

研究报告



酿脓链球菌 Cas9 核酸酶的重组表达、分离纯化及酶学特性

鲍玲娜¹ 吴勇^{1,2} 林军¹ 东圆珍^{1,2} 黄宗庆^{*2}¹ 中国医药工业研究总院上海医药工业研究院 上海 201203² 上海多米瑞生物技术有限公司 上海 201203

摘要:【背景】Cas9 核酸酶是一种 RNA 引导的核酸内切酶,可与单链向导 RNA (single-guide RNA, sgRNA)形成稳定的核糖核蛋白复合物,识别和切割特定的核苷酸片段。由于其具备高灵活性和高效率的特点,目前已经成为基础科学研究领域和临床治疗方法中使用最广泛的基因编辑工具。【目的】为 Cas9 核酸酶的合理开发和利用提供理论依据。【方法】利用大肠杆菌表达系统表达野生型酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9 核酸酶,经硫酸铵沉淀和镍柱亲和层析两步纯化获得较高纯度表达产物,并对其热稳定性、pH 稳定性、金属离子的影响等酶学特性进行研究。【结果】经高密度发酵后,大肠杆菌湿菌重达 191.0 g/L。纯化后酿脓链球菌 Cas9 核酸酶的比酶活达 641.29 U/mg,纯化倍数为 16.02,收率为 46.40%。Cas9 核酸酶在 25–42 °C 保温 2 h 后剩余酶活保持在 65%以上,而在 45 °C 保温 15 min 后全部失活;其在 pH 6.0–10.0 范围内稳定性较高,剩余酶活大于 68%,在 pH 9.0 时稳定性最高;0.5–20.0 mmol/L 浓度范围内的 Mg^{2+} 对该酶有激活作用,10.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 可使该酶酶活力提高约 23%; Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Zn^{2+} 对该酶有不同程度的抑制作用,其中 0.5 mmol/L 的 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对 Cas9 核酸酶有完全抑制作用。【结论】异源表达并纯化出具有较高纯度和较高酶活力的酿脓链球菌 Cas9 核酸酶,并对其酶学特性进行了初步研究,该结果对 CRISPR/Cas9 技术的进一步推广和应用有一定的指导意义。

关键词: 酿脓链球菌 Cas9 核酸酶, 纯化, 硫酸铵沉淀, 亲和层析, 酶学特性

Expression, purification and enzymatic characterization of recombinant *Streptococcus pyogenes* Cas9 nuclease

BAO Ling-Na¹ WU Yong^{1,2} LIN Jun¹ DONG Yuan-Zhen^{1,2} HUANG Zong-Qing^{*2}¹ Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China² Shanghai Duomirui Bio-Technology Company Limited, Shanghai 201203, China

Abstract: [Background] Cas9 nuclease is a site-specific RNA-guided endonuclease that can form a stable ribonucleoprotein complex with single guide RNA (sgRNA), which recognizes and cleaves target DNA molecules. Due to its high flexibility and efficiency, Cas9 is the most widely used gene-editing tool in both basic research and clinical treatment. [Objective] To provide a theoretical basis for the rational

Foundation item: National Key Research and Development Program of China (2017YFD0501404)

***Corresponding author:** Tel: 86-21-20572000; E-mail: hzq560@126.com

Received: 09-03-2020; **Accepted:** 13-05-2020; **Published online:** 05-06-2020

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0501404)

***通信作者:** Tel: 021-20572000; E-mail: hzq560@126.com

收稿日期: 2020-03-09; **接受日期:** 2020-05-13; **网络首发日期:** 2020-06-05

development and utilization of Cas9 nuclease. **[Methods]** The wild type Cas9 nuclease from *Streptococcus pyogenes* was expressed in the *Escherichia coli* system. The expressed enzyme was then purified by ammonium sulfate precipitation and Ni^{2+} -affinity chromatography. Finally, the purified Cas9 nuclease was characterized for its thermal stability, pH stability and the influence of metal ions. **[Results]** The results showed that the wet weight of the bacteria was 191.0 g/L after high-density fermentation. The specific activity was 641.29 U/mg and the bacteria was purified up to 16.02 times with a recovery of 46.40% after purification. Cas9 nuclease retained over 65% of its initial activity after incubation between 25 and 42 °C for 2 h, but it was completely deactivated after treatment at 45 °C for 15 min. The enzyme was stable between pH 6.0 and 10.0 with residual enzyme activity more than 68%, and especially the highest stability at pH 9.0. Mg^{2+} activated the enzyme between 0.5 and 20.0 mmol/L, and 10.0 mmol/L Mg^{2+} increased the enzyme activity by 23%. Besides, this enzyme was inhibited by some metal ions such as Ba^{2+} , Co^{2+} , Ca^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} and Zn^{2+} , wherein Cu^{2+} and Fe^{2+} completely inhibited Cas9 nuclease at a concentration of 0.5 mmol/L. **[Conclusion]** Cas9 nuclease from *Streptococcus pyogenes* was heterologously expressed and purified with high purity and high activity. The purified Cas9 nuclease were characterized, serving as reference for further promotion and application of this enzyme in CRISPR/Cas9 technology.

Keywords: *Streptococcus pyogenes* Cas9 nuclease, Purification, Ammonium sulfate precipitation, Affinity chromatography, Enzymatic characteristics

Clustered, regularly interspaced, short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas)系统是一类分布于 40%已测序细菌和 90%已测序古生菌中, 经过长期进化形成的 RNA 介导的抵御外来噬菌体、质粒或其他外源 DNA 侵染的适应性免疫系统^[1-2]。已知的由单个 Cas 蛋白发挥干扰作用的 CRISPR/Cas 系统有三类, 其中 II 型系统的效应复合物组分包括 CRISPR-derived RNA (crRNA)、Trans-activating RNA (tracrRNA)和 Cas9 核酸内切酶 (CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9)。目前, 酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的 II 型系统是被改造最为成功的 CRISPR/Cas 系统^[3]。酿脓链球菌 Cas9 核酸酶(*Streptococcus pyogenes* Cas9, SpyCas9)是由 1 368 个氨基酸组成的多结构域蛋白^[4], 含有 RuvC-like 结构域和 HNH 结构域。HNH 结构域负责切割与 crRNA 互补配对的模板链, 切割位点位于原型间隔序列毗邻基序(protospacer adjacent motif, PAM)上游 3 nt 处; RuvC-like 结构域负责对另一条非互补链进行切割, 切割位点位于 PAM 上游 3-8 nt 处^[5]。在 crRNA 与 tracrRNA 形成的双链 RNA (或 sgRNA)指导下^[6], SpyCas9 核酸酶对靶位点进行切割产生 DNA 双链断裂(double strand breaks, DSBs)^[7]。DSBs 可激活细胞内固有

的非同源末端连接(non-homologous ending-joining, NHEJ)或同源重组(homologous re-combination, HDR)两种不同的修复机制对损伤的 DNA 进行修复, 从而实现对基因组的定点编辑^[8]。CRISPR/Cas9 技术目前主要应用于在体外对基因组片段进行靶向切割以替代传统的限制性内切酶或 PCR 克隆, 以及在体内细胞或个体水平上实现基因的敲除和插入的基因编辑。由于其操作简单、突变效率高、适用范围广, 该技术迅速成为多种生物基因组编辑的首选方法^[9]。

本研究利用大肠杆菌作为宿主菌对酿脓链球菌 Cas9 核酸酶基因进行了克隆和表达, 并研究了其酶学特性, 以期为 CRISPR/Cas9 技术的进一步应用和后续的开发工作提供必要的理论参数依据。

1 材料

1.1 菌株和质粒

表达型菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3)、质粒 pET-28a(+)均由本实验室保存。

1.2 主要试剂和仪器

对照酶 Recombinant Cas9 protein, PNA Bio 公司; Trans Taq-T DNA 聚合酶、Easy Pure Quick

Gel Extraction 试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司; NEBuffer™ 3.1, New England BioLabs 公司; 三(2-羧乙基)膦盐酸盐[Tris-(2-carboxyethyl)-phosphine hydrochloride, TCEP]、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), Damas-beta 公司; 咪唑, General-Reagent 公司; BCA 蛋白质定量检测试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司。30 kD 超滤膜, Merck 公司; Ni Sepharose™ excel 填料, GE Healthcare 公司; 双层培养振荡器, 上海世平实验设备有限公司; 5L 机械搅拌发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司; 紫外分析仪, 上海菁华科技仪器有限公司; 蛋白纯化系统, 苏州赛谱科技有限公司。

1.3 培养基

LB 培养基^[10](g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, 氯化钠 10.0, 琼脂 20.0 (固体培养基), pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

SM502 培养基(g/L): 甘油 20.00, 葡萄糖 2.00, 胰蛋白胨 10.00, 酵母抽提物 5.00, 硫酸铵 10.00, 十二水合磷酸氢二钠 17.10, 磷酸二氢钾 3.00, 无水硫酸镁 0.51, 无水氯化钙 0.01, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

补料培养基: 75%甘油(质量体积比), 1×10^5 Pa 灭菌 30 min。

2 方法

2.1 表达载体的构建

在 NCBI 网站中查找酿脓链球菌 Cas9 核酸酶的全长 DNA 序列, 然后按照大肠杆菌 BL21(DE3)的偏好密码子, 对其进行密码子优化。在 N 末端和 C 末端分别引入核定位序列(nuclear localization sequence, NLS) (APKKKRKVGIVHPAA), 并在 N 末端插入 6×His 标签接头(MGSSHHHHHSS)的核苷酸序列用于后续分离纯化, 由此构成目的基因序列。另外在目的基因序列的 5'和 3'两端分别添加 *Nco* I (C↓CATGG)和 *Bam* H I (G↓GATCC)限制性酶切位点, DNA 序列共 4 244 bp。目的基因片

段由上海捷瑞生物工程有限公司合成。将目的基因片段克隆至载体 pET-28a 中, 得到重组质粒 pET-28a-Cas9。热击法将重组 pET-28a-Cas9 转化至大肠杆菌 DH5α 中, 测序验证。提取测序正确的重组质粒, 通过电击转化法转入大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 使用含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 固体培养基筛选出阳性单克隆。

2.2 酿脓链球菌 Cas9 核酸酶的诱导表达

挑取含有 Cas9 目的基因片段的阳性单克隆接种于含 25 μg/mL 卡那霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 振荡培养 6 h, 获得种子液。按照 1% (体积比)的接种量将种子液转接至 LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 达到 0.6, 加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 调整培养温度至 25 °C, 继续培养 12 h。发酵结束后, 取发酵液于常温下 10 000 r/min 离心 20 min, 收集菌体并测定菌体湿重。每克湿菌体加入 10 mL 破胞缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0), 混悬后超声破碎菌体(工作时间 5 s, 间歇 10 s, 功率设置为 400 W, 循环工作 7 次), 收集上清进行 SDS-PAGE 电泳(10%分离胶)分析^[11]。

2.3 酶活性测定方法的建立

靶 DNA 来源于 T 细胞受体, 运用巢式 PCR 方法扩增获得, 共 1 089 bp。DNA 模板和 PCR 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成, 引物序列分别为:

F₁: 5'-CAGGTTTCCTTGAGTGGCAGGC-3';

R₁: 5'-TTGGACTTTTCCCAGCTGACAGA-3';

F₂: 5'-GCCTGGCCGTGAACGTTCACTG-3';

R₂: 5'-CTAGAATGGTGCTTCCTCTGGG-3'。

巢式 PCR 方法以 F₁、R₁ 为外引物, F₂、R₂ 为内引物进行扩增。反应体系(50 μL): DNA 模板 1 μL (内引物扩增时以第一次扩增产物 1 μL 为模板), 引物(10 μmol/L)各 3 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 3 μL, Trans Taq-T DNA 聚合酶(5 U/μL) 1 μL, 10×Trans Taq-T 缓冲液(200 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L

KCl, 100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 20 mmol/L MgSO_4 , pH 8.4) 5 μL , 双蒸水 34 μL 。第一次扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。第二次扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 循环 30 次; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。取扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行检测, 并使用 Easy Pure Quick Gel Extraction 试剂盒对琼脂糖凝胶中的 DNA 进行回收。

sgRNA 由南京金斯瑞生物科技有限公司构建完成, 其设计序列为: 5'-AGAGUCUCUCAGCUGGUACARARGRARGRURCRURCRURCRARGRURGRGRURARCRARGRURURURURARGRARGRCRURARURGRRCRU-3'。

SpyCas9 核酸酶酶活测定标准反应体系 (10 μL): 1 \times NEBufferTM 3.1 (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 10 mmol/L MgCl_2 , 1 mmol/L DTT, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BSA, pH 7.9), 60 ng 靶 DNA, 100 ng sgRNA, 150 ng Recombinant Cas9 protein (对照酶)。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min 后, 将反应体系置于 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 进行终止。酶活单位(U)定义为: 在上述反应体系下, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min 完全切割 1 μg 1 089 bp DNA 所需要的酶量, 定义为 1 个酶活力单位。

2.4 重组菌的高密度发酵表达

将甘油管保存的菌种按照 0.1% (体积比) 的接种量接种至含 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 30 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 6 h, 作为一级种子。再按照 0.1% (体积比) 的接种量转接至 100 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 振荡培养 12 h, 作为二级种子。然后按照 3.3% (体积比) 接种量接种至 3 L SM502 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 发酵培养 7-8 h 后溶解氧(dissolved oxygen, DO)飞速上升, 开始补料。补料培养基为 75% 甘油(质量体积比), 补料初速度为 12.0 mL/(L·h)。培养至 OD_{600} 达到 65-80 时, 加入终浓度为 0.3 mmol/L 的 IPTG 进行诱导, 调整培养温度为 25 $^{\circ}\text{C}$, 补料速度调整至

9.2 mL/(L·h), 维持 DO 在 40% 左右, 诱导 19 h 后结束发酵。将发酵液于常温下 10 000 r/min 离心 20 min, 弃发酵液上清, 收集菌体并测定菌体湿重。取所得湿菌体混悬于缓冲液 (20 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 8.0) 中洗涤 2 次, 然后将所得湿菌体置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冷藏备用。

2.5 酿脓链球菌 Cas9 核酸酶的分离纯化

2.5.1 硫酸铵沉淀

将湿菌体以 1:10 (质量体积比) 的比例重悬于预冷的匀浆缓冲液 A (20 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L 咪唑, 0.5 mmol/L TCEP, 1 mmol/L PMSF, pH 8.0) 中, 使用低温超高压连续流细胞破碎机 1 000 bar 匀浆 3 次。匀浆液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min 后取上清液, 即得粗酶液。向粗酶液中缓慢加入研细的固体硫酸铵(冰浴)^[12], 至 40% 饱和度, 搅拌 30 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液; 再向上清液中继续缓慢加入研细的固体硫酸铵(冰浴), 至 70% 饱和度, 搅拌 30 min 后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 20 min, 弃上清液, 将沉淀用缓冲液 B (50 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L TCEP, pH 8.0) 溶解至原体积。

2.5.2 镍柱亲和层析

将上述经硫酸铵沉淀处理过的样品过 Ni SepharoseTM excel (50 mL) 柱进行进一步纯化, 流速为 10 mL/min。先用平衡缓冲液 C (50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 1 mmol/L TCEP, pH 8.0) 平衡色谱柱, 平衡结束后上样, 用洗涤缓冲液 D (50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 30 mmol/L 咪唑, 1 mmol/L TCEP, pH 8.0) 冲洗 10 倍柱体积 (bed volume, BV), 然后用洗脱缓冲液 E (50 mmol/L Tris-HCl, 0.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L 咪唑, 1 mmol/L TCEP, pH 8.0) 进行线性洗脱, 对洗脱峰进行收集。

将洗脱液用 30 kD 超滤膜超滤置换于储存缓冲液 F (50 mmol/L Tris-HCl, 300 mmol/L NaCl, 0.1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L TCEP, 50% 甘油, pH 8.0) 中, 储存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。蛋白浓度使用 BCA 蛋

白质定量检测试剂盒进行测定^[13]。收集各步样品经 10% SDS-PAGE 分析, 并对合并后的纯化液进行酶活测定。

2.6 重组酶的酶学特性研究

2.6.1 重组酶的热稳定性

将纯化后的酶液分别置于 4、25、30、37、42、45 °C 下水浴, 15 min、30 min、1 h、2 h 后取出部分酶液在 37 °C 下进行活力测定, 以未经过热处理的酶液作为空白对照(100%)。

2.6.2 重组酶的酸碱稳定性

取酶液按 9:1 (体积比)的比例分别用不同 pH 值的缓冲液进行稀释, 于 25 °C 放置 2 h 后在 NEBuffer™ 3.1 中检测其剩余酶活力, 以最高酶活为 100%。用于稀释酶液的缓冲液体系包括: 0.2 mol/L 醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.0–5.0)、0.2 mol/L Na₂HPO₄-KH₂PO₄ 缓冲液(pH 5.0–7.0)、0.2 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 7.0–9.0)、0.2 mol/L Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.0–11.0)、0.2 mol/L NaOH-NaCl (pH 11.0–12.0)。

2.6.3 金属离子对重组酶活力的影响

配制不同浓度的金属盐溶液, 按照一定比例加入到反应体系中, 使金属离子终浓度分别达到 0.5、2.5、5.0、10.0、20.0 mmol/L, 所选择的金属离子包括 Mg²⁺、Ba²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺。反应体系(10 μL): 1×Reaction buffer (50 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, 1 mmol/L DTT, 100 μg/mL BSA, pH 7.9), 60 ng 靶 DNA, 100 ng sgRNA, 150 ng 纯化后 Cas9 核酸酶。在 37 °C 条件下测定不同金属离子对 SpyCas9 核酸酶活力的影响, 以未添加金属离子的酶液作为空白对照(100%)。

3 结果与分析

3.1 重组酶的表达验证

重组 BL21(DE3) (pET-28a-Cas9)破胞上清液的 SDS-PAGE 电泳结果如图 1 所示, 特征条带与目标

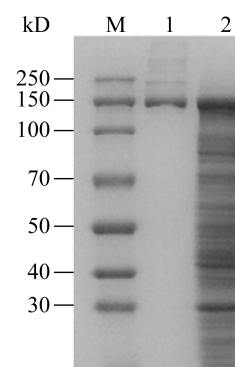


图 1 重组表达 SpyCas9 核酸酶的 SDS-PAGE 分析

Figure 1 SDS-PAGE analysis of the recombinant expression of SpyCas9 nuclease

注: M: 多色预染蛋白 Marker; 1: 对照酶; 2: 破胞上清液.

Note: M: Dual color prestained protein marker; 1: Reference enzyme; 2: Cellular supernatant.

蛋白分子量大小接近, 且与对照酶表达在相同位置, 表明重组 SpyCas9 核酸酶在胞内成功表达。

3.2 重组酶的活性测定

靶 DNA 中 SpyCas9 核酸酶的切割位点如图 2 所示, 酶切后形成的两个 DNA 片段分别为 774 bp 和 315 bp。使用 1.5%琼脂糖凝胶电泳测定两个 DNA 裂解片段(774 bp 和 315 bp) (图 3), 将凝胶置于凝胶成像系统中扫描成像和分析。

3.3 重组酶的高密度发酵和纯化

重组菌经高密度发酵表达后, 发酵液最终体积为 3.42 L, OD₆₀₀ 为 184.8, 菌体湿重为 191.0 g/L。经硫酸铵沉淀和镍柱亲和层析两步纯化后的 SpyCas9 核酸酶已具有较高纯度, 且具有核酸酶活性(图 4 和图 5)。重组酶的比酶活为 641.29 U/mg, 回收率达 46.40%, 纯化倍数为 16.02 (表 1)。

3.4 重组酶的酶学特性分析

3.4.1 重组酶的热稳定性

酶液在不同温度(4–45 °C)下分别水浴 15 min、30 min、1 h、2 h 后的酶活测定结果如图 6 所示。SpyCas9 核酸酶的热稳定性较差, 4 °C 时酶活较稳定; 30 °C 保温 2 h 后剩余酶活为 75%; 42 °C 保温 2 h 后酶活剩余 67%左右; 45 °C 保温 15 min 后活力全部丧失。

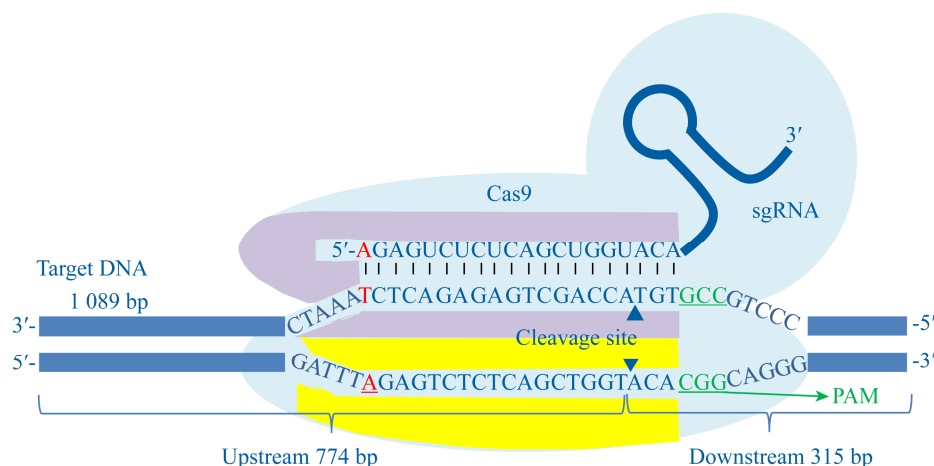


图2 SpyCas9 核酸酶酶切示意图

Figure 2 Schematic illustration of SpyCas9 nuclease digestion

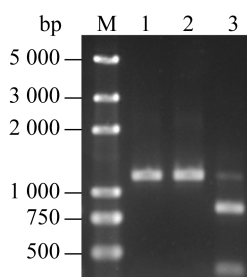


图3 琼脂糖凝胶电泳检测裂解条带

Figure 3 Detection of lysed bands on agarose gel electrophoresis

注: M: Trans2k plus DNA marker; 1: 无 SpyCas9 核酸酶阴性对照; 2: 无 sgRNA 阴性对照; 3: 正常反应.

Note: M: Trans2k plus DNA marker; 1: Negative control without SpyCas9 nuclease; 2: Negative control without sgRNA; 3: Normal response.

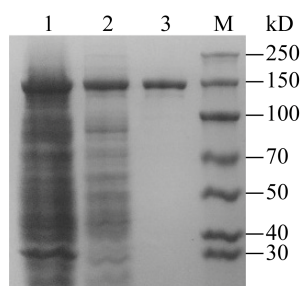


图4 各步纯化样品的 SDS-PAGE 分析

Figure 4 SDS-PAGE analysis of purification samples in each process

注: 1: 粗酶液; 2: 硫酸铵沉淀后样品; 3: 纯化后的 SpyCas9 核酸酶; M: 多色预染蛋白 Marker.

Note: 1: Crude enzyme; 2: Sample after ammonium sulfate precipitation; 3: Purified SpyCas9 nuclease; M: Dual color prestained protein marker.

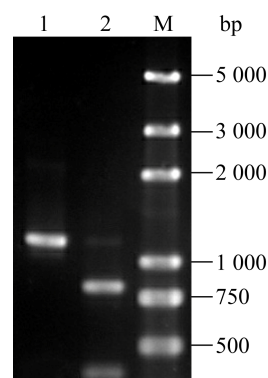


图5 纯化后 SpyCas9 核酸酶的活性测定

Figure 5 Determination of activity of purified SpyCas9 nuclease

注: M: Trans2k plus DNA marker; 1: 无 SpyCas9 核酸酶阴性对照; 2: 纯化后 SpyCas9 核酸酶.

Note: M: Trans2k plus DNA marker; 1: Negative control without SpyCas9 nuclease; 2: Purified SpyCas9 nuclease.

3.4.2 重组酶的酸碱稳定性

SpyCas9 核酸酶的酸碱稳定性(pH 3.0–12.0)结果如图7所示, SpyCas9 核酸酶在 pH 为 9.0 时稳定性最高, 在 pH 6.0–10.0 条件下剩余酶活大于 68%。

3.4.3 金属离子对重组酶活力的影响

8 种金属离子对 SpyCas9 核酸酶活力的影响结果如图8所示, 0.5–20.0 mmol/L 浓度范围内的 Mg^{2+} 对该酶有激活作用, 当 Mg^{2+} 浓度为 10.0 mmol/L 时, SpyCas9 核酸酶活力与原来相比提高了 23%左

表 1 SpyCas9 核酸酶的分离纯化结果

Table 1 Purification results of SpyCas9 nuclease

过程	总活力	总蛋白	比酶活	回收率	纯化倍数
Procedure	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery rate (%)	Purification folds
粗提取	782 615.20	19 548.00	40.04	100.00	1.00
Cude extraction					
硫酸铵沉淀	428 026.50	7 213.50	59.34	54.70	1.48
Ammonium sulfate precipitation					
镍柱亲和层析	363 207.10	566.37	641.29	46.40	16.02
Ni ²⁺ -affinity chromatography					

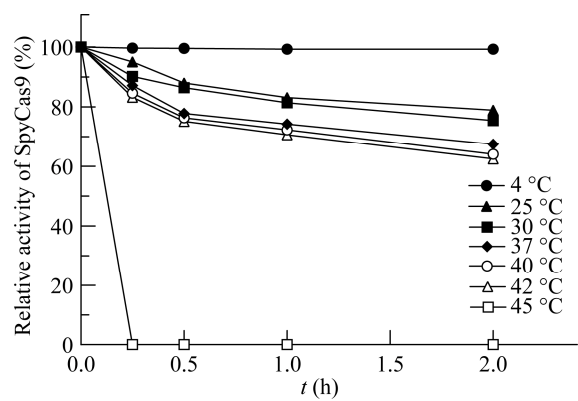


图 6 不同温度下 SpyCas9 核酸酶的热稳定性
Figure 6 Thermal stability of SpyCas9 nuclease at different temperatures

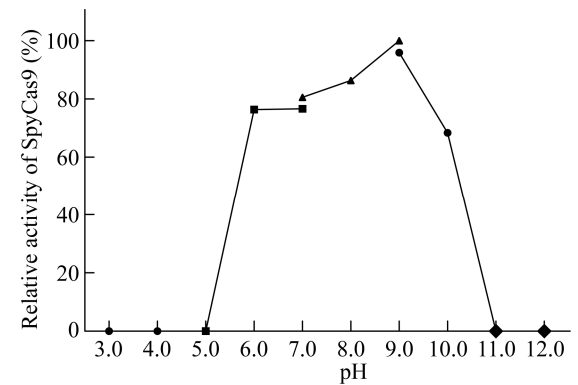


图 7 pH 对 SpyCas9 核酸酶活力的影响
Figure 7 pH dependence of SpyCas9 nuclease

右；随着 Mg^{2+} 浓度的继续升高，酶活力下降，当 Mg^{2+} 浓度为 20.0 mmol/L 时，其活力与原来相比仍提高了 18.2% 左右。

Ba^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{2+} 和 Zn^{2+} 这 7 种金属离子均能不同程度地抑制 SpyCas9 核

酸酶的活力。0.5 mmol/L 的 Cu^{2+} 和 Fe^{2+} 对该酶有完全抑制作用；同浓度的 Zn^{2+} 使酶活力降低至原来的 61.2% 左右，当 Zn^{2+} 浓度继续升高至 2.5 mmol/L 时，酶活力丧失；2.5 mmol/L 的 Co^{2+} 使剩余酶活力保持在 90% 左右，当 Co^{2+} 浓度继续升高至 5.0 mmol/L 时，酶活力丧失。 Mn^{2+} 和 Ca^{2+} 对 SpyCas9 核酸酶活力的抑制作用相对较小，10.0 mmol/L 的 Mn^{2+} 使剩余酶活力保持在约 94.6%，但当 Mn^{2+} 离子浓度继续升高至 20.0 mmol/L 时，其活力降低至原来的 54.3%；0.5–10.0 mmol/L 的 Ca^{2+} 对该酶活力无显著影响，当 Ca^{2+} 浓度继续升高至 20.0 mmol/L 时，其活力降低至原来的 60.7%。

4 讨论与结论

CRISPR/Cas9 技术相较于锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFNs)技术和类转录激活因子效应物核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术而言，具有靶向精确、脱靶率低、细胞毒性低、廉价简便等优势。国内外研究者近年来不断拓展 CRISPR/Cas9 技术的应用范围。Ng 等验证了 CRISPR/Cas9 系统用于对小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)中候选肿瘤抑制基因缺失进行建模的可行性^[14]，有助于进一步验证 SCLC 的治疗靶点。Xu 等基于 CRISPR/Cas9 技术建立了在人成体造血干细胞上进行 CCR5 基因编辑的技术体系^[15]，实现了经基因编辑后的成体造血干细胞在人体内长期稳定地重建造血系统。Jubair 等借助 CRISPR/Cas9 技术利用隐形纳米颗粒成功在小鼠体内靶向对宫颈癌进行了治疗^[16]。

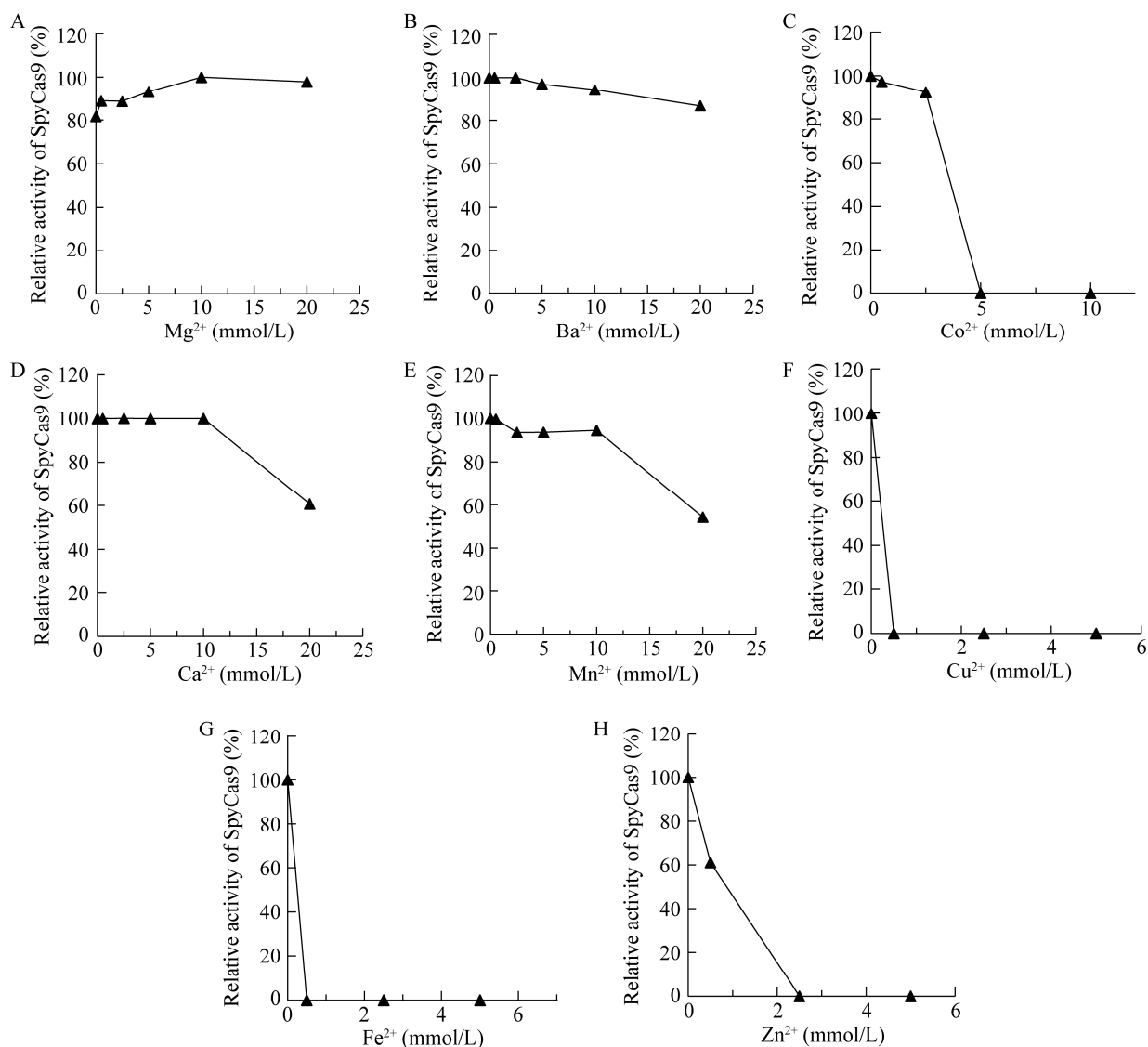


图8 金属离子对 SpyCas9 核酸酶活力的影响

Figure 8 Effect of metal ions on SpyCas9 nuclease assay

通过不断革新和优化, CRISPR/Cas9 技术将为功能生物学、生物技术和基因治疗等各领域带来新的契机。目前 SpyCas9 核酸酶已经成为基因组编辑和基因调节中最常见且最有力的工具酶。

本研究采用硫酸铵沉淀和镍柱亲和层析的纯化方法, 结合体外活力凝胶电泳检测方法, 获得了较高纯度、比酶活达 641.29 U/mg 的 SpyCas9 核酸酶, 酶学性质研究表明, 该酶对热较敏感。Harrington 等使用差示扫描量热法 (differential

scanning calorimetry, DSC) 测定了 *Streptococcus pyogenes* Cas9 的变性温度为 45 °C^[17], 并验证了其在 45 °C 保温 10 min 后活力大大降低。本研究发现 SpyCas9 核酸酶在 45 °C 保温 15 min 后活力全部丧失, 与 Harrington 等^[17]的研究结果一致。另外, 本研究发现, SpyCas9 核酸酶可在较广的碱性条件下维持较高稳定性, 在 pH 6.0–10.0 条件下剩余酶活大于 68%; 0.5–20.0 mmol/L 的 Ba²⁺、Co²⁺、Ca²⁺、Mn²⁺、Cu²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺ 等 7 种金属离子对酶活也

均有不同程度的抑制作用, 同浓度范围内的 Mg^{2+} 对该酶有激活作用, 其中 10.0 mmol/L 的 Mg^{2+} 对酶活的激活作用最高。这些研究为 SpyCas9 核酸酶的进一步体外研究和后续合理开发提供了理论依据, 对 CRISPR/Cas9 技术的进一步推广和应用具有一定的指导意义。

REFERENCES

- [1] Horvath P, Barrangou R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170
- [2] Wiedenheft B, Sternberg SH, Doudna JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea[J]. *Nature*, 2012, 482(7385): 331-338
- [3] Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2014, 15(5): 321-334
- [4] Jinek M, Jiang FG, Taylor DW, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. *Science*, 2014, 343(6176): 1247997
- [5] Chen HF, Choi J, Bailey S. Cut site selection by the two nuclease domains of the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(19): 13284-13294
- [6] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821
- [7] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(39): E2579-E2586
- [8] Ma CX, Ha K, Kim MS, et al. The anaphase promoting complex promotes NHEJ repair through stabilizing Ku80 at DNA damage sites[J]. *Cell Cycle*, 2018, 17(9): 1138-1145
- [9] Zhang XH, Tee LY, Wang XG, et al. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering[J]. *Molecular Therapy—Nucleic Acids*, 2015, 4: e264
- [10] Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in luria-bertani broth[J]. *Journal of Bacteriology*, 2007, 189(23): 8746-8749
- [11] Gao YL, Yang SW, Fan KQ, et al. Development of SDS-PAGE in protein[J]. *Liaoning Chemical Industry*, 2007, 36(7): 460-463 (in Chinese)
高艳利, 杨思文, 樊凯奇, 等. SDS-PAGE 电泳技术分析蛋白质的研究[J]. *辽宁化工*, 2007, 36(7): 460-463
- [12] Zhang XJ, Abell C. The determination of saturation percentages of ammonium[J]. *Journal of Guizhou University of Technology (Natural Science Edition)*, 2000, 29(6): 25-29 (in Chinese)
张学俊, Abell C. 酶的硫酸铵沉淀浓度范围的确定[J]. *贵州工业大学学报: 自然科学版*, 2000, 29(6): 25-29
- [13] Li HL, Peng SM, Li L, et al. Studies on four conventional methods for protein determination[J]. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*, 2008, 29(4): 277-278, 282 (in Chinese)
李海玲, 彭书明, 李凇, 等. 4 种常用蛋白浓度测定方法的比较[J]. *中国生化药物杂志*, 2008, 29(4): 277-278, 282
- [14] Ng SR, Rideout III WM, Akama-Garren EH, et al. CRISPR-mediated modeling and functional validation of candidate tumor suppressor genes in small cell lung cancer[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(1): 513-521
- [15] Xu L, Wang J, Liu YL, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2019, 381(13): 1240-1247
- [16] Jubair L, Fallaha S, McMillan NAJ. Systemic delivery of CRISPR/Cas9 targeting HPV oncogenes is effective at eliminating established tumors[J]. *Molecular Therapy*, 2019, 27(12): 2091-2099
- [17] Harrington LB, Paez-Espino D, Staahl BT, et al. A thermostable Cas9 with increased lifetime in human plasma[J]. *Nature Communications*, 2017, 8: 1424