

Note: English version is right after the Chinese version

秀丽线虫中 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑: 通过纯化的 Cas9 protein 和纯化的 sgRNAs

-----中山大学生命科学学院万刚实验室(Version. 20250201)

一、sgRNA 设计和纯化

1. sgRNA 设计

依据实验需求，在目的基因的适宜位置设计 sgRNA。

(1) 敲除目的基因。在靠近目的基因起始密码子和终止密码子的编码区，用 Snapgene 搜索 GNGG 的 sgRNA，分别设计 1 个 sgRNA，使用在线软件 CRISPOR 检测 sgRNA 编辑效率(数值供参考)。

注意：sgRNA 的 NGG 前 20bp 的 GC 含量应该尽可能是 40%-60%；避免连串的 A, T, C, G；第一个核苷酸如果不是 G，需要添加一个 G；尽可能设计在正义链上面，因为反义链的 sgRNA 通常效率较低（不要看软件的数字）。

(2) 敲除目的基因的特定片段。在特定片段 5'端和 3'端附近的编码区分别设计 1 个 sgRNA。

(3) 特定碱基替换。在目标碱基附近的编码区，设计 1 个 sgRNA。**注意：sgRNA 应尽可能靠近需要编辑的碱基位点 (<10-20bp 以内)，否则会出现 sgRNA 突变位点编辑**

但是想要的编辑不出现的情况。

(4) 目的基因中插入标签蛋白。在目的基因的起始密码子 3'端或终止密码子 5'端插入标签蛋白，使标签蛋白与目的基因融合表达。在起始密码子或终止密码子附近的编码区，设计 1 个 sgRNA。注意：sgRNA 离要插入的位点近是关键，尽可能 10-20bp 以内，可以使用 NGG 的 sgRNA，位置最重要。

2. sgRNA 扩增和体外转录

(1) 以载体 pGW145-1 为模板，利用 sgRNA 上下游引物，扩增含有 T7 启动子、sgRNA 和 trcRNA 的 DNA 片段，胶回收的 DNA 片段。

(2) 通过 T7 RNA 聚合酶 (NEB, M0251L 或者诺唯赞 T7 RNA 聚合酶) 进行体外转录。取 0.2 mL EP 管，冰上配制 20 μ L 反应体系：2 μ L 10 x RNAPol Reaction Buffer、0.4 μ L Ribonucleotide Solution Mix (NEB, N0466S)、280 ng 含 sgRNA 的 DNA 片段、0.5 μ L Recombinant RNase Inhibitor (TaKaRa, 2313A)、0.25 μ L 1 M DTT 溶液、2 μ L T7 RNA Polymerase、RNase-free H₂O (Takara, 9012) 至 20 μ L。放置在 PCR 仪，37 °C 反应 4 小时。转录完成后，通过 2%的琼脂糖胶检测逆转录的 RNA 的效果，是否特异，产量是否充足。

(3)使用 DNase I (Thermo Fisher, EN0525) 消化 DNA 片段。取转录反应后的 EP 管，放置在冰上，分别加入 10 μ L DNase buffer、2 μ L DNase I、68 μ L RNase-free H₂O，颠倒混匀后，短暂离心，37 °C 反应 30 分钟。

3. sgRNA 提取

(1) 将上述 DNase I 消化后的 sgRNA 溶液转移至 1.5 mL EP 管，放置冰上，加入

500 μ L TRizol (Thermo Fisher, 15596026), 颠倒混匀。加入 100 μ L 三氯甲烷 (广州牌, GS0336AR), 剧烈颠倒混匀 30 s, 室温静置 5 分钟。溶液经 4 $^{\circ}$ C、18,000 x g 离心 10 分钟, 转移上清液至新的 1.5 mL EP 管, 并加入 2.5 倍体积预冷的无水乙醇, 颠倒混匀后, -80 $^{\circ}$ C 静置过夜或者至少 4h。注意: 这一步开始, 需要 RNase free 操作。

(2) 取出样品, 4 $^{\circ}$ C、18,000 x g 离心 10 分钟, 移除上清液。向 EP 管中加入 1 mL 75 %乙醇, 颠倒混匀。4 $^{\circ}$ C、6,000 x g 离心 5 分钟, 移除上清液。将敞口的 EP 管放置在超净工作台, 室温静置 10 分钟。

(3) 向 EP 管加入 12 μ L RNase-free H₂O, 剧烈颠倒混匀, 使沉淀充分溶解。测定 RNA 样品浓度和纯度。取 1 μ L RNA 溶液, 加入 1 μ L 2 x RNA 上样缓冲液 (NEB, B0363S), 混匀后进行电泳, 检测 RNA 样品质量。将 sgRNA 样品保存在-80 $^{\circ}$ C 备用。

二、修复模板构建和纯化

1. 构建修复模板

(1) 敲除目的基因, 不需要构建修复模板。

(2) 敲除目的基因特定片段的修复模板。在特定片段左端的目的基因上选择 100 - 500 bp 碱基序列作为左端同源臂, 在特定片段右端选择 100 - 500 bp 序列作为右端同源臂。扩增左端、右端同源臂, 并与经过 *Eco*RI 和 *Hind*III 酶切的 pGEM-7ZF(+)线性化载体连接, 构建重组质粒。测序成功后, 通过引物, 以载体为模板, 扩增并胶回收同源臂片段, 即修复模板。

(3) 特定碱基替换的修复模板。在 sgRNA 的左右两端, 设计特定碱基经过替换的同

源臂，构建重组质粒后，扩增修复模板。

(4) 目的基因中插入标签蛋白的修复模板。在 sgRNA 的左右两端，设计同源臂。在同源臂内的起始密码子 3'端或终止密码子 5'端，插入标签蛋白的 DNA 序列，构成修复模板。构建重组质粒后，扩增修复模板。

2. 修复模板纯化

使用 E4 缓冲液(5mL Tris-HCl(1 M, pH8.5), 12.5 mL NaCl(5 M) for 50ml)，对胶回收的修复模板进行纯化。向装有修复模板溶液的 EP 管加入预冷的 900 μ L E4 缓冲液和 660 μ L 异丙醇（广州牌，GS0304），颠倒混匀后，4 $^{\circ}$ C、18,000 x g 离心 30 分钟。弃上清液，加入 1 mL 70 %乙醇，颠倒混匀，4 $^{\circ}$ C、18,000 x g 离心 5 分钟。移除上清液，敞口室温静置 10 分钟（**注意：不要静置超过 10 分钟，有机试剂 10 分钟肯定可以挥发干净**）。加入 15 μ L RNase-free H₂O，剧烈颠倒混匀，短暂离心后，取 2 μ L 溶液检测浓度。-20 $^{\circ}$ C 保存备用。**注意：最后一步无 RNase 操作。**

2.10.4 显微注射

1. 准备待注射线虫

显微注射前 1 天，挑选 20-50 只 L4 期线虫，转移至新鲜线虫培养板，继续培养。

注意：如果是 egg prep,显微注射应该在下午较晚或者晚上进行，让 germline 足够大，效果最好是提前一天挑取 L4 线虫。

2. 制备琼脂糖垫片

称取 1.25 g 琼脂糖，溶于 50 mL ddH₂O，放置在微波炉加热煮沸，配制 2.5%琼脂糖

凝胶。取 50 μL 琼脂糖溶液，滴在 24 × 50 mm 盖玻片（世泰，10212450C）中央，迅速用另一个盖玻片以“十”字形覆盖在琼脂糖溶液上，2 分钟后，移去上层盖玻片，在下层盖玻片上形成一个直径约 2 cm 的圆形凝胶，即为琼脂糖垫片。室温放置 6 小时，即可使用。

3. 配制显微注射液

取出-80 °C 保存的标记基因 *unc-58* 的 sgRNA、目的基因 sgRNA 和 Cas9 蛋白（本实验室纯化），取出-20 °C 保存的标记基因修复模板 AF-JA-76、目的基因修复模板和 RNase-free H₂O，放置在冰上融化。轻弹管壁混匀溶液，4 °C 短暂离心，放回冰上。研究表明双链 DNA 修复模板经熔化后，可显著提高编辑效率。对修复模板进行熔化处理。取 0.2 mL EP 管，加入适量模板溶液，放置在 PCR 仪反应：95 °C、2 分钟，85 °C、10 秒，75 °C、10 秒，65 °C、10 秒，55 °C、1 分钟，45 °C、30 秒，35 °C、10 秒，25 °C、10 sec。运行完成后，迅速将 EP 管放置冰上。取 0.2 mL EP 管，按照下表，在冰上配制显微注射液。为避免溶液中的微小颗粒阻塞注射针，溶液经 4 °C、18,000 × g 离心 2 分钟，转移 7.5 μL 上层溶液至新的预冷 1.5 mL EP 管，放置的冰上，待使用。

CRISPR/Cas9 显微注射液

组分	质量或体积
sgRNA (<i>unc-58</i>)	} sgRNA 总量为 1.8 μg ，等 量加入不同的 sgRNA
sgRNA1 (目的基因)	
sgRNA2 (目的基因)	
Cas9 蛋白	5 μg

RNase-free H₂O

补充至 10 μ L

上述组分添加完成后，37 °C 孵育 15 分钟，继续添加如下组分。

AF-JA-76

240 ng

修复模板（若无修复模板，忽略此

250 ng

步）

4. 准备显微注射针

将毛细玻璃管（WPI，1B100F-4）固定在拉针仪（Narishige PC-100）。启动仪器后，利用重力，拉动毛细玻璃管一端，使其断裂，形成针尖状注射针。吸取 2.5 μ L 冰上放置的显微注射液，注入注射针内。针尖一侧向下，自然垂降，使溶液通过重力，填充针尖端，避免产生气泡。将填充有注射液的注射针，插入固定在注射臂的显微注射仪（Narishige IM 400），准备显微注射。

5. 调试显微注射针

依次打开连接显微注射仪的氮气瓶，显微注射仪，固定有注射臂的正置显微镜 Leica DMI8。取毛细玻璃管，使用酒精灯烘烤其中部，待柔软变形后，迅速拉伸，形成丝状。将丝状玻璃管放入滴有注射油（Sigma，H8898-50ML）的 24 × 50 mm 盖玻片上，作为参照针。将含有参照针的盖玻片放在正置显微镜载物台，以参照针为参照物，调整注射臂，依次在 10 倍、40 倍物镜视野内寻找注射针。调整注射仪参数，压力值 0.5、注射值 0.6。按下注射按钮，观察视野内注射出的溶液量是否正常。注射测试成功后，轻柔抬起注射臂，切勿横向或纵向调整注射臂，取下放有参照针的盖玻片。

6. 注射线虫

在体视显微镜下，将生长至产卵初期成虫转移至 NGM 培养板。线虫自由爬行，以去除线虫体表的菌体，避免无法将线虫固定在垫片上。将 5 只线虫放入滴有注射油的垫片，待线虫固定后，移至载物台。轻柔向下调整注射臂，直至注射针尖与线虫生殖系中部处于同一清晰视野。40 倍物镜下，旋动注射臂微调旋钮，将注射针插入生殖系内，注射 2 次，退出注射针，抬起注射臂，完成注射。寻找另一只线虫，进行注射操作。5 只线虫依次注射完成后，取下垫片，使用 20 μ L M9 缓冲液，将线虫转移至新鲜培养板。

2.10.5 线虫培养、筛选和基因型鉴定

待完成 10 只动物注射后，平均转移至 5 个新鲜培养板，记为 P0 代，标记名称，放置在线虫培养箱培养。3 天后，在 5 个培养板挑选 96 只运动障碍的 F1 代动物，分别转移至 96 个新鲜培养板，编号 1 - 96。培养 2-3 天，待 F2 代动物孵化后，分别对 96 只 F1 代动物进行基因型鉴定（**注意：尽可能吸取大虫、小虫和胚胎进行鉴定，也可以减少假阳性的概率。此时盘中已经有大量胚胎，挑取 unc 两天后即可开始鉴定**）。线虫为二倍体基因组，经基因编辑后，F1 代动物表现基因型纯合的概率极低，依据孟德尔遗传定律，F1 自交后代有部分线虫表现为基因型纯合。

选择 F1 代为基因型杂合的培养板，从中挑出 12 只运动正常的 F2 代动物，转移至 12 个新鲜培养板继续培养。3 天后，待 F3 代动物孵化后，鉴定 F2 代动物基因型。选择基因型纯合线虫株，其后代群体即为基因编辑线虫株。为减少 CRISPR/Cas9 脱靶效应的影响，将经过基因编辑的线虫与野生型线虫（N2）杂交两次，才可进行后续实验，冻存线虫株。

注意：无论是筛除，还是插入，线虫株至少有 **2** 个独立的 **allele**，和 **N2** 杂交去背景并冻存。

CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *C. elegans*: using Cas9 Protein + Purified sgRNAs)

-----Gang Wan's lab at School of Life Science, Sun Yat-sen University, China
(Version. 20250201)

Note: The following protocol was translated by ChatGPT from the Chinese version above.

1. sgRNA Design and Purification

1.1 sgRNA Design

Design sgRNAs targeting the desired region of the gene based on experimental goals:

- **(1) Knockout of the target gene**

Use SnapGene to search for GNGG motifs near the start and stop codons. Design 1 sgRNA for each end. Evaluate efficiency using CRISPOR (scores are for reference only).

Notes:

- GC content of the 20 bp upstream of NGG should ideally be 40–60%.
- Avoid poly-A/T/C/G stretches.
- If the first nucleotide is not G, add a G to the 5' end.
- Prefer guides targeting the sense strand, as antisense strand guides tend to be less efficient (ignore what the software says about strand).

- **(2) Deletion of a specific gene fragment**

Design 1 sgRNA upstream (5') and 1 downstream (3') of the region to be deleted.

- **(3) Site-specific base substitution**

Design an sgRNA within 10–20 bp of the target base. If it's too far, editing may occur at the sgRNA cut site but not at the desired base.

- **(4) Tag insertion into target gene**

Insert tags near the 3' end of the start codon or 5' end of the stop codon to allow for in-frame fusion. Design 1 sgRNA as close as possible (within 10–20 bp) to the insertion site.

1.2 sgRNA Amplification and In Vitro Transcription

1. Use pGW145-1 as the template. PCR amplify the sgRNA fragment (includes T7 promoter, sgRNA, and tracrRNA).

2. Perform in vitro transcription using T7 RNA Polymerase (NEB M0251L or Vazyme equivalent):

In a 0.2 mL tube on ice, prepare 20 µL reaction:

- 2 µL 10× RNAPol buffer
- 0.4 µL NTP mix (NEB N0466S)
- 280 ng sgRNA PCR product
- 0.5 µL RNase inhibitor (Takara 2313A)
- 0.25 µL 1 M DTT
- 2 µL T7 RNA polymerase
- RNase-free H₂O to 20 µL

Incubate at 37 °C for 4 h. Check product via 2% agarose gel.

3. Add:

- 10 µL DNase buffer
- 2 µL DNase I (Thermo Fisher EN0525)
- 68 µL RNase-free water

Incubate at 37 °C for 30 min to digest template DNA.

1.3 sgRNA Extraction

1. Add 500 µL TRIzol and 100 µL chloroform to sgRNA solution. Shake, incubate, and centrifuge at 18,000 × g, 4 °C for 10 min.

2. Transfer aqueous phase to new tube. Add 2.5× volume cold 100% ethanol. Precipitate overnight at –80 °C.

3. Centrifuge at $18,000 \times g$, 4 °C for 10 min. Wash pellet with 75% ethanol. Dry and dissolve in 12 μ L RNase-free water. Check RNA integrity via gel electrophoresis. Store at -80 °C.

2. Repair Template Construction and Purification

2.1 Template Construction

- **(1) Whole gene knockout:** No repair template needed.
- **(2) Deletion of specific fragment:** Clone ~100–500 bp homology arms flanking the target region into pGEM-7ZF(+) vector (EcoRI/HindIII sites). Sequence, then amplify as template.
- **(3) Base editing:** Include mutated base within homology arms.
- **(4) Tag insertion:** Insert tag coding sequence between homology arms at start or stop codon region.

2.2 Template Purification

Add 900 μ L cold E4 buffer (5mL Tris-HCl(1 M, pH8.5), 12.5 mL NaCl(5 M) for 50ml) + 660 μ L isopropanol to the recovered DNA. Mix, spin at $18,000 \times g$, 4 °C for 30 min. Wash with 70% ethanol, dry ≤ 10 min. Resuspend in 15 μ L RNase-free H₂O. Store at -20 °C.

3. Microinjection

3.1 Worm Preparation

Pick 20–50 L4-stage worms one day before injection. Let them grow overnight to adults.

3.2 Agarose Pad Preparation

Prepare 2.5% agarose. Drop 50 μ L onto a coverslip and overlay another slip in a cross (“+”) pattern. After 2 min, remove the top slip — pad is ready after 6 h at room temp.

3.3 Injection Mix Preparation

Thaw sgRNAs (for **unc-58** and target gene), Cas9 protein, repair templates, and RNase-free water on ice. Heat-denature dsDNA repair templates using a PCR program:

95 °C 2 min → 85 °C 10 s → 75 °C 10 s → 65 °C 10 s
→ 55 °C 1 min → 45 °C 30 s → 35 °C 10 s → 25 °C 10 s

Prepare injection mix (10 µL total):

Component	Amount
sgRNA (unc-58)	part of 1.8 µg total sgRNA
sgRNA1 (target gene)	-
sgRNA2 (target gene)	-
Cas9 protein	5 µg
RNase-free H ₂ O	to 10 µL

Incubate 15 min at 37 °C. Then add:

- AF-JA-76: 240 ng
- Repair template: 250 ng (if applicable)

Spin at 18,000 × g, 4 °C for 2 min. Transfer 7.5 µL of supernatant to fresh tube for injection.

3.4 Needle Preparation

Use WPI 1B100F-4 capillaries and pull with Narishige PC-100 to generate injection needles. Load ~2.5 µL injection mix. Let gravity fill the tip.

3.5 Needle Calibration

Use a heated capillary to make a glass fiber. Place under microscope with oil droplet. Use it to align and calibrate the injection needle with a reference. Set injection pressure to 0.5 and injection value to 0.6. Confirm injection works.

3.6 Worm Injection

Pick young adult worms (with early embryos), wash on OP50-free NGM plate. Mount 5 worms in oil on the agarose pad. Under 40× magnification, inject into the

middle of the germline twice per worm. Transfer injected worms into fresh NGM plate using M9 buffer.

4. Worm Screening and Genotyping

Label injected worms as **P0**. After 3 days, pick 96 F1 worms with *unc* phenotype, transfer to individual plates. After F2 appear, extract F1s and genotype using a worm lysis protocol (include adults + larvae to reduce false positives).

From F1 plates with desired heterozygous genotypes, pick 12 F2s (wild-type movement), grow for 2–3 days. Once F3s hatch, genotype F2s to identify homozygous mutants.

After identifying homozygotes, **outcross twice with wild-type (N2)** to eliminate off-target effects. Freeze validated lines.

Important: Always isolate at least 2 independent alleles and outcross before experiments or freezing.