



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114410608 B

(45) 授权公告日 2023. 08. 22

(21) 申请号 202210054940.3

C07K 19/00 (2006.01)

(22) 申请日 2022.01.18

C12N 15/87 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12R 1/19 (2006.01)

申请公布号 CN 114410608 A

C12R 1/685 (2006.01)

(43) 申请公布日 2022.04.29

(56) 对比文件

(73) 专利权人 华南理工大学

CN 111893105 A, 2020.11.06

地址 510640 广东省广州市天河区五山路  
381号

US 2021261938 A1, 2021.08.26

Lauritsen I等. Bacterial Genome  
Editing Strategy for Control of  
Transcription and Protein Stability.  
《Methods Mol Biol.》. 2018, 第27-37页.

(72) 发明人 潘力 廖清 王斌

审查员 蔡兴

(74) 专利代理机构 广州市华学知识产权代理有  
限公司 44245

专利代理师 崔红丽

(51) Int. Cl.

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

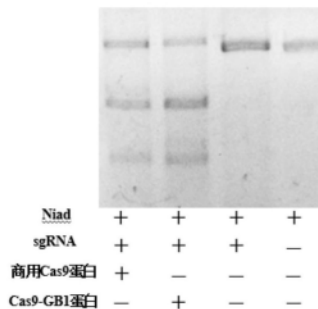
权利要求书1页 说明书8页  
序列表8页 附图5页

(54) 发明名称

一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法和应  
用

(57) 摘要

本发明公开一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法和应  
用。本发明主要包括Cas9表达载体的构建,大肠杆菌的转化,Cas9蛋白的诱导表达,Cas9蛋白的纯化,以及体内体外的应用。使用GB1作为促溶标签,可增加SpCas9的稳定性及溶解性,初步提高SpCas9的表达量,且GB1不影响SpCas9的功能,后续不需去除,简便可行。再通过使用10×His标记,有助于融合蛋白与Ni-NTA树脂的高亲和力,并有助于高盐洗去除污染的核酸,提高纯化效果。使用串联T7启动子,明显提高SpCas9的表达量。通过体内外应用,证明了所纯化得到的SpCas9-GB1蛋白正确折叠,具有切割DNA的能力,且可入核进行基因编辑。



1. 一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法,其特征在于:包括以下步骤:

步骤1,构建多重启动子驱动的核酸酶Cas9表达载体pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7;其中,所述的SpCas9-GB1-10×His的序列如SEQ ID NO:19所示;3T7是指3重T7启动子;

步骤2,Cas9表达载体pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7的表达:将构建的pet28a+-SpCas9-GB1-3T7转入宿主*E. coli* Rosetta (DE3),获得重组菌株;将重组菌株转接活化,利用IPTG进行诱导表达,离心收集菌体,获得表达SpCas9-GB1蛋白的菌体;

步骤3,SpCas9-GB1蛋白的纯化:用缓冲液将步骤2的菌体重悬,超声破碎,离心收集上清,得到阳性克隆中可溶性SpCas9-GB1蛋白,过滤除去细胞碎片及颗粒后,直接将过滤后液体上样经Ni<sup>+</sup>亲和层析柱纯化,收集洗脱的蛋白,得到SpCas9-GB1蛋白溶液;将得到的SpCas9-GB1蛋白溶液超滤浓缩,即得SpCas9-GB1蛋白。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:还包括步骤4:

步骤4,SpCas9-GB1蛋白的应用:将SpCas9-GB1与sgRNA进行组装后用于体外切割模板及转入真菌宿主内进行基因编辑,确定SpCas9-GB1是否正确折叠具有切割DNA和入核进行基因编辑的能力。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤2中的重组菌株挑取于Kan<sup>+</sup>及CHL<sup>+</sup>的LB液体培养基中,37±1℃,200~220 rpm培养8~16 h活化;活化后按照(1~5):100的转接比例量取活化菌液于Kan<sup>+</sup>及CHL<sup>+</sup>的LB液体培养基,37±1℃、200~220 rpm培养至OD<sub>600</sub>为0.6~0.8时,加入IPTG至终浓度为0.3~0.8 mM进行诱导表达。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤2中诱导表达的条件为16~20℃,200~220 rpm;发酵时间为18~22 h。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤2中所述的离心的条件为4~8℃,8000~10000 rpm离心5~10分钟。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤3中超声破碎的条件为:超声开3 s,超声关3 s,功率为30~40%,冰上超声20~30 min。

7. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤3中所述的离心的条件为4~8℃,8000~10000 rpm离心30~40 min。

8. 根据权利要求1或2所述的方法,其特征在于:

步骤3中,SpCas9-GB1蛋白的洗脱采用梯度洗脱,使用Buffer A的咪唑浓度为0 mM,Buffer B的咪唑浓度500 mM;梯度为5%、10%、20%、30%、50% Buffer B;

Buffer A:500 mM NaCl,20 mM Tris-HCl,PH=8.0;

Buffer B:500 mM NaCl,500 mM Imidazole,20 mM Tris-HCl,PH=8.0。

9. 权利要求1~8任一项所述的高效表达及纯化Cas9蛋白的方法在高效表达及纯化Cas9蛋白中的应用。

## 一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法和应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物技术和基因工程技术领域,涉及一种多重启动子驱动的核酸酶Cas9-GB1蛋白表达载体及蛋白表达纯化方法,具体涉及一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法和应用。

### 背景技术

[0002] 来源于原核生物的聚簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)相关RNA引导的Cas9内切酶活性的应用使得在多个物种中进行基因编辑变得简单、快速。在CRISPR系统中主要包括Cas9蛋白和单链导RNA(single guide RNA,sgRNA)两个部分。Cas9蛋白是核酸酶,含有两个具有切割活性的结构域:HNH结构域和RuvC结构域,可以在gRNA存在时将其引导于特定的位置对靶位点进行切割,造成DNA双链断裂。目前CRISPR系统已经应用于多种物种的基因编辑。

[0003] 体外组装Cas9蛋白和sgRNA所形成的核糖蛋白复合物(RNP)也具有基因编辑的能力,目前也已经应用于多种生物中进行基因编辑。RNP的基因编辑具有多种优点:如RNP避免了在宿主体内进行翻译表达,易于降解,对宿主基因组进行瞬时切割,可以减少脱靶效应;只需更换sgRNA,就可以靶向不同的位点,省去了构建质粒的繁琐的过程,方便进行通量的基因编辑;同时,RNP也可以用于体外切割模板,验证sgRNA的效率。

[0004] 目前,Cas9蛋白在表达纯化过程中,易出现形成包涵体形式的不溶解性蛋白,内毒素含量高、蛋白过大导致蛋白折叠不正确、产量低等问题,此外,目前市场上Cas9蛋白价格昂贵,这也限制了Cas9系统在生物体外组装,体内编辑的普及性。

### 发明内容

[0005] 为了克服现有技术的缺点与不足,本发明的目的在于提供一种一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法。该方法是一种可以进行基因编辑、体外切割的表达量显著提高的Cas9蛋白表达纯化方法。本发明主要包括Cas9表达载体的构建,大肠杆菌的转化,Cas9蛋白的诱导表达,Cas9蛋白的纯化,以及体内体外的应用。构建的pet28a<sup>+</sup>-SpCas9-GB1-10×His-3T7载体中,使用GB1作为促溶标签,可以增加SpCas9的稳定性及溶解性,初步提高SpCas9的表达量,且GB1不影响SpCas9的功能,因此在后续也不需要额外去除,简便可行。再通过使用10×His标记,有助于融合蛋白与Ni-NTA树脂的高亲和力,并有助于高盐洗去除污染的核酸,提高纯化效果。使用串联T7启动子的方法,明显提高SpCas9的表达量。通过体内外应用,证明了所纯化得到的SpCas9-GB1蛋白正确折叠,具有切割DNA的能力,且可以入核进行基因编辑。

[0006] 本发明的目的通过下述技术方案实现:

[0007] 一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法,包括以下步骤:

[0008] 步骤1,构建多重启动子驱动的核酸酶Cas9表达载体pet28a<sup>+</sup>-SpCas9-GB1-10×His-3T7;

[0009] 步骤2,Cas9表达载体pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7的表达:将构建的pet28a+-SpCas9-GB1-3T7转入宿主E.coli Rosetta (DE3),获得重组菌株;将重组菌株转接活化,利用IPTG进行诱导表达,离心收集菌体,获得表达SpCas9-GB1蛋白的菌体;

[0010] 步骤3,SpCas9-GB1蛋白的纯化:用缓冲液将步骤2的菌体重悬,超声破碎,离心收集上清,得到阳性克隆中可溶性SpCas9-GB1蛋白,过滤除去细胞碎片及颗粒后,直接将过滤后液体上样经Ni<sup>+</sup>亲和层析柱纯化,收集洗脱的蛋白,得到SpCas9-GB1蛋白溶液;将得到的SpCas9-GB1蛋白溶液超滤浓缩,即得SpCas9-GB1蛋白。

[0011] 为了更好的实现本发明,还包括步骤4:

[0012] 步骤4,SpCas9-GB1蛋白的应用:将SpCas9-GB1与sgRNA进行组装后用于体外切割模板及转入真菌宿主内进行基因编辑,确定SpCas9-GB1是否正确折叠具有切割DNA和入核进行基因编辑的能力。

[0013] 进一步地,步骤1中的载体构建:将pet28a+质粒上的6×硫氧还原蛋白-组氨酸标签替代为10×硫氧还原蛋白-组氨酸标签,T7启动子数量增加为3重,同时将链球菌蛋白G (Streptococcal protein G,GB1)的56-残基B1免疫球蛋白结合域用作融合标签通过linker (ggtggagcaggtggcagtgggcaggggagccgga)与Cas9蛋白连接,将密码子优化的,易于在大肠杆菌中表达的整个Cas9-GB1的基因序列与pet28a+的10×硫氧还原蛋白-组氨酸标签相连。所述的优化将原有GB1序列中稀有密码子及不易于蛋白翻译的碱基替换为易于在宿主菌中翻译表达的碱基。

[0014] 更进一步的,所述的SpCas9-GB1-10×His的序列如SEQ ID NO:19所示。

[0015] 进一步地,步骤2中的重组菌株挑取于Kan<sup>+</sup>及CHL<sup>+</sup>的LB液体培养基中,37±1℃,200~220rpm培养8~16h活化(优选的,37±1℃,220rpm培养16h活化);活化后按照(1~5):100的转接比例量取活化菌液于Kan<sup>+</sup>及CHL<sup>+</sup>的LB液体培养基,37±1℃、200~220rpm培养至OD<sub>600</sub>为0.6~0.8时,加入IPTG至终浓度为0.3~0.8mM(优选为0.5mM)进行诱导表达。

[0016] 进一步地,步骤2中诱导表达的条件为16~20℃,200~220rpm;发酵时间为18~22h。

[0017] 进一步地,步骤2中所述的离心的条件为4~8℃,8000~10000rpm离心5~10分钟;更进一步为4℃,8000rpm离心5分钟。

[0018] 进一步地,步骤3中超声破碎的条件为:超声开3s,超声关3s,功率为30~40%(优选为30%),冰上超声20~30min(优选为20min)。

[0019] 进一步地,步骤3中所述的离心的条件为4~8℃,8000~10000rpm离心30~40min;更进一步为4℃,10000rpm离心30min。

[0020] 进一步地,步骤3中,SpCas9-GB1蛋白的洗脱采用梯度洗脱,使用Buffer A(500mM NaCl,20mM Tris-HCl,PH=8.0)的咪唑浓度为0mM,Buffer B(500mM NaCl,500mM Imidazole,20mM Tris-HCl,PH=8.0)的咪唑浓度500mM。梯度为5%、10%、20%、30%、50% Buffer B。

[0021] 进一步地,步骤4中,所用的sgRNA均为T7体外转录得到的。体外切割模板为米曲霉的Niad位点,体内进行基因编辑的为黑曲霉的pyrg位点。所用的Buffer为市售Cas9蛋白配套Buffer。

[0022] 上述高效表达及纯化Cas9蛋白的方法在高效表达及纯化Cas9蛋白中的应用。

[0023] 本发明相对于现有技术具有如下的优点及效果:

[0024] (1) 本发明利用GB1作为促溶标签和 $10\times$ His标签融合表达SpCas9,提高了SpCas9的稳定性,避免了核酸污染,提高纯化效果。采用 $\text{Ni}^{2+}$ 亲和层析柱纯化,可以有效获得高纯度SpCas9-GB1蛋白,所获得的SpCas9-GB1蛋白折叠正确。且GB1对于SpCas9功能无影响,后续不需要去除,十分便利。

[0025] (2) 本发明利用串联T7启动子,在三重T7启动子的情况下,进一步增加了SpCas9-GB1蛋白的表达量。

[0026] (3) 本发明通过对纯化获得的SpCas9-GB1蛋白的体内外应用,验证了纯化后的Cas9-GB1与sgRNA所形成的复合体可以有效切割体外DNA片段,以及体内的靶向基因。本发明中涉及的SpCas9-GB1蛋白易于纯化,且纯化度高,切割活性高,可以用于工业生产Cas9蛋白以及实验室Cas9蛋白来源。

[0027] (4) 本发明在Cas9蛋白的C端融合了NLS核定位信号肽。NLS核定位信号肽可以使得此蛋白不仅可以用于体外切割和原核生物的基因编辑,还适用于真核生物的基因组编辑。

## 附图说明

[0028] 图1是pet28a+质粒的酶切结果琼脂糖凝胶电泳图。

[0029] 图2是pet28a+多重启动子载体测序结果图。

[0030] 图3是SpCas9、SpCas9-N、SpCas9-C、GB1-C、GB1-N的PCR结果琼脂糖凝胶电泳图(A、B)及pet28a+质粒的酶切结果琼脂糖凝胶电泳图(B)。

[0031] 图4是pet28a+-2T7质粒使用NcoI和XhoI双酶切的琼脂糖凝胶电泳图。

[0032] 图5是pet28a+-SpCas9-GB1- $10\times$ His-3T7质粒图谱。

[0033] 图6是SDS-PAGE分析GB1对于SpCas9表达的影响;其中,His-SpCas9指SpCas9;NGB1-SpCas9指GB1-SpCas9;SpCas9-CGB1指SpCas9-GB1。

[0034] 图7是SDS-PAGE分析多重启动子对于SpCas9表达量的影响;其中,A为多重启动子对NGB1-SpCas9(即GB1-SpCas9)表达量的影响;B为多重启动子对SpCas9-CGB1(即SpCas9-GB1)表达量的影响。

[0035] 图8是AKTA pure Ni-NTA柱纯化后SpCas9-GB1蛋白的SDS-PAGE分析胶图。

[0036] 图9是sgRNA转录模板PCR的琼脂糖电泳图。

[0037] 图10为纯化后的SpCas9-GB1蛋白的应用实例图;其中,Cas9-GB1指SpCas9-GB1。

[0038] 图11是纯化后的SpCas9-GB1蛋白的体内编辑应用实例图;其中,A为阳性、阴性对照板,其中阳性板为未加RNP复合物,且未加筛选物质(5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷);阴性板为未加RNP复合物,施加筛选物质;B为转化板,转化板为添加RNP复合物,且施加筛选物质。

[0039] 图12是纯化后的SpCas9-GB1蛋白基因编辑示意(A)及结果图(B)。

## 具体实施方式

[0040] 下面结合实施例及附图对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。

[0041] 下列实施例中未注明具体实验条件的试验方法,通常按照常规实验条件或按照制造厂所建议的实验条件。所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,为从商业途径得到的试剂

和材料。

[0042] 实施例中所用材料如下：

[0043] 1. 细胞来源：大肠杆菌E.coli Mach1 T1, 大肠杆菌E.coli Rosetta (DE3), 均为常规市售菌株。

[0044] 2. 质粒来源：pET-28a(+) 质粒为常规市售产品。

[0045] 3. 引物来源引物：均合成于生工生物工程(上海)股份有限公司及广州天一辉远基因科技有限公司。

[0046] 4. 主要试剂：均为市售产品。

[0047] 实施例1pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7质粒构建

[0048] 1. Pet28a+多重启动子载体构建

[0049] 根据pET-28a(+) 质粒, 设计一对引物F-1/R-1 (SEQ ID NO:1~2), 以pET-28a(+) 质粒为模板, 通过PCR反应, 得到pet28a+线性化骨架片段。PCR反应体系如表1所示。

[0050] 表1 PCR反应体系

反应组分	体积
2×Primer Star	25μL
F-1~F-6 (10μM)	0.5μL
R-1~R-6 (10μM)	0.5μL
pET-28a(+) 质粒	1μL (10ng)
超纯水	Up to 50μL

[0052] 线性扩增反应程序：

反应温度	时间
98°C	2min
98°C	30s
62°C (tm值)	30s
72°C	1Kb/min
72°C	7min
25°C	1s

[0054] PCR结果如图1所示。第1道为pet28a+PCR骨架片段, 第2道为DNA 1Kb marker。回收该片段。

[0055] 设计多重启动子引物(如下表), 将2T7-F/2T7-R、3T7-F/3T7-R、4T7-F/4T7-R (SEQ ID NO:3~8) 分别98°C退火10min, 形成多重启动子2T7片段、3T7片段、4T7片段。回收该片段。

[0056]	2T7-F	TAATACGACTCACTATAGGTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTG AGCGGATAACAATTC (SEQ ID NO: 3)
	2T7-R	CCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTG AGTCGTATTAATTTTCG (SEQ ID NO: 4)
	3T7-F	TAATACGACTCACTATAGGTAATACGACTCACTATAGGTAATACGAC TCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTC (SEQ ID NO: 5)
	3T7-R	CCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTG AGTCGTATTACCTATAGTGAGTCGTATTAATTTTCG (SEQ ID NO: 6)
	4T7-F	TAATACGACTCACTATAGGTAATACGACTCACTATAGGTAATACGAC TCACTATAGGTAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATA ACAATTC (SEQ ID NO: 7)
	4T7-R	CCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTG AGTCGTATTACCTATAGTGAGTCGTATTACCTATAGTGAGTCGTATT AATTTTCG (SEQ ID NO: 8)

[0057] 将pet28a+线性化片段0.5 $\mu$ L、2T7片段、3T7片段或4T7片段4.5 $\mu$ L, infusion酶5 $\mu$ L加入PCR管中, 50 $^{\circ}$ C, 1h连接。

[0058] 将上述连接产物分别用42 $^{\circ}$ C热激法转入E.coli Mach1 T1感受态细胞中, 加入890 $\mu$ L的LB液体培养基后置于37 $^{\circ}$ C摇床200rpm培养1h后, 取200 $\mu$ L涂布于Kan+抗性LB固体平板上, 倒置于37 $^{\circ}$ C培养箱中培养过夜。

[0059] 挑取平板上的小菌落, 少量扩增后, 进行菌液电泳, 观察质粒大小是否正确。随机挑取条带大小正确的质粒送测序, 经鉴定测序正确后, 得到pet28a+-2T7、pet28a+-3T7、pet28a+-4T7质粒。测序结果见图2。

[0060] 2. pet28a+-6 $\times$ his-SpCas9、pet28a+-10 $\times$ His-GB1-SpCas9、pet28a+-SpCas9-GB1-10 $\times$ His质粒的构建

[0061] 将pET-28a (+) 质粒使用NcoI和XhoI进行双酶切及使用BamHI进行单酶切, 酶切后进行琼脂糖凝胶电泳, 结果如图3B所示, 第3泳道为单酶切后片段, 第4泳道为双酶切后的片段, 第5泳道为对照质粒。

[0062] 使用pCas质粒(常规市售产品)作为模板, 设计引物, 使用F-2/R-2 (SEQ ID NO: 9~10)、F-3/R-3 (SEQ ID NO: 11~12)、F-4/R-4 (SEQ ID NO: 13~14) 分别PCR进行SpCas9基因的扩增, 得到SpCas9-N及SpCas9-C、SpCas9片段。使用合成的GB1及linker (见SEQ ID NO: 25) 模板, 使用设计的引物, F-5/R-5 (SEQ ID NO: 15~16)、F-6/R-6 (SEQ ID NO: 17~18) 进行GB1-N、GB1-C的PCR扩增。扩增的体系见表1。PCR结果如图3A、B所示。图3A第1道为SpCas9-N, 第2道为SpCas9-C, 第3道为GB1-N, 第4道为GB1-C片段, 第5道为200bp marker, 回收片段; 图3B第一道为SpCas9片段、第二道为200bp marker。

[0063] 将pet28a+载体线性化片段0.5 $\mu$ L、SpCas9 1 $\mu$ L及pet28a+线性化片段0.5 $\mu$ L、SpCas9-N/SpCas9-C 1 $\mu$ L, GB1-N/GB1-C 0.5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 3 $\mu$ L infusion酶5 $\mu$ L分别加入PCR管中, 50 $^{\circ}$ C, 1h连接。按照前述方法进行热激转化, 筛选转化子, 经测序进行验证得到正确的pet28a+-6 $\times$ his-SpCas9、pet28a+-10 $\times$ His-GB1-SpCas9、pet28a+-SpCas9-GB1-10 $\times$ His质粒。完整的SpCas9-GB1-10 $\times$ His的序列见SEQ ID NO: 19。

[0064] 3.pet28a+-SpCas9-GB1-10×His三重启动子质粒构建

[0065] 将测序正确的pet28a+多重启动子质粒(pet28a+-2T7质粒)使用NcoI和XhoI进行双酶切,酶切后进行琼脂糖凝胶电泳,结果如图4所示,第1、3道为酶切后片段,第2、4道为对照质粒.pet28a+-3T7、pet28a+-4T7质粒同理。

[0066] 将pet28a+-3T7载体线性化片段0.5μL、SpCas9-C 1μL,GB1-C 0.5μL,ddH<sub>2</sub>O 3μL infusion酶5μL加入PCR管中,50℃,1h进行连接。按照前述方法进行热激转化,筛选正确转化子,测序验证正确质粒pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7(即pet28a+-SpCas9-CGB1-3T7)。构建成功的质粒图谱见图5。

[0067] 同理,将pet28a+-2T7、pet28a+-3T7或pet28a+-4T7载体线性化片段0.5μL、SpCas9-N 1μL,GB1-N 0.5μL,ddH<sub>2</sub>O 3μL infusion酶5μL加入PCR管中,50℃,1h进行连接。按照前述方法进行热激转化,筛选正确转化子,测序验证正确质粒pet28a+-10×His-GB1-SpCas9-2T7、pet28a+-10×His-GB1-SpCas9-3T7、pet28a+-10×His-GB1-SpCas9-4T7。

[0068] 实施例2融合蛋白SpCas9-GB1的表达

[0069] 1.融合蛋白SpCas9-GB1的诱导表达

[0070] 将鉴定正确的pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7质粒转入到大肠杆菌表达宿主E.coli Rosetta (DE3)得到稳定转化的单菌落;接种单菌落到含有100μg/mL Kan<sup>+</sup>及CHL<sup>+</sup>(氯霉素)的LB液体培养基中,在220rpm、37℃下培养过夜,得到过夜菌。将过夜菌接种到500mL LB培养基中,接种比例为1:100,在200rpm,37℃下培养至OD<sub>600</sub>达到0.6~0.8,加入终浓度为0.5mM的IPTG(异丙基硫代半乳糖苷),后16~18℃培养18~22小时。培养后4℃,8000rpm离心5分钟收集菌体。再使用30mL的TE Buffer将菌体重悬,后4℃,8000rpm离心5分钟,即得到的含有核酸酶Cas9融合表达蛋白SpCas9-GB1-10×His菌体。

[0071] 2.SpCas9蛋白、融合蛋白GB1-SpCas9,SpCas9-GB1的表达量的比较

[0072] 将pet28a-6×His-SpCas9、pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-1T7(即pet28a+-SpCas9-GB1-10×His)、pet28a+-10×His-GB1-SpCas9-1T7(即pet28a+-10×His-GB1-SpCas9)的质粒进行诱导表达。分别取2mL菌液离心得到菌体,使用TE Buffer清洗两遍之后,菌体按照终OD<sub>600</sub>每100D/1mL PBS的比例加入PBS缓冲液进行重悬,后使用超声破碎,取40μL制全菌样,其余液体4℃,10000rpm离心后取上清40μL制上清样,再去除上清后再用PBS重悬沉淀,制沉淀样。进行SDS-PAGE跑胶分析,结果如图6所示。使用Image J进行灰度比较,SpCas9-GB1蛋白的表达量最高,为未融合GB1的SpCas9蛋白的表达量的1.68倍。后续选择SpCas9-GB1进行进一步优化。

[0073] 3.多重启动子对表达量的影响

[0074] 将pet28a+-10×His-GB1-SpCas9-1T7、2T7、3T7、4T7质粒转化E.coli Rosetta (DE3)菌株进行诱导表达,按照前述方法进行制样,SDS-PAGE跑胶分析,结果如图7A所示。在多重启动子的比较中,3、4重T7启动子对目标蛋白的表达量影响相差不大,因此后续选择3重T7启动子进行表达量的提高。

[0075] 将pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-1T7、pet28a+-SpCas9-GB1-10×His-3T7的质粒进行诱导表达,按照前述方法进行制样,SDS-PAGE跑胶分析。结果如图7B所示。3重T7启动子明显的提高了SpCas9-GB1蛋白的表达量,使用Image J进行灰度分析比较,3重T7启动子驱动下的SpCas9-GB1的表达量为1.26倍。



[0076] 实施例3融合蛋白SpCas9-GB1的纯化

[0077] 收集上述诱导表达后的菌体,用PBS缓冲液混匀重悬,超声破碎(条件为:超声开3s,超声关3s,功率为30%,冰上超声20min),4℃下10000rpm离心30min收集上清,经0.22μm滤膜过滤后直接上样,收集穿透液;经Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化,使用Buffer A(500mM NaCl, 20mM Tris-HCl,PH=8.0)作为平衡液,同时使用B相(500mM NaCl,500mM Imidazole,20mM Tris-HCl,PH=8.0)与A相进行梯度混合进行梯度洗脱(梯度为5%、10%、20%、30%、50% Buffer B),洗脱目的蛋白,蛋白大小为165KD,实验结果如图8所示。

[0078] 将Ni<sup>2+</sup>亲和层析柱纯化后的融合蛋白SpCas9溶液通过超滤(500mM NaCl,20mM Tris-HCl,3mM DTT(二硫苏糖醇),PH=8.0)除去咪唑及杂蛋白。浓缩后将Cas9蛋白保存在50%甘油中。

[0079] 实施例4融合蛋白SpCas9-GB1的活性检测

[0080] 根据米曲霉Niad基因(A0090012001035)位点设计sgRNA(Niad-sgRNA),具体序列见SEQ ID NO:23中的第21~40位碱基。设计引物,使用F-7/R-7(SEQ ID NO:20~21),使用任意含有sgRNA骨架片段的质粒为模板进行扩增含sgRNA的骨架(具体序列见SEQ ID NO:23),后进行琼脂糖凝胶电泳及回收片段。结果如图9所示,第1、2泳道为Niad-sgRNA模板(扩增得到的含sgRNA的骨架),第5泳道为DL5000 DNA marker。

[0081] 按照表2使用T7 RNA聚合酶进行体外转录,使用异丙醇进行醇沉抽提,得到纯化后的Niad-sgRNA。

[0082] 表2:RNA体外转录体系

[0083]	模板DNA	1μg
	T7 RNA pol/50%甘油	2μL
	NTP	10μL
	RNAase free water	Up to 30μL

[0084] 按照表3的体系配置SpCas9-GB1体外切割体系。设置模板阴性对照,设置市场上购买的Cas9为阳性对照。将体系置于37℃培养箱,8h后,进行琼脂糖凝胶电泳。结果如图10所示,第1泳道为阳性对照,第2泳道为SpCas9-GB1实验组,第3、4泳道为阴性对照。可看到在阳性对照组和实验组中模板被剪切,说明纯化后的SpCas9-GB1蛋白具有正确蛋白活性,可以进行基因编辑。

[0085] 表3:Cas9蛋白体外切割模板体系

	Cas9 蛋白体外切割模板体系	
	模板 DNA	500 ng
[0086]	Cas9 蛋白	1 μL
	sgRNA	2 μL
	Buffer	2 μL
	RNAase free water	Up to 20 μL

[0087] 实施例5融合蛋白SpCas9-GB1的应用实例

[0088] 根据黑曲霉pyrg基因(An12g03570)位点设计sgRNA(pyrg-sgRNA),具体序列见SEQ

ID NO:24中的第21~40位碱基。设计引物,使用F-8/R-7(SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:21),使用任意含有sgRNA骨架片段的质粒为模板进行扩增含sgRNA的骨架(具体序列见SEQ ID NO:24)。

[0089] 按照表2使用T7 RNA聚合酶进行体外转录,使用异丙醇进行醇沉抽提,得到纯化后的pyrg-sgRNA。

[0090] 体外组装的RNP复合物按照常用PEG的曲霉转化方法转入黑曲霉CBS513.88(常规市售产品)的原生质体中,观察是否有转化子长出。结果如图11所示。阳性板长出菌落、阴性板未长出菌落、转化板有菌落长出。其中,阳性板为未加RNP复合物和筛选物质(5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷),阴性板为未加RNP复合物但加筛选物质(5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷),转化板为加RNP复合物和筛选物质(5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷)。

[0091] 挑取转化子于板上,后接24孔板提基因组进行PCR扩增pyrg基因。经测序鉴定得到在pyrg在sgRNA位置产生了缺失,如图12所示。可看出SpCas9-GB1有入核进行基因编辑的能力。

[0092] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 华南理工大学
- [0003] <120> 一种高效表达及纯化Cas9蛋白的方法和应用
- [0004] <160> 25
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 40
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0010] <220>
- [0011] <223> F-1
- [0012] <400> 1
- [0013] agtgagtcgt attaatttcg ttcggcgtgg gtatggtggc 40
- [0014] <210> 2
- [0015] <211> 47
- [0016] <212> DNA
- [0017] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0018] <220>
- [0019] <223> R-1
- [0020] <400> 2
- [0021] tgtgagcggg taacaattcc ataattttgt ttaactttaa gaaggag 47
- [0022] <210> 3
- [0023] <211> 62
- [0024] <212> DNA
- [0025] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0026] <220>
- [0027] <223> 2T7-F
- [0028] <400> 3
- [0029] taatacgact cactataggt aatacgactc actatagggg aattgtgagc ggataacaat 60
- [0030] tc 62
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 63
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0035] <220>
- [0036] <223> 2T7-R
- [0037] <400> 4
- [0038] cctatagtga gtcgtattac ctatagtgag tcgtattacc tatagtgagt cgtattaatt 60
- [0039] tcg 63
- [0040] <210> 5
- [0041] <211> 81

- [0042] <212> DNA  
[0043] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0044] <220>  
[0045] <223> 3T7-F  
[0046] <400> 5  
[0047] taatacgact cactataggt aatacgactc actataggta atacgactca ctataggga 60  
[0048] attgtgagcg gataacaatt c 81  
[0049] <210> 6  
[0050] <211> 82  
[0051] <212> DNA  
[0052] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0053] <220>  
[0054] <223> 3T7-R  
[0055] <400> 6  
[0056] cctatagtga gtcgtattac ctatagtgag tcgtattacc tatagtgagt cgtattacct 60  
[0057] atagtgagtc gtattaattt cg 82  
[0058] <210> 7  
[0059] <211> 100  
[0060] <212> DNA  
[0061] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0062] <220>  
[0063] <223> 4T7-F  
[0064] <400> 7  
[0065] taatacgact cactataggt aatacgactc actataggta atacgactca ctataggtaa 60  
[0066] tacgactcac tataggggaa ttgtgagcgg ataacaattc 100  
[0067] <210> 8  
[0068] <211> 101  
[0069] <212> DNA  
[0070] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0071] <220>  
[0072] <223> 4T7-R  
[0073] <400> 8  
[0074] cctatagtga gtcgtattac ctatagtgag tcgtattacc tatagtgagt cgtattacct 60  
[0075] atagtgagtc gtattaccta tagtgagtcg tattaatttc g 101  
[0076] <210> 9  
[0077] <211> 25  
[0078] <212> DNA  
[0079] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0080] <220>  
[0081] <223> F-2  
[0082] <400> 9  
[0083] atggataaga aataactcaat aggct 25

- [0084] <210> 10  
[0085] <211> 45  
[0086] <212> DNA  
[0087] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0088] <220>  
[0089] <223> R-2  
[0090] <400> 10  
[0091] cagtgggtggt ggtggtggtg ttacaccttc ctcttcttct tgggg 45  
[0092] <210> 11  
[0093] <211> 45  
[0094] <212> DNA  
[0095] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0096] <220>  
[0097] <223> F-3  
[0098] <400> 11  
[0099] ctttaagaag gagatatacc atggataaga aatactcaat aggct 45  
[0100] <210> 12  
[0101] <211> 42  
[0102] <212> DNA  
[0103] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0104] <220>  
[0105] <223> R-3  
[0106] <400> 12  
[0107] ccactgccac ctgetccacc caccttctc ttcttcttgg gg 42  
[0108] <210> 13  
[0109] <211> 45  
[0110] <212> DNA  
[0111] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0112] <220>  
[0113] <223> F-4  
[0114] <400> 13  
[0115] gtggacagca aatgggtcgc ggaatggata agaaatactc aatag 45  
[0116] <210> 14  
[0117] <211> 65  
[0118] <212> DNA  
[0119] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0120] <220>  
[0121] <223> R-4  
[0122] <400> 14  
[0123] gtgcacggag ctggaattcg tcacaccttc ctcttcttct tggggtcacc tctagctga 60  
[0124] ctcaa 65  
[0125] <210> 15

- [0126] <211> 83  
[0127] <212> DNA  
[0128] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0129] <220>  
[0130] <223> F-5  
[0131] <400> 15  
[0132] aactttaaga aggagatata ccatgggcag cagccatcat catcatcatc accaccacca 60  
[0133] tcatgccgtg ggcggatccg gtg 83  
[0134] <210> 16  
[0135] <211> 39  
[0136] <212> DNA  
[0137] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0138] <220>  
[0139] <223> R-5  
[0140] <400> 16  
[0141] attgagtatt tcttatccat gctgctccg ccaccgaa 39  
[0142] <210> 17  
[0143] <211> 61  
[0144] <212> DNA  
[0145] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0146] <220>  
[0147] <223> F-6  
[0148] <400> 17  
[0149] ggtggagcag gtggcagtgg cgcaggggga gccggatata aattgatcct gaacggcaaa 60  
[0150] a 61  
[0151] <210> 18  
[0152] <211> 97  
[0153] <212> DNA  
[0154] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0155] <220>  
[0156] <223> R-6  
[0157] <400> 18  
[0158] cagtgggtgt ggtgggtgtg gtgatgatga tgagagctc cccaccacc cccggcaccg 60  
[0159] cttgccctc cggcttctgt gacagtgaag gttttgg 97  
[0160] <210> 19  
[0161] <211> 4395  
[0162] <212> DNA  
[0163] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0164] <220>  
[0165] <223> SpCas9-GB1-10×His  
[0166] <400> 19  
[0167] atggataaga aatactcaat aggcttagat atcggcacia atagcgtcgg atgggcggtg 60

[0168]	atcactgatg aatataaggt tccgtctaaa aagttcaagg ttctgggaaa tacagaccgc	120
[0169]	cacagtatca aaaaaaatct tataggggct cttttatttg acagtggaga gacagcggaa	180
[0170]	gcgactcgtc tcaaacggac agctcgtaga aggtatacac gtcggaagaa tcgtatttgt	240
[0171]	tatctacagg agattttttc aaatgagatg gcgaaagtag atgatagttt ctttcatcga	300
[0172]	cttgaagagt cttttttggt ggaagaagac aagaagcatg aacgtcatcc tatttttggg	360
[0173]	aatatagtag atgaagtgc ttatcatgag aaatatccaa ctatctatca tctgcgaaaa	420
[0174]	aaattggtag attctactga taaagcggat ttgcgcttaa tctatttggc cttagcgc	480
[0175]	atgattaaat ttcgtgtgca ttttttgatt gagggagatt taaatcctga taatagtgat	540
[0176]	gtggacaaac tatttatcca gttggtacaa acctacaatc aattatttga agaaaacct	600
[0177]	attaacgcaa gtggagtaga tgctaaagcg attccttctg cacgattgag taaatcaaga	660
[0178]	cgattagaaa atctcattgc tcagctcccc ggtgagaaga aaaatggctt atttgggaat	720
[0179]	ctcattgctt tgtcattggg tttgaccct aattttaaat caaatttga tttggcagaa	780
[0180]	gatgctaaat tacagcttc aaaagatact tacgatgatg atttagataa tttattggcg	840
[0181]	caaattggag atcaatatgc tgatttgtt ttggcagcta agaatttatc agatgctatt	900
[0182]	ttactttcag atatcctaag agtaaatact gaaataacta aggctcccct atcagcttca	960
[0183]	atgattaaac gctacgatga acatcatcaa gacttgactc ttttaaaagc tttagttcga	1020
[0184]	caacaacttc cagaaaagta taaagaaatc ttttttgatc aatcaaaaaa cggatatgca	1080
[0185]	ggttatattg atgggggagc tagccaagaa gaattttata aatttatcaa accaatttta	1140
[0186]	gaaaaaatgg atggtactga ggaattattg gtgaaactaa atcgtgaaga tttgctgcgc	1200
[0187]	aagcaacgga cctttgacaa cggctctatt ccccatcaaa ttcacttggg tgagctgcat	1260
[0188]	gctatttga gaagacaaga agacttttat ccatttttaa aagacaatcg tgagaagatt	1320
[0189]	gaaaaaatct tgacttttcg aattccttat tatgttggtc cattggcgcg tggcaatagt	1380
[0190]	cgttttgcat ggatgactcg gaagctgaa gaaacaatta ccccatggaa ttttgaagaa	1440
[0191]	gttgcgata aaggtgcttc agctcaatca tttattgaac gcatgacaaa ctttgataaa	1500
[0192]	aatcttcaa atgaaaaagt actaccaaaa catagtttgc tttatgagta ttttacggtt	1560
[0193]	tataacgaat tgacaaaggt caaatatgtt actgaaggaa tgcgaaaacc agcatttctt	1620
[0194]	tcaggtgaac agaagaaagc cattgttgat ttactcttca aaacaatcg aaaagtaacc	1680
[0195]	gttaagcaat taaaagaaga ttatttcaaa aaaatagaat gttttgatag tgttgaaatt	1740
[0196]	tcaggagtgg aagatagatt taatgettca ttaggtacct accatgattt gctaaaaatt	1800
[0197]	attaaagata aagatttttt ggataatgaa gaaaatgaag atatcttaga ggatattggt	1860
[0198]	ttaacattga cttatttga agataggag atgattgagg aaagacttaa aacatagct	1920
[0199]	cacctcttg atgataaggt gatgaaacag cttaaacgtc gccgttatac tggttgggga	1980
[0200]	cgtttgctc gaaaattgat taatggtatt agggataagc aatctggcaa aacaatatta	2040
[0201]	gatttttga aatcagatgg ttttgccaat cgcaatttta tgcagctgat ccatgatgat	2100
[0202]	agtttgacat ttaaagaaga cattcaaaaa gcacaagtgt ctggacaagg cgatagtta	2160
[0203]	catgaacata ttgcaattt agctggtagc cctgctatta aaaaaggtat tttacagact	2220
[0204]	gtaaaagtgg ttgatgaatt ggtcaaagta atggggcggc ataagccaga aaatatcgtt	2280
[0205]	attgaaatgg cacgtgaaaa tcagacaact caaaagggcc agaaaaatc gcgagagcgt	2340
[0206]	atgaaacgaa tcgaagaagg tatcaaagaa ttaggaagtc agattcttaa agagcatcct	2400
[0207]	gttgaataa ctcaattgca aaatgaaaag ctctatctct attatctcca aaatggaaga	2460
[0208]	gacatgtatg tggaccaaga attagatatt aatcgtttaa gtgattatga tgtcgatcac	2520
[0209]	attgttccac aaagtttct taaagacgat tcaatagaca ataaggtctt aacgcgttct	2580

[0210]	gataaaaatc gtggtaaadc ggataacggt ccaagtgaag aagtagtcaa aaagatgaaa	2640
[0211]	aactattgga gacaacttct aaacgccaag ttaatcactc aacgtaagtt tgataattta	2700
[0212]	acgaaagctg aacgtggagg tttgagtgaa cttgataaag ctggttttat caaacgcca	2760
[0213]	ttggttgaac ctgcaccaat cactaagcat gtggcacaaa ttttgatag tcgcatgaat	2820
[0214]	actaaatagc atgaaaatga taaacttatt cgagaggta aagtgattac cttaaaatct	2880
[0215]	aaattagttt ctgacttccg aaaagatttc caattctata aagtacgtga gattaacaat	2940
[0216]	taccatcatg cccatgatgc gtatctaaat gccgtcgtt gaactgctt gattaagaaa	3000
[0217]	tatccaaaac ttgaatcgga gtttgtctat ggtgattata aagtttatga tgttcgtaa	3060
[0218]	atgattgcta agtctgagca agaaatagc aaagcaaccg caaaatattt cttttactct	3120
[0219]	aatatcatga acttctcaa aacagaaatt acacttgcaa atggagagat tcgcaaaccg	3180
[0220]	cctctaatcg aaactaatgg ggaaactgga gaaattgtct gggataaagg gcgagatttt	3240
[0221]	gccacagtgc gcaaagtatt gtccatgcc caagtcaata ttgtcaagaa aacagaagta	3300
[0222]	cagacaggcg gattctcaa ggagtcatt ttacaaaaa gaaattcgga caagcttatt	3360
[0223]	gctcgtaaaa aagactggga tccaaaaaaa tatggtggt ttgatagtc aacggtagct	3420
[0224]	tattcagtc tagtggtgc taagtgga aaagggaat cgaagaagt aaaatccgtt	3480
[0225]	aaagagttac taggatcac aattatgga agaagttct ttgaaaaaaa tccgattgac	3540
[0226]	tttttagaag ctaaaggata taaggaagt aaaaaagact taatcattaa actacctaa	3600
[0227]	tatagcttt ttgagtaga aaacggtcgt aaacggatgc tggctagtgc cggagaatta	3660
[0228]	caaaaaggaa atgagctggc tctgccaagc aaatatgta atttttata ttagctagt	3720
[0229]	cattatgaaa agttgaagg tagtccagaa gataacgaa aaaaacaatt gtttgggag	3780
[0230]	cagcataagc attatttaga tgagattatt gagcaaatca gtgaattttc taagcgtgtt	3840
[0231]	attttagcag atgccaatt agataaagt cttagtgcat ataacaaca tagagacaaa	3900
[0232]	ccaatacgtg aacaagcaga aaatattatt catttattta cgttgacgaa tcttgagct	3960
[0233]	cccgtgctt ttaaatatt tgatacaaca attgatcga aacgatatac gtctacaaaa	4020
[0234]	gaagtttag atgccaactc tatccatcaa tccatcactg gtctttatga aacacgcatt	4080
[0235]	gattgagtc agctaggagg tgacccaag aagaagagga aggtgggtgg agcaggtggc	4140
[0236]	agtggcgcag ggggagccg atataaattg atcctgaac gcaaaactt gaaggcgaa	4200
[0237]	acaacaacag aagctgtga cgctgctacc gctgaaaaag tatttaaca gtatgcaaac	4260
[0238]	gacaacgtg ttgatggaga atggacatac gatgacgaa ccaaacctt cactgtcaca	4320
[0239]	gaagccggag gggcaagcgg tgccgggggt ggtgggggag gctctcatca tcatcacc	4380
[0240]	caccaccacc accac	4395
[0241]	<210> 20	
[0242]	<211> 65	
[0243]	<212> DNA	
[0244]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0245]	<220>	
[0246]	<223> F-7	
[0247]	<400> 20	
[0248]	taatacgaact cactataggg gaacgcgtca aaaagctgg gttttagagc tagaaatagc	60
[0249]	aagtt	65
[0250]	<210> 21	
[0251]	<211> 19	



- [0252] <212> DNA  
[0253] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0254] <220>  
[0255] <223> R-7  
[0256] <400> 21  
[0257] gcaccgactc ggtgccact 19  
[0258] <210> 22  
[0259] <211> 65  
[0260] <212> DNA  
[0261] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0262] <220>  
[0263] <223> F-8  
[0264] <400> 22  
[0265] taatacgact cactataggg ggtcagcagt accagacgcc gttttagagc tagaaatagc 60  
[0266] aagtt 65  
[0267] <210> 23  
[0268] <211> 116  
[0269] <212> DNA  
[0270] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0271] <220>  
[0272] <223> 含niad-sgRNA的骨架  
[0273] <400> 23  
[0274] taatacgact cactataggg gaacgcgtca aaaaggctgg gttttagagc tagaaatagc 60  
[0275] aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgc 116  
[0276] <210> 24  
[0277] <211> 116  
[0278] <212> DNA  
[0279] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0280] <220>  
[0281] <223> 含pyrg-sgRNA的骨架  
[0282] <400> 24  
[0283] taatacgact cactataggg ggtcagcagt accagacgcc gttttagagc tagaaatagc 60  
[0284] aagttaaaat aaggctagtc cgttatcaac ttgaaaaagt ggcaccgagt cggtgc 116  
[0285] <210> 25  
[0286] <211> 282  
[0287] <212> DNA  
[0288] <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
[0289] <220>  
[0290] <223> 合成的GB1及linker  
[0291] <400> 25  
[0292] gccgtggcg gatccggtg ttcaggcgtt agttataaat tgatcctgaa cggcaaaact 60  
[0293] ttgaaggcg aaacaacaac agaagctgtt gacgctgeta ccgctgaaaa agtattttaa 120

---

[0294] cagtatgcaa acgacaacgg tgttgatgga gaatggacat acgatgacgc aacccaaacc 180  
[0295] ttcactgtca cagaaggtgg tgggagcggg ggcggtggca gcggtggcgg cggtagtggc 240  
[0296] ggtggcggtt cgggcggcgg tggttcgggt ggcggaggca gc 282

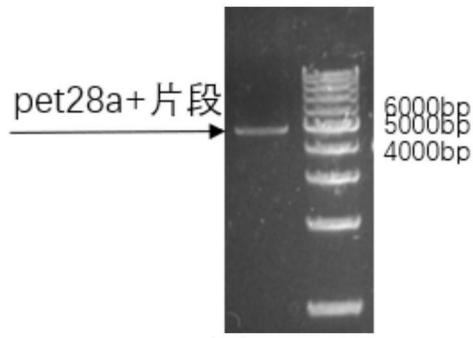


图1

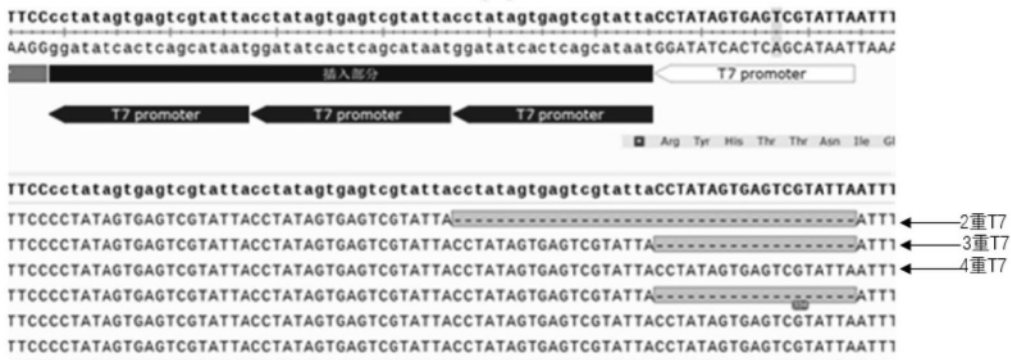


图2

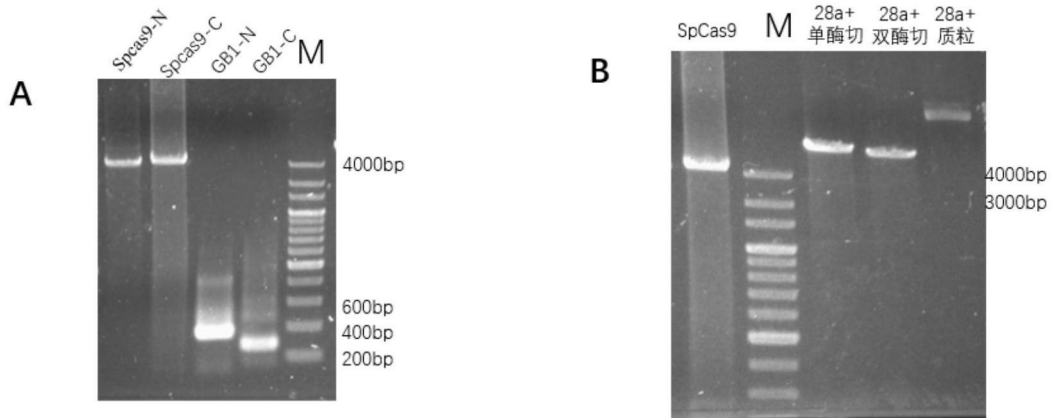


图3

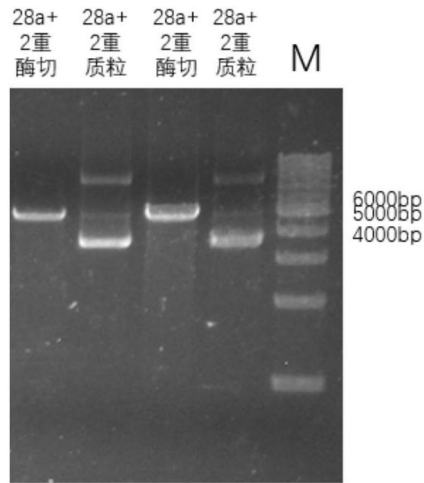


图4

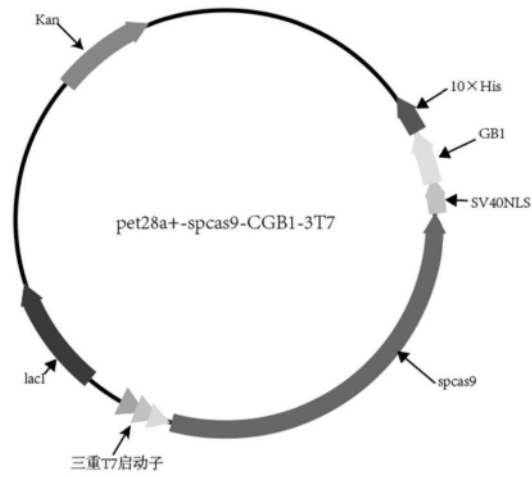


图5

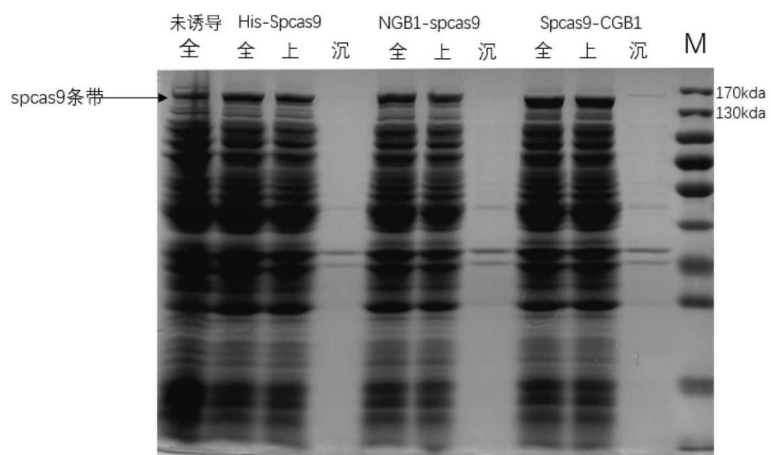


图6

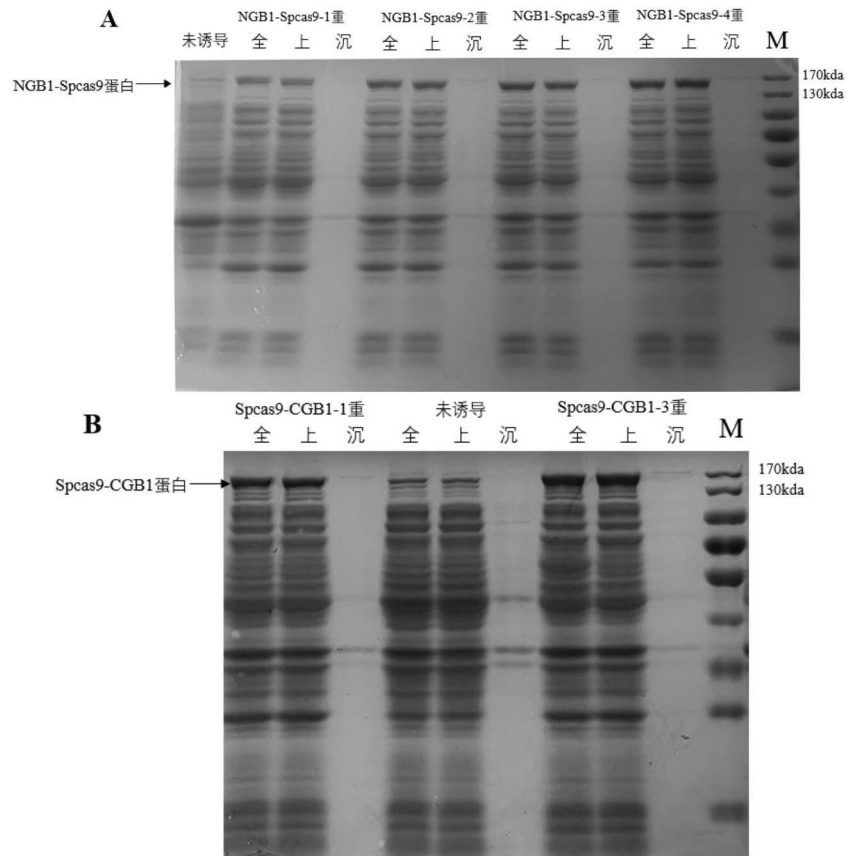


图7

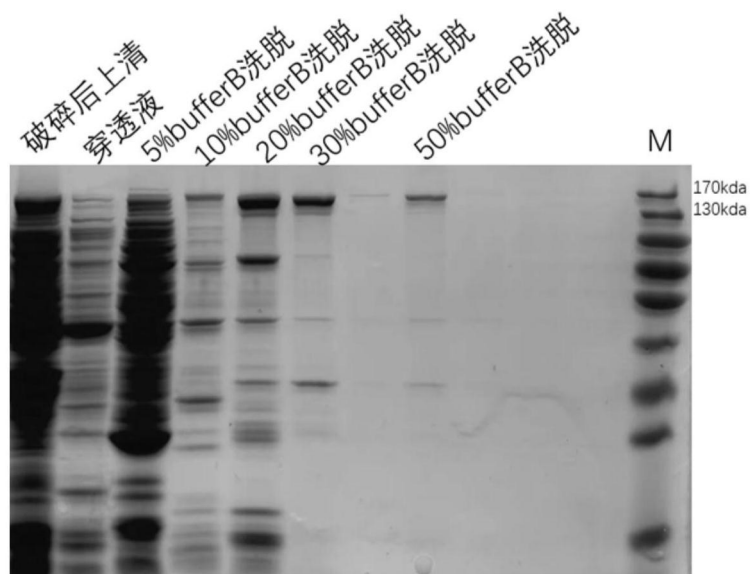


图8

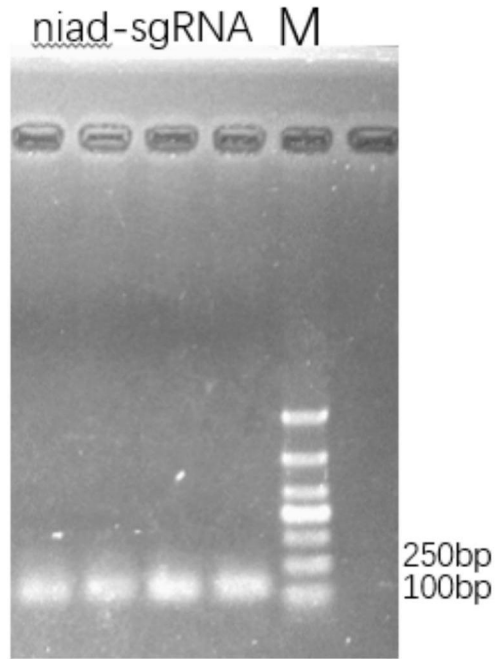


图9

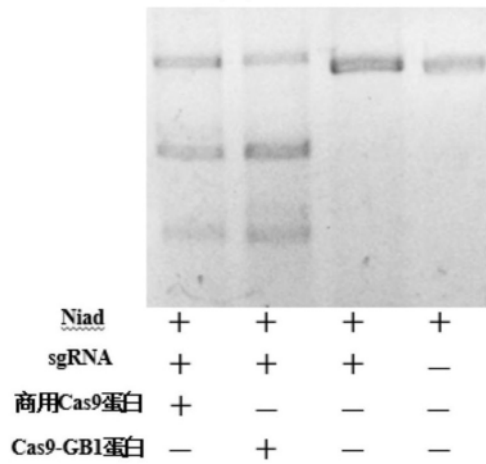


图10

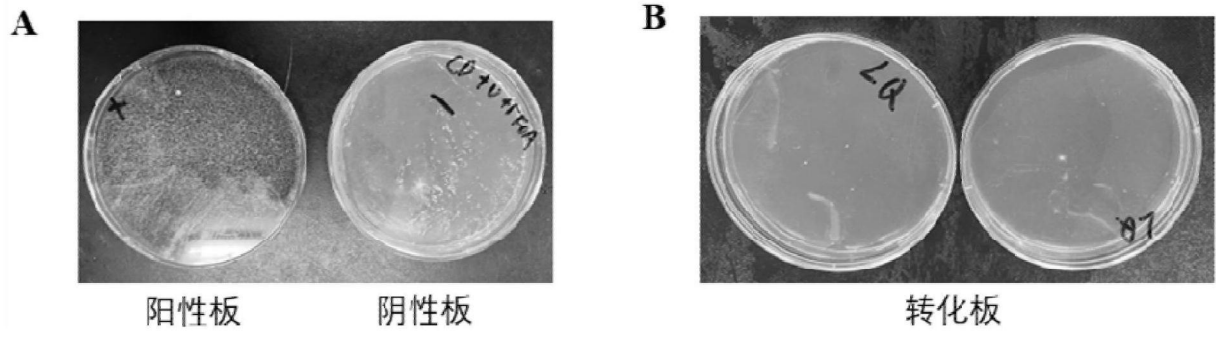


图11

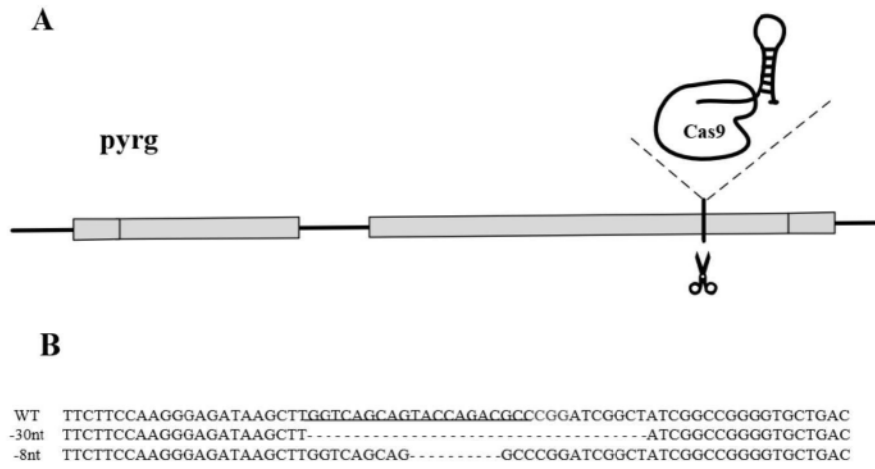


图12