

利用锁核酸化学偶联 *Fok* I 核酸酶靶向切割 HBV 基因的体外实验

马丽¹, 陈红岩¹, 朱化星², 李威³, 卢大儒¹

1. 复旦大学生命科学学院, 遗传工程国家重点实验室, 上海 200433;

2. 上海近岸科技有限公司, 上海 201203;

3. 生工生物工程(上海)股份有限公司, 上海 201611

摘要: 乙肝病毒(HBV)是有缺口的双链 DNA 病毒, 侵入人体肝细胞后形成共价闭环状 DNA(cccDNA)持续复制, 并在逆转录过程中随机整合入宿主基因组。慢性乙型肝炎感染者平均每个细胞中含有 33 个 cccDNA 拷贝, 半衰期长达 35~57 d, 很难从体内彻底清除。利用锁核酸抑制 HBV 转录, 是乙肝治疗的新策略。此外, 利用基因组编辑技术靶向切割 HBV 基因组, 有望从源头治愈乙型肝炎。基于锁核酸与双链 DNA 形成三股螺旋的能力、抵御核酸酶及聚合酶的稳定性以及对单碱基错配的敏感性, 本研究以靶向切割乙型肝炎病毒为例, 设计构建锁核酸修饰的寡核苷酸作为 DNA 结合域, 有效增强对靶基因的特异性识别; 同时利用 *Fok* I 核酸酶分子量小、二聚化时才具有酶活等特点, 设计构建 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白作为 DNA 切割域; 进而通过双功能交联剂 GMBS, 建立了 5'端氨基(-NH₂)修饰的锁核酸与 N 端巯基(-SH)修饰的 *Fok* I 核酸酶定向化学偶联的方法, 并在体外验证了新型工具对 HBV 基因的靶向切割。该方法为此后在体内进行高特异性、无整合风险的抗病毒基因治疗提供了全新的技术思路。

关键词: 乙肝病毒; 基因编辑; 锁核酸; *Fok* I; 化学偶联

Locked nucleic acid couples with *Fok* I nucleases to target and cleave hepatitis B virus's gene *in vitro*

Li Ma¹, Hongyan Chen¹, Huaxing Zhu², Wei Li³, Daru Lu¹

1. State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Science, Fudan University, Shanghai 200433, China;

2. Shanghai Novoprotein Technology Co., Ltd., Shanghai 201203, China;

3. Sangon Biotech (Shanghai) Co., Ltd., Shanghai 201611, China

Abstract: Hepatitis B virus (HBV) is a dented double-stranded DNA virus. After infecting human hepatic cells, it forms cccDNA that replicates persistently and integrates randomly into the host's genome during the process of reverse transcription. On average, in each cell with chronic HBV infection, there are about 33 copies of cccDNA with a

收稿日期: 2015-10-17; 修回日期: 2015-11-19

作者简介: 马丽, 硕士在读, 专业方向: 生物工程。Tel: 021-51630621; E-mail: maryguoji@gmail.com

陈红岩, 博士, 副教授, 研究方向: 人类医学分子遗传学。E-mail: chenhy@fudan.edu.cn

马丽和陈红岩为并列第一作者。

通讯作者: 卢大儒, 博士, 教授, 研究方向: 人类医学分子遗传学。E-mail: drlu@fudan.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.15-435

网络出版时间: 2016/2/23 10:51:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20160223.1051.002.html>

half of 35–57 days, which can be difficult to eradicate. A new strategy is to inhibit HBV transcription by using locked nucleic acid (LNA). Besides, cleaving HBV genome by targeted genome editing technologies could potentially cure patients. In this study, we explored new genome editing tools for HBV treatment. Based on LNA's ability to form triple helix by binding to duplex DNA, its stability towards nuclease and polymerase, and its sensitivity to single base mismatches, we designed LNA-modified oligonucleotides as DNA binding domain to effectively increase the specificity of target gene recognition. Meanwhile, by utilizing the small molecular weight and dimerization dependent activity of nuclease *Fok* I, we used *Fok* I recombinant dimer protein as DNA cleavage domain. Here, we established a method by chemical coupling of LNA-oligonucleotide with *Fok* I cleavage domain, and also validated the targeted cleavage of HBV genes with our new tools *in vitro*. These results provide new possibilities for future *in vivo* anti-virus gene therapy with high specificity and no integration risk.

Keywords: hepatitis B virus; gene editing; locked nucleic acid; *Fok* I; chemical coupling

乙型肝炎是由乙肝病毒(Hepatitis B virus, HBV)引起的肝脏炎性病变,可转化为肝硬化或肝癌。全球约有 2.4 亿人是慢性乙型肝炎感染者,我国属乙型肝炎高发区,一般人群 HBsAg 阳性率为 9.09%。HBV 基因组全长 3.2 kb,在侵入细胞核后形成共价闭合环状 DNA(Covalently closed circular DNA, cccDNA)转录出 3.5 kb 前基因组 RNA(Pre-genome, pgRNA)。pgRNA 带有包装信号,在反转录过程中产生的线性基因组可随机整合到宿主基因组^[1]。目前治疗乙肝的药物主要为干扰素与核酸类似物^[2],只能进行免疫调节或抑制乙肝病毒的复制,无法彻底清除病毒。新型基因组编辑工具,如锌指核酸酶(Zinc-finger nucleases, ZFN)^[3]、转录激活因子样效应因子核酸酶(Transcription activator-like effector nucleases, TALEN)^[4]及规律成簇间隔短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9^[5]系统能在体外与体内特异性靶向切割 HBV 基因组 S 区、P 区、C 区与 X 区编码基因,显著降低 cccDNA 与 pgRNA 的拷贝数以及核心抗原、表面抗原与 E 抗原的表达量,有望达到治愈乙肝的效果。然而,TALE 分子的组筛筛选过程比较繁杂,锌指蛋白与 sgRNA 对双链 DNA 的识别仍存在脱靶效应^[6,7]。此外,这些系统各元件的表达质粒较大,转染效率有限,同时存在外源质粒随机整合入细胞基因组的潜在风险。针对靶位点特异性识别及高效转染、无痕编辑等难题,设计构建锁核酸(Locked nucleic acid, LNA)修饰的寡核苷酸作为 DNA 靶向结合域,*Fok* I 重组蛋白作为 DNA 双链切割域的化学偶联复合物,有望成为抗病毒治疗的新型基因编

辑工具。

LNA 由核糖进行 2'-O,4'-C-亚甲基桥化学修饰而成^[8],包括 A、C、G、T、U、mC 等 6 种碱基,对互补序列具有高亲和力与碱基错配敏感性^[9],可抵御几乎所有核酸酶及聚合酶的 3'外切酶活性^[10]。LNA 能够与双链 DNA 形成三股螺旋结构(Triplex-forming oligonucleotides, TFO)^[11],已成为抑制乙肝病毒的新策略^[12]。*Fok* I 是源于海床黄杆菌(*Flavobacterium okeanoicoites*)的 Type II S 限制酶,含有位于 N 端的特异性 DNA 结合域,以及位于 C 端的非特异性切割域^[13]。*Fok* I 切割域仅有 198 个氨基酸,必须相互作用形成二聚体才具有核酸酶活性,造成的 DNA 双链断裂位点间距 4 bp^[14]。2007 年,Miller 等^[15]构建出异源化的 *Fok* I,降低同源二聚体的非特异切割。2008 年,Miniczuk 等^[16]首次构建出单个 ZFP 识别域融合 *Fok* I 切割域类二聚体的表达质粒,转入线粒体中实现了基因组定向修饰。

本研究利用野生型 *Fok* I 切割域蛋白仅有一个半胱氨酸的特性,设计突变并额外进行巯基(-SH)修饰,建立并优化了通过双功能交联剂 GMBS^[17]实现锁核酸与 *Fok* I 定向化学偶联的方法,实现体外特异性靶向切割 HBV 基因,同时依赖上下游效应能够充分抑制非特异性核酸酶活性,该方法在基因工程、基因治疗等领域将具有广阔的应用前景。

1 材料和方法

1.1 材料

T4 DNA 连接酶、*Bam*H I、*Xho* I、*Bbs* I 限制

性内切酶(New England Biolabs, 美国); GMBS(上海西宝生物科技有限公司); 乙腈(阿拉丁); NanoDrop 2000 分光光度计(Termo Science, 德国); PB-10 Sartorius 普及型 pH 计(赛多利斯科学仪器有限公司); Amicon®Ultra 超滤管 500 μ L/10 K(Merck Millipore, 德国); 低温冷冻离心浓缩系统(LABCONCO, 美国); PowerPac HC 电泳仪(BIO-RAD, 美国); FR-980A 生物电泳图像分析系统(夏日科技)

1.2 方法

1.2.1 *Fok I* 切割域表达质粒的构建

以 TALEN 常用的 Ptalen L2 与 Ptalen R T7 表达质粒分别作为 *Fok I* L 与 *Fok I* R 单体的模板序列, 在第 473 位碱基处进行 G→C 点突变, 即第 158 位氨基酸进行 Cys→Ser 突变。

通过多轮 PCR 在 *Fok I* L 起始密码子后加入半胱氨酸密码子 TGC、HA 抗体识别序列 YPYDVPDYA、SV40 NLS 核定位序列 PKKKRKV 及用于降低空间位阻效应的 Linker 序列 SGGGGSS。此外, 35 个氨基酸的 Linker 有利于 *Fok I* L-R 相互作用形成二聚体。

参考 Golden Gate 的方法, 在 35aa Linker 中正反向插入 *Bbs I* 识别位点, 经 *Bbs I* 酶切产生的粘性末端将 *Fok I* L 与 *Fok I* R 无缝连接为 *Fok I* L-R 二聚体。通过全序列两端 *BamH I* 与 *Xho I* 酶切位点, 经 pSK 中间质粒, 最终克隆至 pET-SUMO 表达质粒(表 1)。

构建 *Fok I* 切割域单体表达质粒, *Fok I* L 与 *Fok I* R 单体 N 端分别添加半胱氨酸、HA 抗体识别序列、SV40 NLS 核定位序列及 SGGGGSS Linker, 两端加入 *BamH I* 和 *Xho I* 酶切位点, 经 pSK 中间质粒克隆至 pET-SUMO 表达质粒。

1.2.2 *Fok I* 切割域重组蛋白的表达纯化

选用 PG-TF2 表达菌株, 在 30 ng/mL 四环素培养基中 37°C 培养 30 min, 加入 0.1 mmol/L IPTG 16°C 培养过夜, 得到少量可溶表达蛋白, 用 His 抗体进行 Western blot 验证。扩大培养并进行超声破碎, 通过阳离子柱(SP-HP)纯化得到 SUMO-*Fok I* L-R 重组蛋白。SUMO 蛋白酶处理 1 h, 切除 SUMO 标签, 通过阴离子柱(Q-HP)纯化得到 *Fok I* L-R 重组蛋白。

SUMO-*Fok I* L 与 SUMO-*Fok I* R 重组蛋白均在 PG-TF2 表达菌株中用 0.1 mmol/L IPTG 诱导, 16°C 培养过夜。少量可溶表达蛋白通过阳离子柱(SP-HP)流穿后经 His-FF(Ni)柱富集纯化, 用 His 抗体进行 Western blot 验证, 得到 *Fok I* 切割域单体蛋白。

以上工作与上海近岸蛋白科技有限公司合作完成。

1.2.3 靶位点的选择及锁核酸的设计

选择乙型肝炎病毒(HBV)中带有包装信号, 能被包装入核心颗粒的前基因组 RNA(pgRNA)转录起始区域作为锁核酸靶向位点。LNA-oligo 全长 27nt, 5'端氨基修饰, 6 个锁核酸修饰。LNA-oligo 自身不会形成二级结构, 与互补序列的亲合力强($T_m=88^\circ\text{C}$)。大写字母加下划线表示锁核酸修饰: 5'-NH₂-ttGgg-tgGctttgGGgcatGgacattG-3'。

LNA-oligo 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.4 化学偶联及脱盐纯化

5'端氨基修饰的 LNA-oligo 很难直接与 *Fok I* 切割域二聚体重组蛋白中唯一的巯基高效地进行定向偶联, 因此用双功能交联剂 GMBS(N-[γ -马来酰亚胺丁酰氧]琥珀酰亚胺酯)辅助反应。

表 1 pET-SUMO-*Fok I* L-R 表达质粒主要引物序列

Table 1 The primer sequences of pET-SUMO-*Fok I* L-R expression plasmids

重组质粒	引物序列(5'→3')	限制性内切酶
pET-SUMO- <i>Fok I</i> L-R	F: CGGGATCCATGTGCTACCCA	<i>BamH I</i>
	R: CCGCTCGAGCGGTTATCAGA	<i>Xho I</i>
pSK- <i>Fok I</i> L	R: GAAGACACCACCACTACCACC	<i>Bbs I</i>
pSK- <i>Fok I</i> R	F: GAAGACAGTGGTGGTGGTGG	<i>Bbs I</i>

注: 下划线部分为限制性内切酶识别序列。

将 LNA-oligo 溶于 200 mmol/L Tris-HCl(pH 8.4) 缓冲液中。取 2.8 mg GMBS 溶于 40 μ L 乙腈中, 加入 100 μ L (100 nmol/L) LNA-oligo, 包裹铝膜, 室温摇浴 90 min。在 LNA-oligo-GMBS 中加入 1 mL 乙腈, 4 700 r/min 低速离心至出现红色沉淀。吸除上清, 用 1 mL 乙腈反复洗涤 9 次, 除去未偶联的 GMBS。在低温真空抽滤系统中除去残留的乙腈, 产物溶于 50 μ L oligo buffer 中(100 mmol/L 磷酸二氢钠, 400 mmol/L NaCl, pH 7.0)。将 400 nmol *Fok* I L-R 重组蛋白溶于 50 μ L protein buffer 中(40 mmol/L 磷酸二氢钠, 20 mmol/L EDTA, pH 7.0), 与上一步所得溶液缓慢混合, 包裹锡箔纸, 室温摇浴 24 h。将 LNA-*Fok* I L-R 加至 0.5 mL/10 k 超滤管中, 13 000 r/min 离心 30 min, 脱盐并去除未偶联的 LNA-oligo-GMBS。换收集管反向倒扣, 1000 r/min 离心 2 min, 偶联产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.2.5 核酸银染

用 12% TBE 胶, 加入样品后 85 V 电泳 3 h。将 TBE 胶放入银染固定液(10%乙醇, 0.5%乙酸)中, 室温摇浴 25 min。银染染色液(0.15%硝酸银/固定液)避光孵育 5 min, 去离子水洗涤 2 次。将 TBE 胶避光放入显色液(3% NaOH, 0.5%甲醛)中至出现核酸条带, 用固定液终止 5 min, 在去离子水中放置 5 min, 扫胶保存。

2 结果与分析

2.1 *Fok* I 蛋白结构预测及切割域突变体的构建

为实现锁核酸与 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白的定向化学偶联, 避免非特异副反应, 拟将 *Fok* I L 与 *Fok* I R 单体中唯一带有巯基(-SH)侧链的半胱氨酸突变为侧链同为极性不带电的丝氨酸。蛋白结构

预测表明, Cys 处于 loop 区, 与二聚体的相互作用位点 Asp-100 和 Arg-104 相距较远(图 1), 对蛋白整体构象影响不大, 可以进行突变。

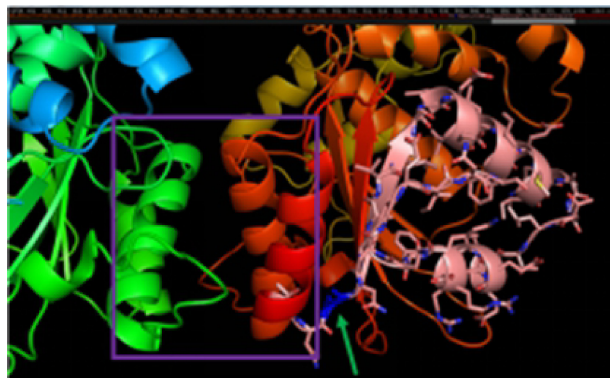


图 1 *Fok* I 蛋白结构预测图示

Fig. 1 The structure prediction of *Fok* I

紫框内是二聚体相互作用区域, 绿色箭头所指的蓝色氨基酸表示拟突变的半胱氨酸。

丝氨酸较半胱氨酸更为亲水, 密码子存在单碱基差异。分别以 Ptalen L2 与 Ptalen R T7 质粒为模板, 完成 *Fok* I L 与 *Fok* I R 单体, 第 473 位碱基处 G \rightarrow C 点突变(图 2)。

2.2 *Fok* I 切割域表达质粒的构建

首先构建 pET-SUMO-*Fok* I L-R 表达质粒, 在 *Fok* I L 与 *Fok* I R 突变体两端共添加了 224 个碱基, 包含 3 个功能域、2 个 Linker 区及 3 个酶切位点。为确保序列的保真性, 便于阳性克隆的鉴定, 构建 pSK-*Fok* I L 与 pSK-*Fok* I R 中间质粒。随后, 经 35aa Linker 中正反向插入的 *Bbs* I 酶切位点, 在识别位点后第 2 位与第 6 位碱基处酶切形成无残留的粘性末端, 恰好切除 21 bp, 将单体无缝连接为二聚体(图 3)。

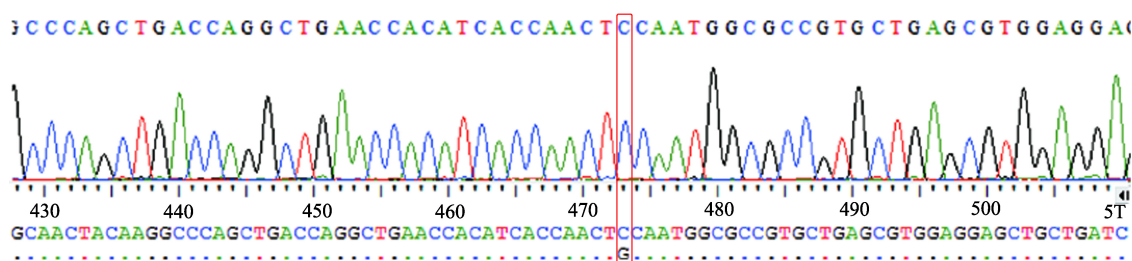


图 2 *Fok* I L 与 *Fok* I R 突变体测序比对结果

Fig. 2 The sequencing results of *Fok* I L and *Fok* I R

红框内为单碱基突变位点。

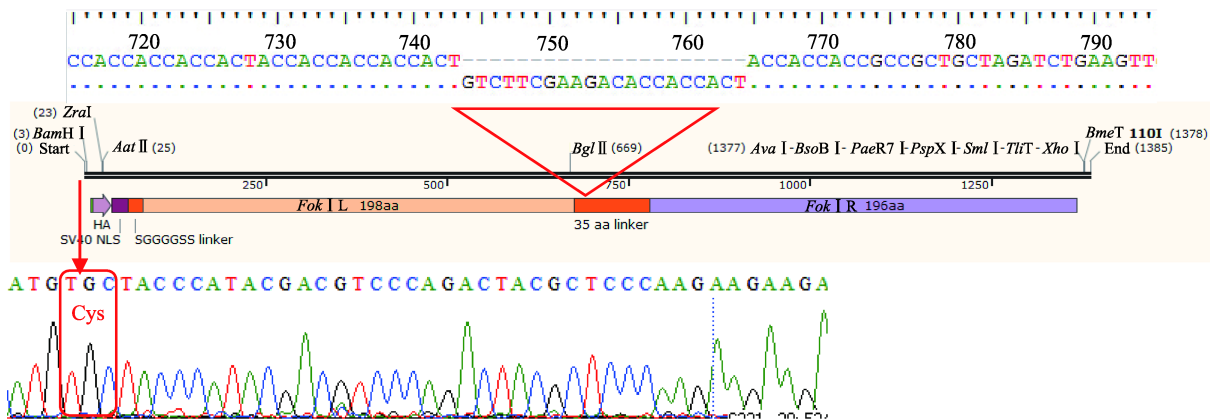


图 3 *Fok I* 全序列结构域图示及测序比对结果

Fig. 3 The construction and sequencing result of *Fok I*

红三角表示 35aa Linker 中经正反向 *Bbs I* 酶切切除的 21 bp, 红框表示用于定向化学偶联的半胱氨酸, 红箭头表示 Cys 密码子位于起始密码子之后。

最终将全序列成功克隆到 pET-SUMO 表达载体中, 测序确认不存在任何碱基突变和移码突变。

然后构建 pET-SUMO-*Fok I* L 和 pET-SUMO-*Fok I* R 表达质粒。在 *Fok I* L 与 *Fok I* R 突变体起始密码子后同样加入半胱氨酸、HA 抗体识别序列、SV40 NLS 核定位序列及 SGGGGSS Linker 序列, 经酶切鉴定与测序比对, 得到的阳性克隆用于下一步表达纯化。

2.3 *Fok I* 切割域重组蛋白的表达纯化

Fok I 切割域二聚体及单体重组蛋白, 融合 SUMO 标签后均实现可溶表达(图 4A), 用 His 抗体进行 Western blot 验证, 在菌液上清中检测到目的蛋白(图 4B)。在纯化过程中, 通过 SP-HP 阳离子交换柱的流穿样经过 His-FF 镍柱富集纯化(图 4C), 得到 SUMO-*Fok I* L-R、SUMO-*Fok I* L 与 SUMO-*Fok I* R 重组蛋白。

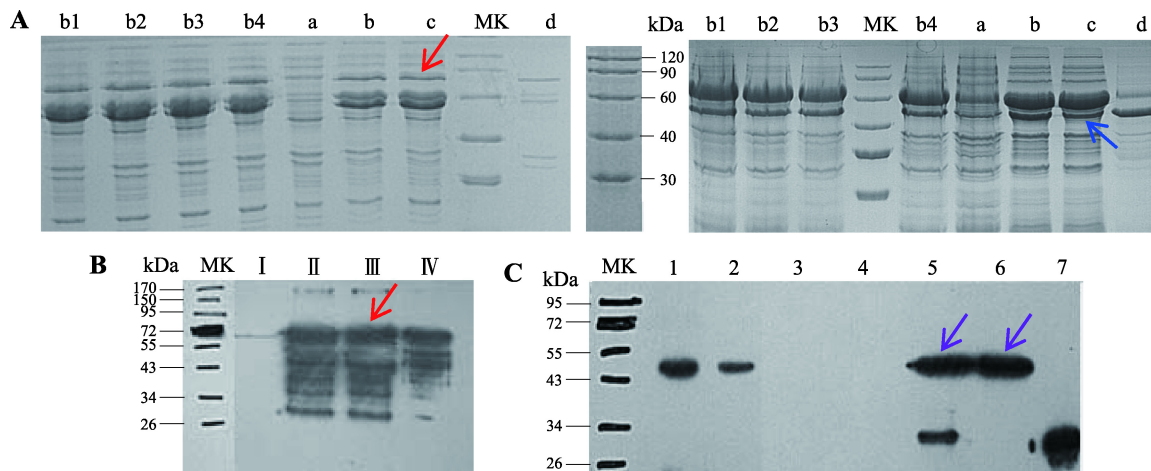


图 4 *Fok I* 切割域重组蛋白的原核表达纯化结果

Fig. 4 The expression and purification result of *Fok I* recombinant dimer protein

A: SUMO-*Fok I* L-R 与 SUMO-*Fok I* L 原核表达结果。MK: 蛋白 marker; 泳道 a: 诱导前的菌落; 泳道 b: 诱导后的菌落; 泳道 b1~4: 诱导后的菌落; 泳道 c: 溶菌液上清; 泳道 d: 溶菌液沉淀; 红色箭头表示 SUMO-*Fok I* L-R 可溶表达蛋白, 蓝色箭头表示 SUMO-*Fok I* L 可溶表达蛋白。B: SUMO-*Fok I* L-R 重组蛋白 Western blot 验证结果。MK: 蛋白 marker; 泳道 I: 诱导前的菌落; 泳道 II: 诱导后的菌落; 泳道 III: 溶菌液上清; 泳道 IV: 溶菌液沉淀; 红色箭头表示 SUMO-*Fok I* L-R 可溶表达蛋白。C: SUMO-*Fok I* R 阳离子柱流穿样 His-FF 镍柱富集纯化结果。MK: 蛋白 marker; 泳道 1: 装载样; 泳道 2: 流穿样; 泳道 3~6: 20 mmol/L、50 mmol/L、200 mmol/L、500 mmol/L 咪唑洗脱样; 泳道 7: anti-His Western blot 阳性对照; 箭头表示 SUMO-*Fok I* R 可溶表达蛋白。

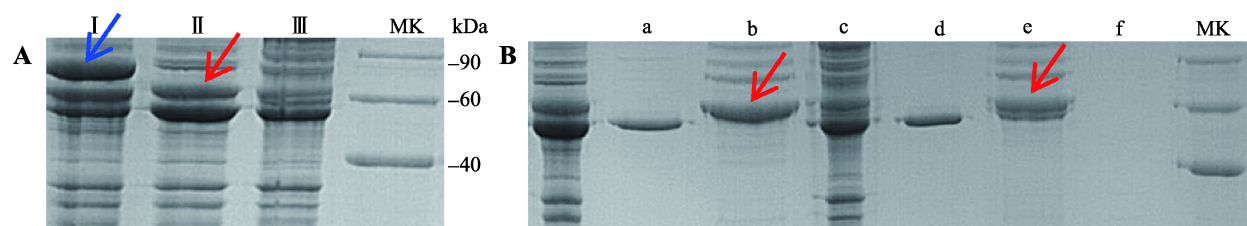


图5 SUMO-*Fok* I L-R 酶切结果及 *Fok* I L-R 纯化结果

Fig. 5 The tag remove experiment of SUMO-*Fok* I L-R and purification result of *Fok* I L-R

A: SUMO 融合标签切除实验。泳道 I: SUMO-*Fok* I L-R; 泳道 II/III: 还原/非还原 MK: 蛋白 marker; 蓝色箭头: SUMO-*Fok* I L-R; 红色箭头: 切除 SUMO 的 *Fok* I L-R 重组蛋白。B: 洗脱样品 SDS-PAGE 电泳结果。泳道 a: 还原电泳 *Fok* I L-R; 泳道 b-c: 还原电泳 200 mmol/L、500 mmol/L NaCl 洗脱样; 泳道 d: 非还原电泳 *Fok* I L-R; 泳道 e-f: 非还原电泳 200 mmol/L、500 mmol/L NaCl 洗脱样; MK: 蛋白 marker; 红色箭头表示切除 SUMO 的 *Fok* I L-R 重组蛋白。

用 SUMO 蛋白酶处理 1 h, 得到共 475 个氨基酸、相对分子质量为 54 kDa 的 *Fok* I L-R 重组蛋白。SDS-PAGE 电泳表明, *Fok* I L-R 相比 SUMO-*Fok* I L-R 相对分子质量有所降低, SUMO 标签切除成功(图 5A)。*Fok* I L-R 用阴离子柱(Q-HP)纯化效果更佳, 在 200 mmol/L 与 500 mmol/L NaCl 洗脱液中, 检测到高纯度的 *Fok* I L-R 重组蛋白(图 5B)。

2.4 *Fok* I 切割域重组蛋白的活性检测

在 1×Cutsmart buffer(50 mmol/L 乙酸钾、20 mmol/L Tris 醋酸盐、10 mmol/L 乙酸镁、100 μg/mL BSA, pH 7.9)酶切体系中, 37℃恒温反应, *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白可非特异性体外切割双链 DNA, 但对 RNA 无效。95℃预处理 10 min 再进行切割实验, 蛋白活性减弱但并未彻底失活(图 6A)。同浓度的 *Fok* I L-R 相比 SUMO-*Fok* I L-R, 非特异性切割活性显著降低, 同时随着浓度的下降, 更倾向于先将环状质粒单切线性化再随机切碎(图 6B)。单加或混合 SUMO-*Fok* I L 与 SUMO-*Fok* I R 可检测到切割活性, 但上下游依赖效应能有效抑制非特异性, 相比 SUMO-*Fok* I L-R 切割效率低但产物更单一(图 6C)。

2.5 锁核酸与 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白的化学偶联及鉴定

为探究化学偶联反应过程中, 高盐、有机溶剂、长时间室温条件对蛋白活性的影响, 将 SUMO-*Fok* I L-R 与 *Fok* I L-R 重组蛋白进行对应处理, 再切割 DNA 模板。结果表明, 高盐与乙腈均会显著影响蛋白活性(图 7A), 室温影响不显著。在高盐溶液中室温 24 h 再用 0.5 mL/10K 超滤管充分脱盐, 蛋白

均可复性, 且 *Fok* I L-R 对质粒模板单切、结合的比例明显增加, 非常有利于此后偶联锁核酸实现靶向切割(图 7B)。

GMBS 中含有 N-羟基琥珀酰亚胺酯基团, 先与锁核酸 5'端的氨基进行第一步定向偶联。利用 NanoDrop 2000 测得 LNA-oligo-GMBS 平均为 2000 ng/μL, 比照初始浓度, 偶联效率约为 90%。GMBS 的马来酰亚胺基团与 *Fok* I 切割域蛋白中唯一的巯基反应得到第二步定向偶联产物, 加至超滤管内离心纯化, 收集得到 15 μL 左右 LNA-*Fok* I L-R。0.5 mL/10 K 超滤管可去除盐离子和未偶联的 LNA-oligo-GMBS, 无法分离未偶联的重组蛋白。用核酸银染实验进行鉴定, 在纯化后的偶联产物中检测到了锁核酸, 且相比对照 LNA-oligo 存在位移差, 表明化学偶联成功(图 8)。

2.6 锁核酸介导 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白体外靶向切割 HBV 基因

LNA-oligo 与 *Fok* I L-R 的化学偶联产物, 即是由 LNA-oligo 特异性识别 HBV 靶向模板形成三股螺旋结构, 介导 *Fok* I 切割域定位于靶向位点附近。*Fok* I L 与 *Fok* I R 经 Linker 相互作用形成二聚体, 实现双链 DNA 切割(图 9)。

以 HBV 模型鼠基因组作为模板, 扩增得到 871 bp 的 HBV 靶向模板, 338 ~ 364 bp 处为锁核酸识别位点。在最适缓冲体系中, LNA-*Fok* I L-R 在 37℃恒温条件下对完全匹配的 HBV 靶向模板产生了特异性切割, 切出相差近 200 bp 的条带。LNA-*Fok* I L-R 浓度的增加以及反应时间的延长, 均可增强对模板的切割效果。使用较低浓度的偶联产物进行长时间

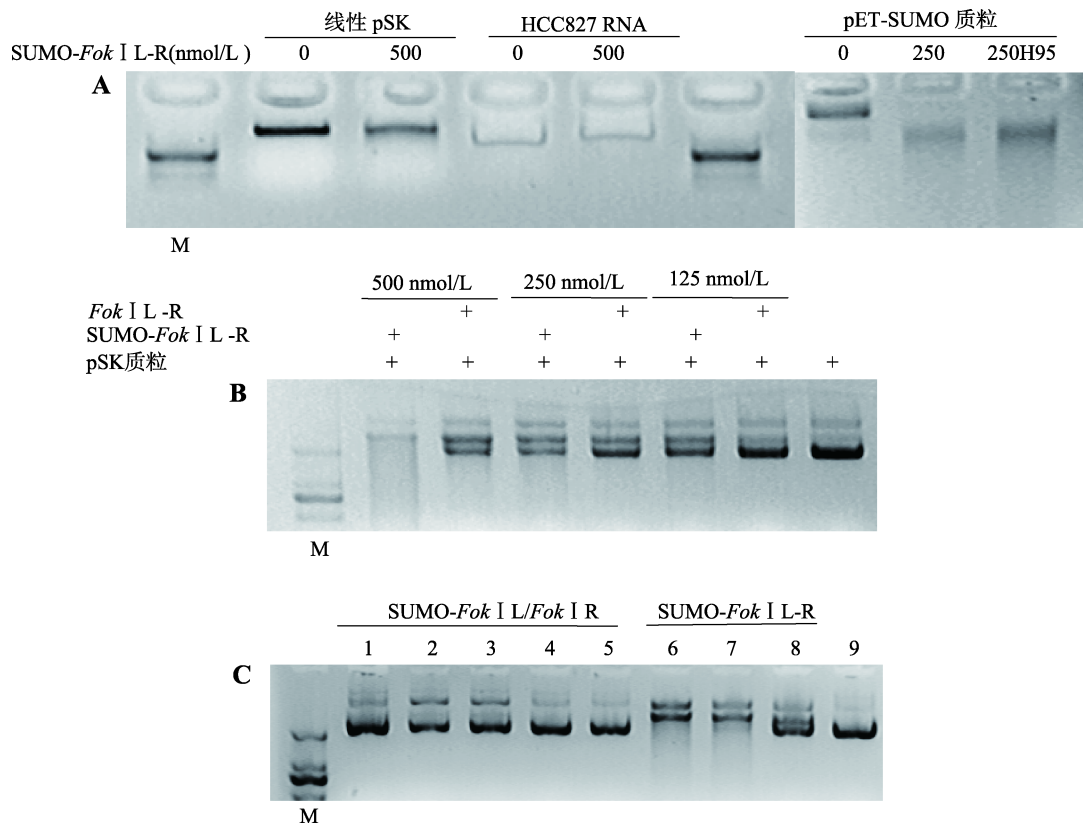


图 6 *Fok* I 切割域重组蛋白体外切割活性检测及对比结果

Fig. 6 The nuclease activity testing of *Fok* I L-R, *Fok* I L and *Fok* I R

A: *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白切割活性及热稳定性检测。M: DL2000 marker; 线性 pSK 为 600 ng, HCC827 RNA 为 900 ng, pET-SUMO 质粒为 330 ng; 250H95: 250 nmol/L SUMO-*Fok* I L-R 95°C 预处理 10 min 后再加入质粒模板; 切割反应条件为 37°C 恒温 15 min。B: SUMO-*Fok* I L-R 与 *Fok* I L-R 体外切割活性对比。M: DL2000 marker; pSK 质粒为 600 ng; 37°C 恒温反应 25 min。C: *Fok* I 切割域单体与二聚体重组蛋白体外切割活性对比。M: DL2000 marker; 1: SUMO-*Fok* I L 500 nmol/L; 2: SUMO-*Fok* I R 500 nmol/L; 3: SUMO-*Fok* I L 与 SUMO-*Fok* I R 各 250 nmol/L; 4: SUMO-*Fok* I L 与 SUMO-*Fok* I R 各 125 nmol/L; 5: SUMO-*Fok* I L 与 SUMO-*Fok* I R 各 50 nmol/L; 6: SUMO-*Fok* I L-R 500 nmol/L; 7: SUMO-*Fok* I L-R 250 nmol/L; 8: SUMO-*Fok* I L-R 100 nmol/L; 9: pSK 质粒为 500 ng; 37°C 恒温反应 20 min。

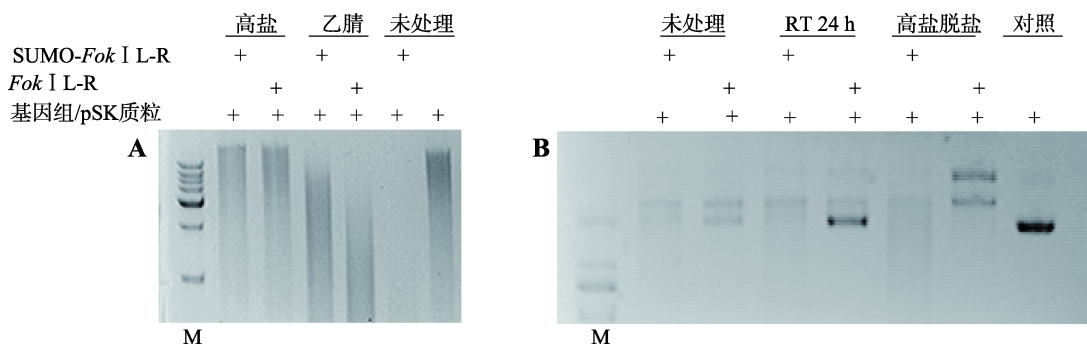


图 7 化学偶联反应条件对 SUMO-*Fok* I L-R 与 *Fok* I L-R 体外切割活性的影响

Fig. 7 The nuclease activity testing of SUMO-*Fok* I L-R and *Fok* I L-R in different influence factors

A: 高盐与乙腈对蛋白活性的影响。M: DL2000 marker; 高盐: 140 mmol/L NaH_2PO_4 , 400 mmol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, pH 7.0; 乙腈: 重组蛋白溶于 10 倍体积乙腈中, 冷冻抽滤至无乙腈残留, 干燥产物溶于 50 mmol/L Tris 缓冲液中; 蛋白为 250 nmol/L; 小鼠基因组为 1 μg 。B: 室温条件及脱盐处理对蛋白活性的影响。RT 24 h: 室温放置 24 h; 高盐脱盐: 高盐处理后, 0.5 mL/10 K 超滤柱中 13 000 r/min 离心 20 min 脱盐处理。蛋白为 250 nmol/L; pSK 质粒为 300 ng; 37°C 恒温反应 15 min。

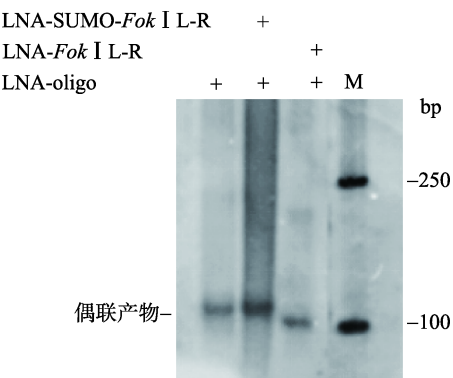


图 8 锁核酸与 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白化学偶联银染鉴定

Fig. 8 The silver stain verification of LNA-*Fok* I L-R and LNA-SUMO-*Fok* I L-R

M: DL2000 marker; LNA-*Fok* I L-R/ LNA-SUMO-*Fok* I L-R: 250 nmol/L; LNA-oligo: 5 μmol/L.

切割, 有助于避免未偶联蛋白对非特异性模板产生非特异性切割(图 10)。

为进一步检测偶联产物对靶序列错配的敏感性, 构建 308 bp 的 HBV 特异性模板, 103 ~ 129 bp 处为锁核酸识别位点。同时构建了 HBV 突变模板, 在识别位点 3'端倒数第二位设计了 T 到 C 的点突变。实验表明, 高浓度偶联产物对 HBV 突变模板并未实现特异性切割, 仅存在非特异切割, 偶联产物对靶向位点单碱基错配敏感, 有严格的切割特异性(图 11)。

3 讨 论

核苷酸与多肽之间有多种偶联途径, 包括生物素-亲合素系统、二硫键、氨基基、肽键、胺键、碳酰基、硫醚键等^[18]。2014 年, Ramakrishna 等^[19]用

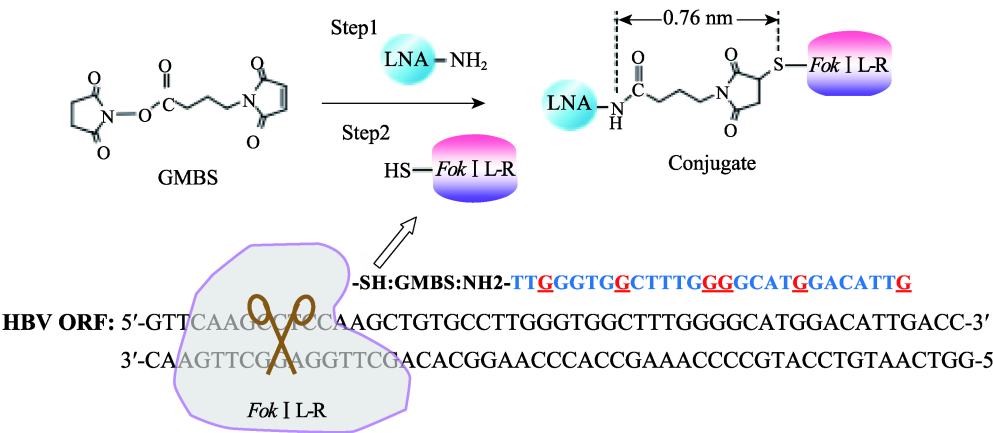


图 9 LNA-*Fok* I L-R 体外靶向切割 HBV 基因 pgRNA 转录起始区图示

Fig. 9 The diagram of LNA-*Fok* I L-R target HBV gene's pgRNA transcription initiation region

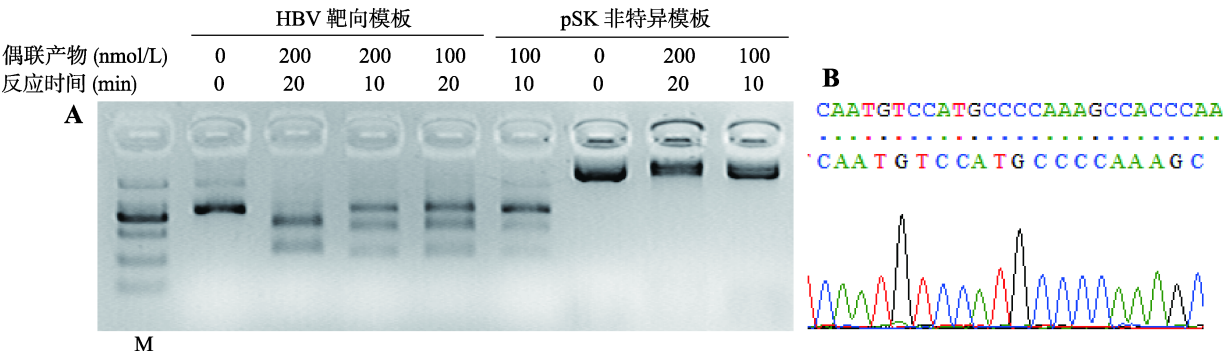


图 10 LNA-*Fok* I L-R 靶向切割 HBV 基因的体外实验

Fig. 10 LNA-*Fok* I L-R target and cleavage HBV gene in vitro

A: 体外实验切割结果。M: DL2000 marker; HBV 靶向模板为 500 ng; pSK 质粒非特异模板为 600 ng。B: HBV 特异性模板反向测序结果。

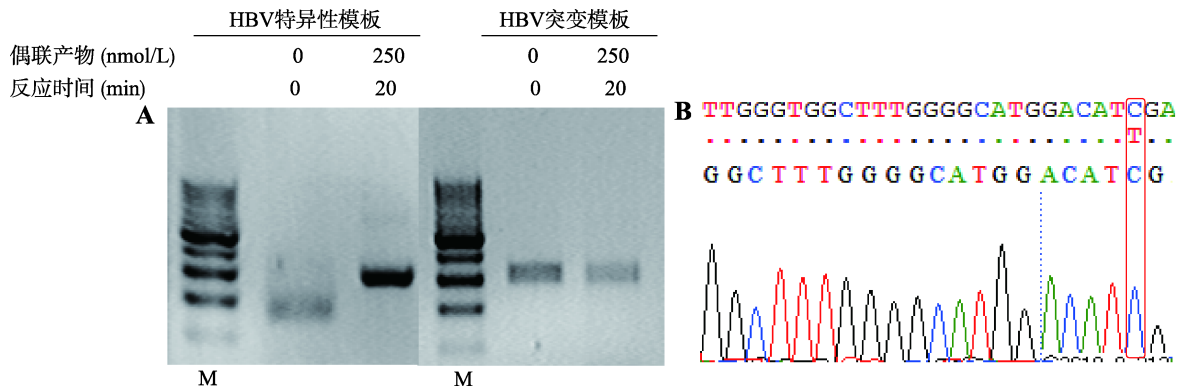


图 11 LNA-*Fok* I L-R 体外切割特异性检测

Fig. 11 The specificity of LNA-*Fok* I L-R *in vitro*

A: 体外实验切割结果。M: DL2000 marker; HBV 靶向模板为 600 ng; HBV 突变模板为 300 ng。B: HBV 突变模板正向测序结果。红框内为单碱基突变位点。

Cas9 融合穿膜肽(CPP)无法得到可溶表达,但在 Cas9 C 端添加半胱氨酸,在 CPP 上连接马来亚酰胺, Cas9 的巯基(-SH)即可与 CPP 的第一个-NH₂作用形成硫醚键,然而偶联产物分子量高达 167.6 kDa。*Fok* I 切割域中恰好只有一个不在功能区的半胱氨酸,突变 Cys 后可完全避免非定向的副反应,因此选定硫醚键。锁核酸上修饰的氨基不同于 CPP 上修饰的马来亚酰胺,很难直接与 *Fok* I 上的巯基反应,但可以借助双功能交联剂 GMBS 实现定向偶联。在 *Fok* I 切割域单体中突变半胱氨酸时,主要考虑到丝氨酸与半胱氨酸的侧链具有类似的物理性质。然而丝氨酸含有羟基,更为亲水。若让突变后的氨基酸不拥有任何额外的化学性质,还可以突变为丙氨酸。

构建表达质粒时以 pTalen L 与 pTalen R 为源模板,所有密码子均经过了人源化处理,为此在原核表达前先行稀有密码子分析。分析得到 CAI 为 0.61(附图 1),表明全序列可完整表达,但表达水平相对不高。将 *Fok* I 切割域二聚体重组序列连入含有 T7-tag 的 pET-28a 表达载体,在 BL21(DE3)中表达形成包涵体,很可能在复性纯化后失去蛋白活性。SUMO(泛素相关小修饰蛋白)能促进蛋白正确折叠与结合稳定^[20],从而提高了 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白的溶解性,实现可溶表达。绝大多数限制性内切酶及核酸酶,包括商品化的 *Fok* I 全酶,65°C 加热 20 min 或 70°C 加热 10 min,即发生不可逆的变性失活。然而 *Fok* I L-R 拥有突出的热稳定性,95°C 高温加热 10 min 仍不会彻底失活,可在退火条件下进行 DNA 靶向切割。

由于用醋酸铵(20 mmol/L, pH 6.8)/乙腈(10% V/V)分层去除未偶联的 oligo-GMBS 时,有机溶剂乙腈会使 *Fok* I L-R 失活,因此改用超滤管实现脱盐纯化。超滤管使用低蛋白吸附的再生纤维素膜,截留分子量(3 kDa、10 kDa、30 kDa、50 kDa 与 100 kDa)最好为目的蛋白分子质量的 1/3 以下,避免高速离心时堵塞分离孔并损失蛋白。*Fok* I L-R 重组蛋白分子质量为 54 kDa,因此最适用于 0.5 μL/10K 超滤柱。

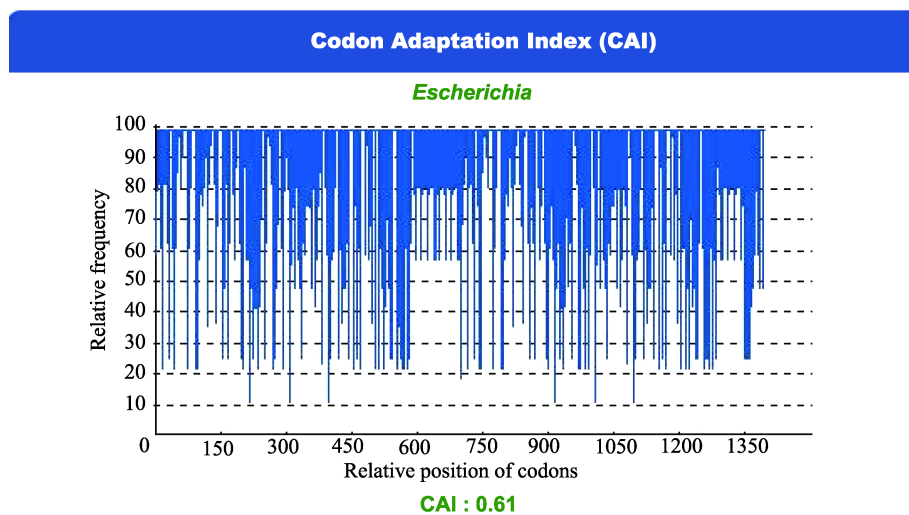
完成化学偶联后,最先采用超高压纳升液相高分辨率质谱联用仪与 MALDI-TOF 串联飞行时间质谱仪进行鉴定,用原管蛋白作为对照发现均不适用,可以尝试改用负离子喷雾质谱仪。SUMO-*Fok* I L-R 重组蛋白的等电点为 8.5,在 pH 为 8.3 的 TBE 胶中基本不带电。切除 SUMO 标签后的 *Fok* I L-R 分子量更小,但等电点为 9.2,在电泳时呈正电,会略微影响带负电的锁核酸的迁移效率,从而导致两种偶联产物的银染条带大小基本一致。未偶联的 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白与偶联产物之间分子量相差较小,不可再用物理的方法分离。通过在锁核酸 3' 端修饰亲和素以及用互补序列捕获的方式,有望进一步纯化偶联产物,以保证靶向切割,消除未偶联蛋白造成的非特异性切割。此外,将 *Fok* I 切割域二聚体重组蛋白拆分为 *Fok* I 单体可以依赖上下游效应有效避免非特异切割,有助于在体内实验中实现更精准而无痕的基因编辑。

附录

附图见网站电子版 www.chinagene.cn。

参考文献(References):

- [1] Perz JF, Armstrong GL, Farrington LA, Hutin YJF, Bell BP. The contributions of hepatitis B virus and hepatitis C virus infections to cirrhosis and primary liver cancer worldwide. *J Hepatol*, 2006, 45(4): 529–538. [DOI]
- [2] Jia F, Zhang YZ, Liu CM. Stable inhibition of hepatitis B virus expression and replication in HepG2.2.15 cells by RNA interference based on retrovirus delivery. *J Biotechnol*, 2007, 128(1): 32–40. [DOI]
- [3] Weber ND, Stone D, Sedlak RH, De Silva FHS, Roychoudhury P, Schiffer JT, Aubert M, Jerome KR. AAV-mediated delivery of zinc finger nucleases targeting hepatitis B virus inhibits active replication. *PLoS One*, 2014, 9(5): e97579. [DOI]
- [4] Chen JL, Zhang W, Lin JY, Wang F, Wu M, Chen CC, Zheng Y, Peng XH, Li JH, Yuan ZH. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther*, 2014, 22(2): 303–311. [DOI]
- [5] Karimova M, Beschorner N, Dammermann W, Chemnitz J, Indenbirken D, Bockmann JH, Grundhoff A, Lüth S, Buchholz F, zur Wiesch JS, Hauber J. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci Rep*, 2015, 5: 13734. [DOI]
- [6] Liu J, Gaj T, Wallen MC, Barbas CF. Improved cell-penetrating zinc-finger nuclease proteins for precision genome engineering. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2015, 4: e232. [DOI]
- [7] Wade M. High-Throughput silencing using the CRISPR-Cas9 system: A review of the benefits and challenges. *J Biomol Screen*, 2015, 20(8): 1027–1039. [DOI]
- [8] Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, Olsen CE, Wengel J. LNA (Locked Nucleic Acids): Synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron*, 1998, 54(14): 3607–3630. [DOI]
- [9] Latorra D, Campbell K, Wolter A, Michael Hurley J. Enhanced allele-specific PCR discrimination in SNP genotyping using 3locked nucleic acid (LNA) primers. *Hum Mutat*, 2003, 22(1): 79–85. [DOI]
- [10] Fluiter K, Ten Asbroek ALMA, de Wissel MB, Jakobs ME, Wissenbach M, Olsson H, Olsen O, Oerum H, Baas F. *In vivo* tumor growth inhibition and biodistribution studies of locked nucleic acid (LNA) antisense oligonucleotides. *Nucl Acids Res*, 2003, 31(3): 953–962. [DOI]
- [11] Brunet E, Alberti P, Perrouault L, Babu R, Wengel J, Giovannangeli C. Exploring cellular activity of locked nucleic acid-modified triplex-forming oligonucleotides and defining its molecular basis. *J Biol Chem*, 2005, 280(20): 20076–20085. [DOI]
- [12] Sun Z, Xiang WQ, Guo YJ, Chen Z, Liu W, Lu DR. Inhibition of hepatitis B virus (HBV) by LNA-mediated nuclear interference with HBV DNA transcription. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 409(3): 430–435. [DOI]
- [13] Wah DA, Bitinaite J, Schildkraut I, Aggarwal AK. Structure of *Fok* I has implications for DNA cleavage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(18): 10564–10569. [DOI]
- [14] Li T, Huang S, Jiang WZ, Wright D, Spalding MH, Weeks DP, Yang B. TAL nucleases (TALNs): Hybrid proteins composed of TAL effectors and *Fok* I DNA-cleavage domain. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): 359–372. [DOI]
- [15] Miller JC, Holmes MC, Wang JB, Guschin DY, Lee YL, Rupniewski I, Beausejour CM, Waite AJ, Wang NS, Kim KA, Gregory PD, Pabo CO, Rebar EJ. An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(7): 778–785. [DOI]
- [16] Minczuk M, Papworth MA, Miller JC, Murphy MP, Klug A. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucl Acids Res*, 2008, 36(12): 3926–3938. [DOI]
- [17] Henke E, Perk J, Vider J, de Candia P, Chin Y, Solit DB, Ponomarev V, Cartegni L, Manova K, Rosen N, Benezra R. Peptide-conjugated antisense oligonucleotides for targeted inhibition of a transcriptional regulator *in vivo*. *Nat Biotechnol*, 2008, 26(1): 91–100. [DOI]
- [18] Lu K, Duan QP, Ma L, Zhao DX. Chemical strategies for the synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates. *Bioconjug Chem*, 2010, 21(2): 187–202. [DOI]
- [19] Ramakrishna S, Kwaku Dad AB, Beloor J, Gopalappa R, Lee SK, Kim H. Gene disruption by cell-penetrating peptide-mediated delivery of Cas9 protein and guide RNA. *Genome Res*, 2014, 24(6): 1020–1027. [DOI]
- [20] Malakhov MP, Mattern MR, Malakhova OA, Drinker M, Weeks SD, Butt TR. SUMO fusions and SUMO-specific protease for efficient expression and purification of proteins. *J Struct Funct Genomics*, 2004, 5(1/2): 75–86. [DOI]



附图 1 宿主菌中表达编码序列的密码子使用频率分布图

注: CAI 与蛋白高表达水平的可能性相关, CAI=1.0 表示最为理想, CAI>0.8 表示具有优势。