DOI: 10.3724/SP.J.1006.2020.93064

基于 CRISPR/Cas9 核糖核蛋白体 DNA 定点内切酶体外活性建立高效基因型分析技术

王 南¹ 祁显涛^{1,2} 刘昌林¹ 谢传晓^{1,*} 朱金洁^{1,*}

¹ 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; ² 安徽农业大学, 安徽合肥 230036

摘 要: 建立快速、准确、高通量与简便易行的基因型分析技术对基因功能解析、分子育种与突变体鉴定研究具有重要价值。本研究的目标是利用 Cas9 或 Cas9NG 变体与单分子指导 RNA (single guide RNA, sgRNA) 核糖核蛋白复合体 (sgRNA/Cas9-RNP 或 sgRNA/Cas9NG-RNP) 体外 DNA 定点内切酶活性, 建立与优化简便高效与低成本的基因型分析技术。以我们前期创制的 CRISPR/Cas9 定点编辑玉米 *ZmWx* 基因第 7 外显子区域定点突变基因编辑后代分离群体为材料, 以 *ZmWx* 靶位点两侧特异引物扩增的 PCR 产物为底物, 利用原核表达并纯化的 Cas9 或 Cas9-NG 蛋白为 DNA 内切酶, 以体外转录的靶向 *ZmWx* 基因靶点的 sgRNA 或骨架序列优化的 sgRNA (enhanced sgRNA, esgRNA) 为 Cas9 或 Cas9-NG 酶定点活性指导元件, 通过体外组装为 sgRNA/Cas9-RNP 复合体, 对目标样本进行酶切, 以区分目标位点野生型、纯合突变体、杂合突变体基因型, 并对反应体系进行了优化。研究表明, 基于 esgRNA/Cas9 的 PCR/RNP 检测技术可对 *ZmWx* 基因编辑目标突变体后代进行快速有效的基因型鉴定; 实验体系优化结果表明, esgRNA/Cas9 蛋白质量比为 1 : 1, 各为 1 μg, 20 μL 反应体系, 37℃ 酶切 0.5 h, 可对 500 ng 待测 DNA 底物充分酶切并确定基因型; esgRNA/Cas9NG 反应体系优化结果表明, 当 esgRNA 与 Cas9-NG 蛋白均为 2 μg 时, 37℃ 酶切 4 h, 可对 500 ng DNA 底物进行酶切并实现基因型分析。利用 Cas9NG 拓宽靶位点检测范围的研究结果, 暗示 Cas9NG 是以牺牲核酸酶酶切活性为代价降低了 Cas9 蛋白对 PAM (protospacer adjacent motif, PAM) 基序 NGG 序列的依赖性, 实现 PAM-NG 基序识别能力, sgRNA/Cas9NG 检测效率等仍有待提升与优化。本研究为基因功能解析、分子育种与突变体鉴定等研究提供了一套简便、成本低廉的技术方法, Cas9NG 体外内切酶活性及其效率也为该 Cas9 突变体活体基因编辑技术研发提供了参考数据。

关键词: sgRNA/Cas9 核糖核蛋白复合体; Cas9NG; 优化 sgRNA (esgRNA); 基因型分析; 突变体筛选

Establishment of an efficient genotyping technique based on targeted DNA endonuclease *in vitro* activity of CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein

WANG Nan¹, QI Xian-Tao^{1,2}, LIU Chang-Lin¹, XIE Chuan-Xiao^{1,*}, and ZHU Jin-Jie^{1,*}

¹ Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China

Abstract: Establishing a rapid, accurate, high-throughput and easily implementable genotyping method is highly desirable for functional genomics, genetic improvement and mutant screening. Here, we describe a convenient and inexpensive technique for genotyping using the targeted DNA endonuclease activity of Cas9 or Cas9NG ribonucleoproteins complex (sgRNA/Cas9-RNP or sgRNA/Cas9NG-RNP). In this study, Cas9 and Cas9NG protein purified from *E. coli* extract was assembled with *in vitro* transcribed single guide RNA (sgRNA) or enhanced sgRNA (esgRNA) as an assembled ribonucleoprotein (RNP) complex to fulfill the targeted endonuclease activity on the PCR amplicons of *ZmWx* exon 7. The restriction profiles can be converted into genotyping

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项(2019ZX08010-003)资助。

This study was supported by the National Major Project of Developing New GM Crops (2019ZX08010-003).

* 通信作者(Corresponding authors): 谢传晓, E-mail: xiechuanxiao@caas.cn; 朱金洁, E-mail: zhujinjie@caas.cn

第一作者联系方式: E-mail: 2720409346@qq.com

Received (收稿日期): 2019-12-18; Accepted (接受日期): 2020-03-24; Published online (网络出版日期): 2020-04-10.

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200410.1406.004.html>

results of wildtype, homozygous or heterozygous mutant, respectively. Our data showed that *ZmWx* gene-edited mutants can be genotyped rapidly and efficiently by the sgRNA-optimized system esgRNA/Cas9. The reaction component optimization data suggested that 500 ng of DNA substrates could be cleaved completely by incubating with 1 μ g 1:1 molar ratio of esgRNA/Cas9 ribonucleoproteins for 30 minutes at 37°C, or by 4 μ g 1:1 molar ratio of esgRNA/Cas9NG ribonucleoproteins for 4 hours at 37°C. Expanding the targeting flexibility of mutant detection via esgRNA/Cas9NG indicated that Cas9NG variant might recognize relax NG PAM (protospacer-adjacent-motif, PAM) at the expense of decreasing restriction activity, which is necessary to improve the activity of esgRNA/Cas9NG by further optimization. Therefore, the establishment and application of esgRNA/Cas9 based PCR/RNP technique provides an easy, simple and low-cost approach to genotyping in functional genomics, molecular breeding and mutant screening. In addition, our *in vitro* data on esgRNA/Cas9NG has certain and significant reference value for developing it into *in vivo* genome editing studies.

Keywords: sgRNA/Cas9 ribonucleoprotein complex; Cas9NG; enhanced single guide RNA (esgRNA); genotyping; mutant screening

2012 年 9 月, Jinek 等^[1]在体外验证了 sgRNA/Cas9 核糖核蛋白复合体具有 DNA 定点剪切的活性。次年, 张峰课题组首次报道了 CRISPR/Cas9 在人类细胞中定点编辑 DNA 的活性^[2]。自此, 基因编辑技术成为生命科学领域的技术发展前沿, 研究热度呈指数级增长。CRISPR/Cas 基因编辑技术不仅可应用于基因敲除、基因插入、定点突变与染色体重组等遗传操作^[3-6], 而且还派生出如碱基编辑、转录激活或抑制、表观修饰以及 DNA 与 RNA 原位示踪成像等一系列重要的遗传学工具^[7-11]。然而, 对该系统的体外应用却鲜有报道。基于该系统的 DNA 定点剪切的功能, 该系统可进一步开发为位点限制性内切酶, 拓展普通限制性内切酶无法靶向的位点, 从而满足日益增长的基因型快速鉴定的需求。

目前, 应用最广泛的为组分优化的 II 型 CRISPR/Cas9 系统, 由 Cas9 与 sgRNA 两个元件组成。在 sgRNA 的指导下, Cas9 蛋白可在 PAM 基序上游的 3 nt 处特异性剪切 DNA 双链^[12]。为打破 Cas9 蛋白对 PAM 序列的依赖性, 科学家们已开发多种识别不同 PAM 序列的 Cas9 蛋白变体^[13], 其中, 基于蛋白结构优化获得的 Cas9NG 的靶向范围最广^[14]。目前, 不同版本的 CRISPR/Cas9 系统已经广泛应用于不同物种的植物基因组编辑^[15-17]。基于经典的 CRISPR/Cas9 系统, 我国科学家首次创建了水稻的 CRISPR/Cas9 突变体库^[18], 我们课题组也针对玉米的 *ZmWx*^[19-20]、*ZmLgl*^[21]、*ZmMTL*^[22]等多个位点实现 DNA 的定点编辑, 获得了多个具有重要育种价值的突变体材料。如何对基因编辑突变体进行快速的基因型鉴定成为当前该技术发展亟待解决的重要问题。此外, 除基因编辑突变体具有基因型快速鉴定的需求外, 任何基于 DNA 序列变异的位点均需要一种快速、经济、可靠、高效与高通量的基因型鉴定技术。例如, 人工诱变及化学诱变群体突变体的快

速筛选、基因功能解析中分离群体中个体的基因型快速鉴定、突变体基因型的快速鉴定等, 因此, 建立高效简便的方法对于功能基因组研究与作物分子育种等均具有重要的应用价值。

目前, 用于植物突变体基因型鉴定的技术主要包括 PCR 限制性内切酶酶切(PCR/RE)、错配特异性核酸酶酶切(T7E I/Surveyor assay)、Sanger 测序、二代测序(Next-generation sequencing, NGS)及高分辨率溶解曲线分析(High-resolution melting analysis, HRMA)等, 这些技术都存在自身的优点, 但同时也有局限性。PCR/RE 技术严重依赖于突变碱基附近的限制性内切酶识别位点, 限制了靶点设计的自由度从而限制了其范围^[23]。基于 DNA 双链错配原理的 T7E I 或 CEL I 酶切检测, 商业酶价格高昂, 技术上也存在不能有效区分纯合突变与野生型以及杂合突变与双等位基因突变的限制^[24]。Sanger 测序虽可直观地呈现靶点突变信息, 但其价格昂贵, 不适用于大规模突变群体检测。NGS 及衍生的 Hi-TOM 技术主要适用于高通量筛选鉴定, 无法满足对小量与中量样本突变体材料早期快速鉴定的需要^[25]。2018 年高彩霞团队首先尝试开发了基于 CRISPR-Cas9 系统的 PCR/RNP 技术^[26], 该技术不受限制性酶切位点选择的局限, 同时可精准区分野生型、纯合突变及杂合突变等基因型, 成本低廉、快速高效, 可实现突变体高通量筛选, 但检测体系仍需要优化, 进一步提高检测效率、特异性与灵敏度, 才能进一步推广应用。

本研究的目标是建立与优化基于 CRISPR/Cas9 与 CRISPR/Cas9NG 核糖核蛋白体定点 DNA 内切酶体外活性的基因型高效分析技术, 为该技术的高效应用奠定完善的技术方案。本研究利用原核表达并纯化的 Cas9 蛋白或 Cas9NG 蛋白为 DNA 内切酶, 以体外转录的靶向 *ZmWx* 基因靶点的 sgRNA 或

esgRNA 为向导 RNA 分子, 通过体外组装为 sgRNA/Cas9-RNP 复合体, 对实验室通过基因编辑手段获得的玉米 *ZmWx* 突变体靶点 PCR 产物进行酶切, 从而实现对突变体的基因型分析。本研究将为突变体的高效基因型分析提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

基于ZC01 玉米自交系背景创制的靶向*ZmWx*基因 CRISPR-Cas9 基因编辑等待基因型分析的玉米材料^[19], BL21(DE3)大肠杆菌表达感受态(北京全式金生物技术有限公司, 货号 3CD801), PET30a-Cas9 载体(构建), PET 30a-Cas9NG载体(构建)。

1.2 方法

1.2.1 Cas9 及 Cas9NG 蛋白的原核表达载体构建

从本实验室保存载体上设计引物(表 1), 扩增获得 Cas9 片段, 使用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Nhe* I 双酶切 PET 30a 载体, 琼脂糖凝胶电泳分离后, 进行胶回收纯化。回收纯化的 Cas9 片段与 PET 30a 线性载体, 用 NEB 组装酶(北京 NEB 公司) 50℃, 1 h 进行组装, 转化至 BL21(DE3)大肠杆菌表达感受态中, 均匀涂布在卡那抗性的 LB 固体培养基上, 37℃过夜培养, 挑取单克隆酶切鉴定, 将获得的阳性克隆质粒送上海英潍捷基公司测序。测序结果与 Snapgene 载体图谱比对一致, 即获得 PET 30a-Cas9 载体。用上述方法, 将限制性内切酶 *Nhe* I 替换为 *Hind* III, 构建得到 PET 30a-Cas9NG 载体。

1.2.2 Cas9 及 Cas9NG 蛋白的原核表达与纯化

将构建好的融合 His 标签的 Cas9 和 Cas9NG 蛋白原核表达载体转化到原核表达菌株 BL21(DE3)中。挑取单克隆, 2 次扩大培养至 OD₆₀₀ 在 0.7~0.8 之间。冰浴后加入 0.5 mol L⁻¹ IPTG 溶液诱导蛋白表达。以下步骤均在 4℃进行: 超声破碎裂解后, 取上清, 进行 Ni-NTA 琼脂糖介质亲和层析, 然后进行阳离子交换柱层析, 收集各组分进行 10% SDS-PAGE 鉴定, 根据凝胶电泳结果收集含有洗脱蛋白的各组分, 最后, 用 100,000-MWCO 蛋白超滤管将含有洗脱蛋白的组分缓冲液替换为蛋白存储液(50 mmol L⁻¹ Hepes, 150 mmol L⁻¹ KCl, 1 mmol L⁻¹ TCEP, 20% Glycerol, pH 7.5)。分装后液氮速冻, 于 -80℃冰箱保存备用。

1.2.3 Cas9 及 Cas9NG 蛋白的定量 对待测样品进行 BSA (bovine serum albumin) 粗定量后, 使用 BCA 蛋白快速测定试剂盒进行蛋白精确定量(上海英潍捷基公司), 首先制备蛋白标准品梯度稀释液和

BCA 工作液, 然后分别取标准品和待测样品 20 μL 加入到微孔板中, 之后加入 20 μL 工作试剂, 充分混匀, 震荡 30 s, 室温静置 5 min, 用分光光度计测量蛋白标准品和待测样品在 480 nm 处的吸光度。最后作出蛋白标准品吸光度相对于浓度的标准曲线, 根据待测样品在 480 nm 处的吸光度, 在标准曲线上查出待测样品相当于标准蛋白的量, 从而计算得出待测样品的浓度。

1.2.4 RNA 体外转录 利用引物重叠 PCR 原理, 设计引物 sgRNA scaffold F、sgRNA scaffold R (表 1) 扩增获得 sgRNA 转录模板, 用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 回收纯化。使用 T7 转录试剂盒(北京 NEB 公司)进行体外转录, 体外转录体系为 2 μL 模板, 15 μL NTP Mix, 3 μL T7 转录酶, RNase-free H₂O 补至 40 μL。37℃ 孵育 3.5 h。结束后, 加入 2 μL DNase I、8 μL RNase-free H₂O 消化模板 DNA。然后用 RNA 纯化浓缩试剂盒(ZYM 公司)进行纯化浓缩, 分光光度计测得浓度后, 通过 10% Urea-PAGE 鉴定 sgRNA 的质量。液氮冷冻, -80℃ 保存备用。采用相同方法获得高纯度 esgRNA。

1.2.5 *ZmWx* 突变体 DNA 提取 切取玉米 *ZmWx* 突变体种子部分, 充分研磨, 置于 1.5 mL EP 管中, 加入 1 mL 裂解缓冲液(10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol L⁻¹ EDTA, pH 8.0, 0.1% SDS, pH 8.0), 混匀后于 65℃ 水浴 1 h, 10,000×g 离心 2 min, 小心吸取上清液于一支新的 1.5 mL EP 管中, 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25 : 24 : 1)(北京酷来博生物技术有限公司), 充分混匀后, 10,000×g 离心 10 min, 吸取上清液于一支新的 1.5 mL EP 管中, 加入 0.2 倍体积 7.5 mol L⁻¹ 的醋酸铵和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA, 10,000×g 离心 1 min, 弃上清液, 用 70% 无水乙醇洗涤 2 次, 弃上清液, 室温干燥, 用 0.2 mL TE 溶液溶解 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2.6 PCR/RNP 酶切 以种子 DNA 为模板, 设计引物 *ZmWx* F、*ZmWx* R (表 1), 通过 PCR 扩增 sgRNA 靶标两侧各 300~500 bp 序列。PCR 程序为 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 25 s, 63℃ 退火 25 s, 72℃ 延伸 30 s, 35 个循环; 72℃ 总延伸 2 min; 4℃ 保存。将 X μg Cas 蛋白、X μg esgRNA、2 μL Buf 3.1 (北京 NEB 公司) 和 (12-X) μL RNase-free H₂O 混合均匀, 37℃ 孵育 0.5 h 进行预组装, 加入 6 μL PCR 产物, 37℃ 孵育 2 h。然后加入 2 μL RNaseA, 37℃ 孵育 15 min 以消化 RNA, 65℃ 孵育 20 min 使蛋白质变性, 终止反应。结束后进行 2%

琼脂糖凝胶电泳检测。将 *ZmWx* 突变体 PCR 产物送上海英潍捷基公司测序, 以验证酶切检测结果。

1.2.7 引物设计 本研究所用引物除 *ZmWx* F、*ZmWx* R 由 Primer premier 软件设计外, 其他引物均由 Snapgene 软件设计, 并委托上海英潍捷基公司合成。引物信息见表 1。

2 结果与分析

2.1 CRISPR-Cas9、Cas9NG 蛋白原核表达与纯化

构建 Cas9 与 Cas9NG 蛋白原核表达载体, 载体的主要元件有 T7 启动子、Lac 操纵子、His 蛋白纯化标签、目标蛋白的 CDS 序列及 T7 终止子等(图 1-A)。通过亲和纯化与阳离子交换纯化两步法对原核表达的 Cas9 与 Cas9NG 蛋白纯化后, 获得纯度较高的 Cas9 与 Cas9NG 蛋白制品(图 1-B, C)。结果表明, 收集 1 L 诱导表达的大肠杆菌可纯化约 4 mg 的 Cas9 蛋白, 且经过阳离子交换柱二次纯化获得的蛋白样品, 纯度显著提高。经过一次原核表达及纯

化所获得的蛋白制品在产量和纯度上可满足后续酶切实验需要。

2.2 RNA 的体外转录与基于 esgRNA/Cas9-RNP 和 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系的初建立

目前, 应用最为广泛的 sgRNA 骨架序列为 81 nt (图 2-A), 后续研究发现将 sgRNA 骨架序列的 poly U 位点的第 4 个碱基突变为 C 以及延长 RNA 双链部分 5 个碱基对(图 2-B), 可有效提高基因编辑的效率^[27-28]。因此, 本研究采用两种 sgRNA 骨架序列进行 Cas9-RNP 与 Cas9NG-RNP 实验体系的建立。首先, 设计体外转录靶向本实验室已发表 *ZmWx* 基因编辑位点的 sgRNA 或 esgRNA 引物, 见表 1 所示。通过 PCR 扩增获得体外转录的 DNA 模板后, 利用 T7 转录酶进行体外 RNA 转录, 转录产物经过纯化后, 经 10% Urea-PAGE 电泳鉴定。结果显示, 经过体外转录的 sgRNA 条带大小在 100 nt 左右, esgRNA 条带大小在 110 nt 左右, 与预期 RNA 条带大小一致且质量较好, 纯化后 esgRNA 有部分杂带(图 2-C), 推测可能是由体外转录 DNA 模板回收不纯所致。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primer sequences used in this paper

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'-3')
Cas9 F	GACGACGACGACAAGGCCATGATGGACAAGAAGTACTCCA
Cas9 R	TCGACGGAGCTCGCTAGCGTCGCCGCCGAGCTGGGAGAGG
Cas9NG F	ACGACGACGACAAGGCCATGGACAAGAAGTACTCCATCGGC
Cas9NG R	CTCGAGTGC GGCCGCAAGCTTGTCCGCCGCGAGCTGGCTCAG
sgRNA scaffold F	GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAG
sgRNA scaffold R	AAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAA
esgRNA scaffold F	GTTTCAGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGCAAGTTGAAATAAGGCTAGTCCGTTATC
esgRNA scaffold R	AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTC
<i>ZmWx</i> F	CATACTTCTCCGGACCATAACGGTAA
<i>ZmWx</i> R	TCCCTGCTGGGGTCCCACTC
T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGAGGTTTCAGCTCCGGGTAGTGTTCAGAGCTAGAAA
eT7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGAGGTTTCAGCTCCGGGTAGTGTTCAGAGCTATGCT
Target1 T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGTTTCAGCTCCGGGTAGTCCGGTTTCAGAGCTATGCT
Target2 T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGCTCCGGGTAGTCCGAGAAGGGTTTCAGAGCTATGCT
Target3 T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGCTTCTCCGACTACCCGGAGCGTTTCAGAGCTATGCT
Target4 T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGTTTCGCTTCTCCGACTACCCGTTTCAGAGCTATGCT
Target5 T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGCCTTCTCCGACTACCCGGAGTTTCAGAGCTATGCT
Target6 T7 F	AAGCTAATACGACTCACTATAGCAGCTCCGGGTAGTCCGAGAGTTTCAGAGCTATGCT
T7 R	AAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTT

图 1 Cas9 与 Cas9NG 蛋白的原核表达及纯化

Fig. 1 Purification of Cas9 and Cas9NG protein

A: 原核表达载体结构示意图; B: Cas9 纯化蛋白 10% SDS-PAGE 胶图; C: Cas9-NG 纯化蛋白 10% SDS-PAGE 胶图。M: Protein marker; 1: 上清液中蛋白; 2: Ni 柱纯化蛋白; 3: 阳离子交换柱纯化蛋白。

A: Schematic diagram of protein expression vector; B: 10% SDS-PAGE of purified Cas9; C: 10% SDS-PAGE of purified Cas9NG. M: Protein marker. 1: Supernatant protein; 2: Ni-column crude purified protein; 3: Cation exchange column purification protein.

图 2 sgRNA、esgRNA 体外转录及基于 esgRNA/Cas9-RNP 和 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系的建立

Fig. 2 *In vitro* transcription of sgRNA and esgRNA, as well as the establishment of cleavage assay via esgRNA/Cas9-RNP and esgRNA/Cas9NG-RNP

A: sgRNA 二级结构图; B: esgRNA 二级结构图; C: RNA 的 10% Urea-PAGE 胶图; D: PCR/RNP 酶切检测; CK: 未加 esgRNA 和 Cas 蛋白的 *ZmWx* 野生型 PCR 产物。

A: Predicted secondary structure of sgRNA; B: Predicted secondary structure of esgRNA; C: 10% Urea-PAGE of sgRNA and esgRNA; D: PCR/RNP cleavage assay; CK: *ZmWx* wild PCR product without esgRNA and Cas protein.

以野生型 *ZmWx* 种子 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增 sgRNA 靶标两侧各 300~500 bp 序列, 作为酶切底物。然后将 Cas9 蛋白、Cas9NG 蛋白分别与

sgRNA、esgRNA 预组装为 4 种 RNP 复合体, 对 PCR 产物进行酶切, 结束后进行琼脂糖凝胶电泳检测, 以验证 RNP 活性。结果显示, sgRNA/Cas9-RNP 或

sgRNA/Cas9NG-RNP 在 *ZmWx* 位点上不具有酶切活性, 底物 DNA 均没有被切开。而基于 esgRNA/Cas9-RNP 或基于 esgRNA/Cas9NG-RNP 可对 *ZmWx* 靶点底物 DNA 进行充分酶切, 酶切产生 400 bp 与 500 bp 两条 DNA 条带(图 2-D)。

2.3 基于 esgRNA/Cas9-RNP 和 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系的优化及其对不同基因型的区分

针对 esgRNA/Cas9-RNP 或 esgRNA/Cas9NG-RNP 两种突变体基因型检测方法进行酶切体系的进一步优化。采用控制变量法分别研究了 esgRNA 用量、Cas9 或 Cas9NG 蛋白用量和酶切反应时间等对酶切效率的影响。对于 esgRNA/Cas9-RNP, 当 esgRNA 和 Cas9 蛋白均为 1 μ g 时, 酶切反应时间

为 0.5 h, 可实现对 500 ng 靶位点 PCR 扩增产物的充分酶切(图 3-A~C)。对于 esgRNA/Cas9NG-RNP, 当 esgRNA 和 Cas9NG 均为 2 μ g 时, 酶切反应时间为 4 h, 实现对 500 ng 靶位点 PCR 扩增产物的充分酶切(图 3-E~G)。采用优化后的 esgRNA/Cas9-RNP 与 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系, 分别对 *ZmWx* 基因编辑产生的 3 种不同基因型材料进行基因型鉴定, 以验证基于 sgRNA/Cas9-RNP 系统是否能够准确区分不同的基因型。优化后的 esgRNA/Cas9-RNP 与 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系均具备准确区分不同基因型 PCR 产物的能力, 能够有效区分野生型、纯合突变体及杂合突变体材料(图 3-D, H)。

图 3 基于 esgRNA/Cas9-RNP 及 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系的优化

Fig. 3 Optimization of cleavage assay via esgRNA/Cas9-RNP and esgRNA/Cas9NG-RNP

A: esgRNA 梯度; B: Cas9 蛋白梯度; C: 酶切反应时间梯度; D: 不同基因型 PCR 产物酶切; E: esgRNA 梯度; F: Cas9NG 蛋白梯度; G: 酶切反应时间梯度; H: 不同基因型 PCR 产物酶切; CK: 未加 esgRNA 和 Cas 蛋白的 *ZmWx* 野生型 PCR 产物。

A: Effect of different gradients of esgRNA; B: Effect of different gradients of Cas9 protein; C: Effect of different gradients of digestion time; D: Digestion of PCR products of different genotypes; E: Effect of different gradients of esgRNA; F: Effect of different gradients of Cas9NG protein; G: Effect of different gradients of digestion time; H: Digestion of PCR products of different genotypes; CK: *ZmWx* wild PCR product without esgRNA and Cas protein.

2.4 利用 Cas9NG 拓宽检测位点范围

前人的研究表明, Cas9NG 作为 spCas9 的变体, 由于替换了 PI 功能域中(PAM-interacting, PI)识别 PAM 的第 2 和第 3 位碱基的氨基酸, 使其不再具有识别特异性, 从而可以识别 PAM 为“NG”基序, 极大地拓展了基因编辑的范围^[13-14]。因此, 我们探索应用 Cas9NG 拓宽检测位点范围。

我们在 *ZmWx* 编辑位点附近重新设计了 6 个 PAM 为“NG”的靶位点(图 4-A), 通过体外转录及

凝胶电泳检测发现, 6 个 esgRNA 的分子量大小正确, 转录效果较好(图 4-B)。应用优化后的 esgRNA/Cas9NG-RNP 体系, 将 Cas9NG 与 6 种 esgRNA 分别组装成 RNP, 对野生型 *ZmWx* 靶位点 PCR 扩增产物进行酶切。从图 4-C 可以看出, 仅有第 6 组对野生型 *Waxy* PCR 产物有酶切活性, 而第 6 组 esgRNA 的 PAM 为“AGG”。结果表明, 利用 esgRNA/Cas9NG-RNP 并不能拓宽 *ZmWx* 靶位点检测的范围。

图 4 基于 esgRNA/Cas9NG-RNP 检测体系对不同 *ZmWx* 位点的检测

Fig. 4 Cleavage assay of different targets for *ZmWx* locus via esgRNA/Cas9NG-RNP

A: Cas9-NG 的 6 个新的靶向位点选择; B: 6 个靶点对应的 esgRNA 10% Urea-PAGE 鉴定; C: PCR/RNP 酶切分析; CK: 未加 esgRNA 和 Cas 蛋白的 *ZmWx* 野生型 PCR 产物。

A: Targets selection of Cas9NG; B: 10% Urea-PAGE of 6 target-related esgRNA; C: PCR/RNP cleavage assay; CK: *ZmWx* wild PCR product without esgRNA and Cas protein.

2.5 基于 esgRNA/Cas9-RNP 检测体系筛选基因编辑突变体

由于 esgRNA/Cas9-RNP 在检测反应中 RNP 用量、酶切反应时间及剪切效率均优于 esgRNA/Cas9NG-RNP, 本研究利用 esgRNA/Cas9-RNP 系统对 *ZmWx* 基因编辑突变群体进行基因型检测。结果表明, 对随机选择

的 32 个 *ZmWx* 基因编辑材料的靶位点进行酶切后, *ZmWx* 野生型、纯合突变体及杂合突变体均得到有效区分(图 5-A)。为进一步确定利用 esgRNA/Cas9-RNP 进行突变体基因型鉴定的可靠性, 我们随机选择 3 种基因型的一个样品进行 Sanger 测序。通过峰图判读与序列比对可知, 测序结果与检测结果一致(图 5-B)。

图 5 基于 esgRNA/Cas9-RNP 的 *ZmWx* 基因编辑突变体检测

Fig. 5 Genotyping genome-edited *ZmWx* mutant via esgRNA/Cas9-RNP

A: 32 个 *ZmWx* 的基因编辑材料的 esgRNA/Cas9-RNP 酶切检测; B: Sanger 测序峰图。WT/WT 为野生型, -1 bp/-1 bp 为缺失 1 bp 的纯合突变体, WT/-3 bp 为一个等位基因缺失 3 bp 的杂合突变体; CK: 未加 esgRNA 和 Cas 蛋白的 *ZmWx* 野生型 PCR 产物。

A: Genotyping genome-edited *ZmWx* mutant via esgRNA/Cas9-RNP; B: Sanger sequencing peak graph of different genotypes. WT/WT is a wild type, -1 bp/-1 bp is a homozygous mutant with 1 bp deleted, and WT/-3 bp is a heterozygous mutant with 3 bp allele deleted; CK: *ZmWx* wild PCR product without esgRNA and Cas protein.

3 讨论

建立一种快速、经济、高效与高通量的突变体基因型鉴定技术对作物基因功能鉴定等基础研究与分子育种研究等方面具有广泛的应用价值。因此, 此类技术具有重要研发价值。此前已研发了多种基因型鉴定方法, 本方法与其相比, 在应用范围与简便高效性上具有重要的优势。以当前应用较广的基于限制性内切酶的 PCR/RE 检测和基于 DNA 双链错配原理的 T7E I 或 CEL I 酶切检测为例。PCR/RE 方法严重依赖于突变位点处具有合适的 II 型限制性内切酶位点, 识别位点为 6 bp 的限制性内切酶约 4K DNA 区间才能有一个合适的位点, 而依赖 CRISPR/Cas9 PAM-NGG 基序的特征, 约 16 bp 即能有一个合适的位点, 约为前者的 260 倍。基于 DNA 双链错配原理的 T7E I 或 CEL I 酶切检测无法有效区分纯合突变体与野生型, 双等位基因突变体和杂合突变体, 商业化的酶价格高昂, 检测体系还依赖 PAGE 胶, 成本高昂, 实验体系操作繁琐。而本研究采用的方法, 经过一次原核表达及纯化获得的 Cas9 蛋白(4 L 原核表达菌液)可用于至少 10,000 个酶切体系的检测, 不同位点突变体材料的检测只需替换与靶位点匹配的 sgRNA 即可, 体外转录 1 个反应的 esgRNA 可用于至少 200 个酶切体系检测, 合计 1 个反应的成本在 1 元以下。整个检测反应可在 1~3 h 内完成, 检测都是基于简明的琼脂糖凝胶分析, 能够满足对突变体进行早期高通量基因型的快速高效分析。此外, 基于 sgRNA/Cas9-RNP 的检测体系还具有应用范围广的特点, 不仅适用于由 ZFN、TALEN、CRISPR-Cas9、CRISPR-Cpf1 等序列特异性核酸酶定点编辑突变体的基因型分析, 还适用于自然变异、人工诱变突变体在特定位点上的基因型分析。

我们在本实验积累的经验还表明, *ZmWx* 位点对应的 sgRNA 无法介导 Cas 蛋白活性, 推测原因是通过 T7 启动子体外转录靶向 *ZmWx* 位点的 sgRNA, 在体外酶切缓冲液中不能形成稳定的二级结构, 从而不能与 Cas 蛋白形成有剪切活性的核糖核蛋白体(RNP)。因此, 将 sgRNA 替换为骨架序列优化的 esgRNA 是必要的, 该优化会显著提高检测体系对位点的兼容性, 优化的 esgRNA 分别与 Cas9 及 Cas9NG 蛋白组装形成的 RNP 复合体可实现底物 DNA 的充分酶切, 这与人研究的结论是一致的, 即通过对 sgRNA 骨架序列优化, 可以提高 sgRNA 结合靶位点的能力, 从而提高 CRISPR-Cas9 的切割

效率^[27-28]。此外, 本研究发现, 基于 esgRNA/Cas9NG-RNP 的检测体系, 除在 PAM 为“NGG”序列的 6 号靶位点有较强的剪切活性外, 在 PAM 为非“NGG”的靶位点均没有检测到明显的剪切活性。推测原因可能是 Cas9NG 蛋白变体对于靶向位点具有一定的偏好性, 不同的靶位点由于 GC 含量的不同、碱基的分布差异, sgRNA 识别结合靶位点的能力有所不同, 基于 esgRNA/Cas9NG-RNP 的检测体系还有待于蛋白活性的进一步优化。该数据对利用 Cas9NG 的 NG-PAM 基序特征扩大体内 CRISPR/Cas9 基因编辑设计位点自由度具有重要参考价值。

4 结论

利用 Cas9 或 Cas9NG 变体蛋白与 sgRNA 核糖核蛋白复合体 (sgRNA/Cas9-RNP 或 sgRNA/Cas9NG-RNP) 体外 DNA 定点内切酶活性, 建立并优化了一种简便、高效与低成本的基因型分析技术。esgRNA/Cas9 形成的 RNP 复合体核酸酶活性比 esgRNA/Cas9NG 高, 酶切等量底物需要的 RNP 复合体的量少且时间更短, 可用于突变体基因型的高通量鉴定。利用 esgRNA/Cas9NG 拓宽目标靶位点的检测数据为 CRISPR/Cas9NG 活体基因编辑技术研发提供了重要参考数据。

References

- [1] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna J A, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337: 816–821.
- [2] Cong L, Ran F A, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu P D, Wu X B, Jiang W Y, Marraffini L A, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339: 819–823.
- [3] Shalem O, Sanjana N E, Hartenian E, Shi X, Scott D A, Mikkelsen T S, Heckl D, Ebert B, Root D E, Doench J G, Zhang F. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science*, 2014, 343: 84–87.
- [4] Platt R J, Chen S, Zhou Y, Yim M J, Swiech L, Kempton H R, Dahlman J E, Parnas O, Eisenhaure T M, Jovanovic M, Graham D B, Jhunjhunwala S, Heidenreich M, Xavier R J, Langer R, Anderson D G, Hacohen N, Regev A, Feng G P, Sharp P A, Zhang F. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. *Cell*, 2014, 159: 440–455.
- [5] Komor A C, Kim Y B, Packer M S, Zuris J A, Liu D R. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533: 420.
- [6] Maddalo D, Manchado E, Concepcion C P, Bonetti C, Vidigal J A, Han Y C, Ogradowski C, Reikhtman N, Lowe S W, Ventura A. *In vivo* engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*, 2014, 516: 423.
- [7] Gaudelli N M, Komor A C, Rees H A, Packer M S, Badran A H,

- Bryson D I, Liu D R. Programmable base editing of A·T to G·C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 2017, 551: 464.
- [8] Konermann S, Brigham M D, Trevin A E, Joung J, Abudayye O O, Barcena C, Hsu P D, Habib N, Gootenberg J S, Nishimasu H, Nureki O, Zhang F. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature*, 2015, 517: 583.
- [9] Kiani S, Beal J, Ebrahimkhani M R, Huh J, Hall R N, Xie Z, Li Y Q, Weiss R. CRISPR transcriptional repression devices and layered circuits in mammalian cells. *Nat Methods*, 2014, 11: 723.
- [10] Hilton I B, D'ippolito A M, Vockley C M, Thakore P I, Crawford G E, Reddy T E, Gersbach C A. Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat Biotechnol*, 2015, 33: 510.
- [11] Zhou Y, Wang P, Tian F, Gao G, Huang L, Wei W, Xie X S. Painting a specific chromosome with CRISPR/Cas9 for live-cell imaging. *Cell Res*, 2017, 27: 298.
- [12] Hsu P D, Lander E S, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. *Cell*, 2014, 157: 1262–1278.
- [13] Hu J H, Miller S M, Geurts M H, Tang W X, Chen L W, Sun N, Zeina C M, Gao X, Rees H A, Lin Z, Liu D R. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*, 2018, 556: 57.
- [14] Nishimasu H, Shi X, Ishiguro S, Gao L, Hirano S, Okazaki S, Oura S. Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space. *Science*, 2018, 361: 1259–1262.
- [15] Nawaz G, Han Y, Usman B, Liu F, Qin B X, Li R G. Knockout of *OsPRP1*, a gene encoding proline-rich protein, confers enhanced cold sensitivity in rice (*Oryza sativa* L.) at the seedling stage. *3 Biotech*, 2019, 9: 254.
- [16] Bao A L, Chen H F, Chen L M, Chen S L, Hao Q G, Guo W, Qiu D Z, Shan Z H, Yang Z G, Yuan S G, Zhang C J, Zhang X J, Liu B H, Kong F J, Li X, Zhou X A, Tran L P, Cao D. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of *GmSPL9* genes alters plant architecture in soybean. *BMC Plant Biol*, 2019, 19: 131.
- [17] Doll N M, Gilles L M, Gérentes M F, Richard C, Just J, Fierlej Y, Borrelli V M G, Gendrot G, Ingram G C, Rogowsky P M, Widiez T. Single and multiple gene knockouts by CRISPR-Cas9 in maize. *Plant Cell Rep*, 2019, 38: 487–501.
- [18] Meng X, Yu H, Zhang Y, Zhuang F, Song X, Gao S, Gao C X, Li J. Construction of a genome-wide mutant library in rice using CRISPR/Cas9. *Mol Plant*, 2017, 10: 1238–1241.
- [19] Qi X T, Dong L, Liu C L, Mao L, Liu F, Zhang X, Cheng B J, Xie C X. Systematic identification of endogenous RNA polymerase III promoters for efficient RNA guide-based genome editing technologies in maize. *Crop J*, 2018, 6: 314–320.
- [20] Dong L, Qi X T, Zhu J J, Liu C L, Zhang X, Cheng B J, Mao L, Xie C X. Supersweet and waxy: meeting the diverse demands for specialty maize by genome editing. *Plant Biotechnol J*, 2019, 17: 1853–1855.
- [21] Li C X, Liu C L, Qi X T, Wu Y, Fei X, Mao L, Cheng B J, Li X H, Xie C X. RNA-guided Cas9 as an *in vivo* desired-target mutator in maize. *Plant Biotechnol J*, 2017, 15: 1566–1576.
- [22] Dong L, Li L N, Liu C L, Liu C X, Geng S F, Li X H, Huang C L, Mao L, Chen S J, Xie C X. Genome editing and double-fluorescence proteins enable robust maternal haploid induction and identification in maize. *Mol Plant*, 2018, 11: 1214–1217.
- [23] Datta S, Budhaliya R, Chatterjee S, Vanlalhmuaaka, Veer V, Chakravarty R. Enhancement of PCR detection limit by single-tube restriction endonuclease-PCR (re-PCR). *Mol Diagn Ther*, 2016, 20: 297–305.
- [24] Vouillot L, Thélie A, Pollet N. Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. *G3: Genes Genom Genet*, 2015, 5: 407–415.
- [25] Liu W, Wang C, Jiao X Z, Zhang H W, Song L L, Li Y X, Gao C X, Wang K J. Hi-TOM: a platform for high-throughput tracking of mutations induced by CRISPR/Cas systems. *Sci China Life Sci*, 2019, 62: 1–7.
- [26] Liang Z, Chen K, Yan Y, Zhang Y, Gao C X. Genotyping genome-edited mutations in plants using CRISPR ribonucleoprotein complexes. *Plant Biotechnol J*, 2018, 16: 2053–2062.
- [27] Dang Y, Jia G G, Choi J, Ma H, Anaya E, Ye C, Shankar P, Wu H. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol*, 2015, 16: 280.
- [28] Yin H, Song C Q, Suresh S, Wu Q, Walsh S, Rhym L H, Mintzer E, Bolukbasi M F, Zhu L J, Kauffman K, Mou H, Oberholzer A, Ding J, Kwan S Y, Bogorad R L, Zatzepin T, Koteliensky V, Wolfe S A, Xue W, Langer R, Anderson D G. Structure-guided chemical modification of guide RNA enables potent non-viral *in vivo* genome editing. *Nat Biotechnol*, 2017, 35: 1179.