

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |

	KRAS 供体	NRAS 供体		
初始变性	98°C	98°C	1 min	1×
变性	98°C	98°C	15 s	30×
退火	61.6°C	64.7°C	15 s	30×
延伸	72°C	72°C	1 min	30×
最终延伸	72°C	72°C	10 min	1×
保持	4°C	4°C	保持	1×

对来自 KRAS 和 NRAS 扩增供体 DNA 的 1.68 kb PCR 产物进行凝胶纯化。

b. 连接扩增的供体 DNA 和 pCRBluntII-TOPO 质粒 在 6 µL 体积中设置凝胶洗脱的 KRAS 和 NRAS 供体 DNA 与 pCRII-Blunt-TOPO 质粒的连接反应，如下（表 12）。

表 12. 供体 DNA 和 pCRBluntII-TOPO 连接设置

	KRAS 供体	NRAS 供体
--	---------	---------

	KRAS 供体	NRAS 供体
凝胶洗脱片段	2 µL	2 µL
盐溶液	1 µL	1 µL
无核酸酶水	2 µL	2 µL
pCR-II-Blunt-TOPO	1 µL	1 µL

在室温下孵育连接反应 5 分钟。将 1-2 µL 的连接混合物转化到感受态大肠杆菌中，并在含有卡那霉素的平板上铺板进行选择。

c. 筛选和确认供体 DNA 从卡那霉素平板中选择几个菌落并培养它们以分离质粒。通过 EcoRI 消化和 Sanger 测序确认阳性克隆，以确保供体序列中没有变化。

d. 从阳性克隆中消化和凝胶洗脱供体 DNA 序列 片段以这样的方式插入 pCRII-Blunt-TOPO，即 EcoRI 位点位于插入物的两端，允许通过 EcoRI 消化恢复插入物。如下消化含有供体序列的阳性克隆（表 13）。

表 13. pCR-II-Blunt-TOPO-供体质粒的消化

	KRAS	NRAS
pCR-II-Blunt-TOPO-供体（1 µg/µL）	20 µL	20 µL
CutSmart 缓冲液 10×	5 µL	5 µL
EcoRI-HF（10 U/µL）	3 µL	3 µL
无核酸酶水	22 µL	22 µL

在 72°C 进行消化 3 小时。从两个样本中凝胶洗脱 1.68 kb 条带。将洗脱的供体片段存储在 -20°C。

注意：克隆供体 PCR 片段是为了促进使用 Sanger 测序确认正确的供体序列，并避免重复扩增。纯化的 PCR 片段可以直接用作供体 DNA，从而减少克隆时间。

2. 克隆用于标记 Grb2 的供体 DNA

为了克隆用于 Grb2 基因编辑的供体 DNA，使用由 NEbuilder 算法设计的引物从 HeLa 基因组 DNA 扩增 5' 和 3'同源臂（HA），而 KRAS 供体 DNA 用作扩增 mNG ORF 的模板。引物为所得 PCR 片段添加重叠序列，然后使用 NEBuilder® HiFi DNA 组装主混合物将这些片段与 Easy-Fusion Halo 质粒组装（表 14）。

表 14. HiFi DNA 组装的组件片段

名称	长度 (bp)	生产方法
5HA 片段	793	PCR
3HA 片段	743	PCR
mNG 片段	755	PCR
作为骨架载体的 EasyFusion halo 质粒	2,927	限制性消化

a. 扩增同源臂（HA）和 mNG ORF 使用 NEBuilder 算法设计带有重叠序列的引物（表 15）。如下扩增构建供体 DNA 所需的全部三个片段（表 16、17 和 18）。

表 15. 用于扩增 Grb2 同源臂和 mNG ORF 的引物

引物	5'.....3'
Grb2-5H A_f	TATCGATAAGCTTGATATCGAGAGGCAG TGTGTAGCCAG
Grb2-5H A_r	CTCCTCCTAAGACGTTCCGGTTCACGGG
Grb2-Neon_f	CCGGAACGTCTTAGGAGGAGGAGGATCA G
Grb2-Neon_r	TTGACTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG
Grb2-3H A_f	GCTGTACAAGTAAGAGTCAAGAAGCAAT TATTTAAAG
Grb2-3H A_r	CCACCGCGGTGGCGGCCGCTTCTCGAAC TCCTGACCTTG

表 16. 用于扩增 Grb2 HA 的 PCR 设置

	5HA 片段	3HA 片段
HeLa 基因组 DNA (100 ng/μL)	3 μL	3 μL
Phusion GC 缓冲液 5×	10 μL	10 μL
10 mM dNTP	1 μL	1 μL
Grb2-5/3HA_f	2.5 μL	2.5 μL
Grb2-5/3HA_r	2.5 μL	2.5 μL
Phusion 聚合酶	1 μL	1 μL
无核酸酶水	30 μL	30 μL

表 17. 用于扩增 mNG ORF 的 PCR 设置

	mNG 片段
mNG-KRAS 供体 (100 ng/μL)	3 μL
Phusion GC 缓冲液 5×	10 μL
10mM dNTP	1 μL
Grb2-Neon_f	2.5 μL
Grb2-Neon_r	2.5 μL
Phusion 聚合酶	1 μL
无核酸酶水	30 μL

表 18. 用于扩增 Grb2 HA 和 mNG ORF 的 PCR 参数

| 循环步骤 | 温度 | 时间 | 循环 |

	5HA	3HA	mNG		
初始变性	98°C	98°C	98°C	1 min	1×
变性	98°C	98°C	98°C	15 s	30×
退火	64.4°C	60°C	59.6°C	15 s	30×
延伸	72°C	72°C	72°C	25 s	30×
最终延伸	72°C	72°C	72°C	10 min	1×
保持	4°C	4°C	4°C	保持	1×

使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒凝胶洗脱 PCR 产物，并估计洗脱片段的 DNA 浓度。

b. EasyFusion-Halo 质粒的限制性酶消化 用 EcoRI 和 XbaI 消化 EasyFusion-Halo 质粒，在 37°C 消化 4 小时以去除 Halo 插入物（表 19）。

表 19. 消化 EasyFusion-Halo 质粒以去除 Halo 插入物

EasyFusion-Halo (5 μg)	10 μL
CutSmart 缓冲液 10×	2 μL
EcoRI	2 μL
XbaI	2 μL
无核酸酶水	2 μL

使用 QIAquick 凝胶提取试剂盒凝胶洗脱消化质粒的 2.9 kb 片段，并估计洗脱片段的 DNA 浓度。

c. HiFi DNA 组装连接反应 将生成 Grb2 供体 DNA 所需的所有四个片段混合到最终体积为 10 μL 中。在冰上解冻 HiFi DNA 组装混合物并充分涡旋。向片段中加入等体积的 HiFi DNA 组装主混合物（表 20）。

表 20. 生成 Grb2 供体 DNA 的连接设置

0.1 pmol 的 5HA	50 ng	0.8 μL
0.1 pmol 的 mNG	50 ng	0.9 μL
0.1 pmol 的 3HA	50 ng	1.1 μL
0.1 pmol 的消化载体	185 ng	2 μL
HiFi DNA 组装主混合物		10 μL
无核酸酶水		5.2 μL

在 50°C 进行连接反应 1 小时。将 2 μL 的反应混合物转化到感受态大肠杆菌中。使用限制性酶消化和 Sanger 测序筛选几个含有所有三个片段（5HA-mNG-3HA）的阳性克隆。

C. 将 gRNA 和供体 DNA 递送至 HeLa 细胞

1. 电穿孔 RNP 复合物以标记 KRAS 和 NRAS

a. 在 75 cm²烧瓶中培养 HeLa 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中至 90%汇合度。用 100 ng/mL 诺考达唑处理 12 小时。 b. 在电穿孔当天，解冻并在冰上储存缓冲液 R、KRAS 和 NRAS 特异性体外转录的 gRNA 和供体 DNA。在无核酸酶水中将 gRNA 和供体 DNA 稀释到适当浓度。 c. 用 1× DPBS 洗去诺考达唑。用胰蛋白酶分散细胞并通过添加含 FBS 的 DMEM 灭活。将单细胞悬浮液以 300 × g 离心 5 分钟。将沉淀物重悬在 10 mL 含 10% FBS 的 DMEM 中。使用血球计数器进行细胞计数。 d. 在 1.5 mL 微量离心管中为每个基因编辑反应准备 RNP 混合物，如下（表 21）。

表 21. 用于电穿孔的 RNP 混合物组件

缓冲液 R	1 μ L
Platinum Cas9 (1 μ g)	0.5 μ L (1 μ g)
gRNA (500 ng)	2 μ L

e. 在室温下孵育 RNP 复合物 20 分钟。 f. 在 RNP 孵育时，准备电穿孔设置并通过以 300 \times g 离心 5 分钟使细胞准备好进行电穿孔。吸走 DPBS 并将细胞沉淀物重悬在缓冲液 R 中至最终细胞密度为 8 \times 10⁷ cells/ml。 g. 向 Neon 枪头站中加入 3 mL 电解缓冲液（缓冲液 E）。 h. 向 RNP 混合物中加入 5 μ L 细胞（最终 4 \times 10⁵ 个细胞）和 1 μ g 各自的供体 DNA 片段。确保最终混合物的体积为 10 μ L。使用 Neon 枪头吸取最终混合物，不要引入气泡，并以 1,005 V 脉冲电压、35 ms 脉冲宽度进行 2 次脉冲电穿孔。 i. 将电穿孔细胞转移到 12 孔板中，其中含有预热的不含抗生素的 DMEM 与 10% FBS，并继续在 37°C CO₂ 培养箱中孵育板。

➤ 2. 转染 gRNA 和供体以标记 Grb2

a. 在 12 孔板中培养 HeLa 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中至 90%汇合度。用 100 ng/mL 诺考达唑处理 12 小时。 b. 在转染当天，将 PX459-Grb2-gRNA 和 Grb2-mNG 供体 DNA 质粒稀释到无核酸酶水中的适当浓度。 c. 用 1 \times DPBS 洗去诺考达唑。加入 1 mL 新鲜含 FBS 的 DMEM。 d. 在 1.5 mL 微量离心管中按给定顺序准备 DNA-脂质混合物，如下（表 22）。

表 22. 标记 Grb2 的转染混合物组件

	管 1
OptiMEM	50 μ L
PX459-Grb2-gRNA (250 ng)	0.5 μ L
Grb2-mNG 供体 (750 ng)	1 μ L
P3000 试剂	2 μ L
	管 2
OptiMEM	50 μ L
Lipofectamine 3000 试剂	1.5 μ L

e. 将管 1 的内容物加入管 2。在 RT 孵育混合物 10 分钟。 f. 将质粒-脂质混合物滴加到细胞上。 g. 转染后第二天，用 2 μ g/mL 嘌呤霉素处理转染的细胞 48 小时，通过杀死未转染的细胞来富集转染的细胞。 h. 移除含嘌呤霉素的 DMEM，用 DPBS 洗涤细胞两次，并允许细胞恢复。分散存活的细胞并扩增它们进行流式分选分析。

D. 流式分选 mNG 阳性细胞

1. 在 25 或 75 cm²烧瓶中扩增标记的 HeLa 细胞在含 10% FBS 的 DMEM 中。
2. 分选当天，使用胰蛋白酶分散细胞并用含 FBS 的 DMEM 灭活。离心细胞并用 PBS 洗涤一次。将最终沉淀物重悬在细胞分选缓冲液中。

3. 在分选前通过一次性过滤器过滤细胞悬浮液以去除细胞聚集物。使用阳性（瞬时或稳定表达 mNG 的亲本 HeLa 细胞）和阴性（亲本未标记 HeLa 细胞）对照来校准分选仪器。
4. 将单个分选细胞收集在 96 孔板或 15 mL 锥形管中作为含有预热的 DMEM 与 10% FBS 和抗生素的汇集团体，以防止污染。

E. 确认阳性克隆

1. 在使用前冷冻至少一管单细胞克隆作为备份。
2. 可以通过使用蛋白质特异性抗体或 mNG 抗体的 Western blot 分析确认克隆。正确的融合蛋白应该比亲本蛋白大约 25 kD。测序 mNG 序列插入区域周围的区域也很重要，以确保在同源修复期间没有不需要的插入或缺失。

注意：没有进行不同递送方法的效率头对头比较。在所有情况下，通过流式分选确定的 mNG 阳性细胞产量为 0.1%至 0.5%。由于我们对筛选单细胞菌落感兴趣，一个 96 孔板的单独分选细胞足以进行筛选。应该注意的是，流式分选可能无意中导致表达融合蛋白产量更高的克隆。

配方

1. 细胞分选缓冲液

- 1 \times PBS (Ca/Mg++无)
- 2%热灭活 FBS
- 1 mM EDTA

2. TGH 缓冲液

- 1% Triton X-100
- 10% 甘油
- 50 mM HEPES
- 2 mM EGTA
- 磷酸酶和蛋白酶抑制剂