**学 号：20140949**

天 津 商 业 大 学 毕 业 设 计（论 文）

|  |
| --- |
| **大肠杆菌中表达pGEX-6p-2p-NLS-Cas9-EGFP质粒的构建** |

|  |
| --- |
| **Construction of pGEX-6p-2p-NLS-Cas9-EGFP recombinant plasmid expressed in *Escherichia coli*** |
|  |

|  |  |
| --- | --- |
| **学 院:** | **生物技术与食品科学学院** |
| **教 学 系：** | **生物工程系** |
| **专业班级:** | **生物技术1401班** |
| **学生姓名:** | **路娟娥** |
| **指导教师:** | **阮海华 副教授** |

**2018 年 6月 2 日**

内容摘要：CRISPR/Cas9系统是一种存在于大多数细菌和古细菌中的后天适应性免疫防御系统，主要用来识别并清除二次入侵的病毒及外源DNA。近年来由于CRISPR/Cas9系统介导的基因编辑技术的快速发展，使得人们对Cas9蛋白的需求逐步增多。为了体外获得高表达的能够进入细胞核进行DNA编辑的Cas9纯蛋白，本论文采用基因克隆的方法，以pGEX-6p-2质粒为基础质粒，构建能够高效表达带有核定位信号NLS（nuclear localization signal，NLS）的Cas9重组质粒。同时，为了更方便对Cas9基因进行观察，在Cas9基因C末端连接了增强型绿色荧光蛋白基因EGFP。本实验选用spCas9-sgRNA-EGFP作为模板质粒，利用PCR技术成功扩增到长度分别为732 bp的EGFP基因片段和4200 bp的NLS-Cas9基因片段，并将这两个基因片段分别克隆至大肠杆菌表达载体pGEX-6p-2质粒的EcoRⅠ和XhoⅠ酶切位点，以及BamHⅠ和EcoRⅠ酶切位点。进一步通过酶切的方法对重组质粒进行鉴定发现成功切下大小分别为732 bp和4200 bp的DNA片段并通过测序验证了DNA序列的正确性。表明，本实验成功构建了pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒，为进一步研究CRISPR/Cas9系统提供了有用的素材，也为该系统的进一步优化和应用奠定了基础。

关键词：CRISPR/Cas9系统；基因克隆；Cas9；EGFP；质粒构建

**Abstract:** The CRISPR/Cas9 system is an epigenetic immune defense system that exists in most bacteria and archaea and is mainly used to fight secondary invading viruses and exogenous DNA. In recent years, the rapid development of gene editing technology mediated by CRISPR/Cas9 system has increased the demand for Cas9 protein. In order to obtain highly expressed and purified Cas9 protein *in vivo* that can enter the cell nucleus for DNA editing, the gene cloning method was used in this study. The pGEX-6p-2 plasmid was used as the basic plasmid to construct a recombinant plasmid which can efficiently express Cas9 gene with a nuclear localization signal (NLS) signal for nuclear entering. Meanwhile, in order to facilitate the observation of Cas9 protein, the enhanced green fluorescent protein gene (EGFP) was linked to the C-terminus of Cas9 gene. In this studyt, spCas9-sgRNA-EGFP was selected as a template plasmid, and a length of 732 bp EGFP gene and 4200bp Cas9 gene were acquired by PCR technology, respectively. Then, these two genes were introduced to the EcoRⅠ- XhoⅠ and BamHⅠ- EcoRⅠ of *E. coli* expression vector pGEX-6p-2 plasmid, respectively. As a result, identification of recombinant plasmids by double enzyme digestion showed that the length of cut DNA fragments were 732 bp and 4200 bp, respectively, and the verificaiton of DNA sequences was done by DNA sequencing. These results showed that the recombinant pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP plasmid was successfully constructed . It might provide a useful material for further research on the CRISPR/Cas9 system and lay a foundation for the further optimization and application of this system.

**Key Words:** CRISPR/Cas9；gene cloning；Cas9；EGFP；recombinant plasmid construction

目 录

|  |  |
| --- | --- |
| 内容摘要．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | I |
| Abstract．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | II |
| 1 导言．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 1 |
| 1.1 CRISPR/Cas9系统．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 2 |
| 1.2 Cas9基因及EGFP基因．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 4 |
| 1.3 pGEX-6p-2质粒．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 6 |
| 1.4 基因克隆流程．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 7 |
| 1.5 PCR反应原理．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 8 |
| 1.6 DNA琼脂糖凝胶电泳原理．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 8 |
| 2 实验材料．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 9 |
| 2.1 实验仪器．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 9 |
| 2.2 试剂与耗材．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 10 |
| 3 实验方法．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 11 |
| 3.1 引物设计．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 11 |
| 3.2 PCR扩增目的基因．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 11 |
| 3.3 目的基因EGFP和Cas9的酶切．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 12 |
| 3.4 质粒载体pGEX-6p-2的酶切．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 13 |
| 3.5 pGEX-6p-2与EGFP的连接．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 14 |
| 3.6 感受态大肠杆菌的转化、阳性克隆的筛选以及重组质粒的提取．．．．．．．．．．．．．．．． | 15 |
| 3.7 重组质粒pGEX-6p-2-EGFP的酶切鉴定．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 17 |
| 3.8 质粒载体pGEX-6p-2-EGFP的酶切．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 17 |
| 3.9 pGEX-6p-2-EGFP与NLS-Cas9的连接．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 18 |
| 3.10 重组质粒pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的酶切鉴定．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 18 |
| 4 结果与分析．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 19 |
| 4.1 Cas9和EGFP基因的引物设计．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 19 |
| 4.2 PCR扩增．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 19 |
| 4.3 感受态大肠杆菌转化率检测．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 20 |
| 4.4 pGEX-6p-2与EGFP连接．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 21 |
| 4.5 pGEX-6p-2-EGFP重组质粒酶切鉴定．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 21 |
| 4.6 pGEX-6p-2-EGFP与NLS-Cas9的连接 ．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 22 |
| 4.7 pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒的酶切鉴定．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 23 |
| 4.8 实验结果分析及总结．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 24 |
| 5 讨论．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 24 |
| 6 展望．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 25 |
| 参考文献．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 27 |
| 致谢．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．．． | 29 |

1 导言

随着基因组测序技术的日益发展，越来越多物种的基因组序列被人们所获悉，研究基因对表型的功能成为科学家面临的一大难题，为此，科学家开发出来的基因组编辑技术成功的解决了这一难题，使我们可以有选择性地诱变具体基因组的区域，并允许在各种生物体中进行研究。基因组编辑技术模拟基因的自然突变，在此基础上修改并编辑原来的基因组，主要通过人工的操作对基因组特定基因片段进行定点改造，包括通过基因敲除、基因敲入、定点改造基因组等技术，真正达到了基因编辑以及研究基因功能的目的。目前,基因组编辑技术包括基因锌指核酸酶（ZFNs）的替代、类转录激活因子效应物核酸酶（TALENs）和CRISPR/Cas9系统等[1]。基因组编辑技术的不断问世，为基因功能研究提供了全新的平台。

众所周知，基因功能的研究以及验证需要快速、准确的实验技术支撑, ZFNs和 TALENs是能够使DNA的靶位点产生DNA双链断裂从而实现基因组定点编辑的常用系统，但在具体的应用中却发现这两种系统仍存在着许多的缺陷和不足，已经满足不了科学研究发展的需求, 带来的不必要弊端也更为的明显，如脱靶效应、构建复杂等，这些弊端都阻碍了高新技术的进一步应用和发展。而近两年来CRISPR/Cas9系统的发现迅速充实和促进了基因组编辑技术，并以此演化出更多研究基因组的手段。此系统主要是在以保持基因编辑核酸酶能精确编辑靶向基因位点为基础的条件下，围绕系统的基因工程，特别是为实现更多精确编辑而对Cas9和sgRNA的改进，在基因组和RNA编辑中的应用修饰、调节和标记基因组位点上对细胞和生物体起到了详细描述的作用，兼备了载体构建简单、快速、低成本、效率高等优势，为经典诱变和转基因方法研究基因功能和改善作物性状提供了一种替代方法。在基因组编辑技术快速发展的条件下，与sgRNA复合的Cas9蛋白为质粒或mRNA转染提供了CRISPR/Cas9技术的优势。Cas9蛋白非常稳定，活性确认比较容易，而且Cas9蛋白的寿命短（在细胞中半衰期约24 h），因此能够将脱靶效应和镶嵌现象最小化。此外，Cas9蛋白最大的好处是可以在体内进行工作，基于以上特点，采用一定的技术手段研究Cas9蛋白则显得极为重要。

1.1 CRISPR/Cas9系统

1.1.1 CRISPR/Cas9系统结构

成簇的规律间隔短回文重复基座（clustered regularly interspaced short palindromic repeat sequences，CRISPR）在许多古生菌和细菌的基因组中被发现[2]。它包括串联的重复与间隔，重复是由许多重复的序列组成，间隔是由来自外源DNA的不同序列所组成[3]。CRISPR/Cas9系统是细菌和古细菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御，用来对抗二次入侵的病毒及外源DNA，它是一类新型的DNA重复序列，通常位于原核细胞染色体上，个别位于质粒中，重复序列随物种不同而有所差异[4]。CRISPR/Cas9系统基因组序列由三部分组成：CRISPR 基因座、Cas基因（CRISPR-associated genes）和tracrRNA（trans-activating crRNA）(图1)[5]。CRISPR基因座通常由短的高度保守的重复序列（direct repeats）和长度相似的间隔序列（spacers）交替排列组成的，这些间隔序列具有识别靶标基因的作用。CRISPR基因位点的第一个重复序列上游有一个前导序列，即Leader，它在CRISPR序列转录过程中发挥启动子的功能。Leader与CRISPR基因座相连的是一系列保守的具备核酸酶功能的Cas蛋白，Cas9蛋白即位于其上，CRISPR基因座相关转录产物crRNA（CRISPR RNA）与Cas蛋白结合之后对靶标DNA序列进行特异性的切割。最后，tracrRNA则主要起连接crRNA和Cas蛋白的桥梁功能 [6]。

图1 CRISPR/Cas系统基本结构

Fig 1 Basic structure of CRISPR/Cas system

资料来源：Jansen R, Embden J D, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6):1565-1575.

根据Cas蛋白基因序列的不同，CRISPR/Cas9系统被分为３类：Ⅰ型、Ⅱ型和Ⅲ型，其中，I型和III型在细菌和古细菌中均有发现，II型仅存在于细菌中[7]。Ⅰ型和Ⅲ型CRISPR/Cas9系统是通过多个Cas蛋白形成核酸酶复合物来切割DNA双链，作用机制相对复杂。与之相比，Ⅱ型CRISPR/Cas9系统则最具特色，只需一种Cas9蛋白就可以对DNA双链进行精确的切割，1个合成的sgRNA即可代替tracrRNA-crRNA引导Cas9蛋白，所以该系统作用机制更简单，更容易进行体外设计和改造，是目前被应用较为成功的一类人工核酸酶系统。

1.1.2 CRISPR/Cas9系统的作用机制

CRISPR/Cas9系统通过将入侵噬菌体（或质粒）的DNA片段整合到CRISPR基因座的间隔序列中，进而转录生成crRNA，crRNA与tracrRNA结合形成向导RNA（Single guide RNA，sgRNA），最后sgRNAs与核酸酶Cas蛋白结合从而在与sgRNAs配对的靶位点处剪切双链DNA，引起DNA双链断裂（DSB），进而利用生物体内非同源末端修复机制（NHEJ）或同源重组机制（HR）修复DNA，导致基因移码突变、替换或删除，致使基因功能丧失，提供自身免疫防御[8]。

将CRISPR/Cas9运用到基因组编辑上需要两个元件，一个是模仿crRNA–tracrRNA复合体的嵌合sgRNA，另一个是有核酸酶活性的Cas9蛋白(图2)[9]。靶点的特异性主要是由sgRNA序列决定的，但Cas9同样也需要几个特殊的碱基，叫做PAM，即原型间隔序列，PAM序列在不同的物种中是不一样的。

![C:\Users\lenovo\Documents\Tencent Files\527967923\FileRecv\MobileFile\Image\07`W@1TNFM]P5@B05`4})XB.png]()

图2 sgRNA-Cas9复合物识别与剪切目标DNA的模型图

Fig 2 Model diagram of DNA recognition and cleavage of sgRNA-Cas9 complex

资料来源:Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Trends in Genetics Tig, 2016, 8(11):2281-2308.

1.2 Cas9基因及EGFP基因

Cas9蛋白是一个核酸内切酶，由1409个氨基酸组成（加上两端的NLS，编码序列全长可达4.5 kb）。化脓链球菌（SpyCas）和内氏放线菌（AnaCas9）的Cas9蛋白晶体结构的解析，使得CRISPR/Cas9系统的作用机制更加清晰（图3）[10]。Cas9蛋白含有两个核酸内切酶结构域：HNH核酸内切酶结构域（H结构）和RuvC-like结构域（R结构域），其中，HNH结构域位于蛋白中间位置，主要负责切割与crRNA互补配对的DNA序列，切割点位于PAM上游3 nt处；RuvC核酸酶结构域位于蛋白的氨基端，负责对另一条DNA互补链进行切割，切割点位于PAM上游3～8 nt处[11]。Cas9蛋白能在体内进行工作，破坏侵入人体的外来基因，而且寿命较短（在细胞中半衰期约24 h），因此能够将脱靶效应和镶嵌现象最小化，基于以上特点，研究Cas9蛋白变得很有意义。本实验力求构建含有Cas9基因的新型质粒，为在体外获得高表达的Cas9纯蛋白做准备。

![C:\Users\lenovo\AppData\Roaming\Tencent\Users\527967923\QQ\WinTemp\RichOle\L$$GJ6AX@`FM{]81H1FN5Z8.png]()

图3 化脓链球菌（SpyCas）和内氏放线菌（AnaCas9）的Cas9蛋白晶体结构

Fig 3 Crystal structure of Cas9 protein of SpyCas and AnaCas9

资料来源：Jinek M, Jiang F, Taylor D W, et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation[J]. Science, 2014, 343(6176):1247997.

通过主动运输进入细胞核的蛋白质必须在其序列上具有特殊的信号，即核定位信号（nuclear localization signal，NLS），NLS是信号肽的一种形式，可位于多肽序列的任何部分，本身没有专一性，有一个带正电荷的肽核心，它的作用主要是帮助亲核蛋白进入细胞核。第一个被确定的含有NLS序列的蛋白质是SV40的T抗原，它在细胞质中合成后很快积累在细胞核中，是病毒DNA在核内复制所必需的蛋白质[12]。本实验旨在构建能够高效表达带有核定位信号NLS的Cas9基因的重组质粒，其中，NLS信号帮助携带NLS的蛋白通过核膜进入细胞核。

绿色荧光蛋白（green fluorescent protein，GFP）是来源于发光水母的一种功能特异的蛋白质，分子量大小为 27 kD，具有238个氨基酸。GFP具有内在荧光性，且不需要外源性的辅助因子或底物，这一性质使它成为一种非常有用的报告标签。EGFP （Enhanced Green fluorescent Protein），即增强型绿色荧光蛋白，是一种优化的突变型绿色荧光蛋白，发射出的荧光强度比GFP大6倍以上。它在GFP的基础上发生了双氨基酸取代，Leu（亮氨酸）取代Phe64（苯丙氨酸），Thr（苏氨酸）取代Ser65（丝氨酸），具有结构稳定、高效表达、无种系依赖性等特点，更适合作为一种报告基因来研究细胞基因表达、调控、细胞分化及蛋白质在生物体内定位和转运等[13]。

1.3 pGEX-6p-2质粒

pGEX系列载体是大肠杆菌表达载体，可用于构建可诱导、高水平表达目的基因片段，具有高拷贝的表达水平[14]。pGEX-6p-2是pGEX载体中的一种，结构中含有Tac启动子，含有多克隆位点，拥有GST（谷胱甘肽巯基转移酶）标签，GST标签蛋白对表达有促进作用，分子量约为26 KD，具有氨苄抗性，带有GST标签蛋白通过特定的目的基因或者基因片段插入到pGEX-6p-2的多克隆位点[15]。除此之外，在pGEX-6p-2载体上还带有大肠杆菌乳糖操纵子，即lac操纵子的片段。基于以上优点，本实验采用pGEX-6p-2质粒作为空载体进行新型重组质粒的构建，因为大部分大肠杆菌都能够克隆和表达pGEX载体，大肠杆菌作为原核生物，因其具有培养条件简单、生长速度快、操作简单以及不易污染等特点而成为原核表达系统中占据优势的菌株，所以，此次以大肠杆菌作为pGEX-6p-2的克隆菌株。



图4 pGEX-6p-2质粒图谱

Fig 4 pGEX-6p-2 plasmid map

资料来源：https://wenku.baidu.com/view/325a8d38b14e852459fb5770.html

1.4 基因克隆流程

一个完整的基因克隆流程应包括目的基因的获取，质粒载体的选择与构建，目的基因与载体的拼接，重组DNA分子导入受体细胞，筛选含重组分子的受体细胞等步骤。其中通过双酶切构建质粒是基因克隆中最常用的一种方法，它主要利用限制性内切酶可以识别并切割特定核苷酸位点的原理，选用2种不同的限制性内切酶切割靶基因得到前后都带有黏性末端的靶基因片段，与同样经2种限制性内切酶切割得到的带有相同黏性末端的线性载体在T4 DNA连接酶的作用下进行连接，从而实现基因克隆。在本实验中，选用限制性核酸内切酶EcoRⅠ、XhoⅠ对EGFP基因进行双酶切，与同样经过双酶切的质粒载体pGEX-6p-2进行连接，之后再选用限制性核酸内切酶BamHⅠ、EcoRⅠ对带有NLS的Cas9基因进行双酶切，与同样经过双酶切的质粒载体pGEX-6p-2-EGFP进行连接，构建新型的pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP质粒，为进一步表达纯化Cas9蛋白做准备。

1.5 PCR反应原理

聚合酶链式反应（Polymerase Chain Reaction，PCR）是80年代中期发展起来的体外核酸扩增技术[16]。PCR包括三个步骤：模板的热变性，寡核苷酸引物复性到单链靶序列上以及由热稳定DNA聚合酶催化的复性引物引导的新生DNA链延伸聚合反应的过程。（1）变性：DNA模板的复性温度由其自身的GC含量所决定，含量越高，则模板DNA的变性温度也越高。一般说来，模板DNA经加热至90～95℃时，可使模板DNA双链或经PCR扩增形成的双链DNA解离，成为单链，以便引物与其结合；（2）引物退火：模板DNA经加热变性成单链后，温度降至50～60℃，引物与模板DNA单链的互补序列按 Watson-Crick碱基互补配对原则配对结合；（3）引物的延伸：DNA模板-引物结合物在KOD DNA聚合酶的作用下，于68～75℃条件下，以dNTP为反应原料，单链DNA为模板，延伸合成一条新的与模板DNA链互补的半保留复制链，之后重复循环“变性-退火-延伸”过程，即可获得足够量的扩增产物。本实验运用的模板质粒为spCas9-sgRNA-EGFP，对其进行PCR反应，扩增实验所需的Cas9基因和EGFP基因。

1.6 DNA琼脂糖凝胶电泳原理

琼脂糖凝胶电泳是用于分离和鉴定DNA片段的常用方法，这种电泳手段采用琼脂糖凝胶作为介质，琼脂糖是一种线装聚合物，具有亲水性，可发挥分子筛功能，能使大小和构象不同的核酸分子的迁移率出现较大差异，从而达到相互分离的目的。核酸分子在高于核酸等电点的电泳缓冲液中，其碱基不解离，而磷酸基团则会全部解离，所以核酸分子在电泳时向正极迁移，这跟它是两性解离分子的性质有关。在相应的电场强度下，DNA分子的迁移速度取决于分子筛的大小，不同构型的DNA分子的迁移速度不同。如环形的DNA分子样品，其中共有三种构型的分子：共价闭合环状的超螺旋分子（cccDNA）、线形DNA分子（IDNA）和开环分子（ocDNA），这三种不同构型的分子进行电泳时的迁移速度大小顺序为：cccDNA＞IDNA＞ocDNA[17]。

溴化乙锭（EB）为扁平状分子，可与DNA分子形成EB-DNA复合物，在紫外照射下发射荧光，且荧光强度与DNA的含量成正比，用肉眼观察，可检测到5 ng以上的DNA[18]。本实验的做法为：在配置凝胶的时候将适量EB溶于凝胶，DNA分子在凝胶内泳动的过程中便可与溴化乙锭结合，电泳结束后在专用的紫外灯下就可以观察到DNA分子的电泳条带了。

2 实验材料

2.1 实验仪器

超低温冰箱 Thermo Fisher Scientific

生化培养箱 上海申贤恒温设备厂

PCR仪 Bio-Rad Laboratories

高压蒸汽灭菌锅 日本SANYO公司

核酸电泳仪 Bio-Rad Laboratories

紫外分光光度仪 日本岛津公司

紫外透射仪 JY02型 北京君意东方电泳设备有限公司

可见光凝胶成像分析系统 Fluor Chem FC3

电热恒温鼓风干燥箱 天津市中环实验电炉有限公司

低速冷冻离心机 Thermo

室温台式离心机 Eppendorf

微量移液器 Thermo fisher scientific

电热恒温水浴锅 上海森信实验仪器有限公司

恒温培养振荡器 太仓市科教器材厂

超净工作台 苏州净化设备有限公司

纯水仪 美国Millipore公司

4℃冰箱、-20℃冰箱 海尔公司

2.2 试剂与耗材

1．PCR扩增所用试剂：KOD DNA聚合酶、10×Buffer、dNTP。

2．DNA琼脂糖凝胶电泳所用试剂

（1）DNA琼脂糖凝胶：配制100 ml琼脂糖凝胶，取2 ml 50×TAE溶液+98 ml超纯水可得100 ml 1×TAE溶液，混匀后加入1 g琼脂糖，在微波炉中缓慢加热至琼脂糖充分溶解，然后加入2-5 µl EB，倒在制胶板中插上梳齿，等冷却后形成凝胶待用。

（2）Marker：每次实验时，取2 µl上样，作为标准对照。

（3）10×Loading Buffer：每次上样时，按照与样品1:10的比例进行加样。

3．大肠杆菌制备、转化及阳性克隆筛选相关试剂与耗材

（1）液体LB培养基：以50 ml为例，取0.25 g酵母提取物、0.5 g胰蛋白胨、0.5 g氯化钠，加入50 ml纯净水后，于 121℃、20 min高压灭菌后置于4℃冰箱储存，加Amp时使其浓度保持在100 mg/L。

（2）含Amp（氨苄青霉素）的LB平板：以100 ml为例，配好培养基后，于121℃、20 min高压灭菌，待培养基温度降至60℃左右时，加入100 µl Amp使其浓度保持在100 mg/L，混匀后倒入平板（15-20 ml/板），打开盖子，在超净工作台紫外下照射10-15 min，待其凝固后置于4℃冰箱保存。以上操作均需保持无菌状态，因此选用超净工作台进行操作。

（3）耗材：酵母提取物、胰蛋白胨、氯化钠，一次性塑料平板。

4．质粒与目的基因酶切、连接耗材

（1）酶切试剂：BamHⅠ限制性内切酶、EcoRⅠ限制性内切酶、XhoⅠ限制性内切酶、10×Buffer（H）、10×Buffer（K）。

（2）连接试剂：T4 DNA连接酶、10×Buffer。

3 实验方法

3.1 引物设计

3.1.1 设计原则

1．引物与模板的序列要紧密互补；

2．引物与引物之间应避免形成发夹结构和稳定的二聚体；

3．引物不能在模板的非目的位点发生错配；

4．引物长度以及 GC 含量应合适，用以保证正确的 Tm 值，Tm 值一般介于 55～80℃为宜。

3.1.2引物合成

引物合成均从5＇端开始，并且需加保护碱基，本次实验旨在构建含有Cas9和EGFP的新型质粒，要想得到完整的基因，则在设计引物时必须从头设计。在Cas9基因的上游引物和下游引物的5＇端分别引入BamHⅠ和EcoRⅠ两个酶切位点，在EGFP基因的上游引物和下游引物的5＇端分别引入EcoRⅠ和XhoⅠ两个酶切位点，然后进行引物设计。

3.2 PCR扩增目的基因

3.2.1 PCR反应体系

如表1所示，反应体系为50 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行PCR反应。

表1 PCR反应混合液的配制顺序（50 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/µl |
| ddH2O10 x BufferspCas9-sgRNA-EGFP2 mmol/l dNTPPrimer Former | 12345 | 34.551（一般为10-100 ng DNA）51 |
| Primer Reverse | 6 | 1 |
| KOD DNA聚合酶 | 7 | 0.5 |
| 25 mmol/l MgSO4 |  | 2 |

3.2.2 PCR反应

将加好样的PCR管放到PCR热循环仪中，按下列程序开始循环：

94℃ 5 min (预变性) 94℃ 30 s，50-60℃ 30 s，68℃ 2 min 68℃ 7 min

30个循环

利用南京尧舜禹生物科技有限公司购买的spCas9-sgRNA-EGFP质粒作为模板，PCR扩增Cas9基因和EGFP基因，扩增条件如下：

Cas9反应条件 EGFP反应条件

94℃ 5 min 94℃ 5 min

94℃ 30 s 94℃ 30 s

50-60℃ 30 s 30个循环 50-60℃ 30 s

68℃ 5 min 68℃ 2 min

68℃ 7 min 68℃ 7 min

3.2.3 PCR产物的检测

对PCR产物选用1%的琼脂糖凝胶进行检测，电泳1 h，目的是使目的基因与产物分离，在紫外灯下观察结果，保存图像，并选用天根公司的琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒对含有目的基因（即EGFP和Cas9）的胶块进行切胶回收。

3.3 目的基因EGFP和Cas9的酶切

3.3.1 EGFP的酶切

1．EGFP酶切体系：如表2所示，反应体系为60 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行酶切反应，反应条件为37℃ 酶切过夜。

表2 PCR产物（EGFP）酶切体系（60 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/µl |
| ddH2O | 1 | 补平  |
| 10 x Buffer（H） | 2 | 6  |
| EGFP | 3 | 某体积数（3 µg） |
| EcoRⅠ | 4 | 2  |
| XhoⅠ | 5 | 2  |

2．EGFP的酶切检测：对PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，将EGFP与产物分离，在Fluor Chem FC3凝胶成像分析系统中观察结果，保存图像，并对EcoRⅠ和XhoⅠ双酶切后的EGFP基因进行切胶回收。

3.3.2 Cas9的酶切

1．Cas9的酶切体系：如下表3所示，反应体系60 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行酶切反应，反应条件为37℃ 酶切过夜。

表3 PCR产物（Cas9）酶切体系（60 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/µl |
| ddH2O | 1 | 补平 |
| 10 x Buffer（K） | 2 | 6 |
| Cas9 | 3 | 某体积数（3 µg） |
| BamHⅠ | 4 | 2 |
| EcoRⅠ | 5 | 2 |

2．Cas9的酶切检测：对PCR产物用1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测，将Cas9与产物分离，在Fluor Chem FC3凝胶成像分析系统中观察结果，保存图像，并对BamHⅠ和EcoRⅠ双酶切后的Cas9基因进行切胶回收。

3.4 质粒载体pGEX-6p-2的酶切

1．质粒载体pGEX-6p-2的酶切体系：如下表4所示，反应体系60 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行酶切反应，反应条件为37℃酶切过夜。

表4 质粒载体pGEX-6p-2酶切体系（60 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/µl |
| ddH2O | 1 | 补平 |
| 10 x Buffer（H） | 2 | 6 |
| pGEX-6p-2 | 3 | 某体积数（1.2 µg） |
| EcoRⅠ | 4 | 2 |
| XhoⅠ | 5 | 2 |

2．质粒载体pGEX-6p-2的酶切检测：选用1%的琼脂糖凝胶电泳对酶切体系进行检测，在Fluor Chem FC3凝胶成像分析系统中观察结果，保存图像，并对EcoRⅠ和XhoⅠ双酶切后的质粒载体pGEX-6p-2进行切胶回收。

3.5 pGEX-6p-2与EGFP的连接

1．连接体系的确定

（1）载体和插入片段的摩尔比在1：5-8之间为最适，为确保连接成功，目的基因片段要多于质粒载体，即EGFP 基因的数量要大于pGEX-6p-2的数量；

（2）选用公式：按照如下公式进行计算，确定目的基因片段EGFP与质粒载体pGEX-6p-2的质量比，再由此获得体积比。

pmol数×kb数（双链）×0.65=微克数

（3）确定连接体系：如表5所示，反应体系为10 µl，反应条件因酶而异，此次实验选用Promega公司的连接酶，连接反应为22℃连接3-5 h。

表5 连接体系（10 µl体系）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 实验组/µl | 对照组/µl |
| 10 x Buffer | 1 | 1 | 1 |
| pGEX-6p-2 | 2 | 1 | 1 |
| EGFP | 3 | 7.5 |  |
| T4 DNA 连接酶 | 4 | 0.5 | 0.5 |
| ddH2O | 5 |  | 7.5 |

2．设置空白对照

对连接实验组设立对照实验，排除自连。实验组按照pGEX-6p-2：EGFP=1：7.5的比例进行连接，对照组只加pGEX-6p-2载体，不加EGFP片段，加无菌水7.5 µl，反应体系如表5所示，选用与实验组同一反应条件进行连接。

3.6 感受态大肠杆菌的转化、阳性克隆的筛选以及重组质粒的提取

3.6.1 感受态大肠杆菌

感受态大肠杆菌是指经过适当处理后容易接受外来DNA进入的大肠杆菌。它的制备方法一般是将快速生长的大肠杆菌，即对数期的菌株，用低渗CaCl2（0.1M）溶液处理，造成细胞膨胀，导致极易与外源DNA相粘附，之后将粘附了外源DNA的大肠杆菌转移到42℃水浴中做短暂的热激，则会使外源DNA被细胞吸收，进入细胞的外源DNA分子通过复制，使大肠杆菌出现新的遗传性状。根据不同的用途可选用不同的菌株进行转化实验，本实验只用于克隆用途，构建pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒，采用的感受态大肠杆菌为Trans10。

3.6.2 感受态大肠杆菌的制备

1．取大肠杆菌trans10菌株进行划线培养，培养完成后，挑取单菌落于5 ml LB液体培养基（不含Amp）摇床过夜，大约16 h。

2．按1%接种量接种，即取2 ml的过夜培养物转接于200 ml LB培养基中，于37℃条件下振荡培养约2.5-3 h（250-300 rpm），至吸光度于0.4-0.6之间。

3．将0.1M CaCl2溶液置于冰上预冷。

以下步骤需在超净工作台和冰上操作

4．将培养好的菌液转移至离心桶中，在冰上冷却10 min。

5．4℃下3000 rpm/min的转速离心20 min。

6．弃去上清，选用0.1M CaCl2重悬每份细胞沉淀，按每50 ml培养液用30 ml 0.1M CaCl2的比例进行加样，重悬后在冰上放置20 min；于４℃以4000 rmp/min的转速离心20 min，用以回收细胞。

7．倒出上清液，将离心桶倒置，以使残留的少量上清液流尽。

8．按照每50 ml初始培养物用2 ml用冰预冷的0.1M CaCl2(其中包括15%甘油)重悬细胞沉淀的比例加样重悬细胞沉淀。此时，可将细胞分成小份（200 µl一管），液氮速冻后，放于-70℃冻存待用。

9．取一管刚制备的大肠杆菌感受态细胞，采用标准质粒pUC19进行转化，计算转化率，当其转化率介于5×106～2×10７转化子/µg时，即表明成功制备了大肠杆菌感受态细胞。

3.6.2 感受态大肠杆菌Trans10的转化、阳性克隆的筛选

由于质粒载体pGEX-6p-2上含有Amp抗性基因，所以成功转化了重组质粒的大肠杆菌Trans10可以在含有Amp的LB平板上生长繁殖，经过12-16 h后出现单菌落，而那些没有成功转化的大肠杆菌Trans10就会由于培养基中的Amp抗性基因而被抑制生长。我们将成功转化的大肠杆菌称为目标基因的阳性克隆，这种对于成功转化的大肠杆菌的筛选手段称为阳性克隆的筛选。实验方法如下：

1．取一管感受态细胞（200 µl）加入10 µl连接体系，混匀后，置于冰水浴中冰浴30 min。

2．将加入连接体系的感受态细胞置于水浴锅中42℃热激90 s，快速转移至冰水浴中冰浴2 min，该过程不要摇动离心管。

3．向每个离心管中加入1 ml 不含Amp的LB培养基，混匀后置于恒温摇床中，37℃条件下培养1 h，使细菌复苏。

4．将已转化的感受态细胞以12000 rpm/min的转速离心3 min，弃去900 µl上清，留300 µl含有沉淀的菌液，重悬混匀后，取200 µl菌液涂平板。

5．将菌液连续滴加到含有Amp的LB平板上，加入玻璃珠左右摇晃平板，将细胞均匀涂开后，倒置平板，于37℃生化培养箱中培养12-16 h。

3.6.3 重组质粒的提取

质粒的提取分为三大步骤：（1）培养阳性克隆菌株，将筛选的阳性单克隆菌体接种至液体LB培养基中扩大培养作为质粒DNA的来源；（2）收集和裂解细菌，从而获取质粒DNA；（3）纯化质粒DNA。为了操作简便，本实验使用的是购自天根公司的质粒小提试剂盒来提取所需目的质粒。

3.7 重组质粒pGEX-6p-2-EGFP的酶切鉴定

1. 重组质粒pGEX-6p-2-EGFP的酶切鉴定体系：如表6所示，反应体系为10 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行酶切鉴定，37℃酶切2 h。

表6 pGEX-6p-2-EGFP的酶切鉴定体系（10 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/ |
| ddH2O | 1 | 补平 |
| 10 x Buffer（H） | 2 | 1 |
| pGEX-6p-2-EGFP | 3 | 5 |
| EcoRⅠ | 4 | 0.5 |
| XhoⅠ | 5 | 0.5 |

2．重组质粒pGEX-6p-2-EGFP的琼脂糖凝胶电泳检测：选用1%的琼脂糖凝胶电泳对EcoRⅠ和XhoⅠ双酶切过的pGEX-6p-2-EGFP进行鉴定，在Fluor Chem FC3凝胶成像分析系统中观察结果，保存图像。

3.8 质粒载体pGEX-6p-2-EGFP的酶切

1．质粒载体pGEX-6p-2-EGFP的酶切体系：如下表7所示，反应体系为60 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行酶切反应，反应条件为37℃酶切过夜。

表7 质粒载体pGEX-6p-2-EGFP酶切体系（60 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/µl |
| ddH2O | 1 | 补平 |
| 10 x Buffer（K） | 2 | 6 |
| pGEX-6p-2-EGFP | 3 | 某体积数（1.2 µg） |
| BamHⅠ | 4 | 2 |
| EcoRⅠ | 5 | 2 |

2．质粒载体pGEX-6p-2-EGFP的酶切检测：选用1%的琼脂糖凝胶电泳对pGEX-6p-2-EGFP的酶切体系进行检测，在Fluor Chem FC3凝胶成像分析系统中观察结果，保存图像，并对双酶切后的质粒载体pGEX-6p-2-EGFP进行切胶回收。

3.9 pGEX-6p-2-EGFP与NLS-Cas9的连接

1．连接体系的确定：如表8所示，反应体系为10 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行连接反应，22℃连接3-5 h。

表8 连接体系（10 µl体系）

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 实验组/µl | 对照组/µl |
| 10 x Buffer | 1 | 1 | 1 |
| pGEX-6p-2-EGFP | 2 | 1 | 1 |
| Cas9 | 3 | 7.5 |  |
| T4 DNA 连接酶 | 4 | 0.5 | 0.5 |
| ddH2O | 5 |  | 7.5 |

2．设置空白对照

对连接实验组设立对照实验，排除自连。实验组按照pGEX-6p-2-EGFP：Cas9=1：7.5的比例进行连接，对照组只加pGEX-6p-2-EGFP载体，不加Cas9片段，加7.5 µl的无菌水，反应体系如表8所示，选用与实验组同一反应条件进行连接。

3.10 重组质粒pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的酶切鉴定

1．将转化后获得的大肠杆菌克隆接至5 ml含Amp的液体LB培养基中，37℃培养过夜后参照质粒小提试剂盒的方法进行质粒提取。

2．重组质粒pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的酶切体系：如下表9所示，反应体系为10 µl，选用无菌的1.5 ml离心管进行加样，混匀，离心后进行酶切鉴定，37℃酶切2 h。

表9 重组质粒pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的酶切体系（10 µl体系）

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 反应物 | 加样顺序 | 体积/ |
| ddH2O | 1 | 补平 |
| 10 x Buffer（K） | 2 | 1 |
| pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP | 3 | 5 |
| BamHⅠ | 4 | 0.5 |
| EcoRⅠ | 5 | 0.5 |

3．重组质粒pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的鉴定：选用1%的琼脂糖凝胶电泳对BamHⅠ和EcoRⅠ双酶切后的pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒进行鉴定，即取5 µl的酶切体系进行琼脂糖凝胶电泳，1 h后在Fluor Chem FC3凝胶成像分析系统中观察结果，保存图像。

4 结果与分析

4.1 Cas9和EGFP基因的引物设计

表10 Cas9和EGFP基因的引物序列

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 基因 | 引物序列 | Tm值 | 引物长度（bp） |
| Cas9 | F:5＇GCGGATCCATGGCCCCAAAGAAGAAGCG 3＇ | 70.3 | 28 |
|  | R:5＇CGGAATTCGTCGCCTCCCAGCTGAG3＇ | 63.5 | 25 |
| EGFP | F:5＇CGGAATTCGCCACCATGGTGAGCAAG3＇ | 66.7 | 26 |
|  | R:5＇CCGCTCGAGCTACTTTTTCTTTTTTGCCTGGCCGGCCTTTTTCGTGGCCGCCGGCCTTTTCTTGTACAGCTCGTCCATGC3＇ | 61.7 | 80 |

注：红色为酶切位点，蓝色为核定位信号。

4.2 PCR扩增

![R`_60%G7R[`KI0]41CX)@6G]()

图5 EGFP DNA片段的扩增

Fig 5 Amplification of EGFP DNA fragment

1：58.0℃；2：56.1℃；3：53.7℃

![B%{%MYX5$(~)$]S6KSV8[AB]()

图6 Cas9 DNA片段的扩增

Fig 6 Amplification of Cas9 DNA fragment

1：58.0℃；2：56.1℃；3：53.7℃；4：50.7℃

为获得实验所需的EGFP基因和Cas9基因，利用PCR法扩增模板质粒spCas9-sgRNA-EGFP，在选择退火温度时按照Tm减去5～10℃即为退火温度的方法采用温度梯度进行退火，结果如图5、图6所示。图5为EGFP基因的PCR产物电泳图，对其设置3个温度进行扩增，3个温度下均成功扩增出了分子量约为732 bp的片段，该片段与预期的EGFP基因片段的分子量接近，应为目标基因片段，且第3泳道的DNA条带最亮，确定本实验中EGFP的最适退火温度为53.7℃；图6为Cas9基因的PCR产物电泳图，对其设置4个温度进行扩增，发现存在比较多的非特异性条带，说明设计的引物扩增目标片段时专一性较差，但是4个温度下均成功获得了分子量约为4200 bp的片段，该片段与预期的Cas9基因片段的分子量接近，应为目标基因片段，且第3条泳道DNA条带最亮，表明该实验中Cas9的最适退火温度也为53.7℃。

4.3 感受态大肠杆菌转化率检测

为了检测大肠杆菌感受态细胞的转化率，利用标准质粒pUC19对新制备的大肠杆菌感受态细胞进行转化，转化率一般介于5×106～2×10７转化子/µg为适，其计算公式如下：

转化率 = 菌落数 / DNA质量 =（菌落数×稀释倍数）/（浓度×体积）

平板计数法记得菌落数为526个，测得转化率为3.156×107转化子/µg，该转化率符合大肠杆菌感受态细胞转化率的最适区间，即成功制备了大肠杆菌感受态细胞。

4.4 pGEX-6p-2与EGFP连接

![ZQVDKOSB]B)T{%G7[[(7P$I]()

图7 pGEX-6p-2-EGFP重组质粒

Fig 7 pGEX-6p-2-EGFP recombinant plasmid

为构建pGEX-6p-2-EGFP重组质粒，利用限制性内切酶EcoRI、XhoI对pGEX-6p-2载体和EGFP基因双酶切，于22℃条件下连接3 h后转化至大肠杆菌感受态细胞，从转化平板上随机挑取6个单克隆，接种培养提取质粒后采用1%的琼脂糖凝胶电泳对提取的质粒进行检测，结果如图7所示，1至6号泳道为提取的质粒。质粒的大小大约位于5717 bp左右（pGEX-6p-2为4985 bp；EGFP为732 bp），与预期重组质粒的分子量接近，且质粒的三种形态表现正常，即为共价闭合>线形>开环。

4.5 pGEX-6p-2-EGFP重组质粒的酶切鉴定

![GNZ2OH]R$WF9A)I75[RR0MD]()

图8 重组质粒pGEX-6p-2-EGFP的双酶切（EcoRI／XhoI）鉴定

Fig 8 Double digestion of pGEX-6p-2-EGFP recombinant plasmid（EcoRI／XhoI）

为验证4.4实验中提取的质粒是否为成功构建的pGEX-6p-2-EGFP重组质粒，利用限制性内切酶EcoRI、XhoI对6个重组质粒分别进行双酶切，结果如图8所示，1至6号泳道均为两条带，一条带约为4985 bp，另一条约为732 bp，片段大小分别与pGEX-6p-2质粒和EGFP基因的分子量接近，应为目标基因片段，即1至6组均为pGEX-6p-2-EGFP重组质粒。但第5组质粒含有轻微杂带，此质粒可能不纯，故不保存该质粒。

4.6 pGEX-6p-2-EGFP与NLS-Cas9的连接



图9 pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒

Fig 9 pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP Recombinant Plasmid

为构建pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒，利用限制性内切酶BamHI、EcoRI对pGEX-6p-2-EGFP载体和NLS-Cas9基因双酶切，于22℃条件下连接3 h后转化至大肠杆菌感受态细胞，从转化平板上挑取8个单克隆，接种培养提取质粒后采用1%的琼脂糖凝胶电泳对提取的质粒进行检测，结果如图9所示，1、3、6、8号泳道为提取的质粒。质粒的大小大约位于9917 bp左右（pGEX-6p-2-EGFP为5717 bp，Cas9为4200 bp），与预期重组质粒的分子量接近，且质粒的三种形态表现正常，即为共价闭合>线形>开环；2、4、5、7号泳道质粒的分子量略小，未能连接上Cas9。

4.7 pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒的酶切鉴定

![LUOT[[ADDGM]LE85M25W`JC]()

图10 重组质粒pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的双酶切（BamHI／EcoRI）鉴定

Fig 10 Double digestion of pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP recombinant plasmid （BamHI／EcoRI）

为验证4.6实验中提取的质粒是否为成功构建的pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒，利用限制性内切酶BamHI、EcoRI对8个重组质粒分别进行双酶切，结果如图10所示，1、3、6、8号泳道均为两条带，一条带约为5717 bp，另一条约为4200 bp，片段大小与pGEX-6p-2-EGFP质粒和Cas9基因的分子量接近，应为目标基因片段，即1、3、6、8组均为pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP重组质粒；2、4、5、7组的分子量与预期目标片段相差较大，即连接失败。

4.8 实验结果分析及总结

 从实验结果图可以看出，此次实验结果与预期一致，因此本实验成功，即成功完成了大肠杆菌中表达pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP质粒的构建。

5 讨论

在重组质粒pGEX-6p-2-EGFP和pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP的构建中，刚开始对PCR产物和质粒载体进行酶切时，选用的是BamHI和EcoRI两种限制性内切酶，酶切条件为37℃酶切2 h，之后在连接的过程中一直连接不成功。通过查找资料，怀疑其连接不成功的原因主要有四点：一是酶失活导致的连接不成功。首先采用BamHI限制性内切酶对pGEX-6p-2质粒进行单酶切，连接时设立空白对照组，即实验组加T4 DNA连接酶，自连组不加T4 DNA连接酶，转化后由平板菌落数可知，实验组的菌落数茂密，而自连组的菌落数稀少，即得出BamHI限制性内切酶和T4 DNA连接酶均正常工作的结论。之后，又选用EcoRI限制性内切酶按如上步骤进行实验，结果同上，即限制性内切酶和T4 DNA连接酶均正常；二是提取的质粒和片段不纯导致连接不成功。在进行质粒提取以及对目的基因片段进行切胶回收过程中，怀疑在加入漂洗液PW后乙醇未能完全挥发，残留于回收后的质粒和目的基因片段中，使得其在连接体系中发挥了一定的作用，导致连接不成功。基于此，重新制备了pGEX-6p-2质粒和目的基因EGFP，在制备过程中的除乙醇环节，将其置于超净工作台中，通风足够长时间，使乙醇充分挥发，但在之后的连接过程中，仍然得不到想要的阳性克隆；三是连接温度和连接时间不准确导致连接不成功。在刚开始进行连接时一直采用在水浴锅中22℃连接过夜的条件，后来用温度计检测，发现水浴锅的温度不准，导致连接温度一直高于22℃，于是便改用了生化培养箱控制温度。通过查看T4 DNA连接酶的说明书，知其在22℃条件下连接3 h即可成功连接，在检测BamHI和EcoRI限制性内切酶以及T4 DNA连接酶是否有效时，采用22℃连接3 h的条件，结果菌落生长状态良好；四是酶切不彻底导致连接不成功。PCR产物两端含有一定的保护性碱基，如果酶切不充分，连接一定成功不了，于是在前面三点的基础上改变了酶切条件，改为酶切过夜（其实3-5 h也足够酶切完全），之后连接便成功了。基于以上经验，认为在进行质粒构建时，PCR产物的酶切一定要充分，否则只会事倍功半！

还有一个很重要的点就是大肠杆菌感受态细胞的转化率问题，刚开始做转化的时候，由于大肠杆菌感受态细胞的储存时间过久，导致其转化率较低，所以在做克隆一直不成功，之后重新制备了大肠杆菌感受态细胞，并选用平板计数法测其转化率为3.156×107转化子/µg，达到了5×106～2×10７转化子/µg的最适区间，之后再做转化便成功获得了本实验所需要的阳性克隆。

6 展望

本实验成功构建了大肠杆菌中表达pGEX-6p-2-NLS-Cas9-EGFP质粒，为进一步研究CRISPR/Cas9系统提供了有用的素材。近两年来，高效简便的操作由CRISPR/Cas9系统启用，它的光明前景将有助于基因组和RNA的革命和改进，将有望在基因功能解析、人类基因治疗、靶向药物研制、合成生物学以及基因网络干扰中大放异彩，因此，我们有理由相信该技术将对生物学领域的发展起到深远影响。另外，CRISPR/Cas9系统除了在基因组改造领域作为靶向修饰的工具之外，还可以将其改造为调控基因表达的工具，即CRISPR干扰(CRIS-PR interference，CRISPRi)技术。虽然我们对CRISPR/Cas9 系统的了解还不够全面和深入，存在的部分问题还有待于进一步解决与发展，但是随着科学家对 CRISPR/Cas9 系统研究的不断深入，该技术的应用将渐趋成熟，发展也更全面，我们有理由相信CRISPR/Cas9 系统将更好的帮助我们研究基因的功能，探索基因组的奥秘。

参考文献

[1]廖鹏飞, 聂旺, 余雅心,等. ZFNs、TALENs和CRISPR-Cas基因组靶向编辑技术及其在植物中的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2016(2):442-451.

[2]Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(12):5429-5433.

[3]Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR elements in Yersinia pestis acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies[J]. Microbiology, 2005, 151(3):653-663.

[4]Mojica F, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements[J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 60(2):174-182.
[5]Jansen R, Embden J D, Gaastra W, et al. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes[J]. Molecular Microbiology, 2002, 43(6):1565-1575.

[6]赵海卫,吕欣,尹文.CRISPR/Cas9系统——靶向基因组编辑的新策略[J].中国病原生物学杂志,2015,10(03):281-284.

[7]Redding S, Sternberg S H, Marshall M, et al. Surveillance and Processing of Foreign DNA by the Escherichia coli CRISPR-Cas System[J]. Cell, 2015, 163(4):854.

[8]Mahfouz M M, Zhu J K. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks.[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(6):2623-2628.

[9] Ran F A, Hsu P D, Wright J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. Trends in Genetics Tig, 2016, 8(11):2281-2308.

[10] Jinek M, Jiang F, Taylor D W, et al. Structures of Cas9 Endonucleases Reveal RNA-Mediated Conformational Activation[J]. Science, 2014, 343(6176):1247997.

[11]Nishimasu, Hiroshi, F. , et al. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA[J]. Cell, 2014, 156(5):935.

[12]赵元茵, 王元忠, 曹念,等. 核定位信号及其分析策略[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, 25(8):683-689.

[13]李云龙, 龙飞燕, 杨臣臣,等. 携带EGFP基因的戊型肝炎病毒重组质粒的构建及其感染性的验证[J]. 病毒学报, 2016(5):529-537.

[14]何炜, 章茜, 张朝,等. 重组原核表达载体pGEX-4T-1-MAGE-1的构建及表达[J]. 郑州大学学报(医学版), 2006, 41(3):491-494.

[15]周宇荀, 魏东芝, 王二力. 融合蛋白表达载体pGEX及其应用[J]. 生命科学, 1998(3):122-124.

[16]尤超, 赵大球, 梁乘榜,等. PCR引物设计方法综述[J]. 现代农业科技, 2011(17):48-51.

[17]韩阳, 何佳梦. 琼脂糖凝胶电泳的理论技术和应用[J]. 科协论坛(下半月), 2012(6):98-99.

[18]Wang M, Lai E. Pulsed field separation of large supercoiled and open-circular DNAs and its application to bacterial artificial chromosome cloning[J]. Electrophoresis, 1995, 16(1):1-7.

致谢

时光荏苒，毕业接踵而至，回想起自己四年的大学生活，心中仍然久久不能平静。本文的写作直接得益于我的论文指导老师阮海华教授的悉心指点，从论文的选题到实验的安排，从技术路线推敲到实验细节，无一不凝聚着她的心血，阮老师不仅在学业上言传身教，在平时的日常生活中她也对我关怀备至，她以其高尚的品格给予我以情操上的熏陶，这也是我毅然决然报考了她的研究生的一大原因。在今后的研究生生涯中，我将以锲而不舍的精神努力做出成绩来报答恩师，尽我所学做些有意义的事来报答社会。同时，我必须感谢我的师姐胡双燕和师兄张春晨，初来实验室，是他们在我不懂的时候给予我指导，在我出错的时候及时指正，在我松懈懒散的时候及时提醒，正是因为他们给予我无私的帮助，我才得以顺利的完成实验和论文。

大学四年，匆匆而过，在这短短的四年里，有一个人对我的影响至关重要，那就是我的班主任王素英老师。四年来，她不仅传授给我们知识而且还非常关心我们的生活，在我们有疑问和困惑的时候，她都会施以援手，也就是在她的教导下，我才能够拥有充实的知识储备，为完成毕业实验打下坚实的基础。四年的师生情谊让我终生难忘，我也一定会遵循王老师的为人之道去力所能及的帮助有困难的人。

最后，也感谢各位老师能在百忙之中帮助我修改论文，正是因为老师的负责，我才有机会如愿完成自己的学业，进而取得发展成才的机会，感谢天商，感谢生命中的每一次幸运！