

基于 CRISPR 的内源性标记

优化的报告基因敲入细胞构建操作指南



摘要

本指南提供了一种利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和常用报告基因标签创建并验证内源敲入细胞的优化操作方案。方案包含可选的 DNA 修复通路抑制剂使用指导，以提高整合效率。

参考方案

Nano-Glo® HiBiT 裂解检测系统 #TM516

Nano-Glo® 活细胞检测系统 #FB195

HaloTag® 技术：水溶性配体 #TM753

获取地址：

www.Promega.com/protocols/

引言

利用 CRISPR/Cas9 技术进行内源性蛋白标记，可在细胞环境中研究蛋白的表达、定位和相互作用。通过将报告基因标签直接整合到基因组中，蛋白表达始终处于天然调控之下，从而避免了过表达或抗体检测相关的假象。NanoLuc®、NanoBiT® 和 HaloTag® 技术广泛用于监测蛋白动态，可作为有效的内源性报告基因标签。NanoLuc® 和 NanoBiT®（包含源自 NanoLuc® 的 HiBiT 肽段及互补的 LgBiT 多肽）提供高灵敏度的发光检测，而 HaloTag® 则具备基于荧光的检测能力。

这些标签通过 CRISPR 介导整合到基因组的效率因细胞系、目标基因座和标签大小而异。实现高效整合的最关键因素之一是激活同源定向修复（HDR）通路。然而，HDR 必须与优先采用的非同源末端连接（NHEJ）和替代性末端连接（Alt-NHEJ）通路竞争以修复双链 DNA 断裂。这些优势修复机制不仅不会促进精确整合，反而会产生破坏基因功能的随机插入缺失（indels）。一种已被证实的通过 HDR 提高报告基因标签整合效率的策略是使用化学抑制剂阻断 NHEJ 和 Alt-NHEJ。靶向 NHEJ 关键蛋白 DNA-PK 的抑制剂（如 AZD7648、M381），和靶向 Alt-NHEJ 关键因子 Pol Theta 的抑制剂（如 PolQ1、PolQ2、RP6685），可显著提高报告基因标签的整合效率，同时减少非预期的缺失。这些抑制剂的联合使用可提高 HiBiT（图 1）和全长报告基因的整合效率，从而加速单克隆细胞系的构建，并实现使用 CRISPR 编辑细胞池进行分析。虽然市面上有多种靶向 DNA-PK 和 Pol Theta 的抑制剂，但本方案中推荐的抑制剂是经过特别筛选的，因其具有高效性、特异性和低毒性。

虽然使用 DNA 修复通路抑制剂并非必需，但推荐使用以最大化敲入效率。若不使用这些抑制剂，仍可实现基因组整合，但可能需要更多时间进行单克隆分离，或限制使用编辑细胞池的分析。以下方案提供了 CRISPR/Cas9 介导的 HiBiT、NanoLuc® 和 HaloTag® 报告基因标签整合的可靠工作流程，并包含可选的效率增强抑制剂使用方案。

第一部分：设计与准备编辑材料

1. 从 NCBI 下载目标基因组 DNA 序列：

(<https://ncbi.nlm.nih.gov/gene>)，确保获取包含 5' 和 3' 非翻译区 (UTR) 的完整基因组序列。在 NCBI 中，这些 RefSeq 编号以 NG 或 NC 开头。

2. 获取报告基因序列：

- 联系 Promega 技术服务部 (chinatechserv@promega.com) 获取 NanoLuc® 或 HaloTag® 的基因组序列。
- 在此处获取合成授权和 HiBiT 序列。

3. 确定标签整合位点：

- N 端融合：**紧接天然起始密码子 (ATG) 之后；如果存在信号肽序列，则放置在信号肽之后。
- C 端融合：**紧接天然终止密码子 (TAG, TAA 或 TGA) 之前。
- 内部融合：**选择内部环状结构或非结构化区域，避免破坏功能域。

4. 设计并订购供体 DNA 模板 (图 2A)：

- HiBiT 整合：**DNA 序列将包含整合位点上游 50 个核苷酸 (N 端同源臂, N-HA)、HiBiT 序列以及整合位点下游 50 个核苷酸 (C 端同源臂, C-HA)。订购单链寡核苷酸 (ssODN, 例如 IDT Ultramer™ DNA 寡核苷酸)。
- 注意：**在某些情况下，例如在内部环中标记时，可能需要连接子以确保 HiBiT 的可及性。更多信息请参见此白皮书第 2 页。
- NanoLuc® 或 HaloTag® 整合：**DNA 序列将包含 400 个核苷酸的 N-HA，随后为 NanoLuc® 或 HaloTag® 序列，然后是 400 个核苷酸的 C-HA。订购不含哺乳动物启动子的载体 (例如 IDT pUCIDT 克隆载体)。
- 注意：**建议在报告基因与目标蛋白之间加入至少四个氨基酸的连接子 (例如 GSSG)。

提示：在供体 DNA 模板的 PAM 序列中引入沉默突变，以避免重复切割。

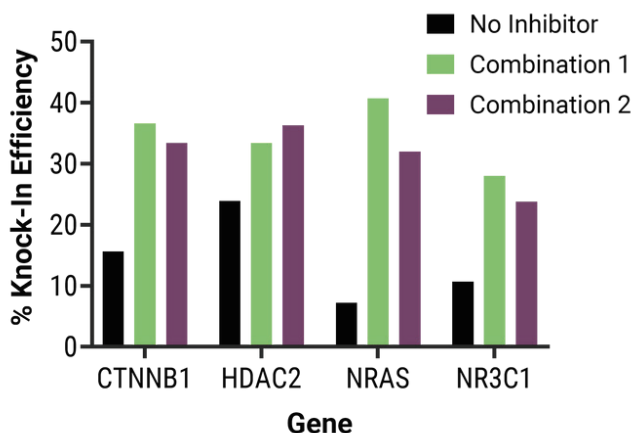


图 1. DNA 修复抑制剂提高 HiBiT 敲入效率。在存在或不存在 DNA 修复抑制剂的情况下，在 HeLa 细胞四个基因组位点 (CTNNB1-C 端、HDAC2-C 端、NRAS-N 端、NR3C1-C 端) 进行 HiBiT 标签整合编辑。通过微滴式数字 PCR 定量敲入效率。未使用抑制剂的编辑细胞以黑色柱表示。抑制剂组合 1 (1 μM AZD7648 + 0.3 μM PolQ1 + 0.3 μM PolQ2) 以绿色柱表示，组合 2 (0.3 μM M3814 + 3 μM RP6685) 以紫色柱表示。

5. 设计并订购引导 RNA (gRNA) (图 2B)：

- 在位于紧邻 PAM 位点 (NGG) 的上游，确定潜在的 20 个核苷酸 gRNA 序列，并在整合位点 10 个核苷酸范围内切割，以实现最佳整合效率。
- 从商业供应商处订购双链 gRNA (crRNA + tracrRNA) (例如 IDT Alt-R CRISPR-Cas9 系统)；建议订购并测试 2 至 3 种不同的引导 RNA，因为不同 gRNA 的切割效率可能有所差异。
- 通过将 12 μl 100 μM tracrRNA 与 12 μl 100 μM crRNA 以及 26 μl IDT 无核酸酶双链缓冲液混合于 PCR 管中，加热至 95°C 5 分钟，冷却至室温，并储存在 -20°C，制备 24 μM gRNA。

第二部分：CRISPR 基因编辑

1. 用 DNA 修复抑制剂预处理细胞（提高整合效率的可选步骤）：

- 在编辑操作前 24 小时，将细胞培养基更换为含有以下任一抑制剂组合的新鲜培养基；这些抑制剂可从多种商业供应商处购买。

组合 1: 1 μ M AZD7648 + 0.3 μ M PolQi + 0.3 μ M PolQi2

组合 2: 0.3 μ M M3814 + 3 μ M RP6685

2. 制备核糖核蛋白（RNP）复合物：

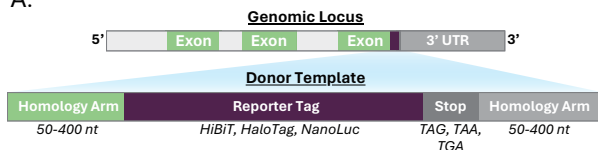
- 将 5 μ l 浓度为 20 μ M 的 Cas9 与 5 μ l 浓度为 24 μ M 的 gRNA 混合，在室温下孵育 10 分钟。

3. 将 RNP 和供体 DNA 递送至细胞：

注意：本方案描述的是通过电穿孔进行递送。也可使用基于脂质的转染试剂（如 FuGENE[®] HD）递送组分，但编辑效率可能降低。

- 将 1×10^6 个细胞转移至锥形管中，以 150 $\times$ g 离心 5 分钟。
- 吸去培养基，将细胞沉淀重悬于 100 μ l Mirus Ingenio[®] 电穿孔溶液中。
- 混合细胞、RNP 和供体：
 - HiBiT 整合：**将 100 μ l 重悬细胞与 10 μ l 组装好的 RNP 及 3 μ l 浓度为 100 μ M（300 pmol）的单链 DNA 供体混合。
 - NanoLuc[®] 或 HaloTag[®] 整合：**将 100 μ l 重悬细胞与 10 μ l 组装好的 RNP 及 3-5 μ g 质粒供体混合。
- 将 RNP 和供体 DNA 电穿孔至细胞中：
 - 将细胞、RNP 和供体 DNA 混合物的全部体积转移至 0.2 cm 电穿孔小皿中。
 - 按仪器制造商针对所选细胞系推荐的参数（通常为 120-170 V）进行电穿孔脉冲操作。
 - 立即将电穿孔后的细胞转移至含有 10 ml 生长培养基的 T75 培养瓶中。
 - 直接向培养基中添加步骤 1a 所用抑制剂组合之一（提高整合效率的可选步骤）。
 - 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育细胞 48-72 小时后再进行验证。

A.



B.

N-Terminal Fusion



C-Terminal Fusion

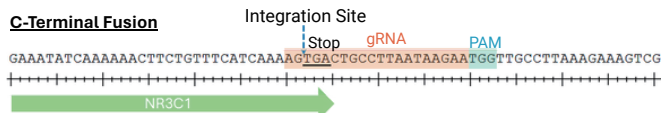


图 2. 编辑材料的设计策略。A. 基于目标整合位点设计供体 DNA 模板，应包括敲入报告基因序列及必要的同源臂。B. 在 PAM 位点上游设计 gRNA 序列，使切割位点位于整合位点 10 个核苷酸范围内。PAM 序列不应包含在 gRNA 中。Cas9 将在 PAM 序列上游第 3 个核苷酸处进行切割。

第三部分：细胞池的敲入验证

1. 筛选融合蛋白的表达：

HiBiT 整合：使用 **Nano-Glo[®] HiBiT 裂解检测试剂盒**（目录号 N3030）筛选发光信号。

- 用胰酶消化细胞，并将其重悬于生长培养基中，终浓度为 200,000 个细胞 / 毫升。
- 取 100 μ l（20,000 个细胞）转移至白色不透明 96 孔检测板中，剩余细胞放回培养瓶中扩增。
- 向已铺板在白色检测板的细胞中加入等体积的 Nano-Glo[®] HiBiT 裂解试剂（按制造商推荐方法配制），将板置于轨道摇床（300-600 rpm）上混匀 3-10 分钟。
- 使用具有发光检测功能的多孔板读数仪（如 GloMax[®] Discover 微孔板读数仪）测量 HiBiT 信号。

第三部分：细胞池的敲入验证（续）

NanoLuc® 整合：使用 **Nano-Glo® 活细胞检测系统**（目录号 N2011）筛选发光信号。

- 用胰酶消化细胞，并将其重悬于生长培养基中，终浓度为 200,000 个细胞 / 毫升。
- 取 100 μ l（20,000 个细胞）转移至白色不透明 96 孔检测板中，剩余细胞放回培养瓶中扩增。
- 向已铺板在白色检测板的细胞中加入 25 μ l Nano-Glo® 活细胞试剂（按制造商推荐方法配制），将板置于轨道摇床（300-500 rpm）上混匀 15 秒。
- 使用具有发光检测功能的多孔板读数仪（如 GloMax® Discover）测量 NanoLuc 信号。

HaloTag® 整合：使用荧光成像验证表达。

- 参考 Promega 技术手册 **TM753**《HaloTag® 技术：水溶性配体》。
- 推荐用于 **CRISPR 细胞池成像的配体**为 Janelia Fluor® 549 HaloTag® 配体（目录号 HT1020）或 Janelia Fluor® 646 HaloTag® 配体（目录号 HT1060）。

第四部分：克隆分离与验证

注意：虽然使用 DNA 修复抑制剂可以提高敲入效率并允许使用多克隆细胞池进行下游分析，但当需要长期标签稳定性、整合效率较低或靶蛋白表达水平较低时，仍需进行克隆分离。

1. 使用以下方法之一在 96 孔组织培养处理微孔板中分离克隆：

- 单细胞分选：**使用 FACS 仪器将单个细胞分配至含有 200 μ l 生长培养基的 96 孔板中的每个孔中。

或

- 有限稀释法：**将细胞稀释至约 1-10 个细胞 / 毫升，并铺板以实现平均每孔 <1 个细胞。

2. 鉴定含有整合标签的克隆。

- 当克隆形成后（约 2-3 周），用胰酶消化细胞，并将一半细胞悬液铺板至一个重复板中，用于筛选检测。
- 在重复板中直接使用第三部分“细胞池的敲入验证”中描述的方法检测 HiBiT®、NanoLuc® 和 HaloTag®。
- 将原始源板中与重复板阳性孔位对应的细胞进行扩增。

3. 通过微滴数字 PCR（ddPCR）确定整合的纯合 / 杂合状态（可选，但推荐）。

- 将 $0.5-2 \times 10^6$ 个细胞转移至锥形管中，以 $150 \times g$ 离心 4 分钟，并吸去培养基。
- 使用自动化方法（如 Maxwell® RSC 培养细胞 DNA 试剂盒，目录号 AS1620）或手动方法（如 Wizard® 基因组 DNA 纯化试剂盒，目录号 A1120）从细胞沉淀中提取基因组 DNA。
- 使用 ddPCR 定量整合标签的拷贝数；此应用说明中提供了通用方法。

4. 通过 Sanger 测序确认整合序列的保真度。

- 测序的示例方案可参考 **Schwinn 等人 2020 年**的文献。

更多信息：

如需了解基于 CRISPR 的内源性标记应用及更多选择，请访问我们的[网站](#)。

延伸阅读：

Schwinn, M.K. et al. (2020) A Simple and Scalable Strategy for Analysis of Endogenous Protein Dynamics. Sci Rep 10, 8953.
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65832-1>

Lankford K.P. and Hulleman J.D. (2024) Protocol for HiBiT tagging endogenous proteins using CRISPR-Cas9 gene editing. StarProtoc. 5(2): 103000. <https://doi:10.1016/j.xpro.2024.103000>

Trademarks herein are the property of Promega Corporation or their respective owners.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

普洛麦格 (北京) 生物技术有限公司

地址：北京市东城区北三环东路 36 号

环球贸易中心 B 座 907-909

电话：010-58256268

传真：010-58256160

网址：www.promega.com

技术支持电话：400 810 8133

技术支持邮箱：chinatechserv@promega.com

更新时间：2025.09



关注 Promega
生命科学