

TrueCut HiFi Cas9 蛋白兼具低脱靶效应与高靶向编辑效率

CRISPR-Cas9 基因组编辑操作简单且成本较低，是最流行的基因治疗工具之一，但能否成功应用取决于许多因素。多年来，我们一直致力于完善和优化每一个因素，确保在各种细胞（包括诱导多能干细胞 (iPSC) 和原代细胞）中实现最大编辑效率。虽然我们已经在核酸酶的递送和定位上做了改进，稳定提高了靶向编辑效率，但脱靶效应仍然是个难题。解决这个难题对治疗型应用来说极为重要，因为低靶向编辑效率和脱靶效应可能会导致不良后果。为了解决上述问题，我们设法找到了一种能够限制脱靶编辑数量的 Cas9 变体。

我们应用了一种富集靶标的 GUIDE-seq (TEG-seq) 技术，专门检测细胞基因组中的脱靶编辑^[1]。之后，我们筛选出了几种候选 Cas9 蛋白，都是发表过或者研发团队内部设计的蛋白，希望从中能找出一种高保真 Cas9 蛋白。我们通过修饰高保真 Cas9 蛋白的 N 端和 C 端来优化编辑效率，得到了 Invitrogen™ TrueCut™ 高保真 (HiFi) Cas9 蛋白 (TrueCut HiFi Cas9)。从本文所列数据可以看出，在 HEK293 细胞、原代 T 细胞和诱导多能干细胞 (iPSC) 中，TrueCut HiFi Cas9 的保真度优于野生型 Invitrogen™ TrueCut™ Cas9 蛋白 v2 (wt-Cas9) 和其他市售高保真 Cas9 蛋白。

表 1 展示了在 HEK293 细胞中转染 HEK4 gRNA 和以下 4 种 Cas9 蛋白之一 (wt-Cas9、高保真 Sniper Cas9^[2]、Supplier I 高保真 Cas9 或 TrueCut HiFi Cas9) 后，对脱靶效应进行全基因组筛选的结果。可以看到 TrueCut HiFi Cas9 比 Sniper 和 Supplier I 蛋白的脱靶效应更低。

为了更好地了解 TrueCut HiFi Cas9 的高保真度，我们评估了 HEK293 基因组中的其他基因。我们使用 TEG-seq 技术做了更多的全基因组筛选，检测 HEK1、HEK4、VEG1 和 VEG3 基因中的脱靶效应。数据显示，TrueCut HiFi Cas9 产生的脱靶编辑少于 wt-Cas9 和 Supplier I 高保真 Cas9 蛋白 (图 1)。将每个编辑位点的脱靶编辑百分比与在靶编辑百分比进行比较，可得到相应位点的脱靶/在靶比例。每个编辑事件都根据其脱靶/在靶比例绘制了对应图像 (图 1A)，并对不同脱靶/在靶比例范围内的总脱靶数进行分组排布 (图 1B)。结果表明，TrueCut HiFi Cas9 产生的脱靶效应明显少于 wt-Cas9 和 Supplier I 高保真 Cas9 蛋白。TrueCut HiFi Cas9 仅有一个脱靶编辑的脱靶/在靶比例大于 10%。而对比相同的脱靶/在靶编辑比例，wt-Cas9 有 16 个脱靶编辑，Supplier I 高保真 Cas9 有 6 个脱靶编辑 (图 1B)。

表 1.通过 TEG-seq 技术在 HEK293 细胞中使用 HEK4 gRNA 检测出的脱靶 RPM。

目标靶点	MM	互补序列	PAM	wt-Cas9	Sniper	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9
On	0	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GGG	25,950	112,147	57,977	41,848
Off-1	2GA.....	GGG	23,050	26,225	6,608	691
Off-2	2	...A.....C..	AGG	20,196	37,895	21,393	497
Off-3	2	...G.....G.....	AGG	18,843	8,898	1,074	7
Off-4	3	A..T.....A..	GGG	16,942	3,890	24	0
Off-5	3	A..G.....A.....	TGG	10,310	5,654	629	0
Off-6	3	T.....C.....A..	TGG	9,697	13,852	12,438	10
Off-7	3	A.G.....G.....	TGG	8,763	4,072	881	5
Off-8	4	.A..CA.....A..	TGG	6,934	619	0	0
Off-9	3	...TCA.....	AGG	5,215	0	0	2
Off-10	2T....C.....	AGG	3,113	976	0	2
Off-11	2G..T.....	GGG	2,988	0	2,180	0
Off-12	2T....G.....	TGG	1,984	172	0	0
Off-13	2	...T.....G..	TGG	1,386	1,987	208	0
Off-14	2	...-.....g.....	AGG	1,272	0	0	0
Off-15	3	A.A....T.....	TGG	1,182	0	0	0
Off-16	3	CC....G.....	GGG	1,128	0	0	0
Off-17	3	T.....T.....A..	GGG	1,014	2	2	0
Off-18	3	..T...CT.....	TGG	908	0	0	0
Off-19	3	..C....A..A.....	AGG	869	0	0	0
Off-20	3g..A..C.....	TGG	800	344	718	0
Off-21	3	...T.C.A.....	GGG	744	0	0	0
Off-22	3A.A...G.....	GGG	628	0	0	0
Off-23	4	A.....A.....GA...	AGG	609	676	0	0
Off-24	3	.A....A..A.....	GGG	550	0	0	0
Off-25	3	T.G.....a...	AGG	511	271	114	0
Off-26	2G.....C..	GGG	498	2,145	0	0
Off-27	4	.A...C.T.A.....	AGG	414	182	0	0
Off-28	3G.....G..A..	GGG	320	0	353	0
Off-29	2A..G.....	GGG	216	0	0	0
Off-30	4	...TG.....CA.....	AGG	211	0	0	0
Off-31	2	..A...T.....	CAG	194	287	0	0
Off-32	3G.A...-.....	TGG	135	0	0	0
Off-33	3	..C....G.....G.....	GGG	80	0	0	0
Off-34	3	..A....G.....G.....	GGG	42	0	0	0

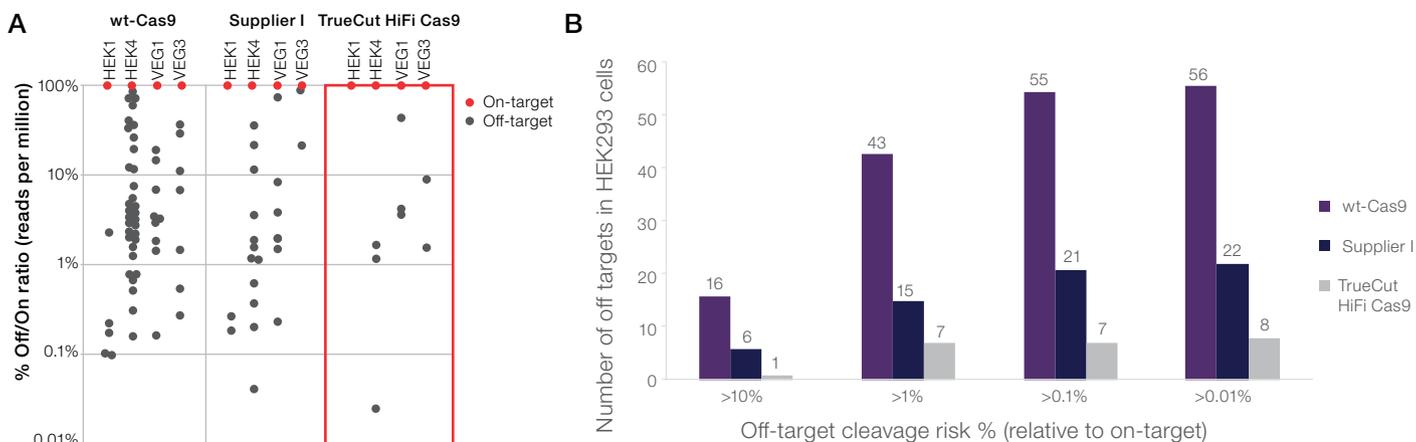


图 1.在 HEK293 细胞中使用 TEG-seq 技术检测到的脱靶编辑和对应的脱靶/在靶比例。(A) 每个脱靶/在靶比例都是根据单个脱靶的 RPM 除以对应的在靶 RPM 计算得出的。RPM (Off-target reads per million)通过 Ion Torrent™ 新一代测序 (NGS) TEG-seq 技术测出。红点代表“在靶切割”，设置为 100%。灰点代表“脱靶切割”，根据对应的脱靶/在靶比例绘制。(B) 脱靶切割风险 (%) (相对于在靶切割)。

为了测试 TrueCut HiFi Cas9、wt-Cas9 和 Supplier I 高保真 Cas9 在更多不同的细胞中的效果，在原代 T 细胞中，我们对 21 个 gRNAs (靶向编辑 CAR T 治疗相关基因 CD52、TRAC、TRBC 和 PD1) 配合三种 Cas9 蛋白的脱靶编辑进行了全基因组筛选 (图 2)。其中一些 gRNAs 也已经用于 CAR T 细胞基因治疗^[2,3]。为了确认这三种 Cas9 蛋白保真度的差异，我们特意用到了 TRBC4、PD1-4 和 PD1-5 gRNAs，这些 gRNAs 在计算机模拟中有大量脱靶错配位点。与 wt-Cas9 和 Supplier I 高保真 Cas9 (图 2A) 相比，TrueCut HiFi Cas9 产生的脱靶编辑更少，且具体脱靶点的脱靶/在靶比例更低。正如预期的那样，我们用 TRBC4、PD1-4 和 PD1-5 gRNA 检测到了一些脱靶编辑。wt-Cas9 有 22 个脱靶编辑效应，Supplier I 高保真 Cas9 有 8 个脱靶编辑 (图 2B)。每个脱靶编辑的 reads 数都超过了相应的在靶 reads 数，所以脱靶/在靶比例大于 100%，而 TrueCut HiFi Cas9 在相同比例下没有检测出脱靶编辑。在脱靶/

在靶比例大于 10% 的区间里，wt-Cas9 有 203 个脱靶编辑，Supplier I 高保真 Cas9 有 63 个脱靶编辑。该结果明显多于 TrueCut HiFi Cas9 测出的 13 个脱靶编辑 (图 2B)。

脱靶编辑最少的 11 个 gRNAs 被用于进一步评估 T 细胞中的靶向编辑效率，包括插入缺失和同源重组修复 (HDR) 的百分比。使用单链寡脱氧核苷酸评估 HDR，并使用基于 NGS 的靶向扩增子测序技术筛选。表 2A 中列出了插入缺失和 HDR 的百分比。表 2B 中列出了以 wt-Cas9 (100%) 为标准的插入缺失和 HDR 的标准化百分比。Supplier I 高保真 Cas9 和 TrueCut HiFi Cas9 产生的插入缺失的标准化百分比分别为 80% 和 84%。这两种蛋白的 HDR 百分比分别为 79% 和 88% (图 3)。平均下来，使用 TrueCut HiFi Cas9 检测到的插入缺失和 HDR 的百分比与使用 Supplier I 高保真 Cas9 检测到的百分比相当。

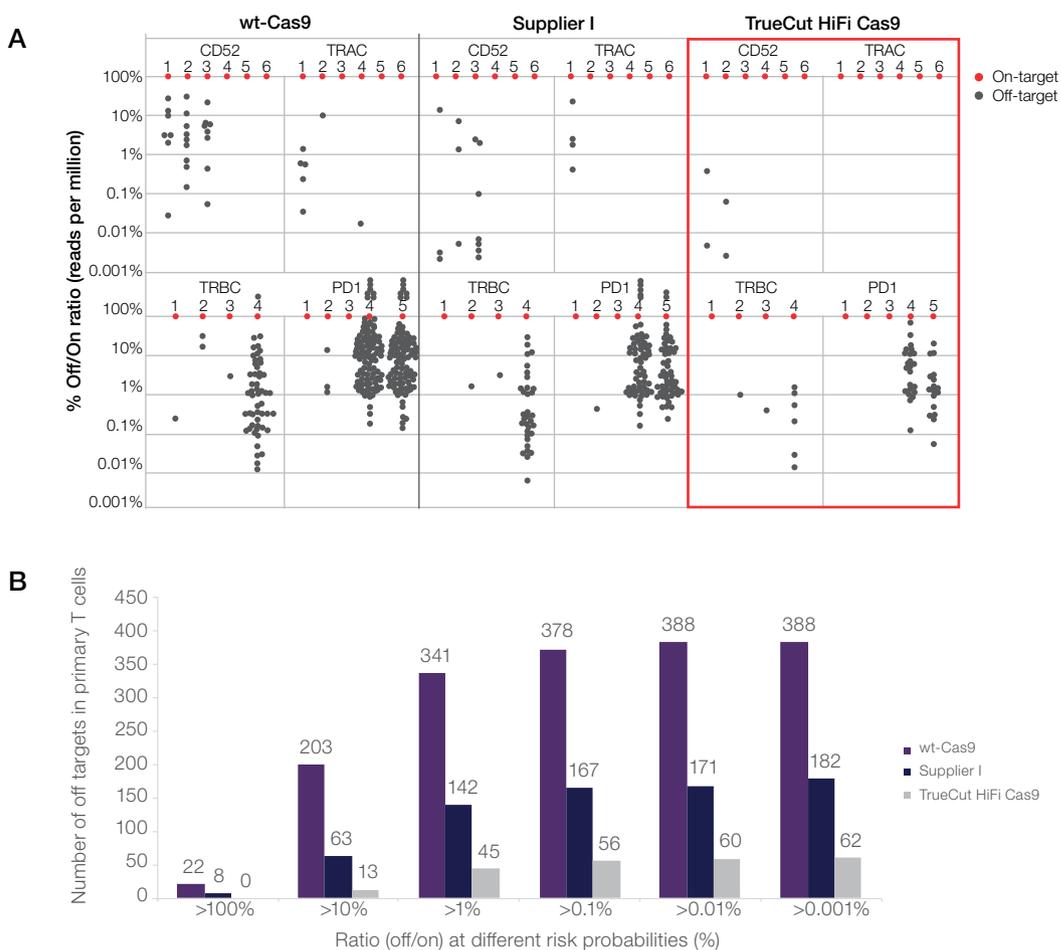


图 2. 在原代 T 细胞中使用 TEG-seq 技术检测到的脱靶编辑和对应的脱靶/在靶比例。(A) 21 个靶向 CD52、TRAC、TRBC 和 PD1 基因的 gRNAs 与 wt-Cas9、Supplier I 高保真 Cas9 和 TrueCut HiFi Cas9 共转染。基因名列出的数字是 gRNAs 的编号。脱靶/在靶比例是根据单个脱靶的 RPM 除以相应的在靶 RPM 计算得出的。红点代表“在靶切割”，设置为 100%。灰点代表“脱靶切割”，是根据相应的脱靶/在靶比例绘制的。灰点出现在红点上方表示，“脱靶”的 reads 多于“在靶”的 reads。(B) 不同脱靶/在靶比例分组中的总脱靶编辑数

表 2.wt-Cas9、Supplier I 高保真 Cas9 和 TrueCut HiFi Cas9 的靶向插入缺失和 HDR。

A	插入缺失平均值 (%)			HDR 平均值 (%)		
	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9
gRNA						
CD52-4	47.67	44.39	43.33	41.83	42.95	41.13
CD52-5	56.70	56.29	55.43	35.67	34.39	35.25
CD52-6	42.66	40.20	23.16	49.49	51.27	38.43
TRA-2	21.53	21.63	22.94	21.75	19.95	15.79
TRA-4	73.94	72.20	34.55	20.93	22.79	17.41
TRC-6	49.12	30.10	38.67	4.70	3.04	6.53
TRB-1	47.41	40.84	44.92	23.14	18.12	23.29
TRB-2	36.06	30.21	31.92	29.24	21.17	16.35
PD1-1	13.70	9.19	12.21	4.63	2.92	3.23
PD1-2	32.09	20.63	30.05	14.94	9.54	16.23
PD1-3	15.00	4.98	12.99	3.77	0.97	2.54
平均值 (%)	39.62	33.69	31.83	22.73	20.64	19.65

B	标准化到 wt-Cas9 的插入缺失 (%)			标准化到 wt-Cas9 的 HDR (%)		
	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9
gRNA						
CD52-4	100%	93%	91%	100%	103%	98%
CD52-5	100%	99%	98%	100%	96%	99%
CD52-6	100%	94%	54%	100%	104%	78%
TRA-2	100%	100%	107%	100%	92%	73%
TRA-4	100%	98%	47%	100%	109%	83%
TRC-6	100%	61%	79%	100%	65%	139%
TRB-1	100%	86%	95%	100%	78%	101%
TRB-2	100%	84%	89%	100%	72%	56%
PD1-1	100%	67%	89%	100%	63%	70%
PD1-2	100%	64%	94%	100%	64%	109%
PD1-3	100%	33%	87%	100%	26%	67%
平均值 (%)	100%	80%	84%	100%	79%	88%

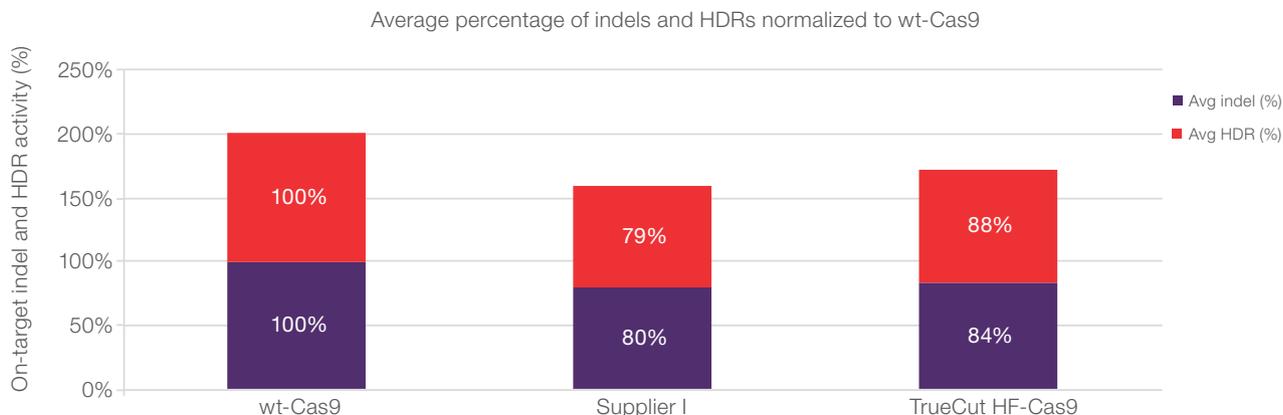


图 3.在 T 细胞中使用 wt-Cas9、Supplier I 高保真 Cas9 和 TrueCut HiFi Cas9 的插入缺失和 HDR 的标准化在靶编辑效率。表 2B 中列出了插入缺失和 HDR 的平均标准化百分比。

我们也在 iPSC 中评估了 TrueCut HiFi Cas9 的性能。在 iPSC 中使用 4 个 gRNAs 对脱靶效应进行了全基因组筛选。其中一个 gRNA 靶向常用于脱靶研究的 HEK4 靶点，两个 gRNAs 靶向与镰状细胞贫血症相关的血红蛋白 β 亚单位基因 (HBB) 中的 SNP。最后一个 gRNA 已被用于 BCL11A 敲除，用于治疗镰状细胞贫血症。如图 4 所示，HBB1、HBB2 和 HEK4 gRNAs 都检测到了脱靶编辑。而 BCL11A gRNA 没有检测到脱靶效应（数据未展

示）。与在其他细胞类型中的编辑效率一致，相较于 wt-Cas9 和 Supplier I 高保真 Cas9，TrueCut HiFi Cas9 产生了更低的脱靶编辑效应，单个脱靶的脱靶/在靶比例更低。

在 iPSC 中评估了使用 BCL11A 和 HBB1 gRNAs 的靶向编辑活性，包括插入缺失和 HDR 的百分比。使用两种 gRNAs 后，TrueCut HiFi Cas9 仍然保持着高靶向编辑活性（图 5）。

A

HBB1			RPM		
目标	互补序列	PAM	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9
靶点	CTTGCCCCACAGGGGCAGTAA	CGG	141,922	258,580	284,917
Off1	TCA.....	GGG	126,583	970	132
Off2	T.....T.G.	CAG	13,100	15,871	1,229

HBB2			RPM		
目标	互补序列	PAM	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9
靶点	CTTGCCCCACAGGGGCAGTAA	AGG	431,212	356,556	452,904
Off1	...AA.....	TGG	246,927	3,153	319
Off2	..A.a.....C.....C.....	GGG	929	228	7
Off3	G.....G.....A.....	AGG	118	2,197	0

HEK4			RPM		
目标	互补序列	PAM	wt-Cas9	Supplier I	TrueCut HiFi Cas9
靶点	GGCACTGCGGCTGGAGGTGG	GGG	82,924	147,851	159,782
Off1	...G.....G.....	AGG	149,096	848,833	8,695
Off2GA.....	GGG	151,950	390	105
Off3	A.G.....G.....	TGG	246,887	927	124
Off4T.....C.....	AGG	118,633	119	65
Off5A.....C.....	AGG	12,949	8	0
Off6G.....C.....	GGG	3,005	21	0
Off7	T.....C.....A.....	TGG	1,734	0	0
Off8-G.....g.....	AGG	99	0	0
Off9T.....G.....	TGG	52	0	0

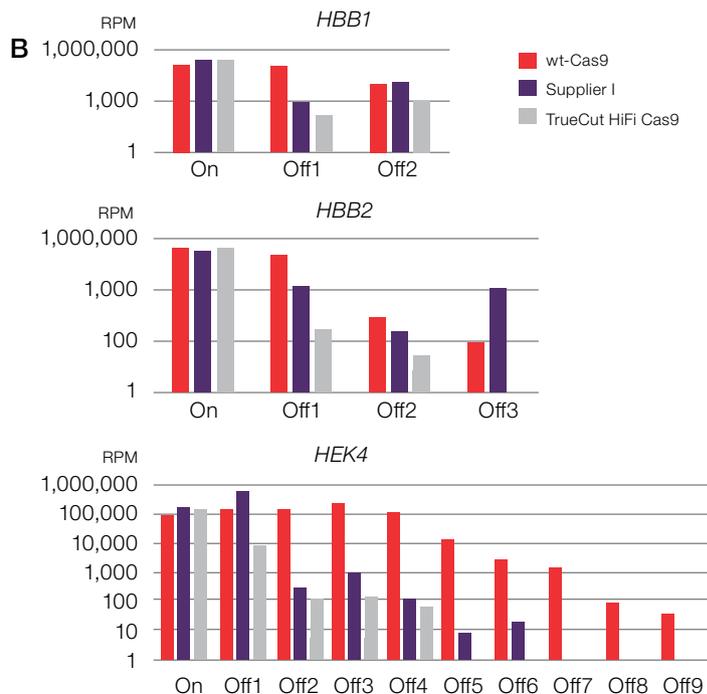


图 4. iPSC 中检测到的脱靶编辑。两个 gRNAs 靶向镰状细胞贫血症相关的血红蛋白 β 亚单位基因 (HBB) 中的 SNP。另一个 gRNA 靶向常用于脱靶研究的 HEK4 位点。(A) 所有在靶和脱靶编辑的互补序列和 RPM。(B) 表格 A 中列出的在靶和脱靶编辑的 RPM 柱状图。TrueCut HiFi Cas9 的保真度高于 wt-Cas9 和 Supplier I 高保真 Cas9 的保真度。

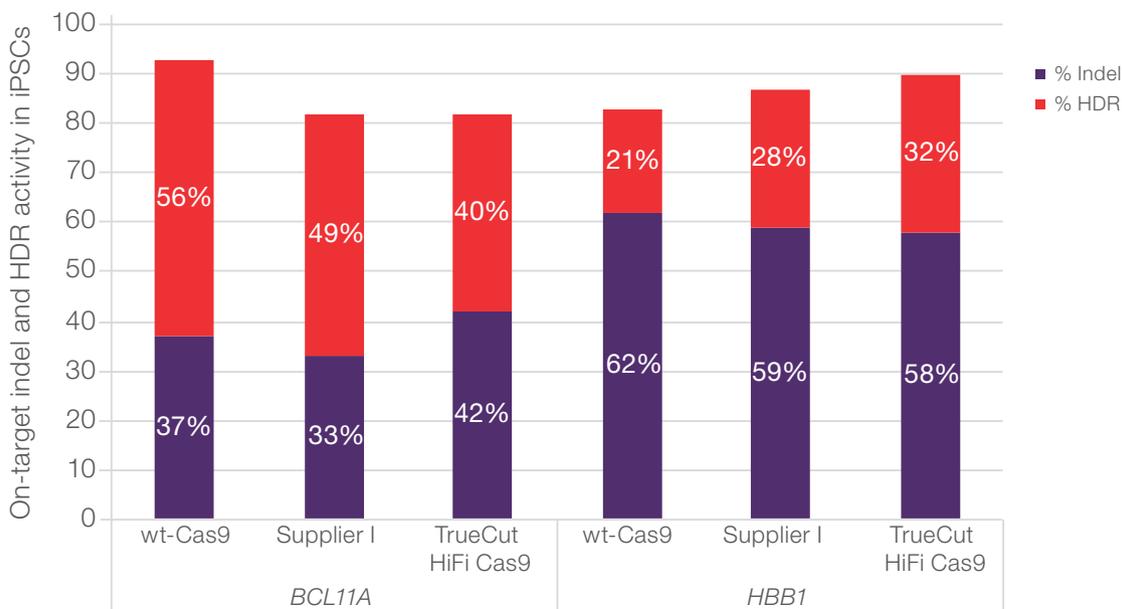


图 5. 在 iPSC 中评估 TrueCut HiFi Cas9 的靶向插入缺失和 HDR 效率。一个 gRNA 靶向血红蛋白 β 亚单位基因 (HBB1) 中的 SNP，另一个 gRNA 靶向 BCL11A 基因。TrueCut HiFi Cas9 保持了高靶向活性。

结论

在处理难编辑且比较珍贵的细胞（例如，原代细胞、免疫细胞和干细胞）时，高保真度和编辑效率尤为重要。从本文所列数据可以看出 TrueCut 高保真 (HiFi) Cas9 蛋白的编辑效果优于野生型 TrueCut Cas9 蛋白 v2 和 Supplier I 高保真 Cas9 蛋白。TrueCut HiFi Cas9 在不同细胞类型（包括 HEK293 细胞、原代 T 细胞和 iPSC）的多个目标靶点上，展示了更高的保真度和相当的靶向编辑效率。TrueCut HiFi Cas9 Protein 提供了一种简化的端到端解决方案，可以最大程度地提高在原代 T 细胞和 iPSC 中的靶向编辑效率。

参考文献

1. Tang P-T, Ding B, Peng L et al.(2018) TEG-seq: an ion torrent-adapted NGS workflow for in cellulo mapping of CRISPR specificity. *Biotechniques* 65(5):259-267.
2. Jungjoon KL, Jeong E, Lee J et al.(2018) Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity. *Nat Commun* doi:10.1038/s41467-018-05477-x.
3. Stadtmayer EA, Carl HJ et al (2020) CRISPR-engineered T cells in patients with refractory cancer. *Science* doi:10.1126/science.aba7365.
4. Graham C, Jozwik A, Pepper A, Benjamin R (2018) Allogeneic CAR-T cells: more than ease of access? *Cells* 7:155, doi:10.3390/cells7100155.
5. Schumann K, Lin S, Boyer E et al.(2015) Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins. *PNAS* 112(33):10437-10442.

有关详细信息，请访问 thermofisher.com/cas9



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学小助手

免费服务电话：800 820 8982/400 820 8982

信息咨询邮箱：cnbidmarketing@thermofisher.com

www.thermofisher.cn

ThermoFisher
S C I E N T I F I C