

應用 E-Crisp 軟體設計 crispr/cas9 基因編輯之 gRNA 位點介紹

農試所生技組 王怡雯 游舜期 陳涵葳 林大鈞

一、前言

如何針對基因組序列之特定位點進行精確及有效率地編輯，在植物功能基因組學研究和作物改良方面扮演著很重要的關鍵因子。早期研究人員以X射線、 γ 射線照射和化學誘變劑 (EMS 或 NaN_3) 等方法造成染色體突變，產生許多不同之外表性狀。然而，這些突變必須經過幾代種植、觀察並選拔，才能釐清造成這些性狀改變之基因所扮演的角色。此外，亦可利用基因工程技術大量表現目標基因或是將目標基因靜默 (gene silencing)，造成基因干擾性突變，再從植株之外表性狀，推測目標基因之功能，但上述方法藉由農桿菌或基因槍方式隨機插入，未能專一性的針對目標基因做改變，因此，無法明確釐清基因型與外表型之間的一致性。近年來，具有序列專一性的不同類型之DNA核酸酶逐漸發展，經由將特定的DNA序列結合至特定DNA核酸酶，對選定之DNA

進行剪切，再以非同源末端連接 (non-homologous End Joining, NHEJ) 或同源重組 (homologous recombination, HR) 修復雙股DNA斷裂的區域，造成DNA序列插入、剔除或替換等，達到精準編輯基因之目的。

第一代及第二代最常使用之DNA核酸酶為FNs (Zinc-Finger Nucleases) 和TALENs (transcription activator-like effector nucleases)，但上述兩法存在構築不易以及結構不穩定的缺點，在廣泛運用於基因編輯上仍有障礙。近年來新發展之CRISPR/Cas原是一套細菌以及古生菌用來防禦外來DNA的系統，利用RNA引導之核酸酶切割入侵嗜菌體DNA，進而防禦外來入侵物的干擾。2012年Jinek等人從*Streptococcus pyogenes*嗜熱鏈球菌中發現具有RNA引導Cas9核酸酶的CRISPR-Cas基因座，利用Cas9核酸酶與crRNA、tracrRNA形成複合物，就可以對DNA進行剪切，逐將此系統進行改造，將crRNA和tracrRNA連接成一個引導gRNA (guide RNA)，之後僅須利用Cas9蛋白與一個引導RNA即可進行基因編輯，爾後，CRISPR/Cas系統迅速被廣泛運用至各種生物體的基因編輯實驗上 (Jinek et al.

作者：王怡雯聘用助理研究員
連絡電話：04-23317356

2012)。CRISPR / Cas分為6種主要類型，其中II型因只需要一個Cas9單一蛋白即可，操作上較為簡易，上述Jinek等人於2012年所發表的系統即屬於此II型系統--CRISPR/Cas9，亦是目前大多數研究與應用所使用之系統。

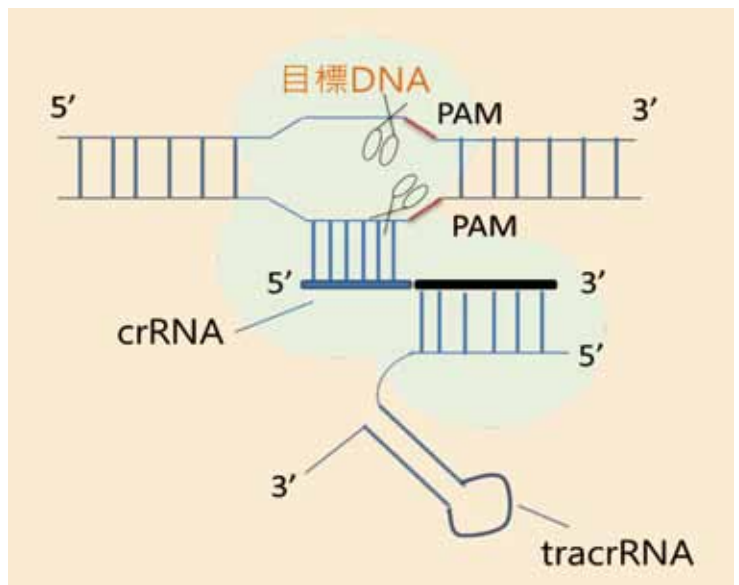
二、原理與機制

CRISPR / Cas9系統在原核生物中包含三個主要組成：Cas9蛋白、CRISPR RNA (crRNA) 和轉錄活化tracrRNA (trans-activating crRNA)，CRISPR 轉錄產生 pre-crRNA 後，會和 tracrRNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 形成複合物。pre-crRNA被Cas9核酸酶加工形成成熟的 crRNA後，形成Cas9/tracrRNA:crRNA 複合體，並根據crRNA特定序列來辨識與切割目標 DNA (Deltcheva et al. 2011)。而利用人工改造 crRNA和tracrRNA兩種 RNA，形成具有引導作用的gRNA，將Cas9 核酸酶引導至與gRNA互補之 20 bp DNA配對序列，在 Protospacer adjacent motif (PAM) 序列NGG之上游 3-4個核苷酸處進行切割並進行基因編輯(圖一) (Li et al. 2013)。因此，gRNA的設計是進行CRISPR/Cas9基因編輯的第一個步驟，也是極其重要的一環。假設目標基因和其他基因的序列相似度很高，

gRNA有可能將會將Cas9核酸酶引導到其他基因序列進行基因編輯，造成所謂的脫靶效應(off-target)，影響整個試驗的準確性。若能從目標基因中找到具有高度專一性20 bp DNA之gRNA序列，就可大大降低上述之脫靶效應，目前有許多生物資訊網站提供研究學者gRNA的設計軟體，使用者可根據自己的需要來設定相關的參數，從而獲得符合要求的gRNA。

三、生物資訊網站設計gRNA之位點

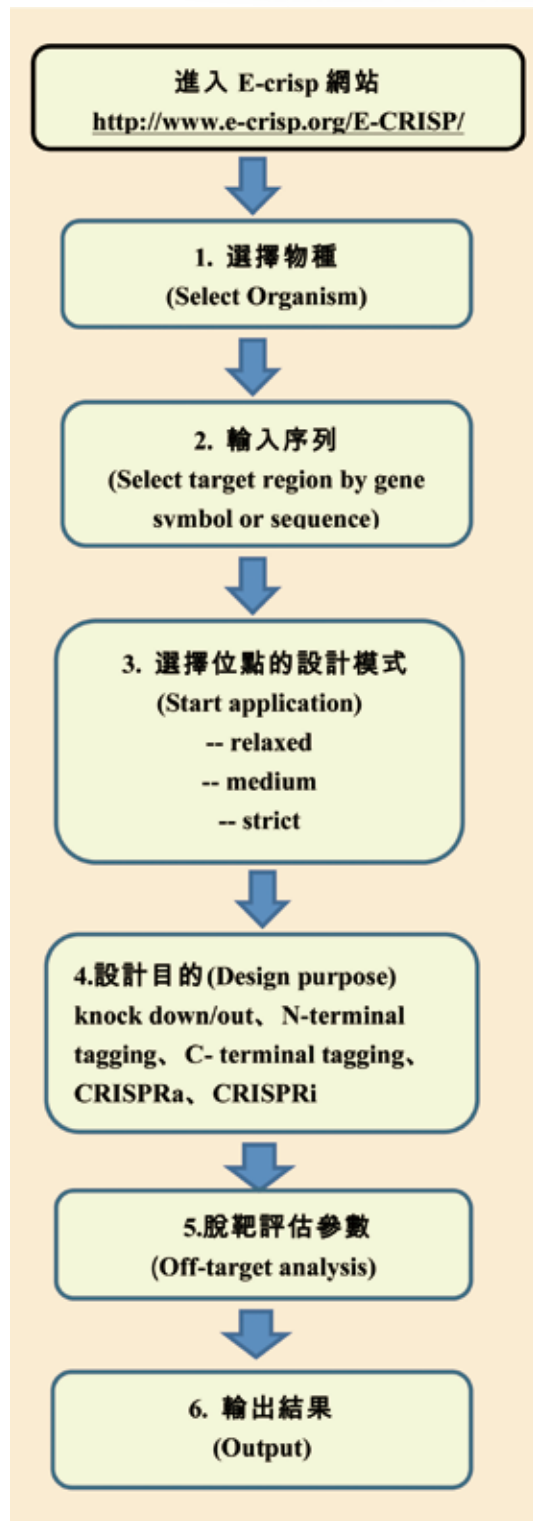
許多的生物資訊網頁提供了各式的gRNA設計軟體，常見的網站如：E-Crisp、FlyCRISPR、CHOPCHOP等，大多數的網站皆提供線上或軟體式服務，並預測目標編輯序列與脫靶效應之排序等。使用者只需提供目標基因的序列，選擇物種，即可挑選到效果好且專



圖一、CRISPR/Cas9原理與機制。由crRNA和tracrRNA複合體引導Cas9蛋白至PAM上游進行切割。

一性高的gRNA。不同的網站也提供不同之功能，例如：基因名搜尋、PAM序列、All-in-one (一個載體同時表現Cas9和gRNA) 之功能等，本篇以常見的使用軟體E-CRISP設計gRNA之位點作為例子。E-CRISP是用於設計和評估CRISPR系統gRNA目標位點的線上工具之一，它有Design和evaluation的選項，此程式於任何核苷酸序列中皆可以快速演算gRNA目標序列，並依照現行公告之物種參考序列，包括其基因組背景等區域，設計具目標專一性的位點。網站提供54個參考基因組 (reference genomes) 資料庫，包括果蠅 (*Drosophila*)、阿拉伯芥(*Arabidopsis*)、斑馬魚 (*zebra fish*)、老鼠 (*mouse*)、人類 (*human*)、酵母菌 (*yeast*)、兔子 (*Leporidae*)、青蛙 (*frog*)、水稻 (*Oryza sativa*)、秀麗隱桿線蟲 (*Caenorhabditis elegans*)、二穗短柄草 (*Brachypodium distachyon*)、青鱗 (*oryzias latipes*)等，可依使用者需求而選擇，E-CRISP是一個免費且可快速分析的線上工具，在使用上較為簡便，茲介紹其操作流程如下(圖二)：

1. 進入<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>網頁，按Design介面進入設計網頁。
2. 開始選擇物種 (Select Organism)。
3. 輸入基因序列，可輸入基因之代號 (accession numbers) 或是基因的序列 (FASTA sequence) 兩種方式。
4. 選擇位點的設計模式，共有3種 (relaxed、medium、strict) 選項可供選擇，第3種strict較嚴謹，標準Cas9位點設計請選擇Single design，要設



圖二、E-crisp 操作流程。

計Nickase位點，就必須選擇Paired designs。之後，可按start sgRNA search 鍵開始搜尋或點選Display advanced options展開其他參數做進階設定。

5. 設計目的 (Design purpose) 有knock down/out、N-terminal tagging、C-terminal tagging、CRISPRa、CRISPRi 五種選項可供選擇，視CRISPR設計編輯位點的位置而定。當上述第4點設計位點選擇strict模式，則此項與Gene annotation filtering條件過濾之參數會自動全選。
6. 設定Off-target site分析參數，有Bowtie (one) 或Bowtie2 選項供選擇，另外勾選Select to check for secondary off-targets進 特定篩選基因 hygromycin、GFP或特定序，排除上述基因或序列被剔除的機會。
7. 全部設定完之後按start gRNA search，開始搜尋。
8. 輸出gRNA之序列，列出於表單可依照需求選擇適合的位點，同時計算gRNA其序列之 E值(Efficiency score)、S值(Specificity score)及編輯位置示意圖可供參考。

四、結論

以CRISPR做為基因組工程和相關之研究技術迅速崛起，包括基因剔除(knockout)、基因激活(activation)和基因抑制(inhibition)等方面，進行這些研究必須透過線上工具找出適合on-target目標位點及有效引導的gRNA序列，避免脫靶效應。因此，線上工具之選擇更加重

要，良好的線上工具需具備於高質量基因組序列、基因註釋的資料庫，以及關於脫靶和有效性指標累積數據等等，進而達到精準且有效率地進行基因研究和作物改良之目標。筆者利用E-CRISP系統運算水稻澱粉合成關鍵酵素--*sbe3*基因之gRNA，並取得農桿菌轉殖系，經由Sanger核酸定序檢測法分析，確實可以看到各種基因編輯的情形，有插入、核苷酸序列改變、缺失等現象，綜合以上結果顯示E-CRISP可以針對目標基因作精準的編輯，未來將針對各種編輯情形進行抗性澱粉含量分析，瞭解此基因在澱粉生合成路徑所扮演之功能。

五、參考文獻

- Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471 (7340):602-607.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, and E. Charpentier. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337 (6096):816-821.
- Li, J. F., J. E. Norville, J. Aach, M. McCormack, D. Zhang, J. Bush, G. M. Church, and J. Sheen. 2013. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat Biotechnol* 31 (8):688-691.