

技术方法

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.001440

利用 CRISPR/Cas9 系统检测同源片段长度对重组效率的影响

孙 菱¹, 康月茜¹, 唐 弘¹, 卢 楠¹, 徐 蕾¹, 杨 婕¹, 庄稀尧¹, 王瑜伟², 杨 春¹

(1. 重庆医科大学分子医学与肿瘤研究中心病原生物学实验室, 重庆 400016;

2. 重庆市中医院检验科, 重庆 400011)

【摘要】目的:在大肠埃希菌中利用 CRISPR/Cas9 系统对插入失活的 mCherry 红色荧光报告基因进行靶向切割并重组, 以研究同源片段长度对重组修复效率的影响。**方法:**通过 Golden Gate 克隆方法构建 Cas9 表达质粒 pKD46-Cas, 转化至大肠埃希菌 DH5 α 中, 阿拉伯糖诱导表达 Cas9 蛋白, Western blot 检测蛋白表达。用同样的方法, 将一段随机靶标序列引入 pTac-mCherry-3guid 质粒中, 造成插入失活, 同时在插入序列两侧分别预留 0、40、80、120 bp 的 mCherry 编码区 overlap 序列, 构建出含不同长度同源片段的插入失活 mCherry 荧光报告质粒 pQ0、pQ40、pQ80、pQ120, 并将其分别转化到表达 Cas9 蛋白的大肠埃希菌 DH5 α 中, 对应的细菌平板分别为 pQ0 组、pQ40 组、pQ80 组及 pQ120 组, 每组各 9 个平板, 对每个平板的红、白色菌落进行计数, 分别计算出红色菌落数/菌落总数的比值, 即为重组修复效率。**结果:**PCR 及测序证实 pKD46-Cas 质粒及插入失活的 mCherry 荧光报告载体 pQ0、pQ40、pQ80、pQ120 构建成功, Western blot 鉴定 pKD46-Cas 在大肠埃希菌 DH5 α 中表达 Cas9 蛋白; 红色菌落计数显示 pQ0 组为 0, 其余 3 组均出现红色菌落, 4 组重组修复效率的差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 重组修复效率与同源片段长度呈正相关 ($r = 0.792, P < 0.01$)。**结论:**成功建立了基于 mCherry 红色荧光报告基因和 Cas9 的同源重组效率检测系统; 研究表明不包含同源片段的质粒无法进行有效的重组, 当同源片段在 0~120 bp 时其长度对重组效率有影响。此系统为深入研究原核生物的同源重组提供了一个新的技术平台。

【关键词】CRISPR/Cas9; 同源重组修复; 基因编辑技术**【中图分类号】**Q78**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2016-10-10**作者简介:**孙 菱, Email: 760227515@qq.com,

研究方向: CRISPR 相关方面研究。

通信作者:杨 春, Email: yangchunim@163.com。**基金项目:**重庆市教委科学技术研究资助项目 (编号: KJ1500203);

重庆市卫计委西医资助项目 (编号: 2015MSXM081); 重庆

市科委基础科学与前沿技术研究资助项目 (编号: cstc2016

jcyjA0277)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20171128.1716.064.html>

(2017-11-28)

therapeutics[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3:e196.

[5] de Kievit TR, Kakai Y, Register JK, et al. Role of the Pseudomonas aeruginosa las and rhl quorum-sensing systems in rhlI regulation[J]. FEMS Microbiol Lett, 2002, 212(1): 101-106.

[6] Ritchie AJ, Jansson A, Stallberg J, et al. The Pseudomonas aeruginosa quorum-sensing molecule N-3-(oxododecanoyl)-L-homoserine lactone inhibits T-cell differentiation and cytokine production by a mechanism involving an early step in T-cell activation[J]. Infect Immun, 2005, 73(3): 1648-1655.

[7] Wagner C, Zimmermann S, Brenner-Weiss G, et al. The quorum-sensing molecule N-3-oxododecanoyl homoserine lactone (3OC₁₂-HSL) enhances the host defence by activating human polymorphonuclear neutrophils (PMN)[J]. Anal Bioanal Chem, 2007, 387(2): 481-487.

[8] Moran VA, Perera RJ, Khalil AM. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs[J]. Nucleic Acids Res, 2012, 40(14): 6391-6400.

[9] Carpentier S, Aiello D, Atianand MK, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes[J]. Science, 2013, 341(6147): 789-792.

[10] Chu C, Qu K, Zhong FL, et al. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions[J]. Mol Cell, 2011, 44(4): 667-678.

[11] Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: cellular address codes in development and disease[J]. Cell, 2013, 152(6): 1298-1307.

[12] Collier SP, Collins PL, Williams CL, et al. Cutting edge: influence of Tmevpgl, a long intergenic noncoding RNA, on the expression of Ifng by Th1 cells[J]. J Immunol, 2012, 189(5): 2084-2088.

[13] Wang P, Xue Y, Han Y, et al. The STAT3-binding long noncoding RNA lnc-DC controls human dendritic cell differentiation[J]. Science, 2014, 344(6181): 310-313.

(责任编辑: 方 济)

Evaluation of the relationship between recombination efficiency and the length of homologous fragments using the CRISPR/Cas9 system

Sun Ling¹, Kang Yuexi¹, Tang Hong¹, Lu Nan¹, Xu Lei¹, Yang Jie¹,

Zhuang Xiyao¹, Wang Yuwei², Yang Chun¹

(1. Center for Molecular Medicine and Cancer Research, Laboratory of Pathogenic Biology, Chongqing Medical University; 2. Clinical Laboratory, Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital)

[Abstract] **Objective:** In this study, CRISPR/Cas9 system was used to target cutting and restructuring of the mCherry red fluorescent reporter gene which inserted an inactivation sequence, and to evaluate the relationship between the length of homologous fragments and recombinant efficiency by the CRISPR/Cas9 system and mCherry reports genes. **Methods:** Cas9 expression plasmid pKD46-Cas was constructed by Golden Gate clone method and transfected into *E. coli* DH5 α , and the arabinose induced Cas9 protein expression which was detected by Western blot assay. Using Golden Gate clone method, the mCherry red fluorescent reporter gene of pTac-mCherry-3guid plasmid was targeted insertion a random DNA sequence, whose flanking contain 0, 40, 80 and 120 bp homologues repeats respectively with mCherry gene to construct the plasmids pQ0, pQ40, pQ80, pQ120. This gene insertion caused reporter gene inactivation. The pQ0, pQ40, pQ80 and pQ120 were transformed into *E. coli* DH5 α which expressing Cas9, the corresponding bacteria solid medium were pQ0 group, pQ40 group, pQ80 group and pQ120 group. Then the ratio of the red colonies to the total colonies were statistic to analysis the recombination efficiency. **Results:** The result of PCR and sequencing analysis showed that pKD46-Cas and the vector pQ0, pQ40, pQ80, pQ120 were correctly constructed. Western blot test demonstrated that Cas9 prote in could successfully express in *E. coli* DH5 α . There was no red colonies in pQ0 group. The difference of recombination efficiency of pQ0, pQ40, pQ80, pQ120 group was statistically significant ($P < 0.05$), the length of homologous fragments was positive correlated to the recombination efficiency ($r = 0.792, P < 0.01$). **Conclusion:** This study developed a new system based on CRISPR/Cas9 and mCherry fluorescent reports gene to detect the efficiency of homologous recombination. recombination may fail without the homologous fragment and the length of the homologous fragment from 0 to 120 bp had effect on the recombination efficiency. This system would be a new technology platform for further study of homologous homologous in prokaryotes.

[Key words] CRISPR/Cas9; homologous recombination; gene edition

CRISPR/Cas9 技术是近年来发展起来的新型基因编辑技术,能对某一特定的基因进行突变、敲除、插入等,目前已成功用于多种生物。利用 Cas9 蛋白进行基因组编辑,会在靶标位点形成 1 个 DNA 双链的缺口,此时机体主要可通过 2 种形式进行自我修复,即非同源末端的连接和同源重组。非同源末端的直接连接会在基因组中引入突变,导致目的基因编码区移码,从而达到基因敲除的目的^[1-3];而同源重组方式则需要额外导入与切割位点两侧同源的 DNA 序列,通过同源重组修复达到基因组编辑的目的,相对而言可以实现更为精确的编辑。同源重组是原核生物对基因组损伤的常用机制且常被用于基因工程等方面,如利用同源重组修复机制将外源片段引入细菌基因组的特异性位点,从而实现基因的敲除和敲入;还可以结合 PCR 技术和同源重

组的原理向质粒引入点突变等^[4-5]。因此,有必要对同源片段的序列、二级结构及长度等问题进行较为深入的研究。

本文利用最新的基因编辑技术 Cas9/CRISPR 系统和 mCherry 红色荧光报告基因系统,发明了一种快速简便的同源重组效率检测方法,并利用该技术在 大肠埃希菌 中初步研究了不同长度同源片段对重组效率的影响。这一方法简便灵敏,可以直接在可见光下观察菌落进行统计,为深入研究原核生物的同源重组提供了一个新的技术平台。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒和菌株 *E. coli* DH5 α 感受态细胞购自大连宝生物 (Takara), pET28-Cas9-6 $\times$ His 质粒购自 addgene (Plasmid

#47327)、pKD46 质粒和 pTac-mCherry-3g 质粒由武汉伯远生物科技有限公司赠送。

1.1.2 主要试剂 DNA marker DL2000、DL10000、细菌基因组 DNA 小量纯化试剂盒、胶回收试剂盒以及质粒提取试剂盒购自 Takara 公司;限制性内切酶 *Bsa* I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;KOD FX PCR 聚合酶购自 TOYOBO 公司;Ampicillin(Amp)购自重庆惠尔立公司。Cas9 抗体购自 Santa 公司。

1.1.3 引物设计 本实验涉及的所有引物和测序均由武汉擎科创新生物科技有限公司完成。载体的构建采用改良的 Golden Gate 克隆方法^[9],在引物上引入 Type II 型内切酶识别位点,利用其切割识别位点下游区域产生不同的黏末端,一步法进行多片段连接克隆。具体引物如表 1 所示,黑体为 *Bsa* I 或 *Sap* I 内切酶的识别位点,下划线为切割后产生的黏末端序列,斜体碱基部分为随机引入的 CRISPR/Cas9 切割序列及对应的 guild RNA 编码序列。测序引物为 S-33mCH 和 S15AR。

表 1 本实验中所用的引物

Tab.1 Primers for molecular cloning and sequencing

引物名称	引物序列
3gF	ACCGTCTCGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
3mCHR0	TTCGGTCTCGATGTCGACATCCCGACTACTTG
3mCHR40	AACGGTCTCGATGTCAGTGGGAGCGCGTGATG
3mCHR80	AAAGGTCTCGATGTCATGTACGGCTCCAAGGC
3mCHR120	AACGGTCTCGATGTTGAAGGTGACCAAGGGTG
gRNAR	TTTGCTCTCTAACTAGGTGGCATCGCCCTCGCCACACA TTATACGAGCCGGAAG
3mTF	TTTGCTCTCAACATCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCAAGC CCTCGGGAAGGACAG
Sap46F	AAGGCTCTTCCGGCATCTCACGATAATATCC
Sap4466R	TTGCTCTTCTAACAAAATTATTCCTATAGTGAGTCGTATTA GGTGGCACTTTTCGGGA
SapC9F	TTGCTCTTCAGTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGG ACAAGAAGTACTCCATTG
SapC9R	TTAGCTCTTCGGCTATTAGCTGTCTCCACCGAGCTGAG
测序引物:	
S-33mCH	GCTTCAAGTAGTCGGGGATGTC
S15AR	GTGTCTCAAAATCTCTAAACGACCG

1.2 实验方法

1.2.1 阿拉伯糖诱导 Cas9 表达质粒的构建及 Western blot 鉴定 pKD46-Cas9 质粒包含 1 个由该质粒在阿拉伯糖诱导下,30℃可复制并表达 Cas9 蛋白。利用 Sap46F 和 Sap4466R 扩增 pKD46 质粒,得到约 3 200 bp 的包含大肠埃希菌阿拉伯糖诱导启动子 *Para*,温敏复制子 *pSC101 ts* 和 Amp 抗性基因的载体片段;利用引物 SapC9F 和 SapC9R 扩增 *Pet28b*-Cas9 得到约 4 000 bp 的 Cas9 ORF 区域;等量混合载体片段

和 Cas9 片段后,加入 *Sap* I 内切酶和 T4 连接酶,T4 Buffer,37℃孵育 4 h 转化 DH5 α 感受态后,涂布 Amp 平板,挑取克隆,SapC9F 和 SapC9R 引物 PCR 鉴定后,送阳性克隆测序。挑取测序正确的单菌落 30℃摇菌过夜,加入阿拉伯糖诱导 3 h,收集 0.5 mL 菌液离心后用 PBS 重悬,取少量蛋白样品经 7.5%的 SDS-PAGE 电泳后,以 350 mA 恒流转膜 2 h,封闭 4 h,用封闭液稀释的兔抗 Cas9 多克隆抗体(1:300)4℃静置过夜,PBS-T 洗涤 3 次,HRP 标记的羊抗兔 IgG(1:3 000)孵育 2 h,PBS-T 洗涤,DAB 显色观察结果。确定 Cas9 可在大肠埃希菌内成功表达。将其制备成感受态细胞,-80℃储存备用。

1.2.2 包含不同长度同源片段的 mCherry 荧光报告质粒的构建 pTac-mCherry-3g 质粒包含 1 个正向的大肠埃希菌 Lac 启动子及其下游驱动的 Cas9 guild RNA 的 3'端区域,该区域 guide RNA 的 3'端不具有特异性;为了与 Cas9 表达质粒兼容,该质粒采用 p15A 复制子和氨苄西林(AmpR)抗性;以及反向的 mCherry 红色荧光报告基因及其下游的反向启动子 *tac* 启动子,如图 1 所示。mCherry 报告基因为组成型表达,转入大肠埃希菌感受态后菌落呈现樱桃红色。以 pTac-mCherry-3g 质粒为模板,用引物 3mTF 和 gRNAR 扩增出包含约 500 bp 的 DNA 片段 F0,该片段包含一段 20 bp 的靶序列,mCherry 基因 5'端 280 bp 的编码区及其 *tac* 启动子和反向的大肠埃希菌 Lac 启动子及其下游与靶标序列配对的 guild RNA 编码序列。为了进行 Golden Gate 克隆,上下游引物均引入了 *Bsa* I 酶切位点,如图 1 所示。同样以 pTac-mCherry-3g 质粒为模板,用上游引物 3gF 与下游引物 3mCH0、3mCH40、3mCH80 和 3mCH120 组合,得到 4 条 PCR 片段 F1-4,这 4 条片段均包括 CRISPR/Cas9 系统 guild RNA 区域的 3'端编码序列(不与靶标序列特异性结合的 guild RNA 区域)、大肠埃希菌 P15A 低拷贝复制子、 β -内酰胺酶抗性编码区(AmpR)以及 mCherry 基因的 3'端序列。上述 4 条下游引物与 mCherry 基因的配对区域分别距其起始密码子约 310、270、230、190 bp,与 PCR 产物 F0 中包含的 mCherry 基因 5'端分别具有约 0、40、80 和 120 bp 的同源重复区域。为了进行 Golden Gate 克隆,上下游引物均引入 *Bsa* I 酶切位点,如图 1 所示。质粒的构建过程如图 1 所示。

1.2.3 重组效率的数据处理 pTac-mCherry-3g 质粒组成型的表达红色荧光蛋白,转入大肠埃希菌 DH5 α 后所有菌落均为红色。包含不同同源片段长度的质粒 pQ0、pQ40、pQ80 和 pQ120 中 mCherry 基因被插入失活,转入 DH5 α 后菌落为白色。该试验中,转入包含 pTac-Cas9 的 DH5 α 感受态后,mCherry 中的插入片段被切割,同源片段重组后得到野生型的 mCherry 报告基因,菌落呈红色。转化后涂布 Amp 平板,可见光下肉眼计数白色菌落和红色菌落,分别计算出红色菌落数/菌落总数的比值,即为重组修复效率。

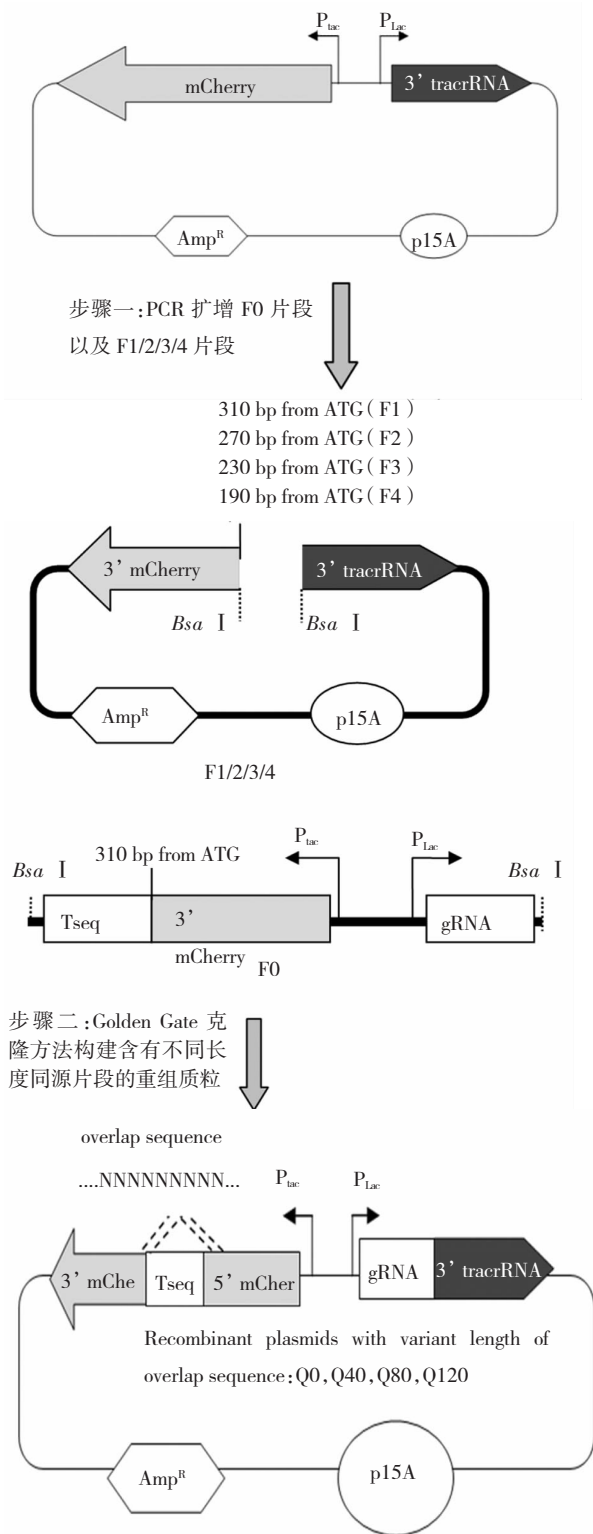


图 1 荧光报告质粒的构建

Fig.1 Construction processing of fluorescent

1.3 统计方法

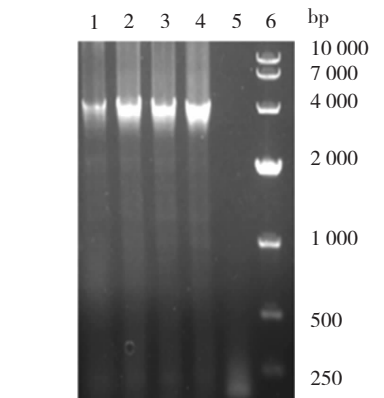
统计分析软件使用 SPSS 19.0, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, pQ0-pQ120 四组之间组间差异采用 Kruskal-Wallis 秩和检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。两者的关系描述采用

Spearman 相关分析, 检验水准 $\alpha=0.01$ 。

2 结果

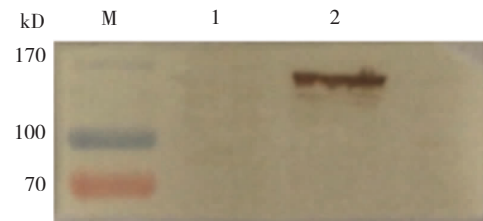
2.1 Cas9 表达质粒的构建及 Western blot 鉴定

菌液 PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 在 4 000 bp 处出现清晰的阳性条带; Western blot 分析显示 pKD46-Cas9 阿拉伯糖诱导组在 140 kD 左右可见特异性的条带, 而对照为转入空质粒 pKD46 的对照菌株 DH5 α 未见到条带 (图2)。



1~3 为待鉴定的克隆菌液; 4 为阳性对照; 5 为阴性对照; 6 为 DNA DL10000 Marker

A. 重组质粒 pKD46-Cas9 的 PCR 鉴定



M 为 protein Maker; 1 为 pKD46 在 DH5 α 中的表达; 2 为 pKD46-Cas9 在 DH5 α 中的表达

B. pKD46-Cas9 在 DH5 α 中表达的 Western blot 鉴定

图 2 表达质粒 pKD46-Cas9 PCR 鉴定及其在 DH5 α 中表达的 Western blot 鉴定结果

Fig.2 PCR identify the recombinant pKD46-Cas9 and Western blot analysis of expression of Cas9 protein

2.2 插入失活的荧光报告载体的构建

扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 在 2 号泳道 3 000 bp 可见清晰的阳性条带, 与目的片段 F0 大小一致, 如图 3A 所示; 在 3 号泳道 500 bp 可见清晰阳性条带, 与目的大小一致, 即 F1 基因片段, 如图 3A 所示。挑取 3 个菌落利用测序引物 S-33mCH 和 P15AR 对进行 PCR 鉴定, 鉴定结果经 1%

琼脂糖凝胶电泳检测,可见 1、2 号泳道条带与目的条带大小一致,重组质粒 Q0 初步鉴定成功,如图 3B 所示。用表 1 中的测序引物 S-33mCH 和 S15AR 测序正确后,用于后续实验。其余检测质粒 Q40、80、120 构建方法相同,均经测序正确后使用,结果未列出。

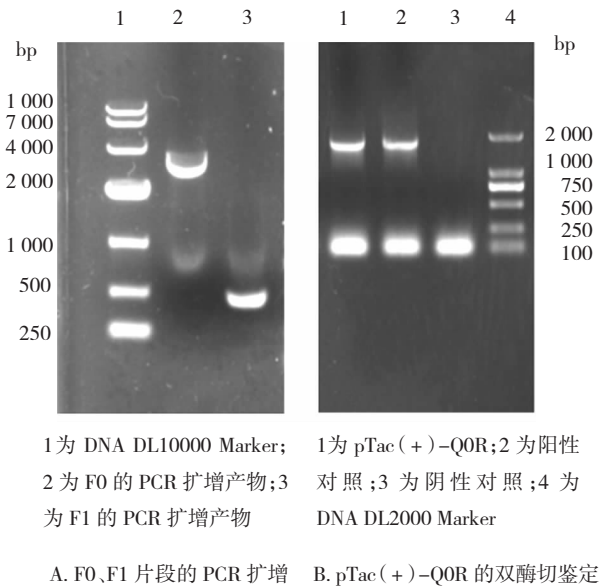


图 3 插入失活的荧光报告质粒的构建及鉴定
Fig.3 Identification of vector of pTac(+)-Q0R by bacteria liquid PCR

2.3 CRISPR/Ca9 系统的切割效率的检测

将不含有同源片段的 mCherry 插入失活报告质粒 pQ0 转入 pKD46-Cas9 感受态 DH5 α , 涂布 Amp 平板观察, 未见有红色菌落产生, 但仍然有一定数量的白色菌落生长, 如图 4A 所示; 同时转化 Pkd46 感受态 DH5 α 作为对照, 涂布 Amp 平板观察, 亦未见有红色菌落产生, 如图 4B 所示, 转化效率约为实验组的 3 倍。

2.4 不同同源臂长度对重组效率影响的比较

将具有不同同源片段长度的质粒, pQ40-Q120 转入 pKD46-Cas9 感受态 DH5 α 和对照感受态后, 涂布 Amp 平板, 对平板上总菌落数及红色荧光菌落数进行计数; 结果显示, pQ0 组均无红色荧光菌落, 具有同源片段的组别均出现红色菌落 (图 4), pQ40-Q120 的切割效率分别是 (0.029 ± 0.010) 、 (0.026 ± 0.017) 、 (0.050 ± 0.015) 。经 Kruskal-Wallis 秩和检验发现 pQ0-pQ120 4 组之间切割效率差异有统计学意义 ($P=0.000$, 表 2), 可认为同源片段在 0~120 bp 时其长度对重组效率有影响, 不包含同源片段的质粒无法进行有效的重组。经 Spearman 相关分析得出重组修复效率与同源片段长度呈正相关, 相关性有统计学意义 ($r_s=0.792$, $P=0.000$)。

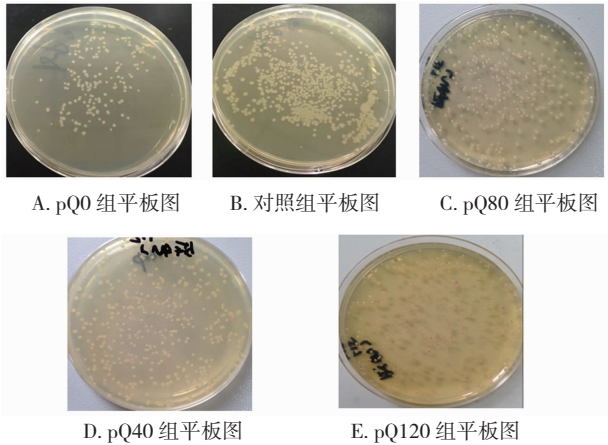


图 4 不同同源臂长度的切割效率比较

Fig.4 Comparison of cutting efficiency among different lengths of homologous sequence

表 2 各组重组修复效率比较

Tab.2 Comparison of recombinant efficiency of each group

组别	同源片段长度 (bp)	重组效率
pQ0组	0	0.000 ± 0.000
pQ40组	40	0.029 ± 0.010
pQ80组	80	0.026 ± 0.017
pQ120组	120	0.050 ± 0.015

注: Kruskal-Wallis 秩和检验: 检验统计量 $=25.551$, $P=0.000$; Spearman 相关分析: $r_s=0.792$, $P=0.000$

3 讨论

CRISPR/Cas9 系统在向导 RNA 的指引下利用 Cas9 蛋白切割临近识别序列的基因组, 出现 DNA 双链的切口, 可以实现对 DNA 位点的特异性切割, 这个切口激发细胞产生自我修复, 主要有 2 种形式即非同源末端的连接和同源重组, 通过这一机制可以在内源基因实现定向的敲除或实现靶向插入外源基因。真核生物可以有效的利用 2 种机制进行基因组修复, 而在大肠埃希菌中, 发现其几乎不能进行有效的非同源重组修复。而当切割位点的两侧具有同源片段时, 可以实现高效的同源重组修复。这一原理也被广泛应用于细菌的基因定点敲除、敲入和构建突变质粒等^[1,2,5]。因此, 有必要对同源序列的长度对重组效率的影响进行探讨。

本实验通过在荧光报告基因 mCherry 的开放阅读框中插入 1 段随机的靶标序列, 一旦靶标序列被 Cas9/guide RNA 复合体识别并切割, 被插入失活的 mCherry 基因通过同源重组的方式进行自我修复, 肉眼就可直接观察到红色的菌落。本研究设计了在

靶标序列的两侧预留不同长度的上下游同源编码区,在此基础上构建与靶标序列互补长度不同的 guide RNA 的质粒。结果发现不包含同源片段的质粒无法进行有效的重组,当同源片段长度在 0~120 bp 时,其长度对重组效率有影响且重组修复效率与同源片段长度呈正相关。这一结果证明原核生物,至少在大肠埃希菌中对同源重组修复的依赖性。本实验中只测试了 0、40、80 和 120 bp 有限的组别,对更短和更长的片段对重组的影响还有待进一步深入研究^[3,7-8]。

此外,本课题组构建的基于 pKD46 质粒骨架的 Cas9 表达质粒,相对于其他质粒,具有温度敏感型复制子,在 30 ℃ 时,能够稳定复制,而在 37 ℃ 时,质粒复制受到抑制,随着细菌的分裂繁殖而丢失^[9]。该质粒采用了 Amp 抗性,与后续转入的 mCherry 报告基因具有相同抗性,但是在 37 ℃ 时复制会受到抑制;而转入的报告基因质粒为 p15A 复制子,37 ℃ 复制不受影响,而且同样具有 Amp 抗性。所以,表达的 Cas9 蛋白对报告基因质粒进行切割后,表达质粒会自行丢失,不会影响后续结果。而报告基因质粒包含的 p15A 拷贝复制子保证了 Cas9 蛋白不至于对太多拷贝的质粒进行切割,从而造成切割不完全的问题。而报告基因之所以选用 mCherry 基因,是因为利用自然光线就可以成为其激发光源,而发射光波长类似于红色荧光,相较于常用的绿色荧光,在自然环境下更易于观察,能够快速直观地反映实验结果^[10-12]。

目前的文献还没有快速直接的利用同源片段重组效率的检测系统,以最普遍使用的大肠埃希菌为例,需要针对其基因组设计复杂的同源片段,通常为线性片段,电转化宿主菌以后,利用随机发生的事件来进行同源重组,这一原理也被用于基因敲除,但是通常无法有效评估同源片段的长度对重组效率的影响。究其原因,是因为在正常情况下,在没有损伤的基因组中发生同源重组发生的效率本来就很低,而本研究中设计的系统利用 Cas9 蛋白特异性的切割靶标序列,人为引入缺口,从而大大提高了同源重组发生的概率,可以较为忠实地反映同源片段的长度等对重组效率的影响。此外,线性化片段转化宿主菌的效率要低于环化的质粒片段,可能是由于线性化片段更容易受到 DNA 外切酶的降解,而本研究采用质粒作为报告载体,克服了这一不足^[9]。

综上所述,本研究设计的系统能够较好地利用 mCherry 报告基因进行同源片段长度对重组效率的

影响研究,不过本次实验的样本稍小,后续拟进一步增加同源片段不同长度的组别及引入不配对的同源片段进行研究。

参 考 文 献

- [1] Geisinger JM, Turan S, Hernandez S, et al. In vivo blunt-end cloning through CRISPR/Cas9-facilitated non-homologous end-joining[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8): e76.
- [2] Li JF, Norville JE, Aach J, et al. Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 688-691.
- [3] Rong Z, Zhu S, Yang X, et al. Homologous recombination in human embryonic stem cells using CRISPR/Cas9 nickase and a long DNA donor template[J]. *Protein Cell*, 2014, 5(4): 258-260.
- [4] Sun Y, Zhang X, Wu C, et al. Engineering herbicide-resistant rice plants through CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination of acetolactate synthase[J]. *Mol Plant*, 2016, 9(4): 628-631.
- [5] Vriend LE, Prakash R, Chen CC, et al. Distinct genetic control of homologous recombination repair of Cas9-induced double-strand breaks, nicks and paired nicks[J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(11): 5204-5217.
- [6] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II restriction enzymes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553.
- [7] Li QH, Jin WN, Zhang HM, et al. Comparison of effect between homologous recombinant gene knockout and siRNA gene silence in cell lines[J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2010, 18(1): 122-126.
- [8] Bouabe H, Okkenhaug K. A protocol for construction of gene targeting vectors and generation of homologous recombinant embryonic stem cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1064: 337-354.
- [9] Doublet B, Douard G, Targant H, et al. Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains[J]. *J Microbiol Methods*, 2008, 75(2): 359-361.
- [10] Tramier M, Zahid M, Mevel JC, et al. Sensitivity of CFP/YFP and GFP/mCherry pairs to donor photobleaching on FRET determination by fluorescence lifetime imaging microscopy in living cells[J]. *Microsc Res Tech*, 2006, 69(11): 933-939.
- [11] Fan JY, Cui ZQ, Wei HP, et al. Split mCherry as a new red bi-molecular fluorescence complementation system for visualizing protein-protein interactions in living cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 367(1): 47-53.
- [12] Doherty GP, Bailey K, Lewis PJ. Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation in *Bacillus subtilis*[J]. *BMC Res Notes*, 2010, 3: 303.

(责任编辑:冉明会)