
遗传发育所阐述碱基编辑工具全基因组水平特异性检测的实验流程与分析方法

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/12168.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

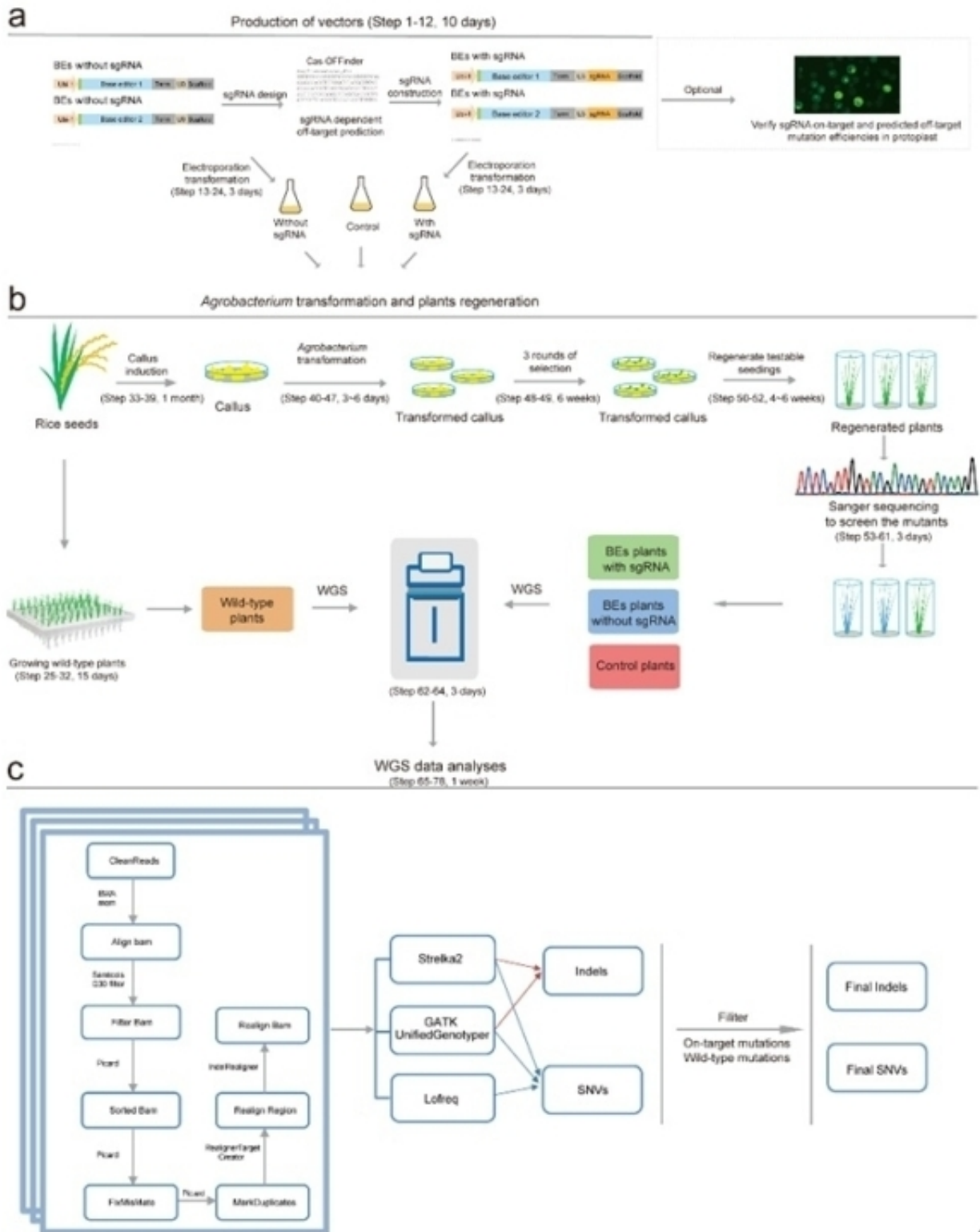
基于CRISPR系统开发出的一系列基因组编辑系统，如碱基编辑系统和引导编辑系统等丰富了基础研究、基因治疗、动植物育种改良的遗传学工具箱。然而，其脱靶效应对推广和应用造成了限制。如何准确、灵敏、无偏地在体内评价基因组编辑工具对生物基因组的影响，是基因组编辑领域的重要科学问题。通过捕获基因组双链断裂（double strand breaks, DSB），可快速全面地评估基因组编辑系统的脱靶效应，但无法准确评估生物个体内真实的脱靶情况，也难以评估不产生DSB的编辑工具如碱基编辑系统的脱靶效应。因此，开发准确、灵敏、无偏的全面评估的基因组编辑工具特异性评价新方法十分重要。

中国科学院遗传与发育生物学研究所研究员高彩霞研究组前期通过利用相似遗传背景的植物突变体及全基因组测序技术，发现胞嘧啶碱基编辑器可造成全基因组范围的不依赖sgRNA的脱靶效应（Jin et al., Science, 2019），并结合脱氨酶理性设计与新型筛选策略开发出了高精度、高编辑活性的新型胞嘧啶碱基编辑工具（Jin et al., Molecular Cell, 2020）。其基于水稻植物重测序的基因组编辑工具特异性评价方法利用水稻基因组小、参考基因组序列清晰，具有突变体群体异质性较低的特点，可以准确、灵敏地评价全基因组范围碱基编辑工具的特异性。为进一步普及和促进该方法的使用，高彩霞研究组在Nature Protocols发表文章，详细介绍在个体水平评价基因组范围基因组编辑工具特异性的具体实验和数据分析流程。

论文阐述了如何利用水稻突变体植物重测序评估基因组编辑工具的特异性的方法，同时检测全基因组范围依赖sgRNA的脱靶效应与不依赖sgRNA的脱靶效应。流程包括：待检测碱基编辑工具的选择与载体构建；野生型、对照组与处理组设计；水稻突变体获得与基因组测序；使用GATK与Strelka2软件分析Indels突变；使用GATK，Strelka2与LoFreq软件分析SNVs突变；利用野生型植物过滤本底突变；使用Cas-OFFinder预测依赖sgRNA的脱靶突变位置；定位并检测基因组范围依赖sgRNA的脱靶突变；过滤依赖sgRNA的脱靶突变；统计过滤后基因组范围Indels与SNVs变异数量以评估不依赖sgRNA的脱靶突变。该方法只需12-15周的时间即可完成数个碱基编辑系统的依赖sgRNA的脱靶效应与不依赖sgRNA的脱靶效应的无偏评估。研究展示了基于水稻植物重测序的碱基编辑工具特异性评价方法的准确性与灵敏性。此外，该方法还可以便捷地推广到其他基因组编辑工具的特异性评估上，并随着新型基因组编辑工具不断出现及该方法的优化得到更广泛应用。

相关研究成果在线发表在[Nature Protocols](#)

上，遗传发育所高彩霞研究组博士生靳帅为论文第一作者，高彩霞为论文通讯作者。研究工作得到国家自然科学基金委、中科院战略性先导科技专项（A类）、国家重点研发计划等的资助。



碱基编辑工具全基因组水平特异性检测的实验与分析流程。(a) 待检测碱基编辑工具的选择与载体构建 (b) 实验设计与水稻突变体获得

(c)基因组数据变异分析、过滤及统计。

研究团队单位：遗传与发育生物学研究所

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](http://www.iikx.com)转发