

國立臺灣大學生命科學院生化科技學系

碩士論文

Department of Biochemical Science and Technology

College of Life Science

National Taiwan University

Master Thesis



以內生性 U6 啟動子發展 *Pichia pastoris*

CRISPR/Cas9 系統

Development of CRISPR/Cas9 system in *Pichia pastoris*

using endogenous U6 promoter

蔡孟羲

Meng-Hsi Tsai

指導教授：黃慶璨 博士

Advisor: Ching-Tsan Huang, Ph.D.

中華民國 106 年 6 月

June, 2017

謝誌



從新生南路地下停車場走到農藝館 106 實驗室的這條路，大概是我在台大最常走的一段路了。

遇到黃老師，是在 lab106 羽球大會結束後，和老師邊聊爬山的事邊走回實驗室。老師平常除了指導我們適當的實驗方法、邏輯，也常常分享對時事、待人處事的看法，在自由的環境之下對內能培養系上專業能力對外能拓展視野，實在慶幸能在黃老師實驗室成長。

遇到吳老師，是在回家或來實驗室的路上，不知道已經幾次被別人說老師長得比我還年輕，也不知道已經幾次在實驗卡關頻頻失敗的時候，吳老師的經驗分享、技巧指導乃至一句話的鼓勵，都是讓我繼續撐下去的動力。

遇到張景翔洪凱琳，應該是在要去吃飯的路上，這幾年來吃飯啊、去上課啊、報告啊、辦手續啊、口試啊，一起做了好多事！你們對實驗的熱情以及以實驗室為家的精神真是我最好的榜樣！遇到哲銘則是在一起去運動或是要去運動的路上，當過兵的男人就是不一樣，食量大度量大這兩年沒有變太胖也都靠他！

遇到學弟妹通常都是在實驗室，希望在下身為早一點點進實驗室的人有在經驗傳承等方面幫到你們一些，進度飛快的浩安映希、進步神速的尚儒冠陞、還有可愛的麒倫翔輔穎之祐桓煒倫，你們這樣一隻一隻的出現讓實驗室熱鬧有趣了許多。

遇到學長姐的場合就各式各樣了，說出各種警世良言的俞均、教我許多實驗技巧的芝榕佳葳昱伶 Lily 彥均、久久來一次實驗室但都能瞬間和大家打成一片的巧青宛伶、提供我台大之外的世外桃源的泡泡玉儒，每每聽到學長姐們看似輕描淡寫的經驗談，怎麼也想不到自己經歷時一點也不簡單。

也怎麼也想不到自己有一天也成為學長姐，然後要畢業、離開這個學校了。

終於兩年的成果濃縮在這本論文中，特別謝謝口委老師凌老師的專業意見、陳老師流暢又豐富的主持以及林老師細心的批評指教。

釀酒養酵母菌煮飯做分生實驗打掃繼代看電影學用新儀器玩桌遊配藥，不知道等我老了還會記得哪些又記得多少，也不知道我還會不會記得實驗室旁每到夏天盛開的穗花棋盤腳香，但如果把我丟在新生停車場的出口，我可能還是會本能的往實驗室的方向走。太多的情緒與回憶於 lab106，想忘都忘不掉。

謝謝這條路上遇到的每個人。

106 年 7 月 孟羲



摘要

基因編輯 (Genome editing) 技術近年來迅速發展，可以針對特定位點進行突變、基因插入或刪除及基因置換等編輯。基因編輯原理簡單，幾乎可以應用在任何物種，不僅加速學術研究，更可用於研發市場導向的產品。其中，Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) 更是蓬勃發展。相較於其他基因編輯技術，CRISPR/Cas9 因設計簡單、編輯效率高，雖然近五年才開始發展但已累積大量的研究資料。CRISPR/Cas9 除了基因編輯的功能，更進一步發展出如 CRISPRi、CRISPR display、CRISPR screen 等應用，CRISPR/Cas9 的前景不可限量。

Pichia pastoris 為常用的異源基因表現物種。*P. pastoris* 表現異源蛋白質具有可嚴謹調控、大量生產等優點，但由於其同源重組 (homologous recombination, HR) 仰賴限制酶的專一性序列，本身又缺少 RNA 干擾 (RNAi) 機制，是 *P. pastoris* 表達系統缺點之一。前人曾在 *P. pastoris* 建立 CRISPR/Cas9 系統編輯內生性基因，並以送入異源基因證實 CRISPR/Cas9 系統可增進同源重組效率。然而此系統表現 single guide RNA (sgRNA) 時須額外預測其結構及序列，使得設計上較為複雜，欲在 *P. pastoris* 方便應用 CRISPR/Cas9 系統仍有改善空間。

本研究欲從 *P. pastoris* 選殖其內生性 U6 基因的啟動子，並以此啟動子表現 CRISPR/Cas9 系統之 sgRNA。預期透過將異源蛋白質基因點突變以證明其可用性。此 CRISPR/Cas9 系統在 *P. pastoris* 中的建立，將使 CRISPR/Cas9 的設計更簡單，除了提升轉形效率，未來更可將 CRISPR/Cas9 系統延伸應用，例如與轉錄因子結合，使 *P. pastoris* 成為更有效率的應用平台。


關鍵字：基因編輯、CRISPR、U6 啟動子

Abstract



Genome editing technique was fast developing recently. It allowed researchers to edit genes through point mutation, insertion, deletion or replacement. The principle of genome editing was so simple that it could be applied in generally all species. It accelerated not only the development of science, but also the product related to people's life. Among the genome editing techniques, clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) was the most popular one. CRISPR/Cas9 was easy to design and was efficient in editing. Many publish researches were accumulated since it developed five years ago. Moreover, there were many techniques related to CRISPR developed like CRISPRi, CRISPR display, CRISPR screen, and so on.

Pichia pastoris was widely used to express exogenous proteins. It had many advantages like strictly controlled and large-scale expression. However, while performing homologous recombination, the target sequence was restricted to the restriction enzymes used. Also, there was no RNA interference (RNAi) system in *P. pastoris*. Therefore, there was still room for improvement for *P. pastoris* as protein expression platform.



Researchers had established CRISPR/Cas9 system, edited endogenous genes and sent template into *P. pastoris* to prove that CRISPR/Cas9 could increase the HR efficiency. However, the sequence and structure of the single guide RNA (sgRNA) in the system should be calculated additionally. The design of CRISPR/Cas9 system in *P. pastoris* could be simplified for application.

This thesis aimed to find the endogenous U6 promoter from *P. pastoris* and use U6 promoter to express sgRNA. The concept was proved by the point mutation of genes of interest. The establishment of the system could make the application of CRISPR/Cas9 in *P. pastoris* easier. It not only could improve the efficiency of transformation, but also could perform other techniques related to CRISPR/Cas9 like the combination with transcription factors.

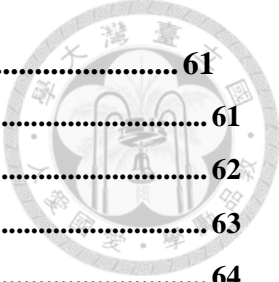
Key words : genome editing, CRISPR, U6 promoter

目錄



謝誌	I
摘要	III
Abstract	IV
目錄	VI
圖目錄	IX
表目錄	X
附圖目錄	XI
第一章、前言	1
一、基因編輯 (Genome editing)	1
1. 簡介	1
2. 常見技術	1
3. 應用	2
二、Clustered regularly Interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)	4
1. CRISPR 簡史	4
2. CRISPR 組成	4
3. CRISPR 機制	5
4. CRISPR 應用與發展	5
5. CRISPR 之挑戰	7
三、 <i>Pichia pastoris</i>	8
1. 微生物蛋白質表現系統	8
2. <i>Pichia pastoris</i>	9
3. 啟動子選擇	9
四、RNA 聚合酶與啟動子	11
1. RNA 聚合酶 II	11
2. RNA 聚合酶 III	11
3. U6 啟動子	12
四、研究動機與目的	13
五、本篇論文具體目標	14

六、本篇論文架構	15
第二章、材料與方法	16
一、菌株及培養條件	16
1. <i>Escherichia coli</i>	16
2. <i>Pichia pastoris</i>	16
二、培養基及製備方法	16
三、質體建構	21
1. pGAPZA-EGFP 表現質體	21
2. pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 表現質體	21
四、 <i>Pichia pastoris</i> 轉形	28
1. 質體製備	28
2. <i>Pichia pastoris</i> 勝任細胞製備	28
3. <i>Pichia pastoris</i> 電轉	28
4. 轉形株篩選	29
五、sgRNA 設計並以 U6 啟動子轉錄 sgRNA	30
六、EGFP 拷貝數確認	32
七、Cas9 蛋白質表現	33
1. 誘導表現	33
2. 破菌	33
3. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)	33
4. 免疫染色	37
八、螢光偵測	38
1. 流式細胞儀	38
2. 螢光顯微鏡	38
第三章、結果	39
一、U6 啟動子序列獲得	39
二、 <i>Pichia pastoris</i> 轉形株篩選與確認	42
三、U6 啟動子轉錄功能確認	45
四、EGFP 拷貝數確認	48
五、Cas9 蛋白質表現	49
六、螢光偵測	55
1. 流式細胞儀	55
2. 螢光顯微鏡	55



第四章、討論.....	61
一、以 GAP 啟動子啟動單一拷貝數 EGFP 作為標的之優劣.....	61
二、sgRNA 之使用.....	62
三、U6 啟動子之序列長度.....	63
四、CRISPR 系統之植入.....	64
五、5-FOA plate 之實驗結果.....	65
六、sgRNA、Cas9 蛋白質之表現量.....	66
七、 <i>Pichia pastoris</i> CRISPR 系統之未來發展.....	67
第五章、結論.....	69
第六章、參考文獻.....	70



圖目錄

圖一、本篇論文架構	15
圖二、pGAPZA-EGFP 表現質體	25
圖三、pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 表現質體	26
圖四、U6 啟動子、sgRNA、U6 基因下游基因片段及 overlap PCR 跑膠結果 ..	40
圖五、U6 啟動子基因序列確認	41
圖六、PCR 確認目標基因插入轉形株	43
圖七、PCR 確認轉形珠 sgRNA 表現	46
圖八、轉形珠誘導 3 天 6% SDS-PAGE CBR 染色結果	50
圖九、轉形珠誘導 3 天 6% SDS-PAGE Western blotting 染色結果	52
圖十、G3CU 轉形珠誘導 3 天 Cas9 蛋白質進核偵測	54
圖十一、轉形珠誘導 3 天、繼代培養 2 天後流式細胞儀偵測結果	57
圖十二、轉形珠誘導 3 天、繼代培養 2 天後螢光顯微鏡偵測結果	58
圖十三、轉形珠誘導 3 天、繼代培養 2 天後共軛焦螢光顯微鏡偵測結果	60

表目錄



表一、培養基組成	17
表二、培養基製備方法	19
表三、PCR 所用之引子對.....	23
表四、本研究使用之 nucleus locating signal 序列	24
表五、本研究使用之 sgRNA	31
表六、聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 相關藥品及成分	35

附圖目錄

附圖一、CRISPR 於原核生物中的機制	76
附圖二、將 crRNA 與 tracrRNA 結合成 sgRNA.....	78



第一章、前言



一、基因編輯 (Genome editing)

1. 簡介

基因編輯近來迅速發展，其主要原因有三：

- (1) 可截切特定位點：如同早已廣泛運用的限制酶，基因編輯的工具可截切特定序列的位點。
- (2) 可應用在任何生物：基因編輯工具幾乎沒有物種的限制，經過研究、調整最適化皆可在任何物種上使用基因編輯工具。
- (3) 可編輯任何位點：和限制酶截切不同的是，基因編輯的位置可以自行決定，即可在任意基因序列的位置編輯。

由於基因編輯既方便又好用，自發展以來已經廣泛運用在不同領域。

2. 常見技術

基因編輯的工具主要有三個：

- (1) Zinc finger nuclease (ZFN) 為基因編輯技術中最早發展者，概念來自廣泛存在於生物體中會與 DNA 結合之蛋白質 Zinc finger protein (ZFP)。1996 年，研究人員首次將 *FokI* 截切蛋白質與 ZFP 結合^[1]，形成可在特定序列造成 DNA 雙股斷裂的基因編輯工具，此複合物即為 ZFN。ZFN 辨認序列的專一性主要來自 ZFP，一個 ZFP 可以專一性辨認到 3 個 DNA 鹼基序列。而 ZFP 種類繁多，不同的 ZFP 會對應到不同的 DNA 序列。正因如此，須仰賴大量 ZFP 資料庫來增加可編輯的基因序列及精確性，並非僅將 ZFP 依序組




裝即可使用，甚至 ZFP 數量只能在 4 個以下才能有最大效果，是 ZFN 在設計上的缺點^[2]。

- (2) Transcription activator-like effector (TALE) 最早於致病菌 *Xanthomonas oryzae* 發現，這種類似轉錄因子的蛋白質會植入宿主並影響其基因轉錄^[3]。2009 年，TALE 與 DNA 結合的機制被發現^[4]，並利用與 ZFN 相同的概念發展出 Transcription activator-like effector nuclease (TALEN)。TALE 利用小單元蛋白質的串連來辨認一段 DNA 序列，這些小單元每個各自辨識一個鹼基，而小單元間差異只要在第 12 及 13 個胺基酸序列不同，便可辨識不同的核酸序列。小單元最長可以串連 20 至 30 個，設計上較為彈性，專一性也較 ZFN 大幅提昇^[5]。
- (3) Clustered regularly Interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) 是三者中最晚開始發展，詳細機制於下一段落中敘述，但由於其專一性辨認 DNA 序列是藉由 RNA 序列，相較於 ZFN 和 TALEN 設計更簡單、序列辨識複雜性更低、所需的金錢、時間及人力相對都較少，使得 CRISPR 自 2013 開始發展以來，已成為現在基因編輯主流工具。

3. 應用

DNA 形成雙股斷裂後，生物細胞會有兩種主要的修補機制，同源重組 (Homologous recombination, HR) 及非同源末端結合 (Non-homologous end joining, NHEJ)^[6]。HR 修補機制乃參照模版 DNA，在 DNA 受損處合成互補的鹼基序列；NHEJ 則是在 DNA 受損後會隨機的進行黏合、插入、刪除鹼基的修補，因此 NHEJ 較易造成隨機的基因突變^[7]。



應用這兩個修補機制於目標基因上，即為基因編輯。以 NHEJ 方法修補可能造成點突變、位移突變進而導致基因失去功能；若使用 HR 方式修補（此時通常要再給予一段互補基因序列），則可精確產生修補、突變、置換或插入的功能；也可以一次針對基因的 5' 及 3' 進行截切，讓整段基因被切掉，達到真正的基因刪除^[7]。

研究人員可以利用基因編輯快速方便的針對物種特定基因進行修改，除了可以加速科學研究發展，日常生活已有以基因編輯技術改良的作物上市^[8]，基因編輯技術也可與醫療發展結合，成為原先緩慢發展的細胞療法、個人療法的加速器^[5]。隨著基因編輯迅速的發展，日後在醫療、健康、農業及日常生活的應用將不可限量。



二、 Clustered regularly Interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR- associated protein 9 (Cas9)

1. CRISPR 簡史

CRISPR 最早在細菌、古細菌研究中發現，被認為是細菌用來對抗病毒（噬菌體）基因入侵之後天免疫系統，示意圖如附圖一^[9]。當病毒基因入侵，存活的細菌會將病毒片段截切並插入自己基因中的 CRISPR locus，這串 CRISPR locus 含有許多先天或後天獲得的病毒基因片段，並轉錄出具有不同病毒片段的 CRISPR RNA (crRNA)。當病毒再次入侵，相應的 crRNA 便會專一性的引導 Cas9 蛋白質截切病毒基因，讓病毒無法發揮感染力，達成免疫效果。CRISPR 在不同細菌中有不同的系統^[10]，現今最常應用的是 *Streptococcus pyogenes* 中的 type II CRISPR^[10]，也是本篇論文探討的系統。

2. CRISPR 組成

若將病毒基因想像成欲截切的目標序列，則只須表現專一性辨認序列的 RNA 即可達成截切目標序列的功能。CRISPR 系統要發揮基因編輯的功能，需要截切蛋白質 Cas9 及引導用的 RNA，這些 RNA 除了前述提到的 crRNA 專一性辨認序列，還需要 trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) 幫助 Cas9 蛋白質的結合固定。研究人員將兩條 RNA 結合在一起，稱為 single guide RNA (sgRNA)，使得 CRISPR 系統產生作用只需要關注 Cas9 蛋白質以及 sgRNA 兩個部分，設計上更為簡便^[11]，示意如附圖二。



3. CRISPR 機制

以 *Streptococcus pyogenes* type II CRISPR 為例，sgRNA 與 Cas9 會形成複合物，稱為 ribonucleoprotein (RNP)，並由 sgRNA 將 Cas9 帶到欲截切基因之特定位點，專一性辨認的序列後三個鹼基序列必須是 NGG，這個序列被稱為 protospacer adjacent motif (PAM)，是雙股螺旋最先被打開的位置。序列互補性越高，與目標序列結合能力越強，完全互補時即於 PAM 往 5' 端三個鹼基處發生截切，造成基因序列雙股斷裂^[12]。

4. CRISPR 應用與發展

研究人員曾在 *Clostridium pasteurianum* 這株含有 type I CRISPR 系統 (不同 type 之間其專一性辨識之 RNA 及截切相關蛋白質的構成、機制不同) 的細菌中成功植入 type II CRISPR 系統並用來編輯內生性基因，這說明不僅可以利用細菌原生的 CRISPR 系統進行編輯，也可以另外植入 CRISPR 系統，供研究人員依需求進行操作^[13]；古細菌是另一體內原生存有 CRISPR 系統之生物種類，然而研究較少，直到 2016 年累始有較完整的 CRISPR 編輯工具及相關應用例子報導^[14]；靈芝為經濟價值高之真菌物種，於靈芝中發展 CRISPR 系統可以免於以往農桿菌轉形法外來基因殘留的問題^[15]；於植物中使用 CRISPR 系統編輯基因，生產抗蟲、耐旱作物是研究人員能加速作物改良的契機，目前 DuPont、Monsanto 等基改作物公司皆在進行相關研究^[16]；至於哺乳類動物，自從 2013 年張峰博士團隊首次於哺乳類動物細胞成功使用 CRISPR 系統進行基因編輯^[58]，CRISPR 系統於哺乳類動物細胞的應用如雨後春筍的產生，Dr. Rudolf Jaenisch 於 2016 年甚至說過一句 “Any idiot can do it” 來形容有 CRISPR 系統後得到基因突變小鼠的容易程度 (<http://www.sciencemag.org/news/2016/11/any->



idiot-can-do-it-genome-editor-crispr-could-put-mutant-mice-everyones-reach)。種種成功的例子於不同物種中不斷出現，甚至有充滿爭議於人類三倍體胚胎使用 CRISPR 系統成功編輯的文獻被發表^[17]，說明了 CRISPR 基因編輯技術確實迅速發展。

CRISPR 不僅為方便好用的基因編輯工具，研究人員更持續發展 CRISPR 其他應用：若將 Cas9 蛋白質進行修改，使其功能從原本造成雙股斷裂改成只能在其中一股形成斷裂，成為 Nickase，則需要 2 組 Nickase 與 sgRNA 的辨識才能截切一段基因，除了增加專一性，更降低 off-target 的可能性^[18]；若是將 Cas9 的截切功能完全突變，使其喪失截切功能，稱為 dCas9^[19]，與 sgRNA 形成 RNP 後會專一性結合於 DNA 上，此複合物可干擾目標基因的轉錄，使基因表現量降低，此降低基因表現的方法稱為 CRISPRi，不僅為一可逆的操作，更有研究說明比 RNA 干擾系統有更加的準確性，對於不存在 RNA 干擾系統的生物如 *Pichia pastoris*，CRISPRi 的出現更有利於往後研究發展；若在 dCas9 後面接上抑制子或是促進子，則可以進一步抑制、促進基因的表現，研究人員曾在同一系統的 dCas9 蛋白質後接上 KRAB 抑制子或 VP16 促進子，便可成功抑制或促進基因的表達，此系統除了有利於單一基因的研究，更能同時調控多個基因乃至一整套生化反應途徑，甚至讓設計合成生物學的迴圈更加方便可行^[20]；若在 dCas9 後面接上甲基酶 DNA methyltransferase enzymes (DNMT)，則成為長久以來甲基化研究缺乏的可以針對特定基因進行甲基化的酵素，在哺乳類動物細胞已有成功進行甲基化相關應用的例子^[21]；若在基因編輯時送入螢光基因表達序列，則可以當做基因探針使用，更方便地進行蛋白質在細胞內位置的研究^[22]，近來更有以 CRISPR 系統編輯 T 細胞進行癌症療法的人體試驗發表 (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02793856>)。本篇論文取用 *Streptococcus*

pyogenes 中的 type II CRISPR 系統，其實不同細菌更有不同 CRISPR 系統，各自有不同的使用規則及專一性^[10]，CRISPR 技術的發展可以預期將愈趨多元。



5. CRISPR 之挑戰

儘管 CRISPR 方便又好用，其最令人質疑的就是 off-target 的可能性，只需要約 20 個鹼基的互補就可以達成專一性^[23]，那麼也有可能截切到其他並非研究人員預期的位置？事實上 off-target 確實會發生，但有許多的研究人員致力於改善 off-target 的問題^[24-26]。另外基因編輯更有短時間無法解決的倫理道德問題^[27]，使得 CRISPR 的發展仍有其阻礙。



三、*Pichia pastoris*

1. 微生物蛋白質表現系統

以微生物、細胞來表現蛋白質於研究、食品及醫療用途^[28]，是基因工程技術逐漸成熟後普遍的應用。將異源基因放入不同生物中，生產所需異源蛋白質，如此以微小生物單位來生產蛋白質具有快速、大量生產、成本低等優點，又因為使用的物種不同而有不同的特性，在此列舉常見三項：

(1) 以 *Escherichia coli* 表現蛋白質

E. coli 是最早應用的蛋白質表現系統^[29]，生長週期短、操作成本低且相關研究最多為其優點，然而 *E. coli* 為原核生物，在蛋白質轉譯後修飾上與真核生物多所不同，例如蛋白質醮基化無法在野生株 *E. coli* 進行，且以細菌生產蛋白質，欲應用在其他生物時，內毒素的生成與其後遺症，是普遍的疑慮^[30]。

(2) 以哺乳類動物細胞表現蛋白質 (以 Chinese Hamster Ovary (CHO) cell 為例)

以 CHO cell 表現蛋白質，其轉譯後修飾與人類最接近，因此可以期待其表現出的蛋白質功能於人體中與預期中最接近^[31]。然而其培養時間長、培養成本高是其缺點。

(3) 以酵母菌表現蛋白質

酵母菌綜合了以上兩者的優點，其培養時間短且培養成本低，又因其為真核生物，可進行之轉譯後修飾較接近哺乳類動物乃至人類，也因為酵母菌普遍具有可食用的歷史，及被認為是 Generally regarded as safe (GRAS)，應用範圍廣，是研究人員喜歡使用的蛋白質表現系統^[28]，也是本篇論文的介紹重點。



2. *Pichia pastoris*

P. pastoris 為最廣泛應用於蛋白質生產的酵母菌之一，屬於嗜甲醇酵母菌。*P. pastoris* 特化的代謝系統使其可以利用甲醇為碳源，在沒有其他如葡萄糖、甘油等碳源時，仍能繁殖、生長^[32]。其中 Alcohol oxidase (AOX) 是甲醇代謝第一步的酵素，分為 AOX1 及 AOX2，其中又以 AOX1 為主，表現量約為 AOX2 的十倍^[33]。當甲醇為唯一碳源時，AOX1 表現量甚至可佔胞內 mRNA 的 5%^[33]。*P. pastoris* 接上訊息胜肽後可以向胞外分泌蛋白質^[34]，得到相對純的蛋白質產物，相較於另一常用酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae*，*P. pastoris* 有較適當的糖基化^[35]，使 *P. pastoris* 蛋白質表現平台廣為人所用。

3. 啟動子選擇

使用 *P. pastoris* 生產異源蛋白質時，選擇適當的啟動子是成功達到目的的第一步^[28]。在此介紹論文中應用的兩種常見啟動子，AOX1 啟動子以及 GAP 啟動子，更多啟動子特性將於下一段落敘述。

- (1) AOX1 啟動子：由上述可知 AOX1 蛋白質為以甲醇為碳源時表現量相當高的酵素。其啟動子應用於其他蛋白質表達時，也能產生大量目標蛋白質。又在轉形株建立時，有高拷貝數之策略^[36]，使蛋白質表現量可以更進一步提升。AOX1 啟動子的另一個特性是當 *P. pastoris* 以其他養分來源作為碳源（例如甘油）時，AOX1 蛋白質的表現量會大幅減少^[33]，意即 AOX1 啟動子幾乎不啟動下游基因表現，甚至在以葡萄糖為碳源時，AOX1 啟動子會抑制下游基因表現。此一特性讓 AOX1 啟動子成為一嚴謹由甲醇調控的啟動子^[33]。
- (2) GAP 啟動子：GAP 啟動子啟動糖解作用中重要酵素 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAP) 基因表現^[37]，相較於 AOX1 啟動子由甲醇的

添加與否調控基因表現，GAP 啟動子會持續啟動下游基因表現，在不同碳源
的環境表現量差異不大^[38]，為持續型啟動子。



AOX1 啟動子及 GAP 啟動子為使用 *P. pastoris* 生產異源蛋白質時最常使用的兩個啟動子，依據不同情形會有不同選擇，表現量則是眾說紛紜。*P. pastoris* 更有許多不同的啟動子選擇，讓研究人員可以依需求做調整^[28]。

P. pastoris 作為表現平台有許多優點，然而起步較晚，相關研究仍在持續進行中，許多機制仍不甚明朗，另外，*P. pastoris* 本身缺乏 RNA 干擾機制來方便地降低目標基因表現^[39]，是相對之下較不便之處。



四、RNA 聚合酶與啟動子


基因係構成生物體最重要的元件，也是物種間獨特性及差異性的由來，由 DNA 轉錄成 RNA，再由 RNA 轉譯成蛋白質，是基因表達的中心法則 (central dogma)。啟動子為控制基因轉錄的元素，其真面目是位於目標基因 DNA 序列上游，調控下游基因轉錄的 DNA 序列。依照研究或應用需求選擇不同特性的啟動子，使目標基因如預期中的轉錄、表現，便是現代基因工程最常應用的模式。這些啟動子通常是藉由不同的轉錄因子調控，讓特定的 RNA 聚合酶與其結合並於適當時機將基因轉錄。真核生物的 RNA 聚合酶主要分成三類，分別是 RNA 聚合酶 I, RNA 聚合酶 II 及 RNA 聚合酶 III [40, 41]，另外植物還特有 RNA 聚合酶 IV 及 RNA 聚合酶 V [42, 43]，其中又以 RNA 聚合酶 II 及 RNA 聚合酶 III 為近來最常應用者，相應的，其啟動子序列也有不同的特性。

1. RNA 聚合酶 II

RNA 聚合酶 II 轉錄出來之 mRNA 會進一步轉譯成蛋白質。調控 RNA 聚合酶 II 之轉錄因子種類繁多，一個 RNA 聚合酶 II 之啟動通常也由多個轉錄因子共同調控。轉錄的最後，RNA 聚合酶 II 通常會轉錄出數百個核酸序列形成二級結構後終止轉錄，這些二級結構序列在後續的轉譯階段並不會被轉譯出來，而是單純作為終止子^[28]。此類 RNA 聚合酶 II 辨識之啟動子像是於 *P. pastoris* 中常用的 AOX1 啟動子及 GAP 啟動子皆為此類。

2. RNA 聚合酶 III

RNA 聚合酶 III 的功能是用於轉錄 small RNA 如 tRNA，其轉錄因子較 RNA 聚合酶 II 少。由 RNA 聚合酶 III 轉錄之 RNA 通常為 functional RNA，



並不會進一步轉譯成蛋白質。不像 RNA 聚合酶 II 在轉錄的最後仍有一小段終止子。RNA 聚合酶 III 轉錄之 RNA 會盡量簡短以避免有多餘的序列影響到 RNA 之構型進而影響功能^[44]，如常見之 U6 啟動子即為 RNA 聚合酶 III 辨識之啟動子，只需 5 至 7 個 Thymidine (T) 鹼基序列即可終止轉錄^[45]。

3. U6 啟動子

真核生物經由 RNA 聚合酶 II 轉錄出的 RNA，稱為 pre-mRNA，通常並非全部序列都會用於轉譯蛋白質，仍須經過剪接：將不需要的片段剪除，並將剩下的片段黏合成完整的 mRNA，而 U6 便是此過程中重要的基因之一^[46]。U6 基因於物種間的序列保守性極高，研究顯示酵母菌、豆類、蠕蟲乃至哺乳類動物細胞間 U6 基因具高度相似性^[47]。

U6 基因轉錄後即為具功能之 RNA，屬於 RNA 聚合酶 III 轉錄的基因之一。近來 functional RNA 之研究日益興盛，最常見之兩種使用 RNA 聚合酶 III 的啟動子為 U6 啟動子及 tRNA 啟動子。研究顯示 U6 啟動子啟動基因表現的強度較 tRNA 啟動子更高，用來表達 RNA 時更能以量來克服其易被分解的特性，因此更具應用潛力^[45]。近來最廣為人知的應用在於 clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9) 中普遍皆使用 U6 啟動子來表現 single guide RNA (sgRNA)^[45]。然而，目前只有少數物種之 U6 啟動子序列發表，又 RNA 聚合酶 III 辨識之啟動子較 RNA 聚合酶 II 辨識之啟動子更難以以相似序列預測^[48,49]，使得 U6 啟動子於不同物種間的廣泛運用仍有阻礙。



四、研究動機與目的

P. pastoris 表現平台乃黃慶瓏教授實驗室建立許久之蛋白質表達系統，前人除了嘗試蛋白質表現，更對表現之機制、不同表現策略及表現後偵測方式多所研究，在實驗室建立了穩固的表達平台。

近年來 CRISPR 技術蓬勃發展，欲將此技術引進到實驗室中。於 2016 年，其他研究單位已有於 *P. pastoris* 成功表達具功能之 CRISPR 系統案例^[50]，文章中利用 RNA 聚合酶 II 表現 sgRNA 並在 sgRNA 5' 及 3' 分別加上 hammerhead (HH) 及 hepatitis delta virus (HDV) ribozyme 序列，此二序列在形成二級結構後會自行截切。文章透過此方法有效建立 CRISPR 系統，然而 ribozyme 在設計上需顧及序列、二級結構，新穎卻過於複雜，不如一般 CRISPR 系統常用 U6 啟動子啟動 sgRNA 表現方便。

然而在搜尋之下，*P. pastoris* 之 U6 啟動子並沒有已發表的序列，所搜尋到最相近者為另一隻常用酵母菌，*Saccharomyces cerevisiae* 之 U6 啟動子序列^[44]，若欲應用 *P. pastoris* 之 U6 啟動子，需以此為參考並鈎取出 *P. pastoris* 內生性之 U6 啟動子。

本篇論文想要從 *P. pastoris* 基因中得到 U6 啟動子之序列，在確認功能後應用在 CRISPR 系統的建立。未來若有 functional RNA 相關之研究需要，將會是可以應用的啟動子，同時也期待 CRISPR 系統更多相關的應用。

五、本篇論文具體目標

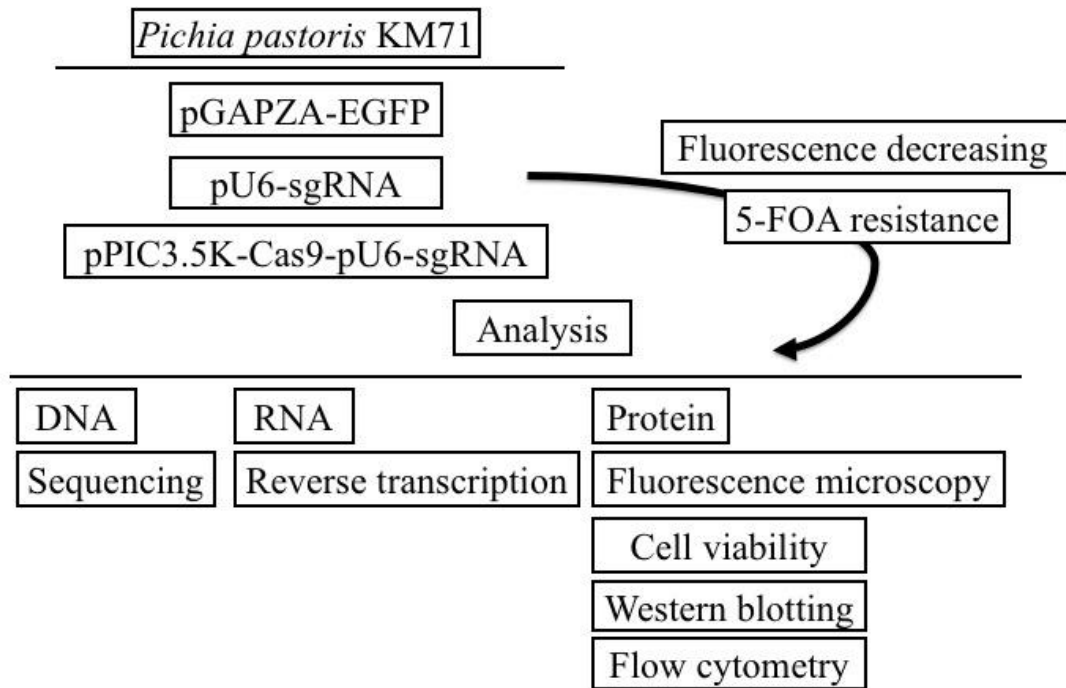
1. 取得有功能之 *P. pastoris* U6 啟動子
2. 將 *P. pastoris* 之 U6 啟動子用以表現 CRISPR 系統的 sgRNA
3. 以偵測目標基因的突變證實 CRISPR 系統之建立



六、本篇論文架構



Framework



圖一、本篇論文架構

Figure 1. Framework of the thesis

第二章、材料與方法



一、菌株及培養條件

1. *Escherichia coli*

Escherichia coli EPI300 (*E. coli*, Epicentre)，用於質體建構、保存。以 Luria-Bertani (LB) 培養基於 37°C 培養。

2. *Pichia pastoris*

Pichia pastoris KM71 (*P. pastoris*, Invitrogen)，為主要實驗菌株，用於鈎取 U6 啟動子、表現異源基因 (EGFP, sgRNA and Cas9) 及測試 CRISPR 系統可行性。以 YPD 培養基於 30°C 培養。


二、培養基及製備方法

本研究所使用之培養基及其成分與用途整理於表一，另製備方法於表二。

表一、培養基組成

Table 1. Composition of medium

名稱	成分	用途
<i>Escherichia coli</i>		
LB	1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl	培養 <i>E. coli</i>
LB w/ Ampicillin	1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 100 µg/mL Ampicillin	培養具 Ampicillin 抗性之 <i>E. coli</i>
LB w/ Kanamycin	1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, 50 µg/mL Kanamycin	培養具 Kanamycin 抗性之 <i>E. coli</i>
LSLB w/ Zeocin	1% casein digested peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl, 33 µg/mL Zeocin	培養具 Zeocin 抗 性之 <i>E. coli</i>
<i>Pichia pastoris</i>		
YPD	2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose	培養 <i>P. pastoris</i>
YPDZ	2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 100 µg/mL Zeocin	培養具 Zeocin 抗 性之 <i>P. pastoris</i>
YPDSZ	2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 1 M sorbitol, 1.5% agar, 100 µg/mL Zeocin	篩選電轉轉形株
YPDG	2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 250 µg/mL G418	培養具 G418 抗 性之 <i>P. pastoris</i>
YPDZG	2% peptone, 1% yeast extract, 2% dextrose, 100 µg/mL Zeocin, 250 µg/mL G418	培養具 Zeocin, G418 抗性之 <i>P. pastoris</i>
MD	0.34% yeast nitrogen base, 1% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 4*10 ⁻⁵ % biotin, 2% dextrose, 1.5% agar	篩選 histidine 營 養缺陷回補之 <i>P. pastoris</i>
MDH	0.34% yeast nitrogen base, 1% (NH ₄) ₂ SO ₄ , 4*10 ⁻⁵ % biotin, 2%	篩選 histidine 營 養缺陷回補之 <i>P. pastoris</i>



	dextrose, $4 \times 10^{-4}\%$ histidine, 1.5% agar	
mBMGY	1% yeast extract, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1% glycerol, 100mM potassium phosphate pH6.0, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin	培養轉形株
mBMMY	1% yeast extract, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 100mM potassium phosphate pH6.0, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 1% methanol	誘導轉形株表現蛋白質
5-FOA	0.34% yeast nitrogen base, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $4 \times 10^{-5}\%$ biotin, 2% dextrose, 750 mg/L 5-FOA, 50 mg/L uracil, 1.5% agar	培養 ura3 基因突變之轉形株

表二、培養基製備方法



Table 2. Preparation of medium

名稱	製備方法
<i>Escherichia coli</i>	
LB	加入適量藥品於一次水中，滅菌後使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
LB w/ Ampicillin	加入適量藥品於一次水中，滅菌後加入 Ampicillin 使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
LB w/ Kanamycin	加入適量藥品於一次水中，滅菌後加入 Kanamycin 使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
LSLB w/ Zeocin	加入適量藥品於一次水中，滅菌後加入 Zeocin 使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
<i>Pichia pastoris</i>	
YPD	加入適量藥品於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後混和使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
YPDZ	加入適量藥品於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後加入 Zeocin 混和使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
YPDSZ	加入適量藥品於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後加入 Zeocin 混和使用
YPDG	加入適量藥品於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後加入 G418 混和使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
YPDZG	加入適量藥品於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後加入 Zeocin, G418 混和使用。若配置成 plate 則加入 1.5% agar 於水中滅菌
MD	加入 1.5% agar 於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後與經 0.22 μm 過濾膜過濾之 yeast nitrogen base, (NH ₄) ₂ SO ₄ , biotin 混和使用
MDH	加入 1.5% agar 於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後與經 0.22 μm 過濾膜過濾之

	yeast nitrogen base, (NH ₄) ₂ SO ₄ , biotin, histidine 混和使用
mBMGY	分別配置 yeast extract, (NH ₄) ₂ SO ₄ , glycerol, potassium phosphate pH6.0 於一次水中，滅菌後與經 0.22 μm 過濾膜過濾之 4*10 ⁻⁵ % biotin 混和使用
mBMMY	分別配置 yeast extract, (NH ₄) ₂ SO ₄ , potassium phosphate pH6.0 於一次水中，滅菌後與經 0.22 μm 過濾膜過濾之 4*10 ⁻⁵ % biotin 混和使用，並依實驗需求添加 methanol
5-FOA	加入 1.5% agar 於一次水中，另配置 10 倍濃度 dextrose 溶液，滅菌後與經 0.22 μm 過濾膜過濾之 yeast nitrogen base, (NH ₄) ₂ SO ₄ , biotin, 5-FOA (融於 DMSO), uracil 混和使用



三、質體建構

1. pGAPZA-EGFP 表現質體

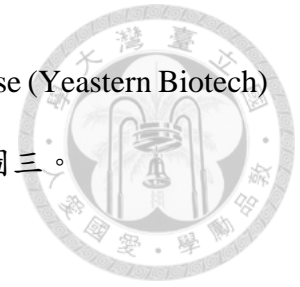
以引子對 EGFP-F 及 EGFP-R (表三) 進行 polymerase chain reaction (PCR)，從實驗室前人留下之質體放大 EGFP 片段，並加上 *EcoRI* 及 *ApaI* 切位。以 *EcoRI* 及 *ApaI* (NEB) 限制酶截切 PCR 片段及 pGAPZA (Invitrogen) 表現載體後，將兩者以 T4 ligase (Yeastern Biotech) 接合。完成建構之 pGAPZA-EGFP 如圖二。

2. pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 表現質體

(1) 以引子對 Cas9-F 及 Cas9-R (表三) 進行 PCR，從購自中研院 RNAi Core (<http://rna.genmed.sinica.edu.tw/searchDatabase>) 之 C6-8-67 質體放大 Cas9 片段，在 N 端及 C 端參考前人研究^[51] 接上 nucleus locating signal (NLS, 表四) 並加上 *BamHI* 及 *EcoRI* 切位，以 *BamHI* 及 *EcoRI* (NEB) 限制酶截切 PCR 片段及 pPIC3.5K (Invitrogen) 表現載體後，將兩者以 T4 ligase (Yeastern Biotech) 接合。

(2) 參考 RNA central 公布之 *P. pastoris* (<http://rnacentral.org/rna/URS000069005A/4922>) U6 基因序列，及酵母菌 U6 啟動子特性^[44]。以引子對 U-F 及 U-R (表三) 進行 PCR，從 *P. pastoris* KM71 genomic DNA 放大 U6 基因上游片段；以引子對 D-F 及 D-R (表三) 進行 PCR，從 *P. pastoris* KM71 genomic DNA 放大 U6 基因下游片段；以引子對 S-F 及 S-R (表三) 進行 PCR，從購自中研院 RNAi Core 之 C6-8-67 質體放大 scaffold 片段，PCR 產物即 sgRNA。將三片段以 overlap PCR 連接，並在兩端加上 *XbaI* 及 *StuI* 切位，以 *XbaI* 及 *StuI* (NEB) 限制酶截切 PCR 片段

及上述步驟 (1) 建構完成之表現質體後，將兩者以 T4 ligase (Yeastern Biotech) 接合。完成建構之 pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 如圖三。



表三、PCR 所用之引子對



Table 3. Primer pairs used in PCR

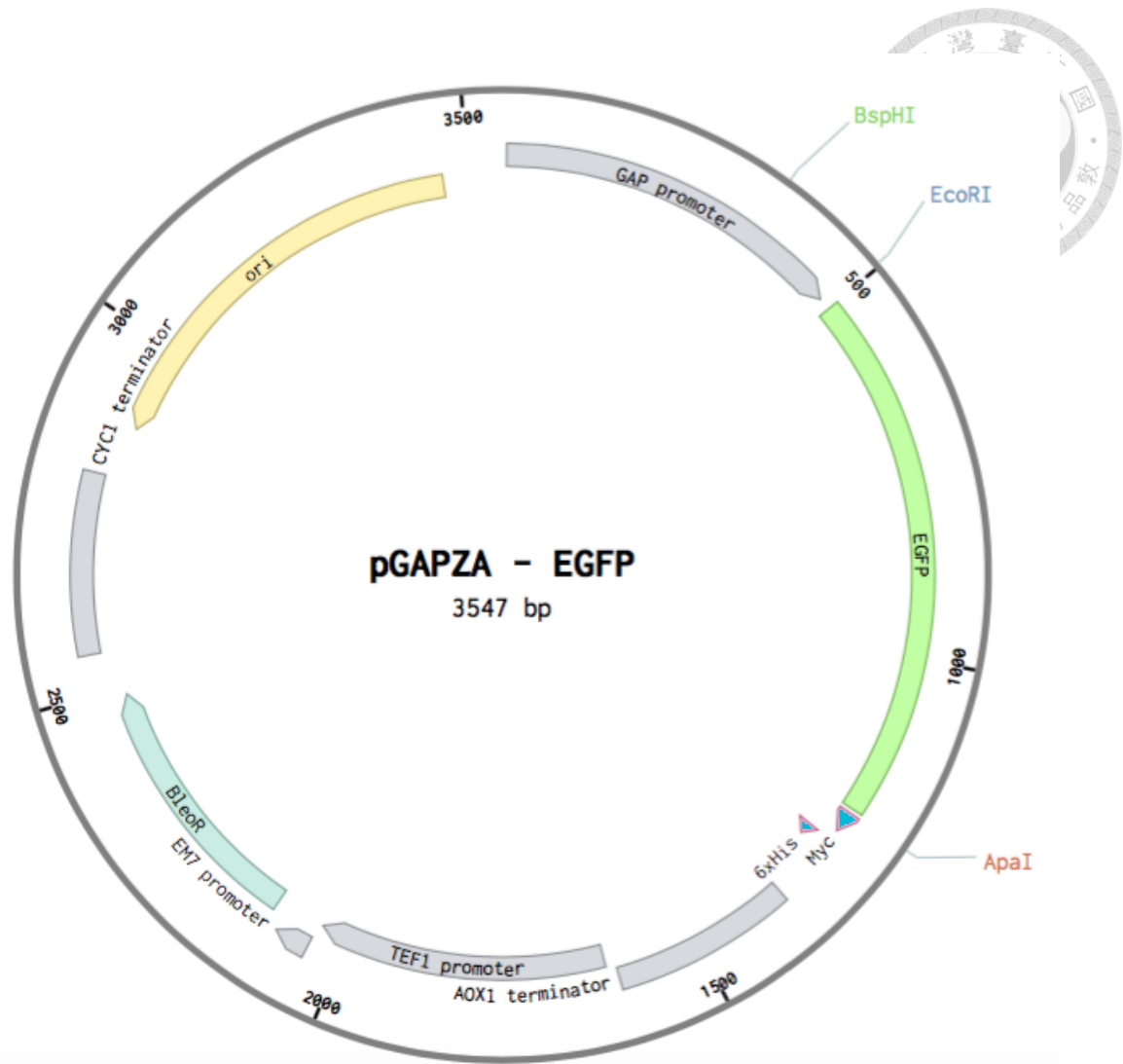
名稱	序列 (5' to 3')
EGFP-F	GAATTCATGGTGAGCAAGGGCGA
EGFP-R	GGGCCCTTACTTGTACAGCTCGT
Cas9-F	TACAATGGATCCATGAAGATTCCAATTAAGGACAAGAAGTAC AGCATCGGCCTGGACATC
Cas9-R	AACTAAGAATTCTTAAACTTTTCTTTTCTTCTTTGGGTCGCCTC CCAGCTGAGACAGGTCGAT
U-F	ATCATTCTAGAAACATGCTCATATGAGTCGTTTGTA
U-R	*sgRNA TTGAGCTTTTCGAGAAAGTTG
S-F	*sgRNA GTTAAAGAGCTAT
S-R	AAGAAAAATAAACTGCAAAAAAAGCACCGACTCG
D-F	CGAGTCGGTGCTTTTTTTGTCAGTTTATTTTTCTT
D-R	AACTAAAGGCCTAGAAAAGGAGCAATGGACCCA
Gene specific primer	GATCACGACTGGTTCTGCATCGCTAAAAAAGCACCGACTCGGT GCCAC
METqF	CGTTCTCGCAACTCTTTCGAA
METqR	CAATGGCATCAGTTATGACGGAAG
GAPqF	GCCGTCGCTGGCAATAATAG
GAPqR	AAACCAAAATTGGGAAAGGTGTT
5' AOX	GACTGGTTCCAATTGACAAGC
HIS	CATCTAGATGCTCACCGCAATGCTG
CasF	TACAATGGATCCATGAAGATTCCAATTAAGGACAAGAAGTAC AGCATCGGCCTGGACATC
ScaR	AAGAAAAATAAACTGCAAAAAAAGCACCGACTCG

*sgRNA 設計將於後續介紹

表四、本研究使用之 nucleus locating signal 序列

Table 4. Sequence of nucleus locating signal used in this study

名稱	C-SV40 large T antigen	N-Mat α 2
胺基酸序列 (N 端至 C 端)	PKKKRKV	KIPIK
DNA 序列 (5' 至 3')	CCAAAGAAGAAAA GAAAAGTT	AAGATTCCAATTAAG

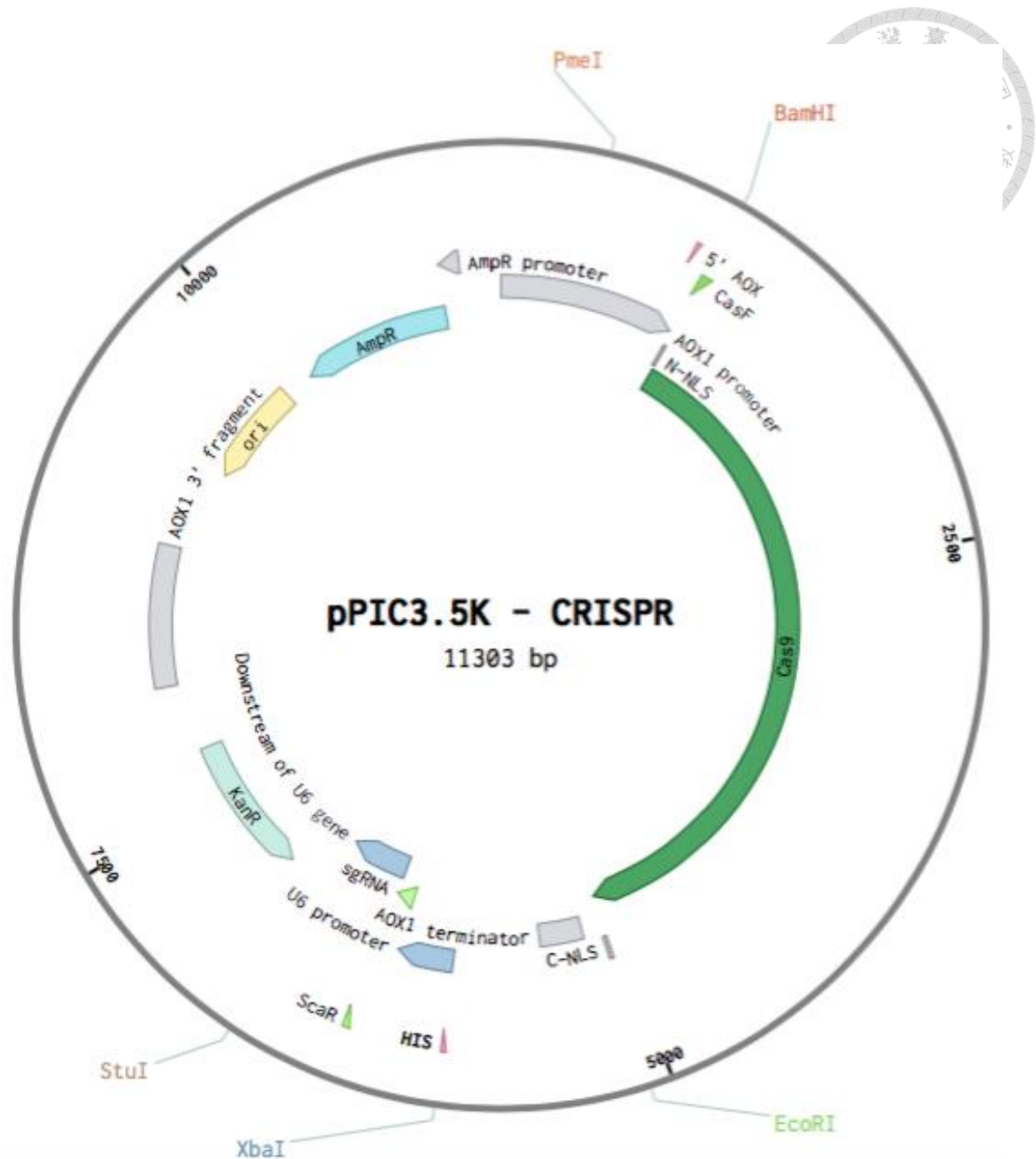


圖二、pGAPZA-EGFP 表現質體

BleoR：Zeocin 抗性基因、Ori：複製起始點。

Figure 2. pGAPZA-EGFP expression plasmid

BleoR: anti-Zeocin gene, Ori: origin of replication.



圖三、pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 表現質體

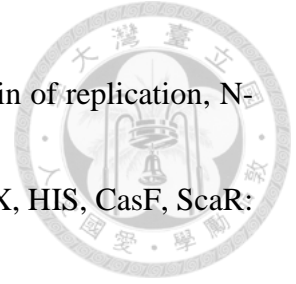
AmpR：Ampicillin 抗性基因、KanR：Kanamycin 抗性基因、Ori：複製起始點、
 N-NLS：Cas9 蛋白質 N 端之 NLS、C-NLS：Cas9 蛋白質 C 端之 NLS、5'
 AOX、HIS、CasF、ScaR：PCR 確認基因插入之引子位置。

Figure 3. pPIC3.5K-Cas9-U6 promoter-sgRNA expression plasmid

AmpR: anti-Ampicillin gene, KanR: anti-kanamycin gene, Ori: origin of replication, N-

NLS: NLS at the N' of Cas9, C-NLS: NLS at the C' of Cas9, 5' AOX, HIS, CasF, ScaR:

primers for PCR confirmation of gene insertion.





四、*Pichia pastoris* 轉形

1. 質體製備

將建構完成之質體透過轉形放入 *E. coli* EPI300 中保存。欲使用時以含抗生素之 LB 培養基培養含所需質體之 *E. coli* 於 37°C、250 rpm 培養 20 個小時，以 HiYield Plasmid Kit (ARROWTEC) 抽取質體。若以 GAP 啟動子為插入目標則以 *Bsp*HI (NEB) 截切後備用；若以 AOX1 啟動子為插入目標則以 *Pme*I (NEB) 截切後備用。

2. *Pichia pastoris* 勝任細胞製備

將 *P. pastoris* 單一菌落接入含 3 mL YPD 培養基之試管，於 30°C、250 rpm 培養 20 小時。將菌液接入含 100 mL YPD 培養基之 500 mL 錐型瓶使 OD₆₀₀ 為 0.15，於 30°C、250 rpm 培養 6 小時使 OD₆₀₀ 達到 1 到 2 之間。於 4°C 以 3000 g 離心 5 分鐘後倒去上清液，加入 50 mL 前處理緩衝液 (10 mM Tris-HCl 使用前加入 pH 7.5, 10 mM DTT 保存於 -20°C 使用前加入, 100 mM CH₃COOLi·2H₂O, 600 mM sorbitol, 現配後置於 4°C 備用) 回溶後於 30°C 靜置 30 分鐘。此後步驟於冰上或 4°C 進行。以 1500 g 離心 10 分鐘後，以 2 mL 1M sorbitol 洗菌 3 次，最後以 100 μL 1M sorbitol 回溶菌體，分裝 80 μL/1.5 mL eppendorf 後置於冰上備用。

3. *Pichia pastoris* 電轉

將置備好之質體 10 μL 與勝任細胞混和後移入 2 mm 電極管，置於冰上 5 分鐘，以 1.5 kV、25 μF、200 Ω 條件電擊後，加入 1 mL 1M sorbitol 於 30°C 靜置 1 小時，以 L 型玻棒將 250 μL 菌液均勻塗抹於 YPDSZ plate 上。



4. 轉形株篩選

約培養 2 到 3 天後菌落長出。

- (1) 將菌落以牙籤挑起，於 10 μ L QE buffer (Epicenter) 中攪拌 5 秒，將此菌液經 65°C、30 分鐘；95°C、15 分鐘破菌後，取 2 μ L 作為 colony PCR 之模板確認基因插入。
- (2) 將菌落接入含 3 mL YPD 培養基之試管，培養 24 小時後抽取 genomic DNA 進行 PCR 分析。
- (3) 若轉形株具 Zeocin、G418 雙重抗性，則將長滿菌之 YPDSZ plate 以 2 mL ddH₂O 將菌洗下，稀釋後塗抹 10⁴ 菌於 YPDZG plate 重新篩選。



五、sgRNA 設計並以 U6 啟動子轉錄 sgRNA

至網站 CHOPCHOP (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu>) 輸入 EGFP、Ura3 基因序列，並選擇物種為 *Pichia pastoris* 來設計 sgRNA，另外也直接以已發表之設計規則 (U6 啟動子由 G 開始轉錄、sgRNA 需為 17-20 個鹼基長度、目標序列後需有 NGG 之 PAM 序列) 以人工方式設計 sgRNA E-3 (表五)，兩基因各選擇 2 條 sgRNA 後到 NCBI 網站 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) 對 *Pichia pastoris* (taxid:4922) 全基因做比對，再次確認不會有 off-target 的疑慮後，將 sgRNA 序列設計於引子合成，並以 U6 啟動子表現 sgRNA。本研究所用到之 sgRNA 列於表五。以 NautiaZ Blood/Bacteria RNA mini kit (NAUTIAGENE) 抽取轉形株 RNA，針對 sgRNA 設計 gene specific primer (表三) 並以 ARROW-Script Reverse Transcriptase III (ARROWTEC) 進行反轉錄。另設計引子以反轉錄 cDNA 產物為模版進行 PCR，以 100V, 33 分鐘 2% agarose 膠體電泳分析，確認預期 sgRNA 轉錄的有無。本研究後續所呈現之轉形株 G3CU 皆為使用 E-3 sgRNA 者。

關於 sgRNA 的設計目前已有許多免費網站可以使用，於論文進行期間曾試用過但未採用其結果的網站還有：張峰團隊所建立的網站 (<http://crispr.mit.edu>)、<https://benchling.com/careers>、<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/breakingcas/>，各個網站之使用及資料庫略有不同，依喜好及適用性選擇即可，在此提出供讀者參考。

表五、本研究使用之 sgRNA

Table 5. sgRNA used in this study

名稱	序列
E-1	GCTGAAGCACTGCACGCCGT
E-2	GAAGGGCATCGACTTCAAGG
E-3	GTGACCACCCTGACCTA
U-1	GTCAAGCATCAATATCAAGG
U-2	GTCATGGTGTTCATTGGTAG

E：目標為 EGFP 序列、U：目標為 Ura3 序列。

E: targets on EGFP sequence, U: targets on Ura3 sequence.



六、EGFP 拷貝數確認

選定單一拷貝數內生性基因 MET2 為參考基因，以及本篇實驗用來表現異源蛋白質 EGFP 之 GAP 啟動子為目標基因，以 Primer Express v 3.0.1 針對 MET2 及 GAP 啟動子基因設計引子 METqF、METqR、GAPqF 及 GAPqR (表三)。以 NautiaZ Bacteria/Fungi DNA Extraction Mini Kit (NUATIAGENE) 抽取野生株及轉形株 genomic DNA，系列稀釋後作為模板，針對目標基因以 IQ2 SYBR Green Fast qPCR system (Bio-Genesis) 進行 real-time PCR，PCR 反應配方為：5 μ L genomic DNA、順反引子各 1 μ L (4 μ M)、10 μ L IQ2 SYBR Green Fast qPCR system、補水至 20 μ L，PCR 擴增條件為：95°C 3 分鐘後進行 40 循環的 95°C 5 秒接 65°C 30 秒，將野生株的拷貝數對得到的 Ct 值做圖，即為兩基因之標準曲線。將轉形株 Ct 值介於 15 至 25 之間者代入標準曲線，即可得到轉形株拷貝數。將目標基因 (GAP 啟動子) 除以參考基因 (MET2) 即可得到兩基因相對拷貝數，此相對值再減一，經重複後即得目標基因於轉形株中的拷貝數^[57]。



七、Cas9 蛋白質表現

1. 誘導表現

將轉形株接到含 3 mL YPD 培養基之試管，以 30°C、250 rpm 培養 24 小時後，將菌液接到含 100 mL mBMGY 培養基之 500 mL 錐形瓶，此時 OD₆₀₀ 為 0.15，以 30°C、250 rpm 培養 24 小時後，以 3000 g 離心 5 分鐘收集菌體，並以 20 mL mBMMY 回溶菌體後，倒回 250 mL 錐形瓶，此時開始加入 1% 甲醇，並視誘導天數需要每 24 小時添加一次 1% 甲醇。

2. 破菌

以 3000 g 離心 5 分鐘收集菌液後，以破菌緩衝液 (50 mM NaH₂PO₄ pH7.4, 1 mM PMSF, 1mM EDTA, 5% glycerol) 清洗一次菌體後以等體積破菌緩衝液回溶菌體，以液態氮於研钵中研磨菌體，磨成粉狀後置於管中，待溶後加入 PMSF，於 4°C 以 12000 g 離心 15 分鐘，上層溶液即為破菌後所得蛋白質。

3. 聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE)

以水仔細清洗鑄膠所需玻璃配件，並以 70% 酒精擦拭後待乾。將樣本與 4 倍蛋白質樣本緩衝液混勻於 99°C 煮 10 分鐘後置於 4°C 備用。將玻璃配件架設好後配置下層 6% SDS 聚丙烯醯胺分離膠體鑄入玻璃配件中並以 100% 異丙醇壓平液面，待凝固後配置 5% SDS 聚丙烯醯胺焦集膠體並鑄入玻璃配件至滿、插入尺梳，待凝固後使用。將膠片架設於直立式電泳槽 (Mini-PROTEAN 3-cell, BIO-RAD)，於膠片間加入 Tris-glycine SDS 跑膠緩衝液至滿，並於槽中也加入 Tris-glycine SDS 跑膠緩衝液至底部電線高度。將蛋白質樣本注入尺梳槽內後，先以 70 V 跑



膠使樣本聚集成一直線，之後轉換成 120V 跑至蛋白質樣本緩衝液染劑跑出膠片後停止，並以 CBR 染色法或西方墨點法分析膠片。

(1) Coomassie Brilliant R- 250 (CBR) 染色法：

將膠片浸入 CBR 染色液 30 分鐘，之後再將膠片浸入 CBR 脫色液 30 分鐘，置換脫色液後放置隔夜，於白光燈版上拍照。

(2) 西方墨點法 (Western blotting)：

將膠片浸泡於轉印緩衝液中 5 分鐘，另外浸泡 0.45 μm PVDF 轉印膜 (PerkinElmer) 於 100% 甲醇 10 分鐘，於轉印緩衝液中由正極到負極依序放置海綿、濾紙、PVDF 轉印膜、膠片、濾紙、海綿，並以轉印夾片固定之。將設置好之夾片放入濕式轉印槽 (BIO-RAD) 中並加入轉印緩衝液至海綿高度，放置一攪拌子，於槽內放置一冰盒，於槽外放置冰塊以防止過熱，於電磁攪拌器上於室溫以 400 mA 轉印 2 小時。將轉印完成之 PVDF 膜浸泡於 gelatin-NET 室溫震盪 1 小時，以 PBST 緩衝液清洗三次後浸泡於以 gelatin-NET 稀釋 20000 倍之 anti-CRISPR-Cas9 antibody [EPR18991] ab189380 (abcam) 室溫震盪作用 1 小時，以 PBST 緩衝液清洗三次後浸泡於以 gelatin-NET 稀釋 100000 倍之 goat anti-rabbit IgG Horseradish peroxidase (HRP) conjugate 室溫震盪作用 1 小時，以 PBST 緩衝液清洗三次後加入受質 Western Lighting ECL (PerkinElmer)，並以照膠裝置 (BioSpectrum 810 imaging system, UVP) 偵測、拍照。

SDS-PAGE 相關藥品及成分列於表六。

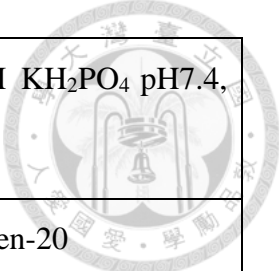
。

表六、聚丙烯醯胺膠體電泳 (SDS-PAGE) 相關藥品及成分



Table 6. Composition of reagents related to SDS-PAGE assay

藥品	成分
SDS-PAGE 膠體電泳	
4 倍蛋白質樣本緩衝液	200 mM Tris-HCl pH6.8, 8% SDS, 0.4% bromophenol blue, 20% glycerol, 400 mM 2-Mercaptoethanol
下層 6% SDS 聚丙烯醯胺分離膠體	375 mM Tris-HCl pH8.8, 6% acrylamide, 0.1% SDS, 0.1% APS, 8×10^{-4} % TEMED, 53% ddH ₂ O
5% SDS 聚丙烯醯胺焦集膠體	125 mM Tris-HCl pH6.8, 5% acrylamide, 0.1% SDS, 0.1% APS, 1×10^{-3} % TEMED, 70% ddH ₂ O
Tris-glycine SDS 跑膠緩衝液	25 mM Tris-Base pH8.3, 250 mM glycine, 0.01% SDS
CBR 染色法	
CBR 染色液	0.5 g coomassie Brilliant R- 250, 50% methanol, 9% acetic acid, 41% dH ₂ O
CBR 脫色液	10% acetic acid, 20% methanol, 70% dH ₂ O
Western blotting	
轉印緩衝液	25 mM Tris-Base pH8.3, 192 Mm glycine, 10% methanol
Gelatin-NET (1L)	6.05 g Tris pH8.0, 2.5 g gelatin, 0.5 mL Tween-20, 8.75 g NaCl



PBS 緩衝液	4.3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1.47 mM KH ₂ PO ₄ pH7.4, 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl
PBST 緩衝液	PBS 緩衝液加入 0.2% Tween-20



4. 免疫染色

將 poly-lysine 佈滿蓋波片作用 20 分鐘後吸去、風乾，將誘導 Cas9 表現 3 天後之菌液佈滿波片 10 分鐘，吸去菌液，此後步驟於 6 孔盤進行。以 PBS 緩衝液清洗兩次，加入甲醛作用 10 分鐘後以 PBS 緩衝液清洗三次，加入含 lyticase 之 sorbitol 緩衝液於 30 °C 作用 30 分鐘後以 PBST 緩衝液清洗三次，gelatin-NET 作用 1 小時後以 PBST 緩衝液清洗三次，以以 gelatin-NET 稀釋 2000 倍之 anti-CRISPR-Cas9 antibody [EPR18991] ab189380 (abcam) 作用 1 小時後以 PBST 緩衝液清洗三次，以以 gelatin-NET 稀釋 2000 倍之 anti-rabbit Alexa Fluor 594 conjugated antibody A21207 (ThermoFisher) 作用 1 小時後以 PBST 緩衝液清洗三次，以 DAPI 染劑 (5 µg/mL in PBS 緩衝液) 作用 15 分鐘後以 PBS 緩衝液清洗三次，製作玻片前於在玻片滴上 10 µL PBS 緩衝液，蓋上製作好之蓋玻片後以指甲油封片，並以共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5, Leica) 觀察、照相。



八、螢光偵測

1. 流式細胞儀

將誘導 Cas9 表現 3 天後之菌液再接到含 3 mL YPD 培養基試管中，此時 OD₆₀₀ 為 0.15，培養 2 天後菌液離心收集菌體，以 PBS 緩衝液回溶菌體，並將菌液稀釋至 OD₆₀₀ 為 0.04 (*P. pastoris* 菌體濃度約為 2×10^6)。以流式細胞儀 (BD FACSCanto II, BD) 分別偵測野生株及轉形株綠色螢光強度，以螢光強度為 X 軸，菌數為 Y 軸做圖，即可得到菌株螢光強度的分佈情形。

2. 螢光顯微鏡

將菌液接到含 3 mL YPD 培養基試管中，此時 OD₆₀₀ 為 0.15，培養 2 天後菌液離心收集菌體，以 PBS 緩衝液回溶菌體，並將菌液稀釋至 OD₆₀₀ 讀值為 1。將 10 μ L 菌液滴在載玻片上，蓋上蓋玻片後以螢光顯微鏡 (Eclipse E600, Nikon) 觀察並以照相機 (Olympus C-7070, Olympus) 拍照，或以共軛焦顯微鏡 (Leica TCS SP5, Leica) 觀察、照相。

第三章、結果



一、U6 啟動子序列獲得

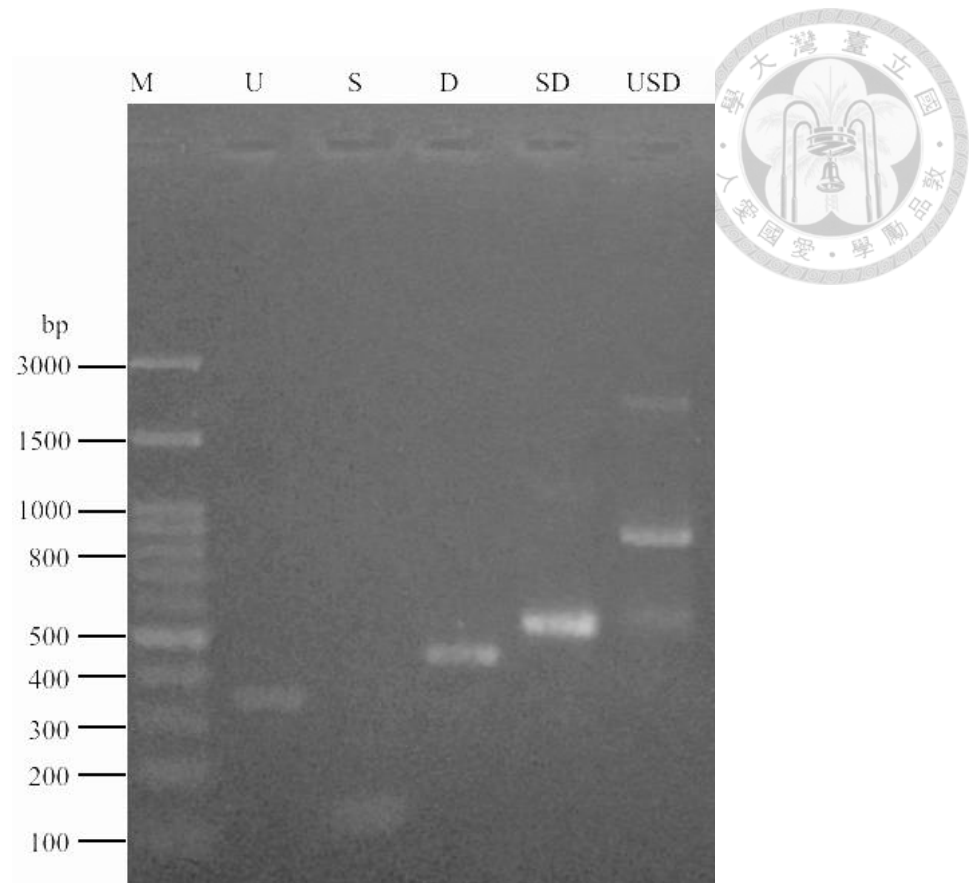
參考 RNA central 公布之 *P. pastoris* U6 spliceosomal RNA 序列 (<http://rnacentral.org/rna/URS000069005A/4922>)，比對到 NCBI 上 *P. pastoris* 全基因序列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012963) 的位置後，往 U6 基因 5' 端延伸 300 個 DNA 鹼基對 (base pair, bp) 序列作為 U6 啟動子，往 U6 基因 3' 端延伸 400 個 DNA 轉錄重要序列，兩者中間以針對目標基因設計的 sgRNA 隔開。即：

5'

```
aacatgctcatatgagtcgtttgtaacttcttaggctagagatagattattctcaaacatctgtagattaatcgaaggggttgta  
cttatcagtggtacattgatgtggtgtcagattttatgcaaccaaccaagaagaactcttgattctgggaataagttactttgag  
aagatttggtagcggcctactaacggcaacaaaactagccgttcatttggaatgaattgatgttcccgccecaaaaaatag  
tcccaatcagtatatatacaactttctcgaaaagctcaagtaccaccctgacctagtttaagagctatgctggaacagcatag  
caagtttaataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgctttttgcagttttttttttcacagtact  
gaataaccgtcaactacacagagacgtatcgttggccacctcgtttcttcaacagtgataattcagtacttgtgtcctttcttg  
ctgggcagtatcaggttcgaggcttgtgtgtaacaaattcaattgttcattcttagtatcttacttacttacttcaaaaccag  
atTTTTattcagtactacgattaaactgaacccaaaaggctaaattggtactgaaagtgtcgattccgacagtatcctctgctttcg  
atagcgtactaaaatacggctctccaagtcttcttaaatcatctataatcaaatatcatggccatcatcacattccagcacgatcct  
gggtccattgctccttttct
```

3'

序列中紅色部分為 U6 啟動子、黑色部分為 sgRNA、藍色部分為下游 DNA 轉錄重要序列。以 overlap PCR 將三段 PCR 片段依序接合 (圖四) 後進行定序 (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>, 圖五)，確認序列後將於後續證明其功能。

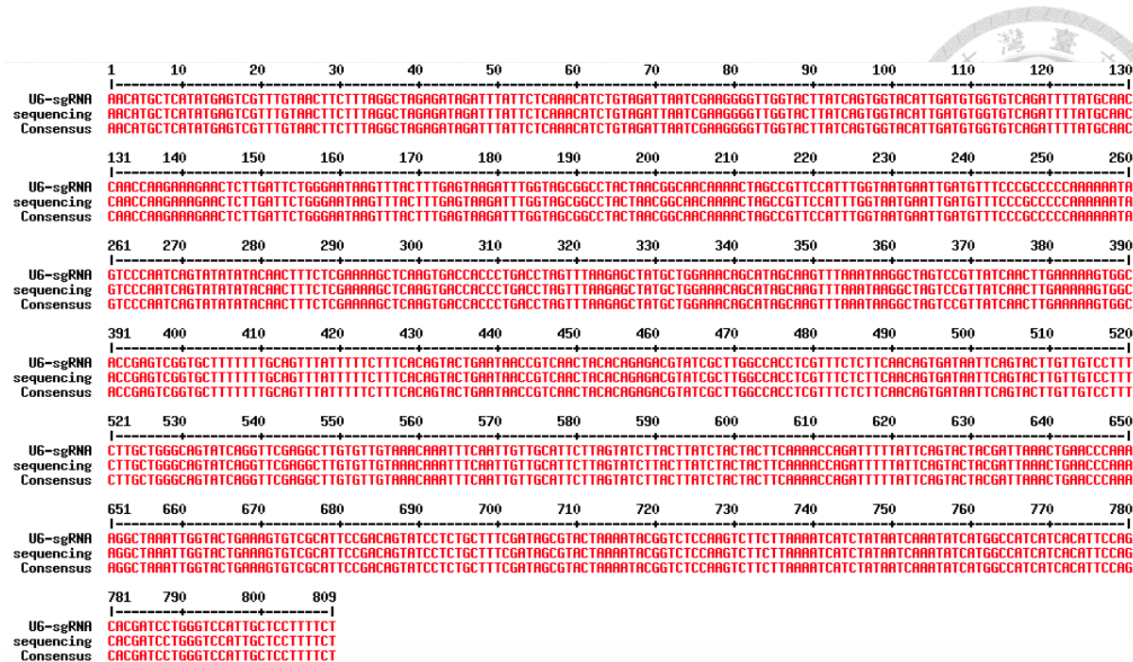


圖四、U6 啟動子、sgRNA、U6 基因下游基因片段及 overlap PCR 跑膠結果

M : 100 bp ladder marker、U : U6 啟動子 (300 bp)、S : sgRNA (109 bp)、D : U6 基因下游基因片段 (400 bp)。

Figure 4. Gel electrophoresis results of U6 promoter, sgRNA and downstream of U6 gene overlap PCR

M: 100 bp ladder marker, U: U6 promoter (300 bp), S: sgRNA (109 bp), D: downstream of U6 gene (400 bp).



圖五、U6 啟動子基因序列確認

U6-sgRNA：預期建構之質體上以 U6 啟動子啟動 sgRNA 轉錄序列、

sequencing：定序結果。

Figure 5. Confirmation of the sequence of isolated U6 promoter

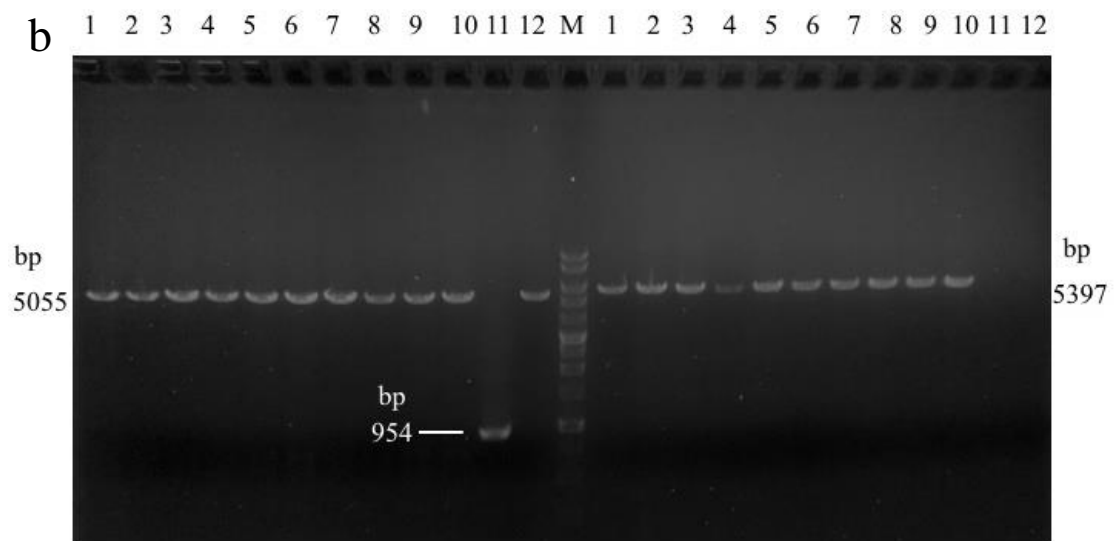
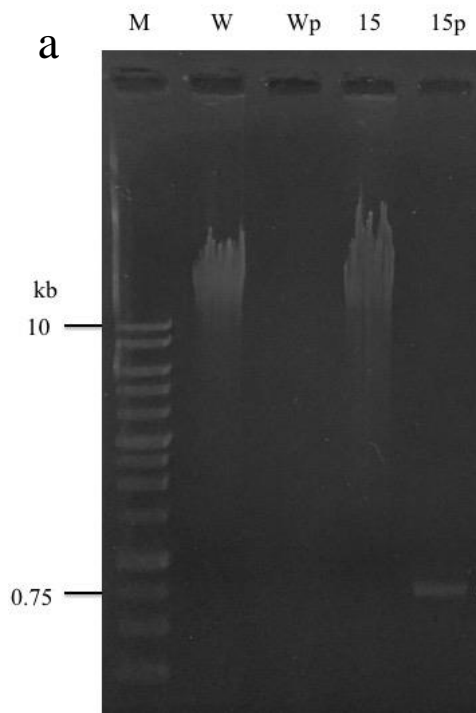
U6-sgRNA: expected sequence on plasmid that using U6 promoter to drive sgRNA

transcription, sequencing: result of sequencing.



二、*Pichia pastoris* 轉形株篩選與確認

以適當抗性培養基篩選轉形株後，抽取 genomic DNA 並進行 PCR，進一步確認目標基因插入轉形株 (圖六)，於此確認的轉型株有：送入 pGAPZA-EGFP 質體之轉形株，用以表現螢光基因，由圖六-a 可見於野生株無法放大之 EGFP 大小片段，可在轉形株中看見，定序後確認其為 EGFP 基因；送入 pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株，含有完整 CRISPR 系統；送入 pPIC3.5K 質體之轉型株，作為空質體控制組；送入 pPIC3.5K-Cas9 質體之轉形株，作為只會表現 Cas9 蛋白質之控制組。參考圖三，以引子對正向：5' AOX、反向：HIS 確認 Cas9 蛋白質表現基因序列之插入，結果顯示於膠圖左半邊，若有 Cas9 基因插入，則會出現 5055 bp 大小片段，若無則出現空質體上 954 bp 片段；以引子對正向：CasF、反向：ScaR 進一步確認以 U6 啟動子表現 sgRNA 之相關基因的插入，結果顯示於膠圖右半邊，若有 U6 啟動子啟動 sgRNA 轉錄相關基因插入則會出現 5397 bp 大小片段，若無則無法進行 PCR，由圖六可見三轉形株基因狀況皆如預期。



圖六、PCR 確認目標基因插入轉形株

a. 確認 genomic DNA 之抽取、確認 EGFP (720 bp) 基因插入轉形株

M : 1 kb ladder marker、W : 野生株 genomic DNA 抽取、Wp : 以野生株

genomic DNA 為模版對 EGFP 做 PCR、15 : 送入 pGAPZA-EGFP 質體之轉形

株 genomic DNA 抽取、15p：以轉形株 genomic DNA 為模版對 EGFP 做 PCR。



b. 確認 Cas9、sgRNA 轉錄基因插入轉形株，此圖皆為 PCR 結果

M：1 kb ladder marker、1-10：送入 pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株、11：送入 pPIC3.5K 質體之轉形株、12：送入 pPIC3.5K-Cas9 質體之轉形株。

Figure 6. Confirmation of genes insertion by PCR

a. Confirmation of genomic DNA extraction and EGFP (720 bp) insertion.

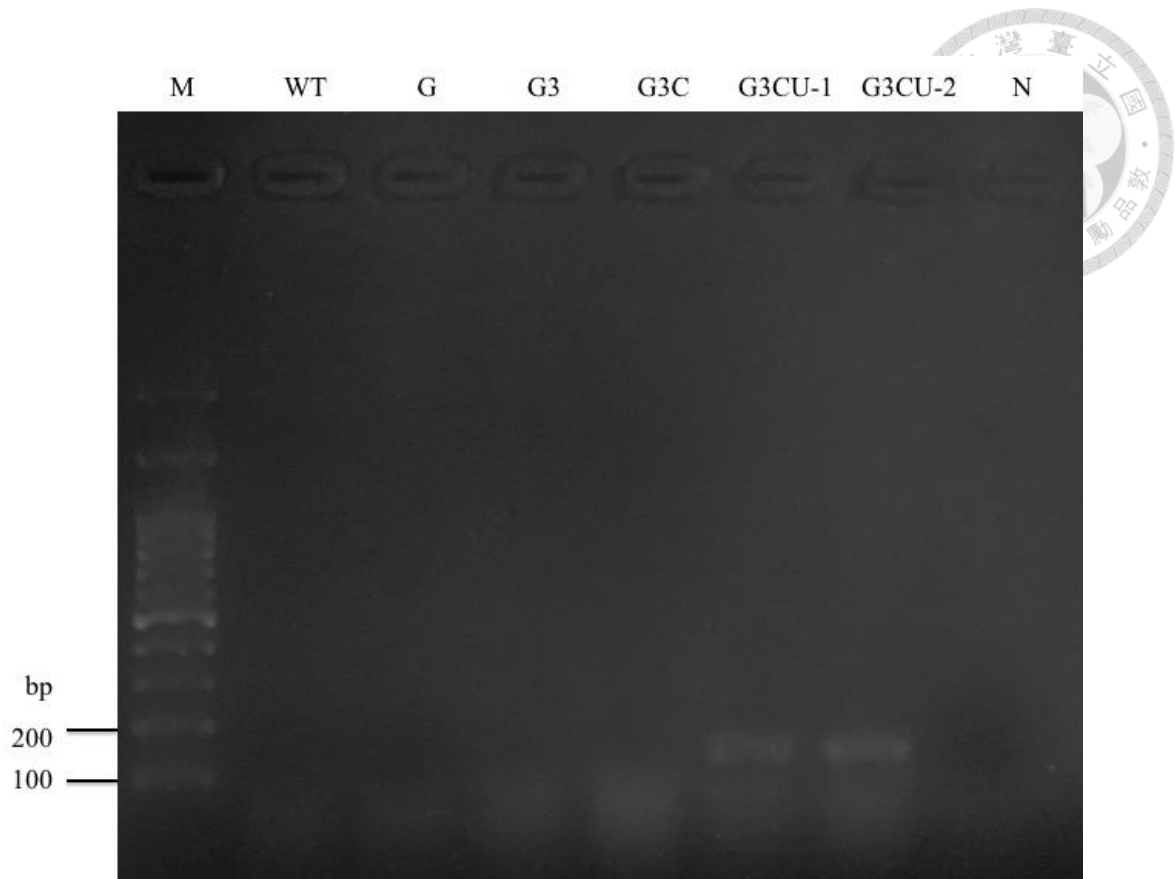
M: 1 kb ladder marker, W: wild type genomic DNA extraction, Wp: wild type genomic DNA PCR for EGFP, 15: transformant with pGAPZA-EGFP insertion genomic DNA extraction, 15p : transformant genomic DNA PCR for EGFP

b. Confirmation of Cas9 and transcription of sgRNA gene insertion. Figure was the results of PCR on agarose

M: 1 kb ladder marker, 1-10: transformants of pPIC3.5K-Cas9-U6 promoter-sgRNA plasmid insertion, 11: transformant of pPIC3.5K plasmid insertion, 12 : transformant of pPIC3.5K-Cas9 plasmid insertion.

三、U6 啟動子轉錄功能確認

抽取轉形株 RNA，利用 gene specific primer 進行反轉錄後，以反轉錄之 cDNA 產物為模版，針對 sgRNA 進行 PCR，進行膠體電泳分析後，可以看到只有含 sgRNA 轉錄基因（以 U6 啟動子啟動 sgRNA 轉錄）之轉形株可以看到 100 bp（實際大小為 109 bp）處有明顯條帶（圖七），在此分別取兩單一菌落之 G3CU 轉形珠進行確認，證實 U6 啟動子確實具有轉錄功能，且可以用來轉錄出 sgRNA。



圖七、PCR 確認轉形株 sgRNA 表現

M：100 bp ladder marker、WT：野生株、G：送入 pGAPZA-EGFP 質體之轉形株、G3：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K 質體之轉形株、G3C：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-Cas9 質體之轉形株、G3CU-1, 2：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株、N：以水作為負控制組。

Figure 7. confirmation of sgRNA expression

M: 100 bp ladder marker, WT: Wild type, G: Transformant of pGAPZA-EGFP plasmid insertion, G3: Transformant of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K plasmids insertion, G3C: Transformant of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-Cas9 plasmids insertion, G3CU-1,2:

Transformants of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-Cas9-U6 promoter-sgRNA plasmids

insertion, N: water as template of PCR for negative control.





四、EGFP 拷貝數確認

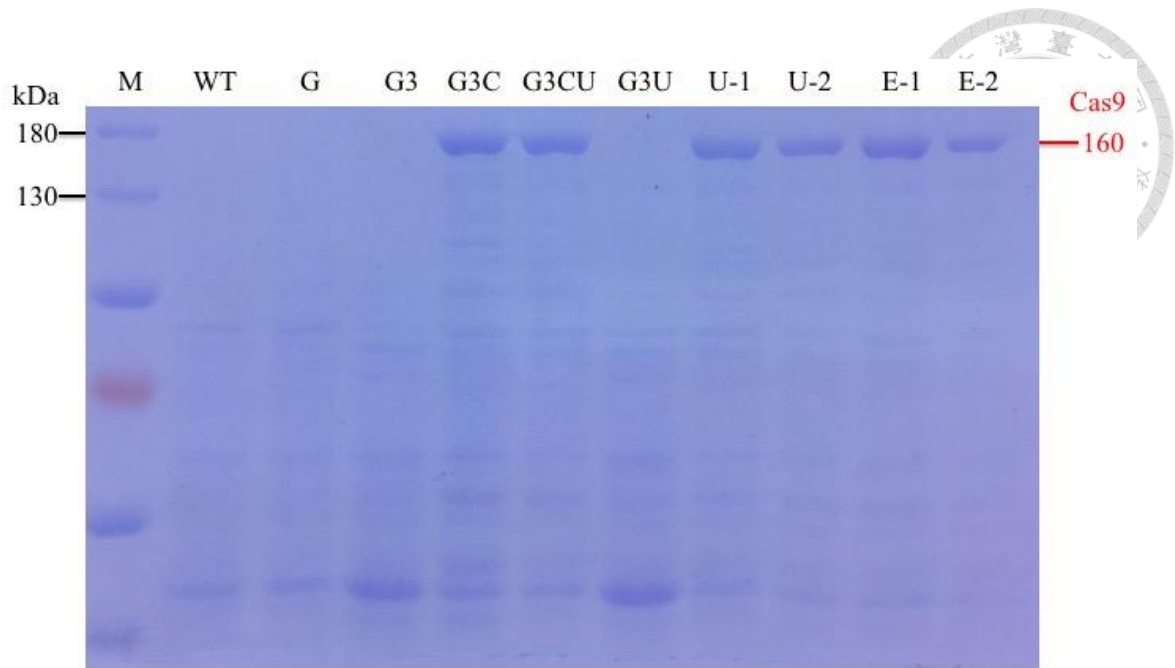
P. pastoris 野生株中，MET2 及 GAP 啟動子基因的拷貝數皆為 1。在此以 MET2 為參考基因，比較用來表現異源蛋白質，插入後會額外增加拷貝數之 GAP 啟動子，計算得到轉型株中的拷貝數。以材料與方法章節中方法作出拷貝數對 Ct 值圖後。將適當 Ct 值代入標準曲線並計算拷貝數，每次實驗進行二重複，共進行三次，於每次實驗進行前以膠體電泳確認 genomic DNA 的抽取（圖六）。得到 GAP 啟動子基因之拷貝數平均約比 MET2 基因多 0.66 ± 0.12 份，由於菌體生長狀況無法完全均質化，又每次培養會有些微差異，參考材料與方法中此方法計算方式來源，取此值之最接近整數為 1。即僅有一份以 GAP 啟動子啟動 EGFP 之基因插入轉型株 genomic DNA 中。此結果方便後續欲進行螢光測試及定序分析的判讀。



五、Cas9 蛋白質表現

將以 1% 甲醇誘導 3 天後之轉形株破菌，進行 6% SDS-PAGE (以 12 μ L 樣品跑膠)，比對 marker，若為表現 Cas9 蛋白質之轉形株 (G3C、G3CU、U-1、U-2、E-1、E-2)，則會於 130 kDa 及 180 kDa 間有明顯條帶 (圖八)，且符合 Cas9 蛋白質預期大小 160 kDa，反之沒有表現 Cas9 蛋白質基因之野生株及轉形株 (G、G3、G3U)，則不會有此條帶。進一步以 anti-CRISPR-Cas9 antibody [EPR18991] ab189380 (abcam) 進行 Western blotting (以 10 μ L 樣品跑膠)，同樣於 160 kDa 大小處有明顯條帶，確認此條帶確實為 Cas9 蛋白質 (圖九)。

另外，利用免疫染色法辨識誘導 Cas9 蛋白質表現 3 天後之 G3CU 轉形株細胞內 Cas9 蛋白質並將之染成紅色螢光，同時利用 DAPI 將細胞核染成藍色螢光，以共軛焦螢光顯微鏡觀察。染色結果 DAPI 會將整顆細胞染成藍色但核處明顯最亮，而紅色則遍佈整個細胞或集中在核處，說明 Cas9 表現量高且會進入核中 (圖十)。



圖八、轉形株誘導 3 天 6% SDS-PAGE CBR 染色結果

M : Protein ladder #26616 (Thermo Scientific)、WT : 野生株、G : 送入 pGAPZA-EGFP 質體之轉形株、G3 : 送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K 質體之轉形株、G3C : 送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-Cas9 質體之轉形株、G3CU : 送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株、G3U : 送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株、U-1、U-2、E-1、E-2 : 同 G3CU，僅 sgRNA 不同 (表五)。

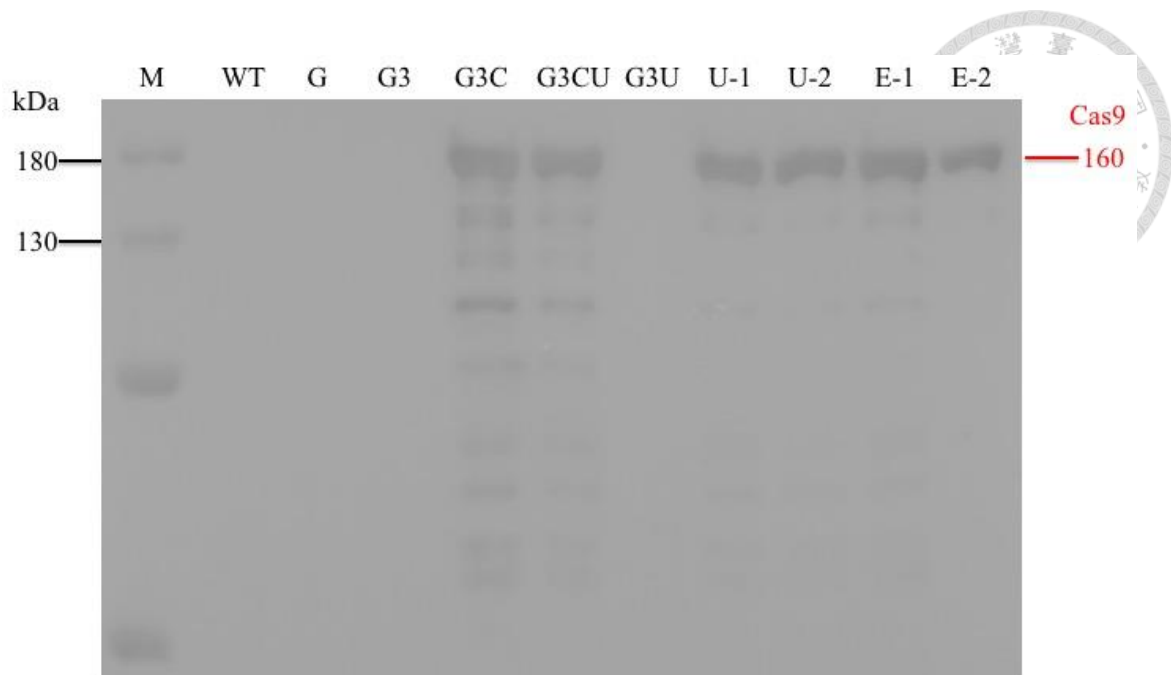
Figure 8. Transformants after 3 days induction on 6% SDS-PAGE after CBR staining

M: Protein ladder #26616 (Thermo Scientific), WT: Wild type, G: Transformant of pGAPZA-EGFP plasmid insertion, G3: Transformant of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K plasmids insertion, G3C: Transformant of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-Cas9 plasmids insertion, G3CU: Transformants of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-Cas9-U6 promoter-sgRNA plasmids insertion, G3U: Transformants of pGAPZA-EGFP and

pPIC3.5K-U6 promoter-sgRNA plasmids insertion, U-1, U-2, E-1, E-2: Same as G3CU,

but different sgRNA (Table 5).





圖九、轉形珠誘導 3 天 6% SDS-PAGE Western blotting 染色結果

以抗體 ab189380 (abcam) 專一性辨認 Cas9 蛋白質結果。M：Protein ladder

#26616 (Thermo Scientific)、WT：野生株、G：送入 pGAPZA-EGFP 質體之轉形株、G3：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K 質體之轉形株、G3C：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-Cas9 質體之轉形株、G3CU：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-Cas9-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株、G3U：送入 pGAPZA-EGFP、pPIC3.5K-U6 啟動子-sgRNA 質體之轉形株、U-1、U-2、E-1、E-2：同 G3CU，僅 sgRNA 不同 (表五)。

Figure 9. Transformants after 3 days induction on 6% SDS-PAGE after Western blotting

Using ab189380 (abcam) to detect Cas9 protein. M: Protein ladder #26616 (Thermo

Scientific), WT: Wild type, G: Transformant of pGAPZA-EGFP plasmid insertion, G3:

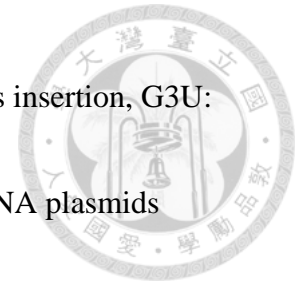
Transformant of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K plasmids insertion, G3C: Transformant

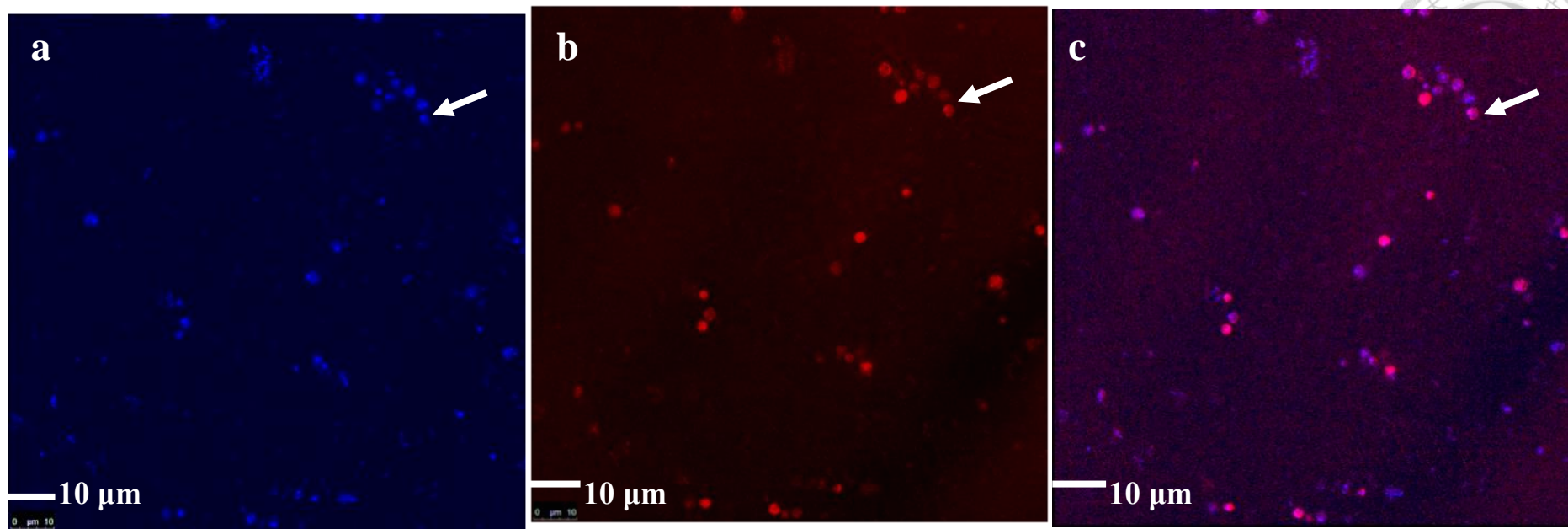
of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-Cas9 plasmids insertion. G3CU: Transformants of

pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-Cas9-U6 promoter-sgRNA plasmids insertion, G3U:

Transformants of pGAPZA-EGFP and pPIC3.5K-U6 promoter-sgRNA plasmids

insertion, U-1, U-2, E-1, E-2: Same as G3CU, but different sgRNA (Table 5).





圖十、G3CU 轉形珠誘導 3 天 Cas9 蛋白質進核偵測

(a) UV filter, 看 DAPI 染細胞核。(b) green filter, 看 Cas9 蛋白質免疫染色。(c) 疊圖, 箭頭指出入核明顯者。

Figure 9. Detection of the nucleus entry of Cas9 of transformant G3CU after 3 days induction

(a) UV filter, to see nuclei dyed by DAPI. (b) green filter, to see Cas9 dyed by immunofluorescence. (c) overlap. The white arrows pointed out the cell which Cas9 nucleus entry was obvious.



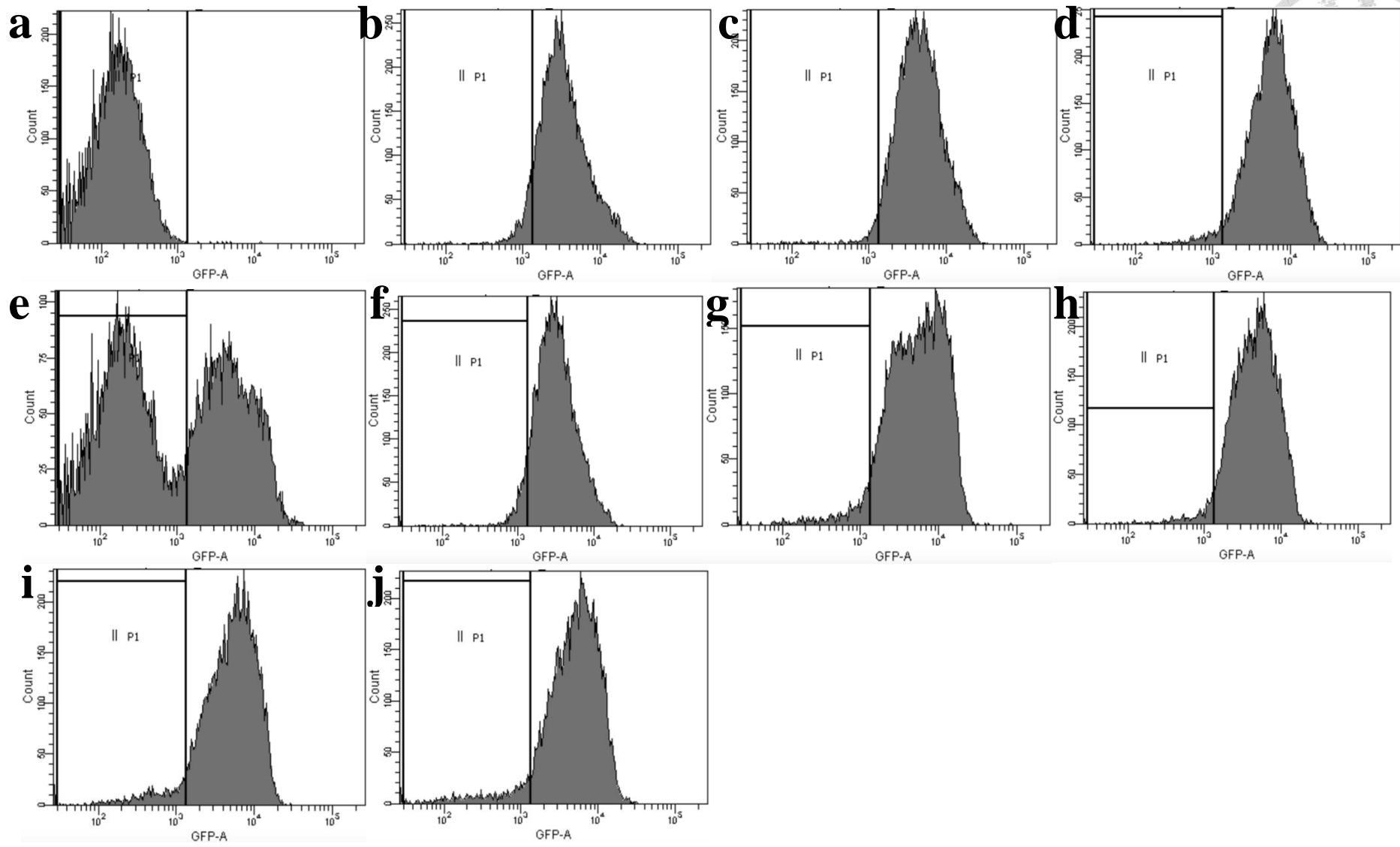
六、螢光偵測

1. 流式細胞儀

將菌液適量回溶於 PBS 緩衝液後以流式細胞儀分析 (圖十一)，偵測 wild type 不會發出綠色螢光之菌株、會發出綠色螢光之轉形株 G 並定義 P1 為會發出綠色螢光菌落之區間，在另外偵測其他控制組、實驗組轉形株。可以看到 wild type 位於 P1 區間左邊，視為不會發出螢光；G 轉形株位於 P1 區間，視為會發出螢光；G3CU 轉形株產生兩個群落，其中一個群落位於 P1 區間，另一群落位於 P1 區間左邊，兩者菌量比例約相等，說明 CRISPR/Cas9 系統影響的菌數約為 50%。G3 為空質體控制組、G3C、G3U 為只含有一半 CRISPR/Cas9 系統之控制組，流式細胞儀結果顯示並不受到 CRISPR/Cas9 影響，分布和 G 轉形株同；U-1、U-2、E-1、E-2 為含有完整 CRISPR/Cas9 系統唯 sgRNA 不同之轉型株 (表五)，其分布和 G 轉形株同，推測此 4 條 sgRNA 皆不會對 EGFP 進行編輯而影響發光。

2. 螢光顯微鏡

將培養菌液直接滴於載波片上，並以蓋玻片覆蓋後，以 400 倍放大倍率觀測，並以照相機 (OLYMPUS C-7070) 曝光 2 秒記錄 (圖十二)。圖中 UV filter 下可以看到全部的 *P. pastoris*，而 blue filter 僅可以看到會產生 EGFP 綠色螢光之 *P. pastoris*，由未置入 CRISPR/Cas9 系統之轉形株 G 及置入完整 CRISPR/Cas9 系統之轉形株 G3CU 比較，可看出並非所有細胞皆亮的情況只在 G3CU 轉形株發生。共軛焦螢光顯微鏡則將明視野與綠色螢光疊圖，同一平面上有對焦到者皆會發出螢光，然而 G3CU 轉型株可觀察到多個不會發光的菌體，再次顯示 CRISPR 發揮了作用 (圖十三)。



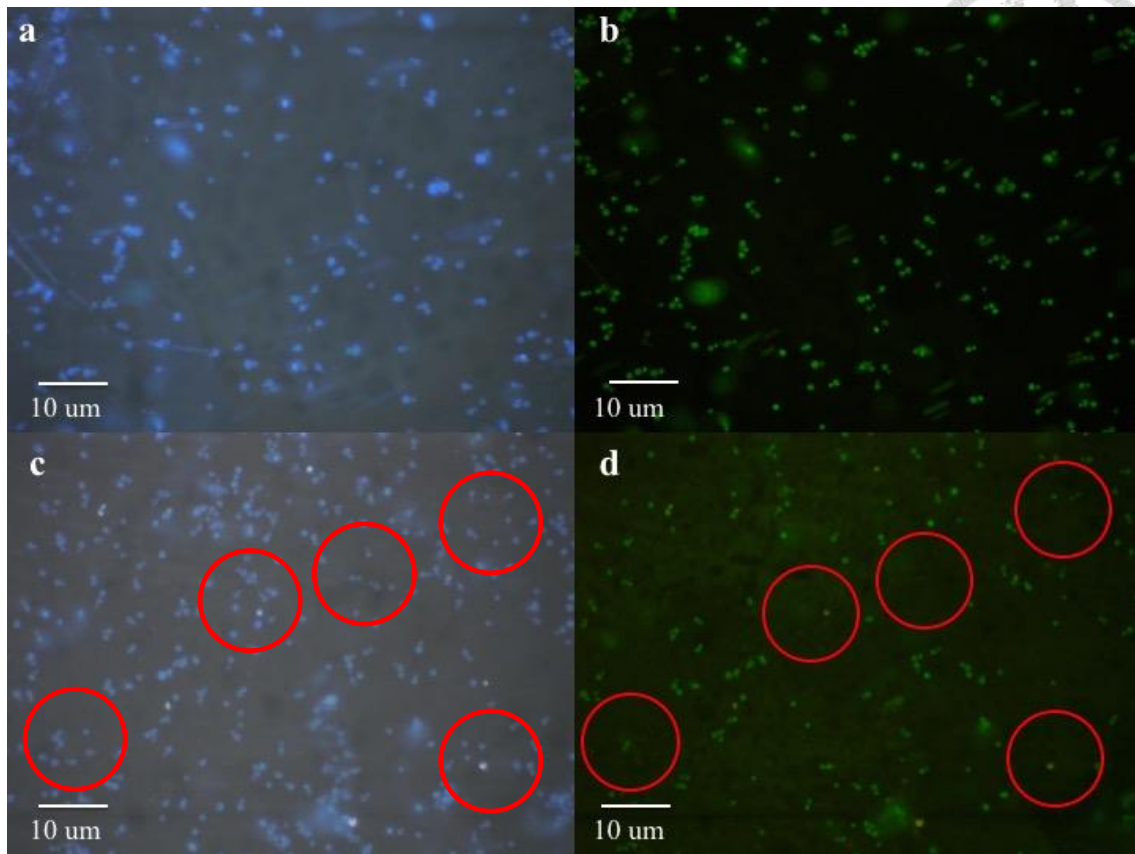


圖十一、轉形株誘導 3 天、繼代培養 2 天後流式細胞儀偵測結果

x 軸：EGFP 螢光強度、y 軸：細胞數、P1：參考轉形株 G 之結果定義出有螢光之範圍，每張圖呈現 10^4 個細胞。(a) 偵測 wild type *P. pastoris* 之結果。(b) 偵測 G 轉形株之結果。(c) 偵測 G3 轉形株之結果。(d) 偵測 G3C 轉形株之結果。(e) 偵測 G3CU 轉形株之結果。(f) 偵測 G3U 轉形株之結果。(g) 偵測 U-1 轉形株之結果。(h) 偵測 U-2 轉形株之結果。(i) 偵測 E-1 轉形株之結果。(j) 偵測 E-2 轉形株之結果。

Figure 11. Results of flow cytometry of transformants after 3 days induction and 2 days subculture

x-axis : Fluorescence intensity, y-axis : Number of cells, P1 : Cells with EGFP, reference of the result of transformant G. Each figure showed 10^4 cells. (a) wild type *P. pastoris*. (b) transformant G. (c) transformant G3. (d) transformant G3C. (e) transformant G3CU. (f) transformant G3U. (g) transformant U-1. (h) transformant U-2. (i) transformant E-1. (j) transformant E-2.



圖十二、轉形珠誘導 3 天、繼代培養 2 天後螢光顯微鏡偵測結果

上排為 G 轉形株同視野 (a) 於 UV filter 之下 (b) 於 Blue filter 之下

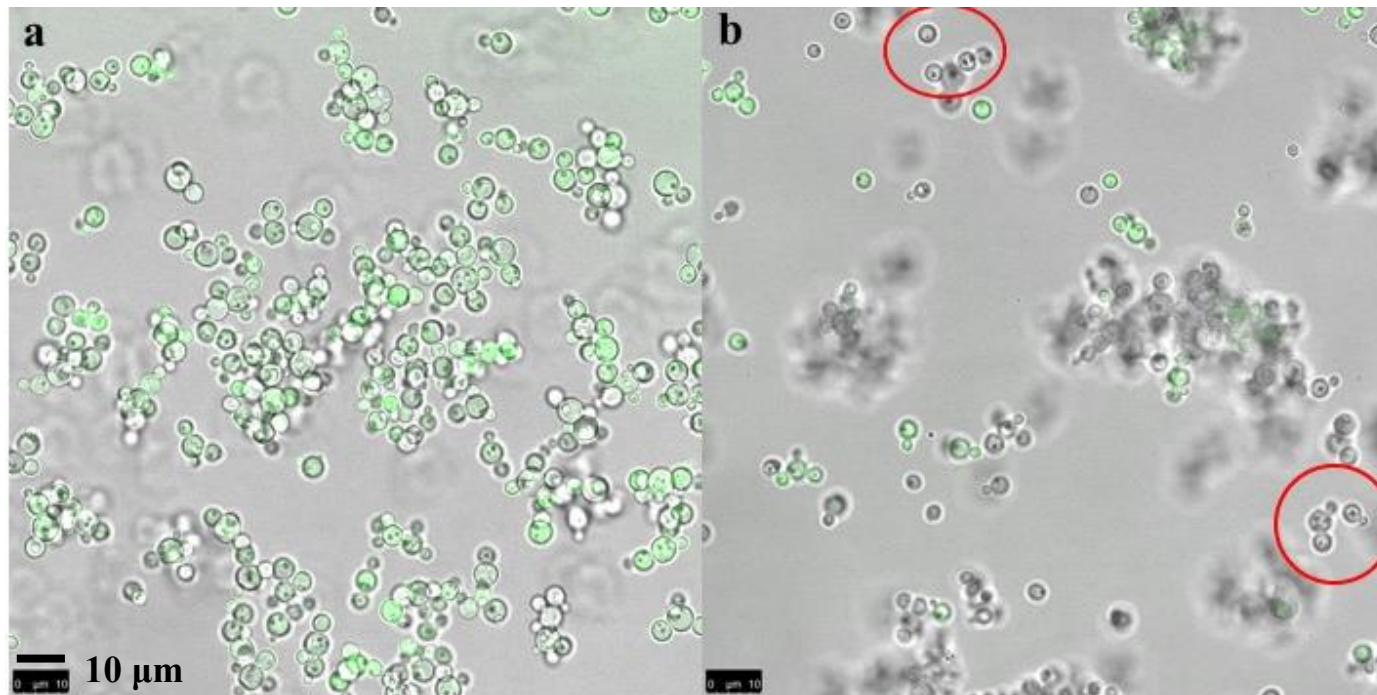
下排為 G3CU 轉形株同視野 (c) 於 UV filter 之下 (d) 於 Blue filter 之下，紅色
 圈圈標示處為觀察重點，對比至 (c) 可看出會發出綠色螢光之細胞明顯比總細胞
 數少。

Figure 12. Results of fluorescence microscopy of transformants after 3 days induction
 and 2 days subculture

Up : Transformant G under same vision (a) under UV filter, (b) under blue filter

Down : Transformant G3CU under same vision (c) under UV filter (d) under blue filter,
red circles marked the region for investigation that in contrast to (c), there were fewer
cells than total cells.





圖十三、轉形珠誘導 3 天、繼代培養 2 天後共軛焦螢光顯微鏡偵測結果

明視野與綠色螢光疊圖結果。(a) G 轉形株。(b) G3CU 轉形株，紅圈處可看到不亮之轉形株。

Figure 13. Results of confocal fluorescence microscopy of transformants after 3 days induction and 2 days subculture

Figures were the results of the overlap of the same vision under bright field and blur filter. (a) Transformant G, (b) Transformant G3CU, Red circles indicated that there were some transformants without EGFP showed.


第四章、討論

一、以 GAP 啟動子啟動單一拷貝數 EGFP 作為標的之優劣

本篇論文以 qPCR 及相對絕對定量法來訂出 EGFP 於 *P. pastoris* 轉形株 genomic DNA 上的拷貝數，得到單一拷貝數後，始接續後續的實驗。以 GAP 啟動子作為啟動子是為了讓誘導後產生的新元件只有 Cas9 蛋白質一個，讓控制變因單一化；而取得單一拷貝數的目的是為了簡化 CRISPR 作用，讓編輯發生在單一 EGFP 基因上，方便後續螢光偵測，也方便後續定序分析。然而此設計會遭遇下列問題：

1. GAP 啟動子相對於 *P. pastoris* 常用的另一啟動子，AOX1 啟動子，表現量較低^[38]，且又由於單一拷貝蛋白質表達量與高拷貝數相比明顯較少，使得本研究所使用 *P. pastoris* 轉形株 EGFP 表現量低，若用一般偵測螢光方法較難看出顯著差異性，需用如流式細胞儀才能明顯看出差異，又或者需要用螢光顯微鏡、定序等定性方法看出轉形株確實受到 CRISPR 的作用。

2. 會表現 EGFP 蛋白質的轉形株其實也有較亮、較暗（表現亮多、表現亮少）的差別，又由於上述 EGFP 蛋白質單一拷貝，EGFP 基礎表現量就已經不多，在挑選不亮的，即預期受到 CRISPR 作用的轉形株時，容易有 false negative 的情形發生，此 false negative 可能是發生在沒有截切功能但仍會辨認之下造成立體障礙，同樣會降低螢光表現量。若要證明此猜測可以將 Cas9 換成 dCas9 表現，又或者經多次 EGFP RNA、蛋白質定量實驗結果後驗證之。另外本篇論文進行中嘗試以藍光燈版初步篩選含有 CRISPR/Cas9 系統且不會發出綠色螢光的三隻轉形株，以



螢光顯微鏡再次確認其不會發光後分別以 PCR 擴增放大其 EGFP 序列進行定序，皆無發現基因突變現象。此螢光系統並非全有全無，又因為螢光較弱，在挑選適當轉形株進行定序上會遇到困難，需要更小心、更精確的挑選方法如流式細胞分選儀。

3. 由於 GAP 啟動子是屬於連續表現型的啟動子，在誘導 Cas9 蛋白質表現，使 CRISPR 發生作用後，已經生成的 EGFP 需要一段時間才能被分解，同時 Cas9 也須一段時間才會被分解。因此誘導 CRISPR 系統後，仍須計算額外培養、繼代的時間，才能得到真實的數據資料。

二、sgRNA 之使用

本篇論文中針對 EGFP 設計了三段 sgRNA、針對 Ura3 基因設計了兩段 sgRNA，一開始的質體建構只測試其中一條 E-3 sgRNA (表五)，其截切位置位於 EGFP 蛋白質之螢光發光基團上，預期截切一發生就會造成螢光蛋白序列改變，使其不發光。然而這條 sgRNA 起初並沒有達到預期中的截切效果，之後重複實驗才發現有經 CRISPR 作用的現象，而這之間又設計了其他條 sgRNA (U-1、U-2、E-1、E-2)，其他 sgRNA 似乎都沒有效果。此結果顯示即使參照已發表的設計規則設計 sgRNA，仍然會有無法使用的可能，而哪條可以使用是無法預期的，可以期待後續研究發現，現階段若要使用 sgRNA 截切特定序列，一次設計三條以上的序列同時測試，是比較有效率的測試方法。



三、U6 啟動子之序列長度

本篇論文順利從 *P. pastoris* 中獲得有功能的 U6 啟動子序列，並將之應用於 sgRNA 的表現，使 CRISPR 系統產生作用。此 *P. pastoris* U6 啟動子序列是參照前人獲得之另一種常用酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* 之已發表文章^[44]，以及其他常用 U6 啟動子序列長度及特性如轉錄從 G 開始，來設計引子進而 PCR 放大。所預期是 U6 啟動子的片段，其有功能固可喜，但仍在此提出尋求此序列的經驗及後續能做的事以供討論：

1. 參照 *S. cerevisiae* 之 U6 啟動子序列，其啟動子除了一般上游序列外，下游也有重要相關因子的結合位置，若無下游序列則轉錄無法發生。參考這點所以所尋求的 *P. pastoris* U6 啟動子亦包含上、下游基因序列，雖然結果是有功能，然則此下游序列於 *P. pastoris* U6 啟動子之功能性尚待確認。
2. 除了參考 *S. cerevisiae* 之 U6 啟動子序列上下游皆有重要序列之特性，亦參考於材料與方法章節所敘述購自中研院之質體上的 U6 啟動子序列長度，最後保守估計放大 *P. pastoris* U6 上游 300 bp、下游 400 bp 長度之序列測試期功能性，結果雖然有效，但若需獲得確切有效長度，仍須進一步確認。RNA 聚合酶 III 之啟動子重要因子，其不同物種甚至同物種不同基因之間的保守性低，如 RNA 聚合酶 II 中有保守的 TATA box，於 RNA 聚合酶 III 中只有 TATA box-like sequence，因此在預測啟動子之序列長度上較困難，若需要確定 U6 啟動子的長度，需要做更多的啟動子截切實驗才能確定。



四、CRISPR 系統之植入

本篇論文所使用植入 CRISPR 系統的方法，為在 *P. pastoris* 已行之有年，且實驗室普遍應用的方法：藉由同源重組將目標基因插入 genomic DNA 中，使異源基因表現。然而要表現 CRISPR 系統有多種方法，在此簡述各種不同方法的優缺點：

1. 植入 DNA

優：本篇研究所使用之方法。此方法將基因確實植入宿主中，異源基因的表達穩定，若使用本篇論文獲得之 U6 啟動子，由於其連續性表現的特性，更進一步解決在應用 CRISPR 系統時 sgRNA 容易被分解導致量不足的問題，是各種方法中最能確切使 CRISPR 產生功能的方法。

缺：此方法需要較長的建構、測試及確效過程，雖然仍較其他基因編輯工具如 ZFN、TALEN 快速^[52]，但二到三個星期對於標榜快速的 CRISPR 系統仍嫌略久。其次，外源基因的插入常常是在進行基因工程時的一個疑慮，究竟影響到宿主本身生理的程度如何？又之後若真正要應用到產品上，異源基因的存在往往是市場最顧忌的一點^[27]。最後，隨著 CRISPR 系統於生物體中表達的穩定性，伴隨而來的便是它存在生物體中更久，更有機會造成 CRISPR 系統中人人聞之變色的 off-target 效果。



2. 植入 RNA

優：將 RNA 植入宿主的行為本身並不會造成宿主本身基因永久的改變，這點是植入 RNA 相較於植入 DNA 最誘人的理由。且植入 RNA 相較於植入蛋白質更普遍，其作法更簡單。

缺：RNA 容易分解，使得要將 CRISPR 系統的效率最大化往往需要一段時間的最佳化，尤其是若要直接送入 sgRNA，往往要送入非常大量的 sgRNA 使能達到效果^[53]。另外，RNA 要轉譯出蛋白質仍有一段時間，姑且不論需要詳細探究這段時間發生的機制，可以看出植入 RNA 的方法，於即時性上仍不如植入蛋白質。

3. 植入蛋白質

優：如同 RNA，將蛋白質植入宿主的行為本身並不會造成宿主本身基因永久的改變，在 CRISPR 系統的應用上，已有將 sgRNA 與 Cas9 蛋白質於細胞外結合，形成 ribonucleoprotein (RNP)，再植入細胞中的技術^[54]，此技術具有快速產生作用的優點，同時具有無外源基因植入又較 RNA 穩定的優點，是應用 CRISPR 系統的最佳選擇之一，也是實驗室之後可以發展的重要方向。

缺：此系統相較於植入 DNA，並非持續穩定植入，因此在 CRISPR 系統表現上穩定性以植入 DNA 方法較佳。

五、5-FOA plate 之實驗結果

本篇論文除了嘗試以 CRISPR 突變外源性 EGFP 序列，同時也針對內生性 Ura3 基因設計 sgRNA 進行編輯，預期的結果是當 Ura3 基因發生突變，無法代謝 5-FOA 成有毒物質 5-fluorouracil，即可在培養基上生成菌落^[56]。然而幾經重複並沒有得到菌落，推測有以下可能：



1. 此兩條針對 Ura3 設計之 sgRNA 無效，需要再另外設計有效之 sgRNA。
2. 塗抹轉形株時的菌量需要最適化，已突變之轉形株有可能被未突變之轉形株產生的有毒代謝物影響而死亡，因此需要持續實驗找到最佳稀釋倍率塗盤，此觀點由於尚未掌握此 CRISPR 編輯之效率，有待後續實驗調整之。
3. Ura3 基因表現後可能會存在細胞內一段時間，且只需小量即可作用，則若成功突變珠繼代培養時間不夠長，可能仍然不會再 5-FOA plate 上生長，需要更熟悉 Ura3 基因的特性。
4. 5-FOA plate 配方需要再做調整。本篇研究中由於時間及藥品限制，並未周延做到正控制組，即 Ura3 基因不表現菌珠的塗盤，其結果即可看出 5-FOA plate 的配方及實驗方法的可行性。

六、sgRNA、Cas9 蛋白質之表現量

本篇論文使用 AOX1 啟動子表現 Cas9 蛋白質，並使用所找到之 U6 啟動子表現 sgRNA，雖有研究顯示 U6 啟動子於表現量較 tRNA 等 RNA 聚合酶 III 之啟動子要高^[45]，且於細胞內表現 sgRNA 較外源性送入 sgRNA 更能降低被分解的風險^[53]，然而 sgRNA 之表現量是否與 Cas9 之表現量相符，使其效果達到最佳，需進一步調整。

另外，Cas9 蛋白質的表現量過高似乎對生物體有毒性。本篇論文執行過程中，發現誘導 5 天後之轉形株再接到 YPD 培養基培養時，有表現 Cas9 蛋白質者生長狀況皆較差，約需於試管培養 3 天才長出，若需要達到基因編輯的功能，Cas9 蛋白質誘導表現 5 天或許已經過量，而只需更短的誘導天數即可達到功能。本篇論文選取誘導 3 天之轉形珠進行後續實驗，乃因為在使用 SDS-PAGE 分析後誘


導 3 天之 Cas9 蛋白質表現較明顯，然而是否過量仍須進一步實驗調整。綜合上述，確認 sgRNA、Cas9 蛋白質之表現量是此系統最適化的重要工作，有待後續進行。



七、*Pichia pastoris* CRISPR 系統之未來發展

本篇論文成功獲得 *P. pastoris* U6 啟動子，並成功以此來啟動 CRISPR 系統中的 sgRNA 的轉錄。於上述討論中敘述 U6 啟動子以及植入 DNA 法的優點，植入 DNA 並以 U6 啟動子為啟動子可以讓 sgRNA 長期在轉形株中穩定表現，此效果讓下述應用更方便達成：

1. 上述優點使得要同時使用多條 sgRNA 也較為簡單，也就是可以達到同時調控多基因位點的效果，於同一個細胞中同時使用多條 sgRNA，就一般 CRISPR 系統而言，若是針對同一基因進行剪輯，則此單一基因更有機會被剪輯而造成表現上的變化；若是針對不同基因，則可以達到同時改變多個基因表現的效果。
2. 若將 CRISPR 系統中 Cas9 蛋白質修改成不會截切的 dCas9 蛋白質^[19]，使其不具有截切功能轉而具備抑制基因表現的功能，甚至是接上 activator 或 repressor 來加強功能^[20]，則當同時表現多個 sgRNA，可以達到一次調控多個基因表現的結果。此想像可以實現在整套機制的調控上，尤其使用 U6 啟動子為啟動子，可以讓一套機制只需誘導表現 dCas9 蛋白質即可調控其開關，成為一可逆的機制開關，應用在機制研究及蛋白質表現上皆方便^[55]。



3. *P. pastoris* 之基因轉形已實行多年，操作上方便且容易達成，因此要植入基因、置換基因乃至敲除基因皆可用此傳統的轉形系統。然而由於此物種缺少 RNA 干擾 (RNAi) 機制^[39]，使得 gene knockdown 較難以達成，透過 U6 啟動子及 dCas9 的結合，將使得新建立的 CRISPR 系統讓 *P. pastoris* 除了多了一個更快速的基因編輯工具，更多了 gene knockdown 的可能性。

4. *P. pastoris* 之基因轉形已實行多年，由於其同源重組系統傳統上受到限制酶截切序列的限制，使得應用上多為使用特定幾個常用啟動子表現不同目標蛋白質，較少有其他應用。本研究初步建立一設計簡單之 CRISPR/Cas9 系統，可望在基因編輯上更方便，達到 *P. pastoris* 全基因皆可編輯的效果，產出如改造內部糖基化、甲基化的機制、快速營養缺陷株建立、抗生素基因刪除等等應用。

第五章、結論




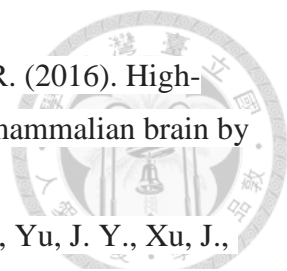
1. 本篇論文從 *P. pastoris* 中得到 U6 啟動子，並證實可以用來啟動 functional RNA 的轉錄。
2. 本篇論文以流式細胞儀看到 CRISPR/Cas9 系統的植入讓綠色螢光表現菌株產生分群現象，且不亮的族群約為全部的一半。又以螢光顯微鏡觀測，明顯觀察到有些轉形株會亮、有些轉形株不會亮，再次說明了 CRISPR/Cas9 系統對原本會發出綠色螢光的轉形株有一定的影響。藉由定量、定性實驗，證實本篇論文中建立的 CRISPR/Cas9 系統確實可行。
3. 本篇論文嘗試了許多條 sgRNA，然而似乎只有一條有效，因此，雖然 CRISPR/Cas9 系統證實可行，但最佳化仍待努力。

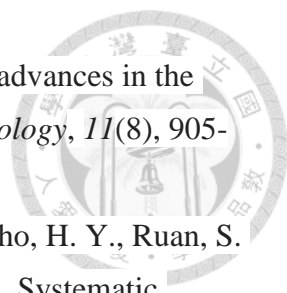
第六章、參考文獻

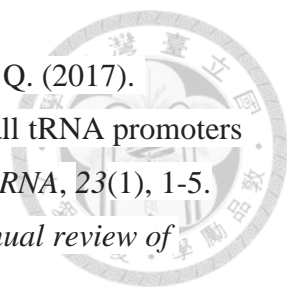


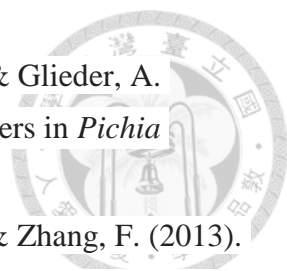
1. Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156-1160.
2. Cradick, T. J., Ambrosini, G., Iseli, C., Bucher, P., & McCaffrey, A. P. (2011). ZFN-site searches genomes for zinc finger nuclease target sites and off-target sites. *BMC bioinformatics*, 12(1), 152.
3. Hopkins, C. M., White, F. F., Choi, S. H., Guo, A., & Leach, J. E. (1992). Identification of a family of avirulence genes from *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5(6), 451-459.
4. Boch, J., Scholze, H., Schornack, S., Landgraf, A., Hahn, S., Kay, S., Lahaye, T., Nickstadt, A., & Bonas, U. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959), 1509-1512.
5. Liu, B., Zhang, A. K., Zhou, L., & Miao, J. (2015). New era of gene editing: a brief discussion of engineered nucleases with gene editing ability. *Gene and Gene Editing*, 1(1), 26-30.
6. Rudin, N., Sugarman, E., & Haber, J. E. (1989). Genetic and physical analysis of double-strand break repair and recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(3), 519-534.
7. Mout, R., Ray, M., Lee, Y. W., Scaletti, F., & Rotello, V. M. (2017). *In vivo* delivery of CRISPR/Cas9 for therapeutic gene editing: progress and challenges. *Bioconjugate Chemistry*.
8. Waltz, E. (2016). CRISPR-edited crops free to enter market, skip regulation.
9. Wiedenheft, B., Sternberg, S. H., & Doudna, J. A. (2012). RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 482(7385), 331-338.
10. Wright, A. V., Nuñez, J. K., & Doudna, J. A. (2016). Biology and applications of CRISPR systems: harnessing nature's toolbox for genome engineering. *Cell*, 164(1), 29-44.
11. Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816-821.

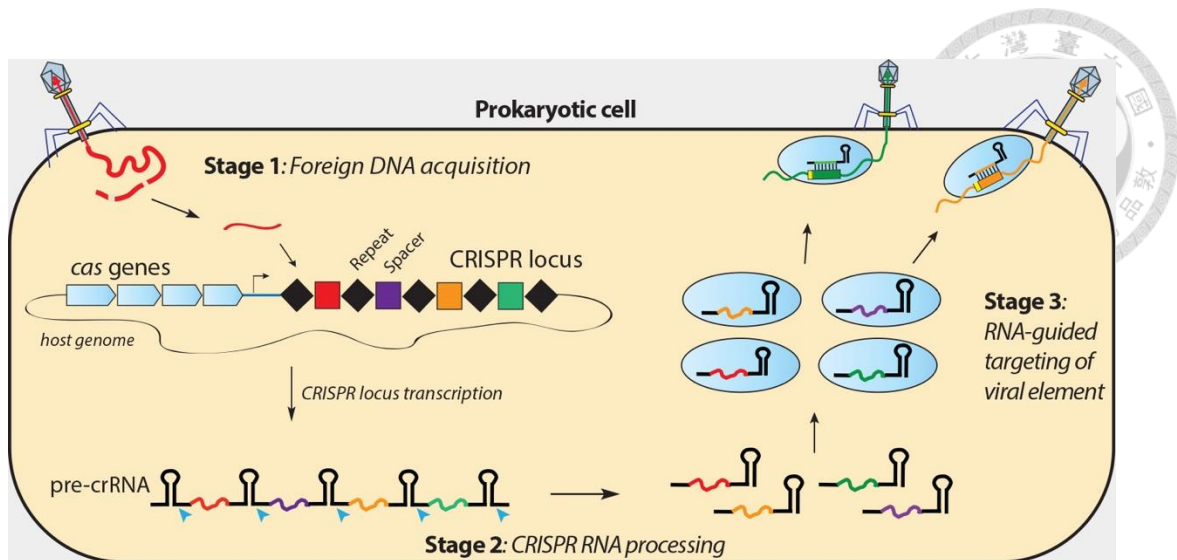
- 
12. Sternberg, S. H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E. C., & Doudna, J. A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*, *507*(7490), 62-67.
13. Pyne, M. E., Bruder, M. R., Moo-Young, M., Chung, D. A., & Chou, C. P. (2016). Harnessing heterologous and endogenous CRISPR-Cas machineries for efficient markerless genome editing in *Clostridium*. *Scientific reports*, *6*.
14. Gophna, U., Allers, T., & Marchfelder, A. (2017). Finally, archaea get their CRISPR-Cas toolbox. *Trends in Microbiology*, *25*(6), 430-432.
15. Qin, H., Xiao, H., Zou, G., Zhou, Z., & Zhong, J. J. (2017). CRISPR-Cas9 assisted gene disruption in the higher fungus *Ganoderma* species. *Process Biochemistry*, *56*, 57-61.
16. Belhaj, K., Chaparro-Garcia, A., Kamoun, S., & Nekrasov, V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, *9*(1), 39.
17. Liang, P., Xu, Y., Zhang, X., Ding, C., Huang, R., Zhang, Z., Lv, J., Xie, X., Chen, Y., Li, Y., Bai, Y., Songyang, Z., Ma, W., Zhou, C., Huang, J., & Sun, Y. (2015). CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes. *Protein & cell*, *6*(5), 363-372.
18. Shen, B., Zhang, W., Zhang, J., Zhou, J., Wang, J., Chen, L., Wang, L., Hodgkins, A., Iyer, V., Huang, X., & Skarnes, W. C. (2014). Efficient genome modification by CRISPR-Cas9 nickase with minimal off-target effects. *Nature methods*, *11*(4), 399-402.
19. Qi, L. S., Larson, M. H., Gilbert, L. A., Doudna, J. A., Weissman, J. S., Arkin, A. P., & Lim, W. A. (2013). Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*, *152*(5), 1173-1183.
20. Gilbert, L. A., Larson, M. H., Morsut, L., Liu, Z., Brar, G. A., Torres, S. E., & Lim, W. A. (2013). CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell*, *154*(2), 442-451.
21. McDonald, J. I., Celik, H., Rois, L. E., Fishberger, G., Fowler, T., Rees, R., Kramer, A., Martens, A., Edwards, J. R., & Challen, G. A. (2016). Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation. *Biology open*, *5*, 866-874.

- 
22. Mikuni, T., Nishiyama, J., Sun, Y., Kamasawa, N., & Yasuda, R. (2016). High-throughput, high-resolution mapping of protein localization in mammalian brain by *in vivo* genome editing. *Cell*, *165*(7), 1803-1817.
 23. Zhang, J. P., Li, X. L., Neises, A., Chen, W., Hu, L. P., Ji, G. Z., Yu, J. Y., Xu, J., Yuan, W. P., Cheng, T., & Zhang, X. B. (2016). Different effects of sgRNA length on CRISPR-mediated gene knockout efficiency. *Scientific reports*, *6*.
 24. Tycko, J., Myer, V. E., & Hsu, P. D. (2016). Methods for optimizing CRISPR-Cas9 genome editing specificity. *Molecular cell*, *63*(3), 355-370.
 25. Kleinstiver, B. P., Pattanayak, V., Prew, M. S., Tsai, S. Q., Nguyen, N. T., Zheng, Z., & Joung, J. K. (2016). High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects. *Nature*, *529*(7587), 490-495.
 26. Fu, Y., Sander, J. D., Reyon, D., Cascio, V. M., & Joung, J. K. (2014). Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature biotechnology*, *32*(3), 279-284.
 27. Baumann, M. (2016). CRISPR/Cas9 genome editing—new and old ethical issues arising from a revolutionary technology. *NanoEthics*, *10*(2), 139-159.
 28. Ahmad, M., Hirz, M., Pichler, H., & Schwab, H. (2014). Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *98*(12), 5301–5317.
 29. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R., Riggs, A. D., Heyneker, H. L., Bolivar, F., & Boyer, H. W. (1977). Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. *Science*, *198*(4321), 1056-1063.
 30. Baroni, C. D., De Franceschi, G. S., Uccini, S., Adorini, L., Cnen, G. D., & Ruco, L. (1976). Biological effects of *Escherichia coli* lipopolysaccharide (LPS) *in vivo*. I. Selection in the mouse thymus of killer and helper cells. *Immunology*, *31*(2), 217.
 31. Bandaranayake, A. D., & Almo, S. C. (2014). Recent advances in mammalian protein production. *FEBS letters*, *588*(2), 253-260.
 32. Hartner, F. S., & Glieder, A. (2006). Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microbial Cell Factories*, *5*(1), 39.
 33. Liang, S., Wang, B., Pan, L., Ye, Y., He, M., Han, S., Zheng, S., Wang, X., & Lin, Y. (2012). Comprehensive structural annotation of *Pichia pastoris* transcriptome and the response to various carbon sources using deep paired-end RNA sequencing. *BMC genomics*, *13*(1), 738.

- 
34. Cregg, J. M., Vedvick, T. S., & Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nature Biotechnology*, *11*(8), 905-910.
35. Wang, T. Y., Huang, C. J., Chen, H. L., Ho, P. C., Ke, H. M., Cho, H. Y., Ruan, S. K., Hung, K. Y., Wang, I. L., Cai, Y. W., & Sung, H. M. (2013). Systematic screening of glycosylation-and trafficking-associated gene knockouts in *Saccharomyces cerevisiae* identifies mutants with improved heterologous exocellulase activity and host secretion. *BMC Biotechnology*, *13*(1), 71.
36. Vassileva, A., Chugh, D. A., Swaminathan, S., & Khanna, N. (2001). Expression of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* using the GAP promoter. *Journal of biotechnology*, *88*(1), 21-35.
37. Waterham, H. R., Digan, M. E., Koutz, P. J., Lair, S. V., & Cregg, J. M. (1997). Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene*, *186*(1), 37-44.
38. Zhang, A. L., Luo, J. X., Zhang, T. Y., Pan, Y. W., Tan, Y. H., Fu, C. Y., & Tu, F. Z. (2009). Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris*. *Molecular biology reports*, *36*(6), 1611-1619.
39. Crook, N. C., Schmitz, A. C., & Alper, H. S. (2013). Optimization of a yeast RNA interference system for controlling gene expression and enabling rapid metabolic engineering. *ACS synthetic biology*, *3*(5), 307-313.
40. Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, *23*(20), 4051-4060.
41. Willis, I. M. (1993). RNA polymerase III. Genes, factors and transcriptional specificity. *European Journal of Biochemistry*, *212*, 1-11.
42. Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., Baulcombe, D.C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* *308*: 118-120.
43. Wierzbicki, A. T., Ream, T., Haag, J. R., & Pikaard, C. S. (2009). RNA Polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics*, *41*(5), 630-634.
44. Brow, D. A., & Guthrie, C. (1990). Transcription of a yeast U6 snRNA gene requires a polymerase III promoter element in a novel position. *Genes & Development*, *4*(8), 1345-1356.

- 
45. Wei, Y., Qiu, Y., Chen, Y., Liu, G., Zhang, Y., Xu, L., & Ding, Q. (2017). CRISPR/Cas9 with single guide RNA expression driven by small tRNA promoters showed reduced editing efficiency compared to a U6 promoter. *RNA*, 23(1), 1-5.
46. Guthrie, C., & Patterson, B. (1988). Spliceosomal snRNAs. *Annual review of genetics*, 22(1), 387-419.
47. Brow, David A., & Christine Guthrie. (1988). Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*. 334(21) 213-218.
48. Lubliner, S., Keren, L., & Segal, E. (2013). Sequence features of yeast and human core promoters that are predictive of maximal promoter activity. *Nucleic acids research*, 41(11), 5569-5581.
49. Lubliner, S., Regev, I., Lotan-Pompan, M., Edelheit, S., Weinberger, A., & Segal, E. (2015). Core promoter sequence in yeast is a major determinant of expression level. *Genome research*, 25(7), 1008-1017.
50. Weninger, A., Hatzl, A. M., Schmid, C., Vogl, T., & Glieder, A. (2016). Combinatorial optimization of CRISPR/Cas9 expression enables precision genome engineering in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Journal of biotechnology*, 235, 139-149.
51. Weninger, A., Glieder, A., & Vogl, T. (2015). A toolbox of endogenous and heterologous nuclear localization sequences for the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS yeast research*, 15(7).
52. Jakočiūnas, T., Jensen, M. K., & Keasling, J. D. (2016). CRISPR/Cas9 advances engineering of microbial cell factories. *Metabolic engineering*, 34, 44-59.
53. Severinov, K., Ispolatov, I., & Semenova, E. (2016). The influence of copy-number of targeted extrachromosomal genetic elements on the outcome of CRISPR-Cas defense. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3.
54. Caitlin S. (2017). Editing the editor: Genome editing gets a makeover with CRISPR 2.0. *Science*, 355, 210.
55. Vanegas, K. G., Lehka, B. J., & Mortensen, U. H. (2017). SWITCH: a dynamic CRISPR tool for genome engineering and metabolic pathway control for cell factory construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories*, 16(1), 25.
56. Krooth, R. S., Hsiao, W. L., & Potvin, B. W. (1979). Resistance to 5-fluoroorotic acid and pyrimidine auxotrophy: a new bidirectional selective system for mammalian cells. *Somatic Cell and Molecular Genetics*, 5(5), 551-569.

- 
57. Abad, S., Kitz, K., Hörmann, A., Schreiner, U., Hartner, F. S., & Glieder, A. (2010). Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnology journal*, 5(4), 413-420.
58. Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.



(<http://rna.berkeley.edu/crispr.html>)

附圖一、CRISPR 於原核生物中的機制

Stage 1：當病毒基因入侵，存活的細菌會將病毒片段截切並插入自己基因中的 CRISPR locus，這串 CRISPR locus 含有許多先天或後天獲得的病毒基因片段。

Stage 2：轉錄出具有不同病毒片段的 CRISPR RNA (crRNA)，crRNA 會引導 Cas9 蛋白質

Stage 3：當病毒再次入侵，對應到的 crRNA 便會專一性的引導 Cas9 蛋白質截切病毒基因，讓病毒無法發揮感染力，達成免疫效果。

Supplementary figure 1. The mechanism of CRISPR in prokaryotic cell

Stage 1: When the virus attacked the bacteria by DNA insertion, there were chances that the survived bacteria would digest small fragments of virus DNA and insert the fragments into its own genome, which called CRISPR locus that contained many virus naturally of nurturally.

Stage 2: The transcribed RNA contained different virus fragments which called

CRISPR RNA (crRNA) would guide Cas9 protein.

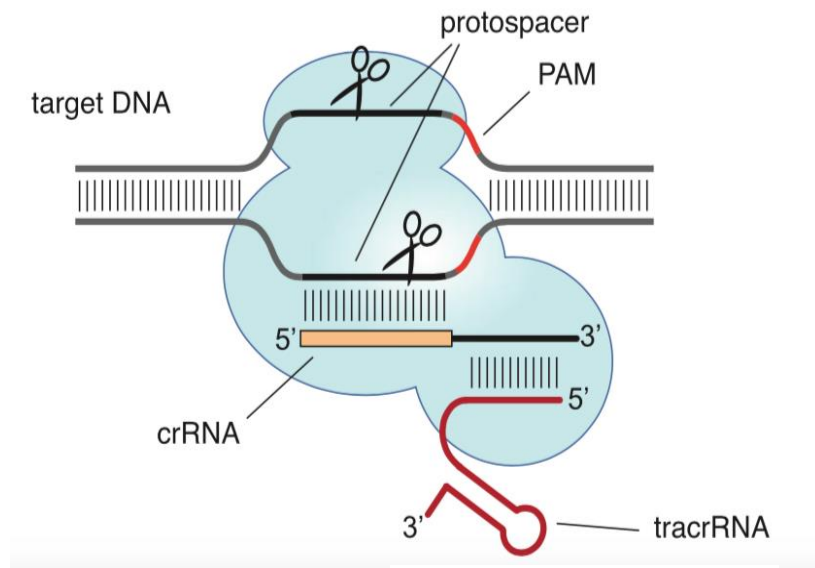


Stage 3: When the virus attacked again, the crRNA would guide Cas9 protein to digest

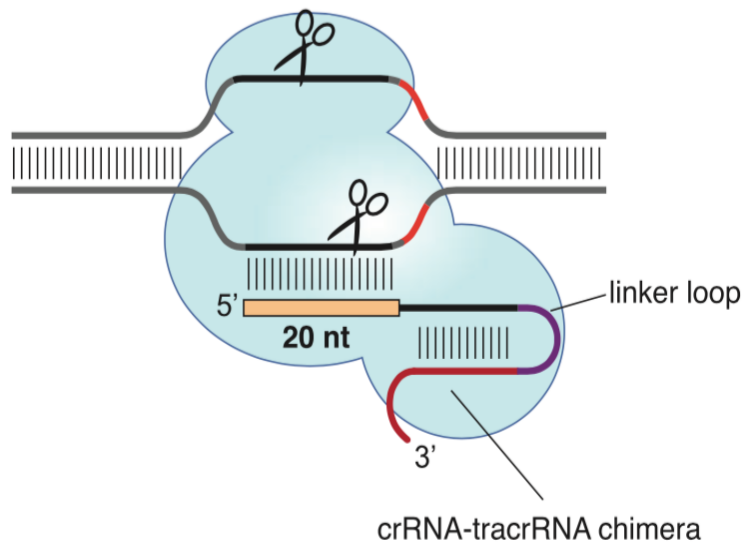
the virus DNA into piece accordingly so that the virus could not affect the bacteria. The

bacteria were immuned by CRISPR/Cas9 system.

Cas9 programmed by crRNA:tracrRNA duplex



Cas9 programmed by single guide RNA



附圖二、將 crRNA 與 tracrRNA 結合成 sgRNA

將上圖中 crRNA 與 tracrRNA 結合而成下圖中 chimera，即 sgRNA。

Supplementary figure 2. Combination of crRNA and tracrRNA to be sgRNA

The combination of crRNA and tracrRNA in upper figure was so-called sgRNA (chimera in figure below).