

【小鼠大学问】定制策略CRISPR和ES，如何选择？

ES细胞打靶和CRISPR/Cas9 的技术特点

ES细胞打靶技术的核心就是对ES细胞的打靶操作。从同源重组载体的构建、到ES细胞的打靶及阳性克隆筛选、再到ES细胞的囊胚注射获得嵌合小鼠，这个过程大约需要4-6个月时间。而CRISPR/Cas9技术抛开了这部分工作，直接移植注射后的小鼠受精卵获得F0代，大约只需要1个月左右，研发费用也就节省了不少。

另一方面，通过ES细胞打靶技术获得的基因修饰小鼠，其遗传背景来自于我们选择的ES细胞，而成熟的、可用于基因打靶的ES细胞系通常只有有限的几种品系来源：C57BL/6N、C57BL/6J、129S3以及C57与129的杂交F1系。如果需要其它背景，则需要通过与目的品系野生型小鼠回交的方式获得，回交代数在10代以上。而CRISPR/Cas9技术打破了小鼠品系的限制，可以实现在不同品系、甚至免疫缺陷品系上的遗传修饰，比如：BALB/c、FVB、Nod、Nod-scid等等。






CRISPR/Cas9技术是短片段RNA介导的靶向基因修饰。脱靶一直是该技术应用过程中很让人纠结的问题。随着这项技术的不断发展与优化，改良后的Cas9蛋白在精确性上的性能已大大改善。当然，目前我们仍无法阻止脱靶的发生，但有一些方法可以一定程度上减少脱靶的可能或排除脱靶带来的影响。比如：

- 在设计guideRNA时，可以利用脱靶预测的公共资源来筛选高特异性guideRNA；
- 在获得基因敲除小鼠模型后，可以通过与野生型小鼠交配，不断地稀释脱靶效应；
- 或针对软件预测的潜在脱靶位点进行测序分析验证；
- 还可以针对同一种基因敲除小鼠模型设计不同靶点的guideRNA，获得多个line，若表型相一致，那么可以推论该表型由指定基因敲除造成，而非脱靶效应。

下面归纳比较一下这两种技术吧：

	ES 细胞打靶	CRISPR/Cas9
构建周期	长	短
构建费用	高	低
多基因同时修饰	困难	简单
品系背景选择	少	多
脱靶风险	极低	相对较高

那么，针对不同类型的基因修饰小鼠模型，我们又该如何选择呢？

模型类型	技术策略	推荐指数	推荐理由
完全敲除	CRISPR/Cas9	★★★★★	构建快、成本低、可实现大片段或多位点操作、小鼠品系背景选择广
	ES 细胞打靶		-
条件性敲除	CRISPR/Cas9	★★★★★	构建快、成本低、小鼠品系背景选择广
	ES 细胞打靶		Flox 区域范围大、复杂结构宽容度高、打靶一次成功率高
点突变	CRISPR/Cas9	★★★★★	构建快、成本低、小鼠品系背景选择广
	ES 细胞打靶		-
片段敲入	CRISPR/Cas9	★★★★★	构建快、成本低、常用于工具鼠的制备
	ES 细胞打靶		适合大片段、复杂结构的敲入
定点过表达	CRISPR/Cas9	★★★★★	构建快、成本低、小鼠品系背景选择广
	ES 细胞打靶		适合超大片段（10kb 以上）、复杂结构的定点过表达

最后，技术策略并没有绝对的好与劣。适合的才是最好的！